

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

LAIS ALFLEN

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR P2X3 EM TECIDOS CARDIOVASCULARES EM
RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E RATOS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLÍPIDICA**

FLORIANÓPOLIS

2021

Lais Alflen

**EXPRESSÃO DO RECEPTOR P2X3 EM TECIDOS CARDIOVASCULARES EM
RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E RATOS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLÍPIDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Renata Maria Lатарo

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alflen, Lais

Expressão do receptor P2X3 em tecidos cardiovasculares em ratos com insuficiência cardíaca e ratos submetidos à dieta hiperlipídica / Lais Alflen ; orientadora, Renata Maria Lataro, 2021.

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Receptores purinérgicos. 3. Insuficiência cardíaca. 4. Dieta hiperlipídica. I. Maria Lataro, Renata. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Lais Alflen

Expressão do receptor P2X3 em tecidos cardiovasculares em ratos com insuficiência cardíaca e ratos submetidos à dieta hiperlipídica

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciada em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 13 de setembro de 2021.

Prof. Drº Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profª Drª Renata Maria Lataro
Orientadora – UFSC

Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta
Avaliador – UFSC

Profª Drª Regina de Sordi
Avaliadora - UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais Sueli e Alcinei, os quais eu tenho imensa gratidão por todo amor e apoio que recebi ao longo de toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais Sueli e Alcinei por todo o amor e suporte que me deram. Sou imensamente grata por toda a dedicação de vocês para eu pudesse ter a melhor educação possível e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por todo apoio emocional e financeiro. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. E agradeço também ao meu irmão Luan por todo apoio.

Gostaria de agradecer com todo meu coração à professora Renata Lataro que me acolheu em 2018 e desde então me ensinou tanto. Obrigada pela orientação, paciência e por ter contribuído tanto com a minha formação científica. Sou infinitamente grata por tudo que me ensinou.

Agradeço à professora Lígia Subitoni por toda a ajuda nos experimentos de Western Blot. Obrigada pela paciência, carinho e pelos aprendizados.

Agradeço também aos professores que gentilmente emprestaram equipamentos e reagentes de seus laboratórios para que esse estudo pudesse ser realizado: professora Fernanda Barbosa Lima, professor Jamil Assury, professor José Eduardo da Silva Santos, professor Adair dos Santos e professor Alex Rafacho.

Quero agradecer também ao Flaviano Lorenzon e especialmente à Tamires Gregorio por toda ajuda durante meus anos como IC. Obrigada pela companhia durante os dias de blot, pela disposição em me ajudar e por todo carinho e amizade.

Agradeço meus colegas de laboratório: Igor, Nayara, Esthela, Camila, Viviane, Liliane e Marcelo. Obrigada por contribuírem com minha formação durante as reuniões do LAFIC.

Obrigada aos membros da banca avaliadora, professora Regina de Sordi, professor Guilherme Speretta e professora Domitila Huber por aceitarem o convite e contribuir para a minha formação.

Toda minha gratidão e amor às minhas amigas Cibele e Agatha. Ter a amizade de vocês durante a graduação me fez uma pessoa melhor e fez desses cinco anos de curso muito melhores. Obrigada por tanto. Agradeço especialmente à Cibele que compartilhou comigo os momentos bons e as angústias durante esses anos de pesquisa. Obrigada por todo o apoio e amizade.

Agradeço também as minhas amigas de longa data Taynara e Bárbara por todo o suporte que me deram durante todos esses anos de amizade. Obrigada pelos conselhos, risadas e apoio sempre.

Agradeço à Mia, Nina, Pepi e Tadeu por todo amor e calma que me deram ao longo de todos esses anos.

Agradeço à UFSC por possibilitar esse estudo, por ser um ambiente que incentiva o conhecimento e que luta pela ciência.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pelo apoio para a realização desse trabalho.

Agradeço aos animais que possibilitaram que esse estudo acontecesse.

Por fim, agradeço especialmente as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade”.

(Paulo Freire)

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais causas de morte não só no Brasil, bem como em todo o mundo. A disfunção autonômica, os distúrbios respiratórios e o remodelamento cardíaco constituem importantes preditores de morbidade e mortalidade na IC. Um dos fatores de risco para a IC é a ingestão de dieta hiperlipídica, a qual produz alterações cardiovasculares que precedem o desenvolvimento da IC. Foi demonstrado que ratos hipertensos apresentam aumento da expressão de receptores purinérgicos do subtipo P2X3 no corpúsculo carotídeo. A inibição dos receptores P2X3 normalizou a elevada atividade do corpúsculo carotídeo, além de reduzir a pressão arterial e a atividade simpática basal nestes animais. Dados recentes de nosso laboratório mostraram que a inibição crônica e sistêmica do receptor P2X3 foi capaz de reduzir a hiperatividade reflexa do corpúsculo carotídeo e prevenir a progressão da IC em ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Portanto, em conjunto, estes dados indicam que os receptores P2X3 podem ser um novo alvo terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares. No entanto, ainda não há relatos na literatura sobre a expressão e função de receptores P2X3 no coração ou vasos sanguíneos durante o desenvolvimento de IC. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos receptores P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta em ratos controles, ratos com IC e ratos submetidos à dieta hiperlipídica, uma vez que a dieta hiperlipídica produz alterações cardiovasculares que precedem o desenvolvimento da IC em humanos. A determinação da expressão de receptores P2X3 nestes tecidos em animais com disfunção do sistema cardiovascular (IC e submetidos à dieta hiperlipídica) poderá identificar novos mecanismos que justifiquem os benefícios da inibição destes receptores no tratamento de doenças cardiovasculares. A IC foi induzida pelo infarto do miocárdio através da ligadura cirúrgica do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda. Animais sham foram submetidos à cirurgia fictícia. A dieta hiperlipídica foi composta por ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1. Animais controles receberam dieta padrão. Assim, este estudo foi composto por 4 grupos experimentais: animais sham, IC, animais controles e submetidos à dieta hiperlipídica. Nos animais submetidos ao infarto do miocárdio, observou-se aumento do índice cardíaco e pulmonar, menor contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo, o que caracteriza o desenvolvimento de IC. Já os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram peso corporal maior em comparação aos ratos controles. A expressão do receptor P2X3 foi analisada por *Western Blotting*. Foi detectada a expressão do receptor P2X3 no coração, aorta,

artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta nos quatro grupos estudados. No entanto, o desenvolvimento de insuficiência cardíaca ou a dieta hiperlipídica não alterou a expressão dos receptores P2X3 nestes tecidos, indicando que nos tecidos estudados, a alteração da expressão dos receptores P2X3 não exerce um papel crucial nos mecanismos fisiopatológicos da IC e no modelo de dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Receptor purinérgico, Insuficiência cardíaca, Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is one of the leading causes of death that occur not just in Brazil but also worldwide. Autonomic dysfunction, respiratory disorders, and cardiac remodeling are important factors of morbidity and mortality in HF. One of the risk factors for HF is the intake of a high-fat diet, which produces cardiovascular changes that precede the development of HF. Previous studies have demonstrated that hypertensive rats have increased P2X3 subtype purinergic receptor expression in the carotid body. The inhibition of P2X3 receptors normalized the carotid body elevated activity and reduced blood pressure and the basal sympathetic activity of hypertensive rats. Recent data from our laboratory show that chronic and systemic P2X3 receptors inhibition was able to reduce the carotid body hyperactivity and prevent the progress of HF in rats. Thus, together, these data indicate that P2X3 receptors can be a new therapeutic target for treating cardiovascular diseases. However, there are still no reports in the literature concerning the expression of the P2X3 receptor in the heart or blood vessels during the development of cardiovascular diseases. Therefore, the purpose of this study was to determine the expression of the P2X3 receptor in the heart, aorta, mesenteric artery, and perivascular tissue of the aorta of HF rats, sham rats, control rats, and rats submitted to a high-fat diet (HFD), once the HFD produces cardiovascular changes that precede the development of HF in humans. In addition, the determination of P2X3 receptors expression in the heart, aorta, and resistance vessels of animals with cardiovascular dysfunction (HF rats and HFD rats) may identify new mechanisms that can justify the benefits of P2X3 inhibition in the treatment of cardiovascular diseases. HF was induced by myocardial infarction through surgical ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery. Sham animals underwent sham surgery. HFD was composed of standard rat chow plus peanuts, milk chocolate, and sweet biscuits in a proportion of 3:2:2:1. Control animals received a standard diet. Thus, this study was composed of 4 experimental groups: sham animals, IC, control animals, and HFD. In rats submitted to myocardial infarction, there was an increase in the cardiac and pulmonary index, reduced contractility, and relaxation of the left ventricle, which characterizes the development of HF. In HFD, rats had increased body weight compared to control rats. P2X3 receptor expression was analyzed by *Western Blotting*. P2X3 receptor was detected in the heart, aorta, mesenteric artery and perivascular tissue of the aorta in the four groups studied. However, HF or HFD did not change the expression of P2X3 receptors in these tissues, indicating that in the tissues studied, P2X3 receptors do not play a crucial role in the pathophysiological mechanisms of HF and HFD model.

Keywords: Purinergic receptor, Heart failure, High-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo do protocolo experimental do grupo IC e grupo Sham.....	24
Figura 2: Linha do tempo do protocolo experimental do grupo submetido à dieta hiperlipídica e grupo controle	25
Figura 3: Peso cardíaco, índice de peso cardíaco, peso pulmonar, índice de peso pulmonar, +dP/dt e -dP/dt de ratos sham e ratos com IC	29
Figura 4: Expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular de ratos com IC e ratos Sham.....	30
Figura 5: Peso cardíaco, índice cardíaco e peso corporal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle	31
Figura 6: Expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+dP/dt	Valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda
-dP/dt	Valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda
βT	β -Tubulina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CTL	Controle
DH	Dieta hiperlipídica
IC	Insuficiência Cardíaca
NTS	Núcleo do trato solitário
P2X3	Receptores purinérgicos do subtipo P2X3
PA	Pressão arterial
PVAT	Tecido adiposo perivascular
SH	Sham
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SRA	Sistema renina-angiotensina
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1.1. A Insuficiência Cardíaca	17
1.1.1. Dieta hiperlipídica e doenças cardiovasculares	18
1.1.2. Receptores P2X3	19
1.1.3. Hiperatividade simpática e Receptores P2X3	20
1.2. HIPÓTESE.....	22
1.3. JUSTIFICATIVA.....	22
1.4. OBJETIVOS	23
1.4.1. Objetivo Geral	23
1.4.2. Objetivos específicos	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. ANIMAIS.....	23
2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	24
2.2.1. Desenho Experimental	24
2.2.2. Indução da insuficiência cardíaca	25
2.2.3. Análise da função cardíaca	26
2.2.4. Dieta hiperlipídica	26
2.2.5. Coleta dos tecidos	26
2.2.6. Expressão de receptores no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta	27
2.2.7. Análise estatística	28
3. RESULTADOS.....	28
4. DISCUSSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. A Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é um problema de saúde pública grave, sendo uma das principais causas mundiais de morte (BRAUNWALD 2015). Estima-se a existência de mais de 38 milhões de indivíduos com este diagnóstico em todo o mundo (BRAUNWALD 2015, BENJAMIN *et al.*, 2017). No Brasil, a incidência da IC é de 199 casos por 100.000 pessoas por ano (CIAPPONI *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos, é estimado que a IC acometa em torno de 6 milhões de americanos acima de 20 anos de idade (VIRANI *et al.*, 2021). Sua prevalência está em ascensão devido ao aumento da expectativa de vida, uma vez que a IC acomete, de forma preponderante, faixas etárias mais elevadas (BENJAMIN *et al.*, 2017). Desta forma, a IC tem sido, de certa maneira, considerada como uma epidemia, associada a significativa mortalidade, morbidade, e a elevados investimentos em saúde pública, particularmente entre aqueles indivíduos com idade ≥ 65 anos (BRAUNWALD 2015, BENJAMIN *et al.*, 2017).

A IC é uma síndrome heterogênea, na qual uma anormalidade na função cardíaca é responsável pela inabilidade do coração em prover fluxo sanguíneo adequado para atender às necessidades metabólicas dos tecidos (MUDD & KASS 2008, MANN 2012). A IC ocorre em algumas doenças cardiovasculares, dentre as quais se inclui o infarto do miocárdio, e consiste, predominantemente, de disfunção do ventrículo esquerdo (VE), redução da contratilidade do miocárdio e do débito cardíaco, aumento do volume diastólico final do VE e redução da reserva cardíaca funcional (MANN 2012). A IC envolve complexa interação de vários mecanismos neuro-humorais, com ajustes circulatórios periféricos e cardíacos, para que os parâmetros hemodinâmicos sejam mantidos em níveis normais. Dentre esses mecanismos neuro-hormonais, a hiperatividade simpática, a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) e várias citocinas exercem papel fundamental na fisiopatologia da IC (MUDD & KASS 2008, MANN 2012). Em decorrência destes fatores, a disfunção autonômica, os distúrbios respiratórios e o remodelamento cardíaco constituem importantes preditores de morbidade e mortalidade na IC (HANLY e ZUBERI-KHOKHAR 1996, COHN *et al.*, 2000, LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013, NIEWINSKI 2017).

A IC pode ser induzida pelo infarto do miocárdio (PFEFFER *et al.*, 1979, MUDERS e ELSNER 2000). No rato, o infarto do miocárdio promovido pela ligadura cirúrgica do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda resulta em perda considerável de tecido ventricular localizada, preferencialmente, na parede anterolateral do ventrículo esquerdo. Quando a perda de tecido contrátil não pode ser compensada pelo miocárdio residual, o ventrículo esquerdo começa a apresentar sinais de insuficiência (PFEFFER *et al.*, 1979). Ratos com infarto >40% da circunferência do VE apresentam alterações funcionais e anatômicas (remodelamento) do coração; além de alterações hemodinâmicas, autonômicas e humorais, típicas da IC, entre 2-6 semanas após o infarto do miocárdio (MUDERS e ELSNER 2000). A disfunção do ventrículo esquerdo pode ser caracterizada por redução do débito cardíaco e fração de ejeção, aumento do volume diastólico final, redução da complacência ventricular, e, em alguns casos, menor pressão arterial (PA) (PFEFFER *et al.*, 1979).

1.1.1. Dieta hiperlipídica e doenças cardiovasculares

A obesidade possui efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, incluindo o aumento da pressão arterial, o qual é um fator de risco para a IC. Além disso, a obesidade possui efeitos adversos na função e estrutura do coração, e tem sido consistentemente associada à hipertrofia e dilatação do VE, os quais são conhecidos precursores da IC (MESSERLI *et al.*, 1983, HAMMOND *et al.*, 1988, LAUER *et al.*, 1991, ALPERT *et al.*, 1995).

A ingestão de dieta hiperlipídica está relacionada com o aumento da gordura corporal, e o acúmulo excessivo de gordura, particularmente no tecido adiposo visceral. Também está associada à inflamação crônica em diferentes tecidos, incluindo o cérebro, causando alterações metabólicas que favorecem o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares, devido ao comprometimento da sensibilidade do barorreflexo, aumento da atividade do SRA, pressão arterial elevada e consequente redução da função cardíaca (ESLER *et al.*, 2006, FARDIN *et al.*, 2012).

Um tipo de tecido adiposo, chamado tecido adiposo perivascular (PVAT) é um tecido que circunda a maioria dos vasos sanguíneos, com exceção da vasculatura do cérebro (GAO *et al.*, 2007). Estruturalmente, o PVAT é composto por adipócitos, fibroblastos, macrófagos e raros linfócitos T (GRIGORAS *et al.*, 2019). A disfunção do PVAT está associada a danos vasculares em doenças cardiometabólicas, incluindo aterosclerose, hipertensão, diabetes e obesidade (GUZIK *et al.*, 2006; IGNACAK *et al.*, 2012, FONTES *et al.*, 2020). O PVAT

libera substâncias vasoativas que são capazes de modificar o tônus vascular (LÖHN *et al.*, 2002, GAO *et al.*, 2007, GREENSTEIN *et al.*, 2009). Além disso, componentes do SRA são expressos no PVAT das artérias mesentéricas e aorta de ratos saudáveis (GÁLVEZ-PRIETO *et al.*, 2008). A disfunção vascular observada na IC está associada à ativação do SRA e a hiperativação do SRA no PVAT é fundamental para a disfunção vascular observada em ratos com IC (FONTES *et al.*, 2020).

1.1.2. Receptores P2X3

A sinalização purinérgica foi proposta em 1972 e o ATP (Adenosina 5'-trifosfato) foi identificado como um cotransmissor excitatório em nervos simpáticos e parassimpáticos (BURNSTOCK 1972, BURNSTOCK 1978, RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). Mais tarde, o ATP foi identificado como um cotransmissor em nervos do sistema nervoso periférico (SNP) e no sistema nervoso central (SNC) (BURNSTOCK, 2007).

O ATP ativa dois tipos de receptores: receptores acoplados à proteína G (receptores P2Y) e canais iônicos controlados por ligante (receptores P2X) (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). A família dos receptores P2X é composta por sete subunidades (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7) (NORTH e SURPRENANT, 2000).

O receptor purinérgico do subtipo P2X3 (P2X3) é um canal catiônico, permeável a cálcio, sódio e potássio (VIRGINIO *et al.*, 1998). Esse receptor foi clonado e identificado em 1995 (CHEN *et al.*, 1995) e tem recebido especial atenção devido à sua localização e alto nível de expressão em neurônios aferentes sensoriais (BRADBURY *et al.*, 1998; BURNSTOCK, 2006; CHEN *et al.*, 1995). Os receptores P2X3 foram localizados predominantemente em pequenos neurônios sensoriais nociceptivos juntamente com receptores heteroméricos P2X2/3, sugerindo seu envolvimento na sinalização nociceptiva (BRADBURY *et al.*, 1998; BURNSTOCK 2016). Além disso, o ATP é um neurotransmissor que atua em células receptoras das papilas gustativas, onde transduz os sinais gustativos para os nervos gustativos aferentes via receptores P2X3 (BO *et al.*, 1999). Já no corpúsculo carotídeo, o ATP é um transmissor liberado por células quimiorreceptoras, que ativa os receptores P2X3 em terminações das fibras aferentes do nervo sinusal (RONG *et al.*, 2003).

O envolvimento da sinalização purinérgica na fisiopatologia de doenças cardiovasculares e seu potencial terapêutico tem sido discutidos em patologias como a insuficiência cardíaca, infarto, arritmias, síncope, cardiomiopatia, angina, transplante

cardíaco, doença arterial coronariana, cardiomiopatia diabética, hipertensão, isquemia, trombose, diabetes mellitus e enxaqueca (BURNSTOCK 2017).

1.1.3. Hiperatividade simpática e Receptores P2X3

O sistema nervoso autônomo modula o sistema cardiovascular por meio das divisões simpática e parassimpática (SHEPHERD & VANHOUTTE 1979). A ação simpática, por meio da noradrenalina, promove cronotropismo e inotropismo positivos, acelera o relaxamento cardíaco, diminui a capacitância venosa, e induz a constrição dos vasos de resistência (OPIE & HANSENFUSS 2012). Todos estes efeitos têm como objetivo aumentar o desempenho cardíaco. Já a ação parassimpática sobre o sistema cardiovascular se expressa, fundamentalmente, por meio de seu mediador químico acetilcolina, o qual promove uma resposta cronotrópica negativa, e, também, embora menos expressiva, uma resposta inotrópica negativa (SCHWARTZ & DE FERRARI 2011).

O aumento da atividade simpática na IC é evidenciado pelo aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) e elevada atividade de núcleos centrais responsáveis pela geração da atividade simpática (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013). A relação positiva entre a gravidade da IC e a concentração de noradrenalina plasmática é bem estabelecida (COHN *et al.*, 1984, LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013). É consenso que o grau de hiperatividade simpática determina o mau prognóstico de pacientes com IC, uma vez que o mesmo está relacionado à ocorrência de arritmias e alto grau de mortalidade (COHN *et al.*, 1984, LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013).

Logo após o infarto do miocárdio, a ativação simpática pode restaurar a função cardíaca (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013). No entanto, como o insulto cardíaco persiste ao longo do tempo, a ativação simpática não é capaz de manter a função cardíaca, e o coração evolui para um estado de IC descompensada, no qual a hiperatividade simpática continua a induzir o coração a trabalhar em um nível muito mais elevado do que o músculo cardíaco pode suportar, levando à piora progressiva da função cardíaca (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013). Deste ponto em diante, a hiperatividade simpática torna-se um fator negativo na IC, conferindo efeitos deletérios sobre miócitos e outras células do coração insuficiente, aumentando a morbidade e a mortalidade (LYMPEROPOULOS *et al.*, 2013).

A simpato-excitação na IC está associada à redução da sensibilidade dos reflexos simpato-inibitórios, como o barorreflexo arterial e o reflexo cardiopulmonar (TOSCHI-DIAS *et al.*, 2017), mas, também, a um aumento da atividade dos quimiorreceptores periféricos

(PONIKOWSKI *et al.*, 2001, DEL RIO *et al.*, 201a, TOLEDO *et al.*, 2017). Os quimiorreceptores periféricos monitoram os níveis de oxigênio no sangue arterial de forma contínua, e promovem alterações cardiorrespiratórias para garantir o fornecimento adequado de oxigênio (LAHIRI *et al.*, 2006). Estas células sensíveis ao oxigênio estão localizadas, principalmente, nos corpúsculos carotídeos, e liberam neurotransmissores em resposta à hipóxia, ativando nervos aferentes que transmitem esta informação para os neurônios da região comissural do núcleo do trato solitário (NTS), situado no tronco cerebral (MACHADO 2001, COLOMBARI *et al.*, 2001). No NTS, estes impulsos são processados e transmitidos para outras regiões do cérebro envolvidas no controle autonômico, as quais aumentam a atividade respiratória, simpática, e, também, parassimpática (MACHADO 2001).

Em indivíduos hígidos, os impulsos aferentes originados no corpúsculo carotídeo são mínimos ao nível do mar, mas em várias doenças, como na IC, ele gera altos níveis de descarga aferente, a qual contribui para a atividade simpática excessiva (LAHIRI *et al.*, 2006). Notavelmente, a ablação dos corpúsculos carotídeos reduziu a ativação de neurônios pré-simpáticos no bulbo ventrolateral rostral, recuperou o equilíbrio autonômico, com redução significativa da atividade simpática, diminuiu as arritmias cardíacas, normalizou a sensibilidade do barorreflexo, além de estabilizar a função respiratória de ratos com IC induzida pelo infarto do miocárdio (DEL RIO *et al.*, 2013a). A destruição dos corpúsculos carotídeos também reduziu, significativamente, o remodelamento cardíaco e melhorou a fração de ejeção em ratos com IC (Del Rio *et al.*, 2013a).

Dados publicados no renomado periódico *Nature Medicine*, mostram que, na hipertensão arterial, a excessiva sinalização gerada pelos quimiorreceptores localizados nos corpúsculos carotídeos está ligada aos receptores purinérgicos do subtipo P2X3 (PIJACKA *et al.*, 2016). Estes autores demonstraram que a expressão do receptor P2X3 está aumentada no corpúsculo carotídeo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e, também, em neurônios sensoriais, ligados à resposta quimiorreflexa, no gânglio petroso de SHR. Os resultados mostraram que esses neurônios, localizados no gânglio petroso, geram atividade tanto tônica quanto hiperreflexa em SHR, mas não em ratos normotensos; e que ambos os fenômenos foram normalizados pelo bloqueio dos receptores P2X3 (PIJACKA *et al.*, 2016). A inibição sistêmica dos receptores P2X3 reduziu a PA e a atividade simpática basal, além de ter normalizado a elevada atividade reflexa do corpúsculo carotídeo observada em SHR (PIJACKA *et al.*, 2016). Além disso, dados recentes de nosso laboratório mostraram um aumento da expressão dos receptores P2X3 no gânglio petroso de ratos com IC e que a inibição crônica e sistêmica dos receptores P2X3 foi capaz de reduzir a atividade excessiva do

corpúsculo carotídeo e prevenir a progressão da IC em ratos com IC (LATARO *et al.*, 2018). Portanto, em conjunto, estes dados indicam que os receptores P2X3 localizados no corpúsculo carotídeo e gânglio petroso podem ser um novo alvo terapêutico para o tratamento da hipertensão e IC. No entanto, ainda é desconhecido se receptores P2X3 localizados em outros tecidos do sistema cardiovascular podem contribuir para os efeitos benéficos induzidos pela inibição sistêmica destes receptores em doenças cardiovasculares. Além disso, ainda não há relatos na literatura sobre a relação do receptor P2X3 e a obesidade, a qual é um fator de risco para a IC. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar, tanto em ratos submetidos à dieta hiperlipídica, quanto em ratos com IC, a expressão do receptor P2X3 em outros tecidos que compõem o sistema cardiovascular; sendo estes: o coração, aorta, o tecido perivascular da aorta e a artéria mesentérica.

1.2. HIPÓTESE

A hipótese desse estudo foi de que há aumento de receptores P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e no tecido perivascular da aorta de animais com disfunção do sistema cardiovascular (animais com IC e animais submetidos à dieta hiperlipídica).

1.3. JUSTIFICATIVA

Como ainda não há relatos na literatura sobre a expressão de receptores P2X3 no coração ou vasos sanguíneos durante o desenvolvimento de IC, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos receptores P2X3 no coração ou vasos sanguíneos de ratos com IC e ratos submetidos à dieta hiperlipídica, uma vez que a dieta hiperlipídica produz alterações cardiovasculares que precedem o desenvolvimento da IC em humanos. A avaliação da expressão de receptores P2X3 nestes tecidos na IC estabelecida (IC induzida pelo infarto do miocárdio) e, também, em um modelo que apresenta fatores de risco para a IC (dieta hiperlipídica), poderá contribuir para a determinação de novos mecanismos que justifiquem os benefícios da inibição destes receptores no tratamento da IC.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão de receptores P2X3 em tecidos-alvo do sistema cardiovascular em ratos com IC e ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

1.4.2. Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o modelo de IC e dieta hiperlipídica em ratos;
- 2) Avaliar a expressão de receptores P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta de ratos controles, ratos com IC e ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo nº 2351090518 na reunião do dia 13/07/2018.

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (300 a 320g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (três animais por caixa) com livre acesso a ração e água. Os animais permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas.

A cirurgia do infarto do miocárdio para induzir a IC foi realizada em 10 ratos, dos quais 8 sobreviveram à cirurgia. A cirurgia fictícia para o infarto do miocárdio foi realizada em 5 ratos, denominados sham. A análise da função cardíaca foi realizada nos 8 ratos com IC, dos quais 2 não sobreviveram e também nos 5 ratos sham, dos quais 1 rato não sobreviveu. Os animais que não sobreviveram ao experimento não foram incluídos nos resultados.

O tratamento da dieta hiperlipídica foi realizado em 6 ratos. Foram utilizados 6 ratos como grupo controle, os quais receberam dieta padrão.

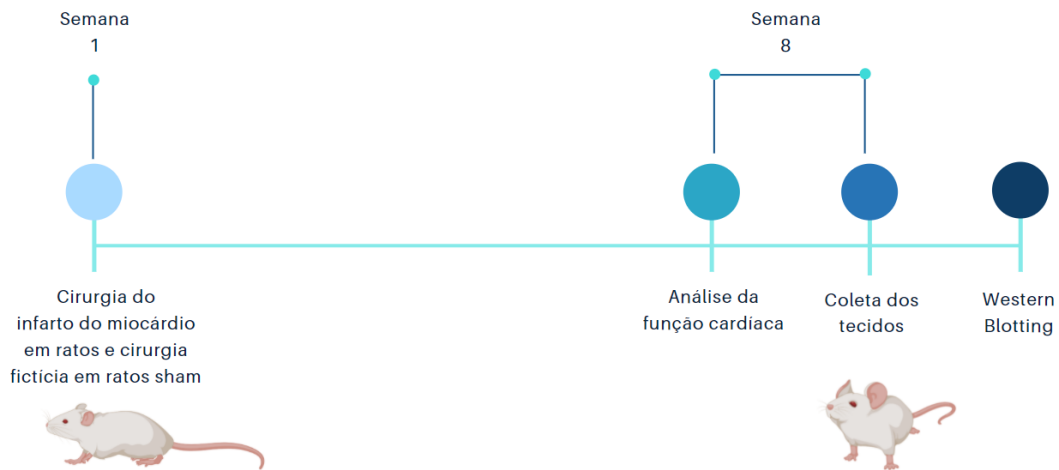
Para a análise da expressão do receptor P2X3 por *Western Blotting*, o número total de animais foi reduzido, pois algumas bandas referentes ao receptor não puderam ser quantificadas.

2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

2.2.1. Desenho Experimental

O desenho experimental do grupo controle e grupo com IC está ilustrado na Figura 1. Os ratos foram submetidos à ligadura da artéria coronária esquerda para indução da IC e ratos sham foram submetidos à cirurgia fictícia, a qual é semelhante à cirurgia do infarto do miocárdio, porém com a exceção da ligadura da artéria coronária. Após oito semanas da cirurgia do infarto do miocárdio foi realizada a análise da função cardíaca e coleta de tecidos para a avaliação da expressão do receptor P2X3 com a técnica de *Western Blotting*.

Figura 1: Linha do tempo do protocolo experimental do grupo IC e grupo Sham



Legenda: Os ratos foram submetidos a cirurgia do infarto do miocárdio e ratos sham foram submetidos à cirurgia fictícia. Após oito semanas foi realizada a análise da função cardíaca e coleta de tecidos para posterior avaliação da expressão do receptor P2X3 por *Western Blotting*. Imagem da autora.

O desenho experimental do grupo controle e grupo submetido à dieta hiperlipídica está ilustrado na Figura 2. Os ratos foram submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle

receberam dieta padrão. Após sete semanas de tratamento com dieta hiperlipídica foi realizada a coleta de tecidos para a avaliação da expressão do receptor P2X3 com a técnica de *Western Blotting*.

Figura 2: Linha do tempo do protocolo experimental do grupo submetido à dieta hiperlipídica e grupo controle



Legenda: Ratos foram submetido à dieta hiperlipídica e ratos controle receberam dieta padrão. Após sete semanas foi realizada a coleta de tecidos para posterior avaliação da expressão do receptor P2X3 por *Western Blotting*. Imagem da autora.

2.2.2. Indução da insuficiência cardíaca

A IC foi induzida pelo infarto do miocárdio como descrito por Lataro e cols (2013). Para realização do infarto do miocárdio os animais foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg, i.p., União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, BR), Xilazina (10 mg/kg, i.p., Hertape Calier Saúde animal S/A, Juatuba, MG, BR) e tramadol (2 mg/Kg, i.p., Laboratório Teuto Brasileiro S.A, Anápolis, GO, BR), e submetidos à intubação orotraqueal para ventilação mecânica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). O coração foi exposto por uma incisão no terceiro espaço intercostal, e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado, e ligado com um fio de poliéster (4.0, Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Ratos sham foram submetidos à cirurgia fictícia para o infarto do miocárdio, ou seja, passaram por procedimentos semelhantes aos descritos acima, com exceção da ligadura da artéria coronária. Os animais foram estudados após 8 semanas da oclusão da artéria coronária esquerda, como descrito por Xu e cols (2012).

2.2.3. Análise da função cardíaca

Após oito semanas da cirurgia do infarto do miocárdio e da cirurgia fictícia em ratos sham, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (90/10 mg/kg, i.p.) e tramadol (2 mg/Kg, i.p.) e uma cânula de polietileno (PE-50, Intramedic, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) foi introduzida na carótida direita até atingir o interior do ventrículo esquerdo, onde foi fixada. A cânula ventricular foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0380; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) e os valores batimento a batimento da pressão ventricular sistólica e diastólica foram detectados por um amplificador (AVS Projetos, São Carlos, Brazil) e um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) conectado à um computador. A primeira derivada da pressão ventricular esquerda (dP/dt) foi calculada e os seus valores máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco foram identificados. O valor máximo da dP/dt ($+dP/dt$) representa um índice de contratilidade do ventrículo esquerdo, enquanto que o valor mínimo ($-dP/dt$) representa um índice de relaxamento deste ventrículo.

2.2.4. Dieta hiperlipídica

A dieta hiperlipídica foi composta por ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1, como descrito anteriormente (ESTADELLA *et al.*, 2004, SPERETTA *et al.*, 2012). Essa dieta continha 20g de proteína, 20g de gordura total, 48g de carboidrato e 4g de fibra por cada 100g de dieta. (ESTADELLA *et al.*, 2004, SPERETTA *et al.*, 2012). Todos os componentes da dieta hiperlipídica foram moídos, misturados e oferecidos aos animais em forma de pellets. Os animais controles foram alimentados com dieta padrão. Os animais receberam dieta padrão (grupo controle) ou dieta hiperlipídica por sete semanas, como descrito por Speretta e cols (2016) e foram pesados semanalmente.

2.2.5. Coleta dos tecidos

Em ratos com IC e ratos sham a coleta dos tecidos foi realizada logo após a análise da função cardíaca. Nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle a coleta dos tecidos foi realizada sete semanas após o tratamento com a dieta hiperlipídica. Foram coletados para estudo o coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta. Os

corações foram removidos, banhados em solução salina (NaCl 0,9%) gelada e pesados para o cálculo do índice de peso cardíaco (fórmula abaixo). O pulmão direito foi, também, removido e pesado para o cálculo do índice de peso pulmonar (fórmula abaixo). A aorta torácica, o tecido perivascular da aorta e a artéria mesentérica superior também foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C para a realização dos experimentos com a técnica de *Western Blotting*.

Após a pesagem, o coração foi seccionado por corte transversal, equidistante entre o ápice e a base. A porção apical do coração foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C para os estudos de *Western Blotting*.

$$\text{Índice de Peso Cardíaco} = \frac{\text{Peso Cardíaco (mg)}}{\text{Peso Corporal (g)}}$$

$$\text{Índice de Peso Pulmonar} = \frac{\text{Peso Pulmonar (mg)}}{\text{Peso Corporal (g)}}$$

2.2.6. Expressão de receptores no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta

A expressão dos receptores P2X3 no coração, na aorta, na artéria mesentérica e no tecido perivascular da aorta foi avaliada por *Western Blotting*. Foi utilizado 25 µg de cada amostra. Para a extração de proteínas cada amostra foi pulverizada e incubada a 4°C em um tampão de extração com inibidores de protease (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), T-PER (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Ortovanadato e PMFS. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um tubo e o conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. As proteínas foram separadas por eletroforese, em gel de separação de acrilamida/bisacrilamida, e, então, transferidas para membrana de nitrocelulose. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas com Ponceau. Em seguida, as membranas foram lavadas em H₂O deionizada, e submetidas ao bloqueio com tampão TBS-T contendo 10% de leite mólico por 2 horas. Após esse procedimento, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-receptor P2X3 (APR026AN0202, Alomone; Israel, 1:400). Após

cinco lavagens de 10 minutos cada com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (170-6515, Bio-Rad Laboratories, Califórnia EUA, 1:10.000) por 30 minutos. A β -tubulina (β T) (sc-80005, Santa Cruz Biotechnology, Texas EUA, 1:400) foi utilizada como controle endógeno. As proteínas foram detectadas por quimioluminescência utilizando-se o kit ECL (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido). As imagens das bandas foram capturadas utilizando-se câmera CCD e aparelho ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). A quantificação da intensidade das bandas foi feita por densitometria (ImageJ, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, disponível na internet no site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Os valores de densitometria encontrados nas bandas de interesse foram normalizados pelos valores encontrados na marcação para o controle endógeno (β T).

2.2.7. Análise estatística

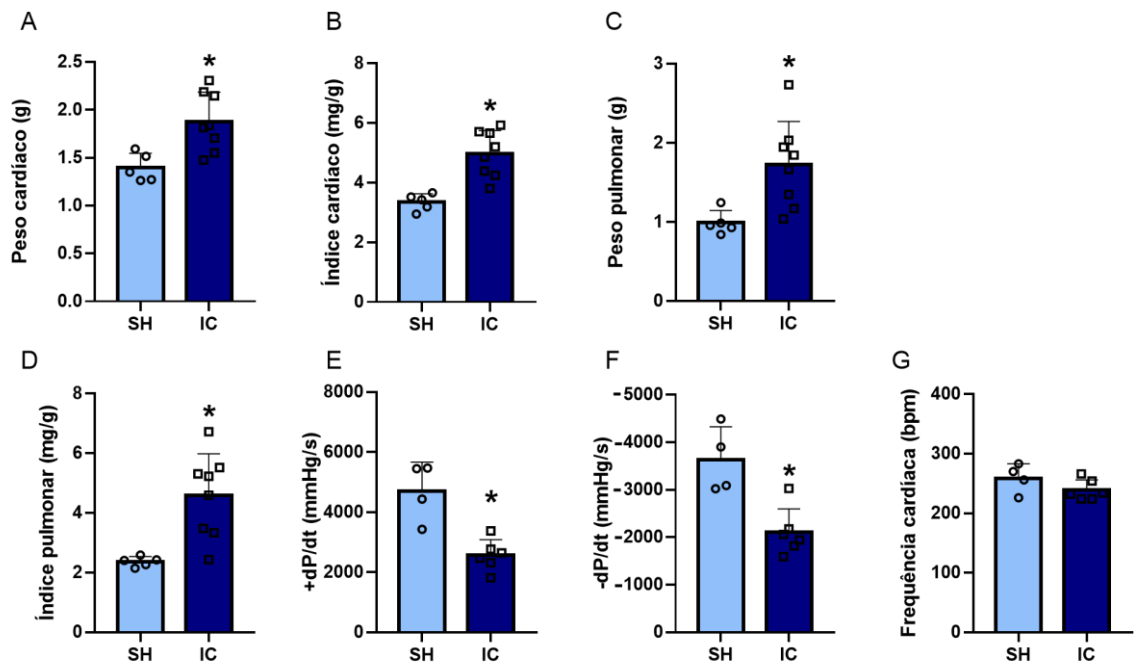
Todos os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). Anova de duas vias para medidas repetidas (Two-way ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls, foi usada para a comparação do peso entre ratos controles e ratos submetidos à dieta hiperlipídica. As demais variáveis foram avaliadas pelo Teste T de Student não pareado (T-Test). Todas as análises estatísticas e gráficos foram construídos com o software *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

O peso cardíaco, índice de peso cardíaco, peso pulmonar, índice de peso pulmonar, $+dP/dt$ e $-dP/dt$ dos ratos sham e ratos com IC são apresentados na Figura 3. Ratos com IC apresentaram aumento do peso cardíaco (T-Test, $p = 0.001$) (Figura 3 A) e aumento do índice de peso cardíaco (T-Test, $p = 0.003$) (Figura 3 B) quando comparados aos ratos sham. Também foi observado maior peso pulmonar (T-Test, $p = 0.0154$) (Figura 3 C) e índice de peso pulmonar (T-Test, $p = 0.005$) (Figura 3 D) em ratos com IC em comparação aos ratos sham. Ratos com IC apresentaram valores de $+dP/dt$ (T-Test, $p = 0.001$) (Figura 3 E) e $-dP/dt$ (T-Test, $p = 0.003$) (Figura 3 F) menores que os ratos sham. No entanto, não houve diferença

significativa na frequência cardíaca entre ratos com IC e ratos sham (T-Test, $p= 0,1688$) (Figura 3 G).

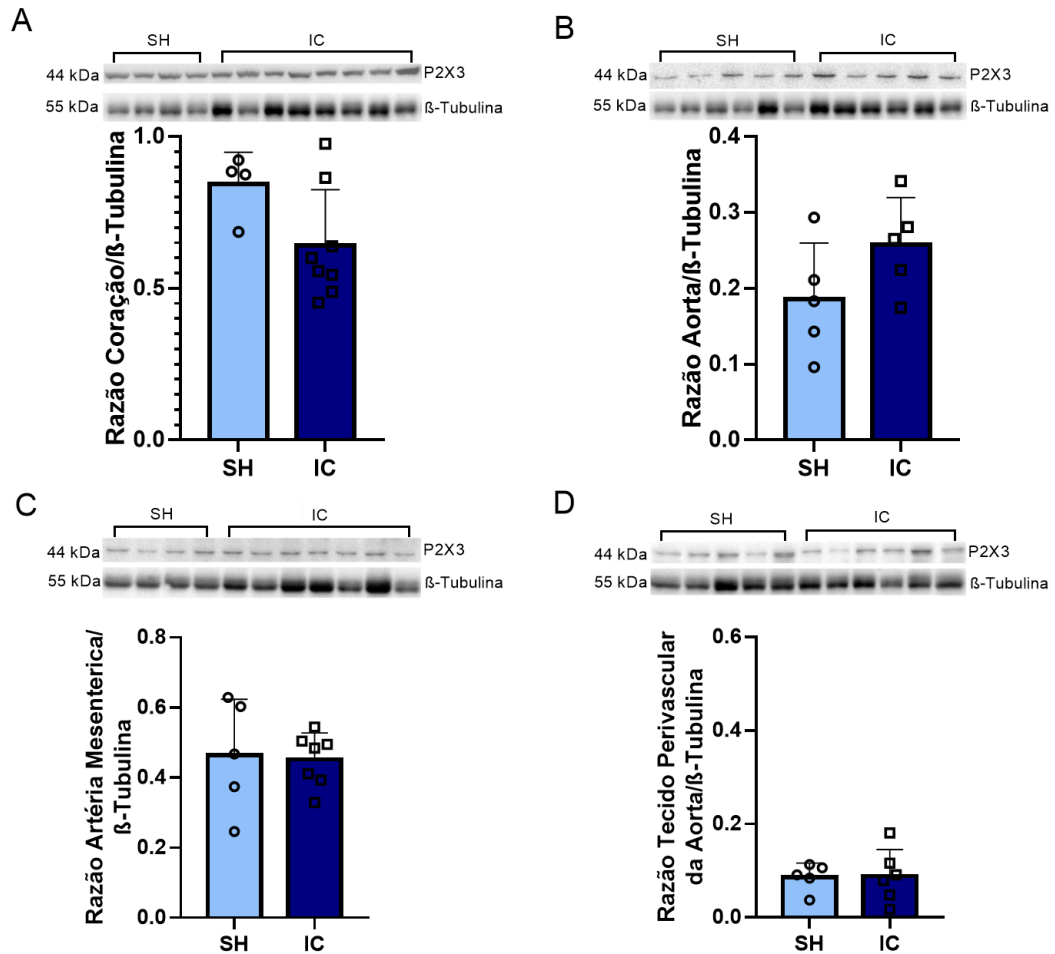
Figura 3: Peso cardíaco, índice de peso cardíaco, peso pulmonar, índice de peso pulmonar, +dP/dt e -dP/dt de ratos sham e ratos com IC



Legenda: +dP/dt: valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda; -dP/dt: valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda. Ratos com insuficiência cardíaca (IC) demonstraram índices cardíacos e pulmonares aumentados e redução da contratilidade do ventrículo esquerdo em comparação aos ratos sham (SH). Os valores são apresentados como médias ± EPM. T-test. IC (n=6-8); SH (n=4-5). * $P < 0,05$ em comparação aos ratos sham.

A expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta de ratos com IC e ratos sham está apresentada na Figura 4. Em cada um dos tecidos estudados, sendo esses o coração (Figura 4 A), aorta (Figura 4 B), artéria mesentérica (Figura 4 C) e tecido perivascular da aorta (Figura 4 D), foi detectada a expressão do receptor P2X3. No entanto, nenhuma diferença na expressão deste receptor entre ratos com IC e ratos sham foi observada.

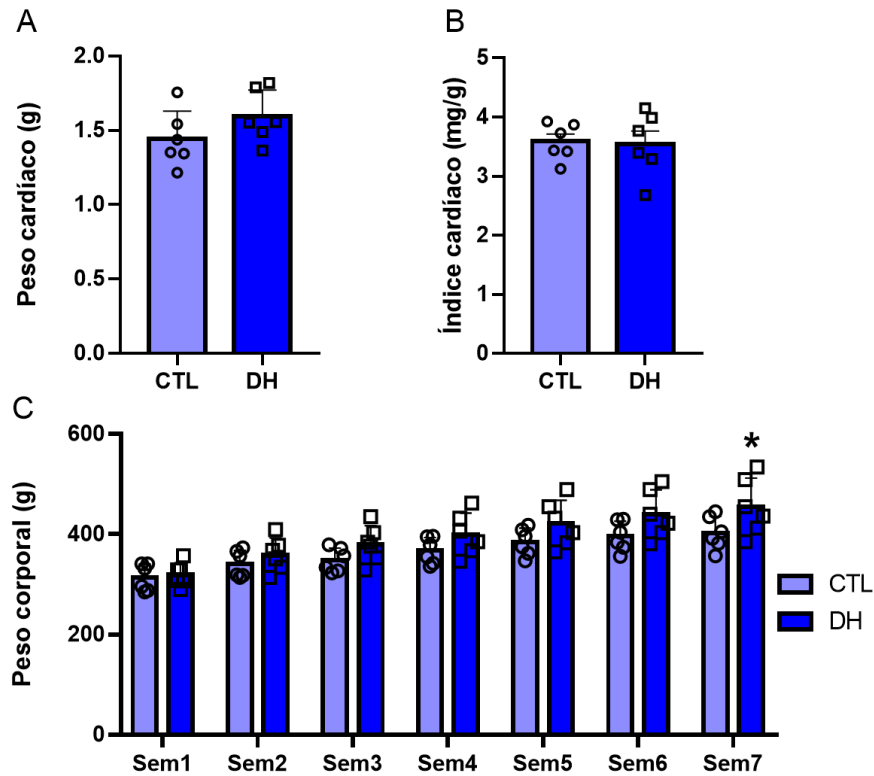
Figura 4: Expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular de ratos com IC e ratos Sham



Legenda: O receptor estava presente em cada um dos tecidos estudados (coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta) de ratos com insuficiência cardíaca (IC) e ratos sham (SH). No entanto, nenhuma diferença entre os grupos foi observada. Os valores são expressos como média \pm EPM. T-Teste. IC (n = 5-8); SH (n = 4-5).

O peso cardíaco, índice de peso cardíaco e peso corporal dos ratos controle e ratos submetidos à dieta hiperlipídica são apresentados na Figura 5. O peso cardíaco (T-test $p=0,1756$) (Figura 5 A), assim como o índice cardíaco (T-test, $p=0,8732$) (Figura 5 B), foram semelhantes nos ratos controles e ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram peso corporal maior (Two-way ANOVA, $p=0,0001$) do que os ratos controles (Figura 5 C).

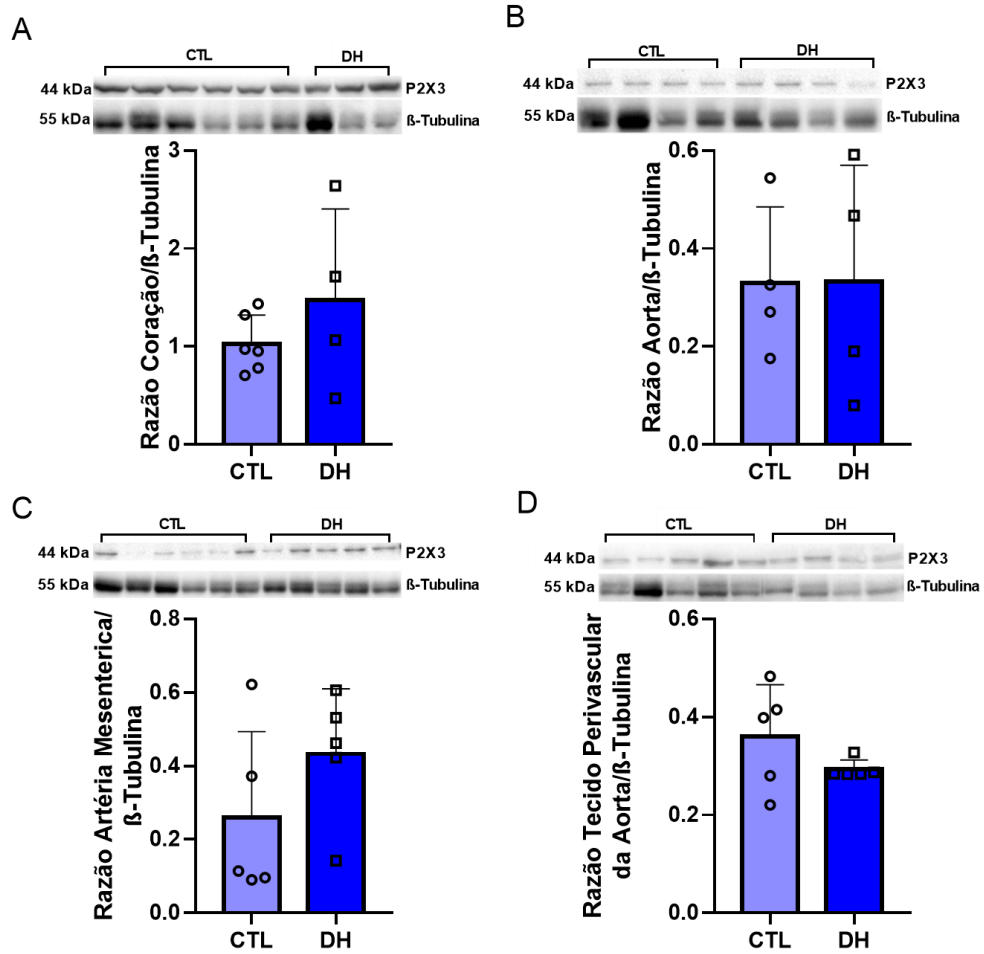
Figura 5: Peso cardíaco, índice cardíaco e peso corporal de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle



Legenda: Ratos submetidos à dieta hiperlipídica (DH) apresentaram maior peso corporal em comparação ao grupo controle (CTL). Os valores são expressos como média \pm EPM. Two-way ANOVA; T-Teste. DH (n = 6); CTL (n = 6). * P < 0,05 em comparação aos ratos controle.

A expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta de ratos controle e ratos submetidos à dieta hiperlipídica está apresentada na Figura 6. Em cada um dos tecidos estudados, sendo esses o coração (Figura 6 A), aorta (Figura 6 B), artéria mesentérica (Figura 6 C) e tecido perivascular da aorta (Figura 6 D), foi detectada a expressão do receptor P2X3. No entanto, nenhuma diferença na expressão destes receptores foi observada entre ratos controle e ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 6: Expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ratos controle



Legenda: O receptor estava presente em cada um dos tecidos estudados (coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica (DH) e ratos controle (CTL). No entanto, nenhuma diferença entre os grupos foi observada. Os valores são expressos como média \pm EPM. T-Teste. DH (n=4-5); CTL (n=4-6).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou pela primeira vez a expressão do receptor P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta em ratos com IC e ratos submetidos à dieta hiperlipídica. No entanto, em comparação a seus respectivos controles, o desenvolvimento da IC ou a administração de dieta hiperlipídica não alterou a expressão destes receptores nos tecidos estudados.

O aumento do peso e índice cardíaco em ratos com IC indicam uma consequência notável do infarto do miocárdio, que é o remodelamento do miocárdio sobrevivente ao infarto, o qual inclui hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos (ANVERSA *et al.*, 1985). Este remodelamento afeta a função cardíaca e, conseqüentemente, a progressão da IC (PFEFFER e BRAUNWALD 1990, VAN DEL BORNE *et al.*, 2010). Ratos com IC também apresentaram aumento do peso e índice pulmonar em comparação aos ratos sham, indicando acúmulo de líquido no pulmão, o que é consistente com a progressão da IC (FRANCIS *et al.*, 2001).

Os ratos com IC apresentaram redução nos valores de $+dP/dt$ e $-dP/dt$ quando comparados aos ratos sham, indicando, assim, um déficit significativo da função do VE. O valor máximo da dP/dt representa um índice de contratilidade do VE, enquanto que o valor mínimo representa um índice de relaxamento deste ventrículo. A redução da contratilidade e relaxamento do VE ocorre devido à perda do tecido contrátil em decorrência do infarto do miocárdio e o remodelamento cardíaco subsequente (FRANCIS *et al.*, 2001, MANN e BRISTOW 2005, VAN DEN BORNE *et al.*, 2010).

Não houve diferença entre a frequência cardíaca de ratos sham e ratos com IC. De uma maneira geral, neste modelo, observa-se taquicardia, que é atribuída ao aumento da atividade simpática cardíaca e redução do tono vagal (FRANCIS *et al.*, 2001, SCHWARTZ e DE FERRARI 2011, LATARO *et al.*, 2013). Neste estudo, o registro da frequência cardíaca foi realizado em animais anestesiados, o que altera o controle autonômico do sistema cardiovascular (AKINE *et al.*, 2001). Assim, em conjunto, esses dados mostram que foi possível reproduzir o modelo de IC induzida pelo infarto do miocárdio.

No modelo de ratos submetidos à dieta hiperlipídica, foi observado que o peso cardíaco, assim como o índice cardíaco, foram semelhantes nos ratos controles e ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Resultados similares foram obtidos por outro estudo, no qual o peso cardíaco foi semelhante nos ratos controles e ratos submetidos à dieta hiperlipídica (GONCALVES *et al.*, 2017). Ratos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram peso corporal maior do que os ratos controles. Dados semelhantes também foram observados neste modelo de dieta hiperlipídica por outros pesquisadores (SPERETTA *et al.*, 2016), o que indica que houve reprodução do modelo experimental estudado.

O receptor P2X3 é uma subunidade da família dos receptores P2X, os quais são canais iônicos ativados por ATP extracelular (NORTH e SURPRENANT, 2000). Sete subunidades (P2X1-7) dessa família de receptores foram identificadas (NORTH e SURPRENANT, 2000). A sinalização purinérgica é transduzida de maneira específica para células e receptores, dependendo das concentrações locais de ATP (NORTH 2016). Os receptores P2X3 são

sensores de ATP, que se comportam como moduladores de respostas neuronais em uma variedade de contextos fisiológicos diferentes (NORTH 2016). No entanto, ainda não está bem elucidado como sua expressão e função são moduladas por mecanismos moleculares ativados durante um processo patológico crônico (NORTH 2016).

Os mediadores inflamatórios influenciam a expressão neuronal de nociceptores e canais iônicos, incluindo receptores de ATP, o que contribui para a atividade espontânea das fibras sensoriais, levando a um círculo vicioso de hiper-responsividade patológica (ELLIS e BENNETT, 2013). Em cultura de gânglios sensoriais, o desenvolvimento de um perfil neuroinflamatório induz a liberação de mediadores endógenos, incluindo citocinas e ATP, para reforçar a ativação de células inflamatórias e potencializar a ativação dos receptores P2X3, o que amplifica a sinalização nociceptiva (FABBRETTI, 2013). Assim, estímulos inflamatórios podem modular a função do receptor P2X3 em associação com o aumento de atividade de células do sistema imune (FABBRETTI, 2013, FRANCESCHINI *et al.*, 2013).

A expressão do receptor P2X3 e receptor P2X2 foi relatada anteriormente no átrio e ventrículos, bem como em neurônios nos gânglios petrosos e nodosos (SONG *et al.*, 2012). A literatura mostra que o ATP é um mediador liberado localmente durante o infarto agudo do miocárdio (XU *et al.*, 2005). Especula-se que o receptor P2X3 é o principal subtipo envolvido na nocicepção mediada por ATP no coração. Evidências mostram que entre os subtipos dos receptores P2X, a intensidade de imunorreatividade dos receptores P2X3 no gânglio nodoso, o qual é um gânglio sensorial do SNP, é a mais forte (XIANG *et al.*, 1998). Assim, foi demonstrado que a isquemia do miocárdio ativa um subgrupo de neurônios aferentes simpáticos cardíacos que transmitem informações nociceptivas ao sistema nervoso central para desencadear a nocicepção cardíaca (PAL *et al.*, 1989; PAN e LONGHURST, 1995; PAN *et al.*, 1999; TJEN-ALOOI *et al.*, 1998). Especula-se que a isquemia miocárdica estimule a liberação de ATP potencialmente responsável pela ativação de neurônios aferentes cardíacos nociceptores (WANG *et al.*, 2008). A ativação destas aferências cardíacas, por sua vez, ativaria reflexamente os neurônios eferentes cardíacos simpáticos. A ativação reflexa de neurônios eferentes cardíacos aumentou o dano cardíaco, avaliado pelo aumento dos níveis de lactato desidrogenase, creatina quinase e a isoforma MB da creatina quinase (CK-MB), os quais são biomarcadores de dano cardíaco (WANG *et al.*, 2008). Foi relatado, também, que houve um aumento da expressão de mRNA e proteína do P2X3 no coração e aumento da expressão da imunorreatividade e mRNA do P2X3 em gânglios nodosos, devido à liberação de ATP, após lesão isquêmica aguda do miocárdio em ratos (WANG *et al.*, 2008). Além disso, o antagonismo do receptor P2X3 reduziu a expressão do mRNA e da proteína do P2X3

no coração, em ratos com lesão isquêmica aguda do miocárdio, corroborando com a hipótese de que o receptor P2X3 está envolvido na transmissão nociceptiva após o infarto do miocárdio, e que o antagonismo do receptor P2X3 nesta situação poderia proteger a função cardíaca (WANG *et al.*, 2008). No presente estudo não observou-se alteração da expressão do P2X3 no coração de ratos com IC. Assim, especulamos que, embora os receptores P2X3 possam estar envolvidos na transmissão da nocicepção cardíaca mediada por ATP, na IC crônica a nocicepção cardíaca é reduzida após o remodelamento cardíaco, o qual é consistente com a progressão da IC.

A expressão do receptor P2X3 e receptor P2X2 também foi previamente descrita em terminais das fibras nervosas do seio carotídeo, arco aórtico e veia cava (SONG *et al.*, 2012). No presente estudo, avaliamos a expressão do receptor P2X3 na aorta torácica, a qual é um vaso característico de condutância, e na artéria mesentérica superior, a qual é um vaso de resistência (MULVANY e KORSGAARD, 1983). A literatura mostra que a elevada resistência vascular encontrada em pacientes e ratos com IC atua como um mecanismo compensatório, contribuindo para manter a pressão arterial, enquanto que a longo prazo, contribui para agravar os sintomas desta patologia (LEDOUX *et al.*, 2003, SCHRIER e ABRAHAM, 1999). Além disso, a IC induzida pelo infarto do miocárdio promove alterações na função endotelial, bem como na reatividade miogênica, e estes fatores estão associados a mudanças no tônus vascular (COUTO *et al.*, 2015, GSCHWEND *et al.*, 2003). Na obesidade também é observada a disfunção endotelial causada pelo estado inflamatório crônico, que induz desregulação das ações endócrinas e parácrinas dos fatores derivados dos adipócitos, os quais interrompem a homeostase vascular e contribuem para a disfunção endotelial (CAMPIA *et al.*, 2012). Porém, ainda não há relatos na literatura que mostrem a expressão e funcionalidade do receptor P2X3 na aorta e artéria mesentérica. No presente estudo foi demonstrado que o receptor P2X3 é expresso tanto na aorta quanto na artéria mesentérica, porém, não há alteração da expressão desse receptor nesses tecidos em animais com IC ou animais submetidos à dieta hiperlipídica. A literatura mostra que tanto na obesidade, quanto na IC, há aumento de citocinas circulantes (BRAUNWALD 2015, ORTEGA-LOUBON *et al.*, 2019). O receptor P2X3 foi identificado por RT-PCR em macrófagos alveolares de camundongos, porém, apenas os receptores P2X4 e P2X7 são funcionais nessa célula e participam da resposta imune do pulmão (KESSLER *et al.*, 2011). No presente estudo foi detectada, pela primeira vez, a expressão do receptor P2X3 no tecido perivascular da aorta, composto por adipócitos e células do sistema imune (GRIGORAS *et al.*, 2019), no entanto, a IC e a dieta hiperlipídica não alteraram a expressão deste receptor neste tecido.

Ainda assim, a inibição dos receptores P2X3 se mostra como potencial alvo terapêutico, exercendo um papel crucial no controle da sensibilidade dos quimiorreceptores do corpúsculo carotídeo, como já relatado anteriormente, em um estudo que mostra que a inibição dos receptores P2X3 em SHR normalizou a hiperreflexia do corpúsculo carotídeo e levou à redução da pressão arterial e da atividade simpática basal nestes animais (PIJACKA *et al.*, 2016). Além disso, um estudo recente de nosso laboratório demonstrou pela primeira vez, em ratos com IC crônica, o aumento da expressão de receptores P2X3 localizados no gânglio petroso, o que contribui para a hiperreflexia do corpúsculo carotídeo, e consequente aumento da atividade simpática (LATARO *et al.*, 2018). Neste estudo, o antagonismo farmacológico dos receptores P2X3 no corpúsculo carotídeo normalizou a quimiossensibilidade periférica e reduziu a atividade simpática, atenuando a progressão da IC (LATARO *et al.*, 2018).

Desse modo, no presente estudo foi demonstrado que não houve aumento da expressão dos receptores P2X3 no coração, aorta, artéria mesentérica e tecido perivascular da aorta de ratos com IC ou tratados com dieta hiperlipídica e, portanto, conclui-se que a alteração da expressão destes receptores P2X3 localizados nesses tecidos não exerce um papel crucial nos mecanismos fisiopatológicos da IC ou no modelo de dieta hiperlipídica, o qual é um fator de risco para IC. Estes dados indicam que os efeitos benéficos observados previamente com administração sistêmica de antagonistas de receptores P2X3 em SHR e ratos com IC estão diretamente ligados à inibição dos receptores P2X3 envolvidos na via de sinalização do quimiorreflexo, localizados no corpúsculo carotídeo e gânglio petroso, como previamente demonstrado (PIJACKA *et al.*, 2016, LATARO *et al.*, 2018).

5. CONCLUSÃO

Nos animais submetidos ao infarto do miocárdio, observou-se aumento do índice cardíaco e pulmonar, menor contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo, o que caracteriza o desenvolvimento de IC. Já os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram peso corporal maior em comparação aos ratos controles. Assim, conclui-se que foi possível reproduzir e caracterizar os dois modelos experimentais propostos pelo estudo.

A expressão do receptor de P2X3 foi detectada nos tecidos estudados, sendo esses o coração, aorta, artéria mesentérica e no tecido perivascular da aorta, mas não houve diferença na expressão desse receptor entre os grupos experimentais propostos por esse estudo, sugerindo que nesses tecidos a alteração da expressão dos receptores P2X3 não exerce um papel crucial nos mecanismos fisiopatológicos da IC e no modelo de dieta hiperlipídica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINE, A, SUZUKA H, HAVASHIDA Y, KATO Y. Effects of ketamine and propofol on autonomic cardiovascular function in chronically instrumented rats. **Auton Neurosci.** 87(2-3):201-8, 2001.
- ALPERT MA, LAMBERT CR, TERRY BE, et al. Influence of left ventricular mass on left ventricular diastolic filling in normotensive morbid obesity. **Am Heart J** 130:1068-1073, 1995.
- ALPERT MA, LAVIE CJ, AGRAWAL H, AGGARWAL KB, KUMAR SA. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Transl Res** 164(4):345-56, 2014.
- ANDRIÉ RP, BECHER UM, FROMMOLD R, TIYERILI V, SCHRICKEL JW, NICKENIG G, SCHWAB JO. Interleukin-6 is the strongest predictor of 30-day mortality in patients with cardiogenic shock due to myocardial infarction. **Crit Care** 16: R152, 2012.
- ANVERSA P, BEGHI C, KIKKAWA Y, OLIVETTI G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. **Circ Res** 58: 26-37, 1986.
- BARTLETT JR D, TENNEY SM. Control of breathing in experimental anemia. **Respir Physiol** 10: 384–395, 1970.
- BENJAMIN EJ, BLAHA MJ, CHIUVE SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation** 135(10):e146-e603, 2017.
- BLANCO-RIVERO J, COUTO GK, PAULA SM, FONTES MT, ROSSONI LV. Enhanced sympathetic neurotransduction in the superior mesenteric artery in a rat model of heart failure: role of noradrenaline and ATP. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 320(2):H563-H574, 2021.
- BO X, ALAVI A, XIANG Z, OGLESBY I, FORD A, BURNSTOCK G. Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. **Neuroreport.** 10(5):1107-1111, 1999.
- BOHM M, MAACK C. Treatment of heart failure with β -blockers. Mechanisms and results. **Basic Res Cardiol** 95 (Suppl I): I15-I24, 2000.

BOUSTANY CM, BROWN DR, RANDALL DC, CASSIS LA. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 289(1):R181-R186, 2005.

BRADBURY EJ, BURNSTOCK G, MCMAHON SB. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. **Mol Cell Neurosci** 12:256–68, 1998.

BRAUNWALD E. The war against heart failure: the Lancet lecture. **Lancet** 385(9970):812-24, 2015.

BROURI F, HANOUN N, MEDIANI O, SAURINI F, HAMON M, VANHOUTTE PM, LECHAT P. Blockade of beta 1- and desensitization of beta 2-adrenoceptors reduce isoprenaline-induced cardiac fibrosis. **Eur J Pharmacol** 485:227–234, 2004.

BROWN MD, DAVIES MK, HUDLICKÁ O. Angiogenesis in ischemic and hypertrophic hearts induced by long-term bradycardia. **Angiogenesis** 8: 253-262, 2005.

BURNSTOCK G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev.** 24(3):509-581, 1972.

BURNSTOCK G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L, eds. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: **Raven Press**. 107–118, 1978.

BURNSTOCK G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. **Pharmacol Therapeut.** 110:433–54, 2006.

BURNSTOCK G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev.** 87(2):659-797, 2007.

BURNSTOCK G. Purinergic Mechanisms and Pain. **Adv Pharmacol.** 75:91-137, 2016.

BURNSTOCK G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. **Circ Res.** 120(1):207-228, 2017.

BURNSTOCK G. Introduction to Purinergic Signaling. **Methods Mol Biol.** 2041:1-15, 2020.

CAMPBIA U, TESAURO M, CARDILLO C. Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. **Br J Pharmacol.** 165(3):561-573, 2012.

CARMELIET P, JAIN RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature** 473: 298-307, 2011.

CHEN CC, AKOPIAN AN, SIVILOTTI L, COLQUHOUN D, BURNSTOCK G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**. 377(6548):428-431, 1995.

CIAPPONI A, ALCARAZ A, CALDERÓN M, et al. Burden of Heart Failure in Latin America: A Systematic Review and Meta-analysis. **Rev Esp Cardiol (Engl Ed)**. 69(11):1051-1060, 2016.

COHN JN, FERRARI R, SHARPE N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. **J Am Coll Cardiol** 35: 569-82, 2000.

COHN JN, LEVINE TB, OLIVARI MT, GARBERG V, LURA D, FRANCIS GS, SIMON AB, RECTOR T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **N Engl J Med** 311: 819-823, 1984.

COLOMBARI E, SATO MA, CRAVO SL, BERGAMASCHI CT, CAMPOS RR JR, LOPES OU. Role of the medulla oblongata in hypertension. **Hypertension**. 38(3 Pt 2):549-554, 2001.

COMMUNAL C, SINGH K, PIMENTEL DR, COLUCCI WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. **Circulation** 98:1329–1334,1998.

COUTO GK, BRITTO LR, MILL JG, ROSSONI LV. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**. 86:110-120, 2015.

DEL RIO R, MARCUS NJ, SCHULTZ HD. Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. **J Am Coll Cardiol** 62(25):2422-30, 2013a.

DEL RIO R, MARCUS NJ, SCHULTZ HD. Inhibition of hydrogen sulfide restores normal breathing stability and improves autonomic control during experimental heart failure. **J Appl Physiol** 114: 1141–1150, 2013b.

- DINARELLO CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gate- keeper of inflammation. **Eur J Immunol** 41: 1203–1217, 2011.
- ELLIS, A., BENNETT, D.L. Neuro inflammation and the generation of neuropathic pain. **J.Anaesth.** 111, 26–37, 2013.
- ENGIN A. Endothelial Dysfunction in Obesity. **Adv Exp Med Biol.** 960:345-379, 2017.
- ESLER M, STRAZNICKY N, EIKELIS N, MASUO K, LAMBERT G, LAMBERT E. Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. **Hypertension.** 48(5):787-796, 2006.
- ESTADELLA D, OYAMA LM, DAMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition.**20(2):218–24, 2004.
- FABBRETTI E. ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. **Front Cell Neurosci.** 7:236. Published 2013 Dec 4, 2013.
- FANG L, MOORE XL, DART AM, WANG LM. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. **J Geriatr Cardiol** 12(3):305-12, 2015.
- FARDIN NM, OYAMA LM, CAMPOS RR. Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. **Obesity (Silver Spring).** 20(8):1591-1597, 2012.
- FONTES MT, PAULA SM, LINO CA, et al. Renin-angiotensin system overactivation in perivascular adipose tissue contributes to vascular dysfunction in heart failure. **Clin Sci (Lond).** 134(23):3195-3211, 2020.
- FRANCESCHINI A, HULLUGUNDI SK, VAN DEN MAAGDENBERG AM, NISTRINI A, FABBRETTI E. Effects of LPS on P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons and macrophages from mice expressing the R192Q Cacna1a gene mutation of familial hemiplegic migraine-1. **Purinergic Signal.** 9(1):7-13, 2013.
- FRANCIS J, WEISS RM, WEI SG, JOHNSON AK, FELDER RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 281(5):R1734-45, 2001.

- FRIELER RA, MORTENSEN RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. **Circulation** 17;131(11):1019-30, 2015.
- FU YC, CHI CS, YIN SC, HWANG B, CHIU YT, HSU SL. Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species-TNF alpha-caspase signaling pathway. **Cardiovasc Res** 62:558–567, 2004.
- GÁLVEZ-PRIETO B, BOLBRINKER J, STUCCHI P, et al. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. **J Endocrinol.** 197(1):55-64, 2008.
- GAO, Y.J., LU, C., SU, L.Y., SHARMA, A.M. AND LEE, R.M. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br. J. Pharmacol.** 151, 323–331, 2007.
- GARCIA-GUZMAN M, STÜHMER W, SOTO F. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. **Brain Res Mol Brain Res.** Jul;47(1-2):59-66, 1997.
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol** 119: 493-501, 1992.
- GONCALVES, G. K.; OLIVEIRA, T. H. C.; BELO, N. O. Cardiac Hypertrophy and Brain Natriuretic Peptide Levels in an Ovariectomized Rat Model Fed a High-Fat Diet. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 380-391, 2017.
- GSCHWEND S, BUIKEMA H, HENNING RH, PINTO YM, DE ZEEUW D, VAN GILST WH. Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. **Eur J Heart Fail.** 5(2):147-154, 2003.
- GREENSTEIN, A.S., KHAVANDI, K., WITHERS, S.B., SONOYAMA, K., CLANCY, O., JEZIORSKA, M. et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. **Circulation** 119, 1661–1670, 2009.
- GRIGORAS A, AMALINEI C, BALAN RA, GIUSCA SE, CARUNTU ID. Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update. **Anatol J Cardiol.** 22(5):219-231, 2019.
- GUZIK TJ, MANGALAT D, KORBUT R. Adipocytokines – novel link between inflammation and vascular function? **J Physiol Pharmacol.** 57: 505–528, 2006.

HAMMOND IW, DEVEREUX RB, ALDERMAN MH, LARAGH JH. Relation of blood pressure and body build to left ventricular mass in normotensive and hypertensive employed adults. **J Am Coll Cardiol.** 12(4):996-1004, 1988.

HANLY PJ, ZUBERI-KHOKHAR NS. Increased mortality associated with Cheyne-Stokes respiration in patients with congestive heart failure. **Am J Respir Crit Care Med** 153, 272–276, 1996.

IGNACAK A, KASZTELNIK M, SLIWA T, KORBUT RA, RAJDA K, GUZIK TJ. Prolactin—not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. **J Physiol Pharmacol** 63: 435–443, 2012.

KALKMAN EA, VAN HAREN P, SAXENA PR, SCHOEMAKER RG. Regionally different vascular response to vasoactive substances in the remodeled infarcted rat heart: aberrant vasculature in the infarct scar. **J Mol Cell Cardiol** 29: 1487-1497, 1997.

KARAM R, HEALY BP, WICKER P. Coronary reserve is depressed in postmyocardial infarction reactive cardiac hypertrophy. **Circulation** 81: 238-246, 1990.

KENCHIAIAH S, EVANS JC, LEVY D, et al. Obesity and the risk of heart failure. **N Engl J Med** 347(5): 305–13, 2002.

KESSLER S, CLAUSS WG, GÜNTHER A, KUMMER W, FRONIUS M. Expression and functional characterization of P2X receptors in mouse alveolar macrophages. **Pflugers Arch.** 462(3):419-430, 2011.

LAHIRI S, ROY A, BABY SM, HOSHI T, SEMENZA GL, PRABHAKAR NR. Oxygen sensing in the body. **Prog Biophys Mol Biol** 91: 249–286, 2006.

LATARO RM, GAVA FN, OMOTO ANM, SILVA CAA, MORAES DJA, FORD AP, PATON JAFR, SALGADO HC. P2X3 Receptors as a New Target for Heart Failure Treatment. **Faseb Journal**, Abstract 885.18, 2018.

LATARO RM, SILVA CA, FAZAN R JR, ROSSI MA, PRADO CM, GODINHO RO, SALGADO HC. Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 305: R908 - R916, 2013.

LATARO RM, SILVA CA, TEFÉ-SILVA C, PRADO CM, SALGADO HC. Acetylcholinesterase inhibition attenuates the development of hypertension and inflammation in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, 28(10): 1201-8, 2015.

LAUER MS, ANDERSON KM, KANNEL WB, LEVY D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. **The Framingham Heart Study. JAMA**. 266(2):231-236, 1991.

LEDOUX J, GEE DM, LEBLANC N. Increased peripheral resistance in heart failure: new evidence suggests an alteration in vascular smooth muscle function. **Br J Pharmacol**. 139(7):1245-1248, 2003.

LEE, R.M., LU, C., SU, L.Y. AND GAO, Y.J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **J. Hypertens**. 27, 782–790, 2009.

LEITE RD, DURIGAN RDE C, DE SOUZA LINO AD, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. **Metabolism**. 62(10):1477-1484, 2013.

LI LZ, YUE LH, ZHANG ZM, et al. Comparison of mRNA Expression of P2X Receptor Subtypes in Different Arterial Tissues of Rats. **Biochem Genet**. 58(5):677-690, 2020.

LÖHN M, DUBROVSKA G, LAUTERBACH B, LUFT FC, GOLLASCH M, SHARMA AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB J**. 16(9):1057-1063, 2002.

LYMPEROPOULOS A, RENGO G, KOCH WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circ Res** 113:739–753, 2013.

MACHADO BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. **Ann NY Acad Sci** 940, 179–196, 2001.

MANN DL, BRISTOW MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. **Circulation** 111:2837–2849, 2005.

MANN DL. Pathophysiology of heart failure. In: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Edited by Braunwald E: 487-504, W.B. **Saunders Company**, Philadelphia, 2012.

- MESSERLI FH, SUNDGAARD-RIISE K, REISIN ED, et al. Dimorphic cardiac adaptation to obesity and arterial hypertension. **Ann Intern Med.** ;99(6):757-761, 1983.
- MILL JG, STEFANON I, LEITE CM, VASSALLO DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovasc Res** 24: 748-753, 1990.
- MUDD JO, KASS DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. **Nature** 451:919–928, 2008.
- MUDERS F, ELSNER D. Animal model of chronic heart failure. **Pharmacol Res** 41: 605-612, 2000.
- MULVANY MJ, KORSGAARD N. Correlations and otherwise between blood pressure, cardiac mass and resistance vessel characteristics in hypertensive, normotensive and hypertensive/normotensive hybrid rats. **J Hypertens.** 1983;1(3):235-244, 1983.
- NIEWINSKI P, JANCZAK D, RUCINSKI A, JAZWIEC P, SOBOTKA PA, ENGELMAN ZJ, FUDIM M, TUBEK S, JANKOWSKA EA, BANASIAK W, HART ECJ, PATON JFR & PONIKOWSKI P. Carotid body removal for treatment of **Cardiol** 168: 2506–2509, 2013.
- NIEWINSKI P. Carotid body modulation in systolic heart failure in the clinical perspective. **J Physiol** 595: 53–61, 2017.
- NORTH RA, SURPRENANT A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 40:563-580, 2000.
- NORTH RA. P2X receptors. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 371(1700):20150427, 2016.
- OPIE LH, HASENFUSS G. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Edited by Braunwald E: 459-486, W.B. **Saunders Company**, Philadelphia, 2012.
- ORTEGA-LOUBON C, FERNÁNDEZ-MOLINA M, SINGH G, CORREA R. Obesity and its cardiovascular effects. **Diabetes Metab Res Rev.** 35(4):e3135, 2019.
- OSADCHII OE, NORTON GR, MCKECHNIE R, DEFTEREOS D, WOODIWISS AJ. Cardiac dilatation and pump dysfunction without intrinsic myocardial systolic failure

following chronic beta-adrenoreceptor activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 292:H1898–H1905, 2007.

PAL P, KOLEY J, BHATTACHARYYA S, GUPTA JS, KOLEY B. Cardiac nociceptors and ischemia: role of sympathetic afferents in cat. *Jpn. J Physiol.* 39:131–44, 1989.

PAN HL, LONGHURST JC. Lack of a role of adenosine in activation of ischemically sensitive cardiac sympathetic afferents. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 269:106–13, 1995.

PAN HL, LONGHURST JC, EISENACH JC, CHEN SR. Role of protons in activation of cardiac sympathetic C-fibre afferents during ischaemia in cats. **J Physiol.** 518:857–66, 1999.

PAN HL, LONGHURST JC. Ischaemia-sensitive sympathetic afferents innervating the gastrointestinal tract function as nociceptors in cats. **J Physiol.** 492:841–50, 1996.

PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. **Circulation** 81:1161-1172, 1990.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, FISHBEIN MC, FLETCHER PJ, SPADARO J, KLONER RA, BRAUNWALD E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Cir Res** 44: 503-512, 1979.

PIJACKA W, MORAES DJ, RATCLIFFE LE, NIGHTINGALE AK, HART EC, DA SILVA MP, MACHADO BH, MCBRYDE FD, ABDALA AP, FORD AP, PATON JF. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. **Nat Med.** 22(10):1151-1159, 2016.

PONIKOWSKI P, CHUA TP, ANKER SD, FRANCIS DP et al. Peripheral chemoreceptor hypersensitivity: an ominous sign in patients with chronic heart failure. **Circulation** 104:544–549, 2001.

RALEVIC V. P2X receptors in the cardiovascular system and their potential as therapeutic targets in disease. **Curr Med Chem.** 22(7):851-65, 2015.

RONG W, GOURINE AV, COCKAYNE DA, XIANG Z, FORD AP, SPYER KM, BURNSTOCK G. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. **J Neurosci.** 23:11315–11321, 2003.

SABINO JP, OLIVEIRA MD, GIUSTI H, GLASS ML, SALGADO HC, FAZAN R Jr. Hemodynamic and ventilatory response to different levels of hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated rats. **Clinics** 68(3):395-9, 2013.

SCHOBER, K.E., HART, T.M., STERN, J.A., LI, X., SAMII, V.F., ZEKAS, L.J. SCANSEN, B.A., BONAGURA, J.D. Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. **J Vet Intern Med** 24:1358-1368, 2010.

SCHWARTZ PJ, DE FERRARI GM. Sympathetic-parasympathetic interaction in health and disease: abnormalities and relevance in heart failure. **Heart Fail Rev** 16(2):101-7, 2011.

SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM. Neurohumoral regulation. In: The human cardiovascular system, ed. Shepherd JT, Vanhoutte PM 5: 107-155, **Raven Press**, New York, 1979.

SIMAS BB, NUNES EA, CRESTANI CC, SPERETTA, GF. Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. **Stress**, 1-10, 2018.

SONG X, GAO X, GUO D, YU Q, GUO W, HE C, BURNSTOCK G, XIANG Z. Expression of P2X(2) and P2X (3) receptors in the rat carotid sinus, aortic arch, vena cava, and heart, as well as petrosal and nodose ganglia. **Purinergic Signal**. Mar;8(1):15-22, 2012.

SPERETTA GF, ROSANTE MC, DUARTE FO, LEITE RD, LINO AD, ANDRE RA, SILVESTRE JG, ARAUJO HS, DUARTE AC. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics (Sao Paulo)**, 67, n.2,1469-77, 2012.

SPERETTA GF, SILVA AA, VENDRAMINI RC, ZANESCO A, DELBIN MA, MENANI JV, BASSI M, COLOMBARI E, COLOMBARI DS. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life Sci**, 146, 154-62, 2016.

SCHRIER RW, ABRAHAM WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. **N Engl J Med**. 341(8):577-585, 1999.

STOCKER SD, MEADOR R, ADAMS JM. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**. 49(3):640-646, 2007.

SWYNGHEDAUW B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev** 9(1):215-262, 1999.

TEXTER EC Jr, MERRILL S, SCHWARTZ M, VAN DERSTAPPEN G, HADDY FJ. Relationship of blood flow to pressure in the intestinal vascular bed of the dog. **Am J Physiol.** 202:253-256, 1962.

THAMES MD, SCHMID PG. Interaction between carotid and cardiopulmonary baroreflex in control of plasma ADH. **Am J Physiol** 241: H431-H434, 1981.

TJEN-A-LOOI SC, PAN HL, LONGHURST JC. Endogenous bradykinin activates ischaemically sensitive cardiac visceral afferents through kinin B2 receptors in cats. **J Physiol** 510:633–41, 1998.

TODD GL, BAROLDI G, PIEPER GM, CLAYTON FC, ELIOT RS. Experimental catecholamine-induced myocardial necrosis. II. Temporal development of isoproterenol-induced contraction band lesions correlated with ECG, hemodynamic and biochemical changes. **J Mol Cell Cardiol** 17:647–656, 1985.

TOLEDO C, ANDRADE D, LUCERO C, SCHULTZ H, MARCUS N, RETAMAL M, MADRID C, DEL RIO R. Contribution of peripheral and central chemoreceptors to sympatho-excitation in heart failure. **J Physiol** 595: 43–51, 2017.

TOSCHI-DIAS E, RONDON MUPB, COGLIATI C, PAOLOCCI N, TOBALDINI E, MONTANO N. Contribution of Autonomic Reflexes to the Hyperadrenergic State in Heart Failure. **Front Neurosci** 11:162, 2017.

VALGIMIGLI M, CECONI C, MALAGUTTI P, MERLI E et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the cytokine-activation and long-term prognosis in myocardial infarction (C-ALPHA) study. **Circulation** 111: 863–870, 2005.

VAN DEN BORNE SW, DIEZ J, BLANKESTEIJN WM, VERJANS J, HOFSTRA L, NARULA J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. **Nat Rev Cardiol** 7(1):30-37, 2010.

VIRANI SS, ALONSO A, APARICIO HJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation.** 143(8):e254-e743, 2021.

VIRGINIO C, NORTH RA, SURPRENANT A. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. **J Physiol.** 510 (Pt 1) (Pt 1):27-35, 1998.

WANG Y, LI G, LIANG S, ZHANG A, XU C, GAO Y, ZHANG C, WAN F. Role of P2X3 receptor in myocardial ischemia injury and nociceptive sensory transmission. **Auton Neurosci.** May 30;139(1-2):30-7, 2008.

WARE JA, SIMONS M. Angiogenesis in ischemic heart disease. **Nat Med** 3(2): 158-164, 1997.

WENCKER D, CHANDRA M, NGUYEN K, MIAO W, GARANTZIOTIS S, FACTOR SM, SHIRANI J, ARMSTRONG RC, KITSIS RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. **J. Clin. Invest** 111: 1497-1504, 2003.

XU B, ZHENG H, PATEL KP. Enhanced activation of RVLM-projecting PVN neurons in rats with chronic heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 302(8):H1700-H1711, 2012.

ZHENG W, BROWN MD, BROCK TA, BJERCKE RJ, TOMANEK RJ. Bradycardia induced coronary angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor. **Circ Res** 85:192-198, 1999.

ZHONG Y, BANNING AS, COCKAYNE DA, FORD AP, BURNSTOCK G, MCMAHON SB. Bladder and cutaneous sensory neurons of the rat express different functional P2X receptors. **Neuroscience.** 120(3):667-675, 2003.

ANEXOS

Certificado CEUA/UFSC



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "RECEPTORES PURINÉRGICOS NO CORPÚSCULO CAROTÍDEO COMO NOVO ALVO PARA O TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA", protocolada sob o CEUA nº 2351090518, sob a responsabilidade de **Renata Maria Lataro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 13/07/2018.

We certify that the proposal "P2X3 receptors as a new target for heart failure treatment.", utilizing 18 Heterogenics rats (18 males), protocol number CEUA 2351090518, under the responsibility of **Renata Maria Lataro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 07/13/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **07/2019**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **70 a 90 dias**

N: **18**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **270 a 310 g**

Resumo: A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais causas de morte não só no Brasil, bem como em todo o mundo. A disfunção autonômica, os distúrbios respiratórios, o remodelamento cardíaco e vascular constituem importantes preditores de morbidade e mortalidade na IC. O papel desempenhado pelos quimiorreceptores periféricos na progressão da IC tem recebido particular atenção devido às evidências de que o aumento da função quimiorreflexa contribui para a disfunção autonômica, para os padrões respiratórios anormais, e aumento da mortalidade na IC. Portanto, ferramentas terapêuticas destinadas a normalizar a atividade quimiorreflexa mediada pelo corpúsculo carotídeo pode ser um potencial alvo para o tratamento da IC. Dados recentes, publicados no renomado periódico Nature Medicine, mostraram que, na hipertensão arterial, a excessiva sinalização gerada pelos quimiorreceptores localizados nos corpúsculos carotídeos está ligada aos receptores purinérgicos do subtipo P2X3 (P2X3). A inibição sistêmica dos receptores P2X3 normalizou a elevada atividade quimiorreflexa do corpúsculo carotídeo e reduziu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Além disso, dados prévios de nosso grupo demonstraram, em ratos com IC, um aumento da expressão de receptores P2X3 no gânglio petroso, onde estão localizados neurônios sensoriais ligados à resposta quimiorreflexa. Neste mesmo estudo, observou-se que a inibição crônica dos receptores P2X3 em ratos com IC reduziu a atividade excessiva dos quimiorreceptores carotídeos, atenuou a disfunção respiratória, melhorou a modulação autonômica cardíaca, preveniu a progressão da disfunção ventricular, reduziu a hipertrofia cardíaca e a concentração plasmática de peptídeo natriurético atrial. Em conjunto, estes dados demonstraram que o tratamento crônico com o inibidor do receptor P2X3 reduziu a atividade excessiva do corpúsculo carotídeo e preveniu a progressão da IC em ratos submetidos ao infarto do miocárdio, indicando que os receptores P2X3 podem ser considerados um novo alvo clínico para o tratamento da IC. Porém, ainda não há relatos na literatura da presença, ou ausência, de receptores P2X3 no coração ou vasos sanguíneos. A identificação de receptores P2X3 no coração e vasos sanguíneos de animais com disfunção do sistema cardiovascular poderá apontar novos mecanismos, relacionados a estes tecidos, que justifiquem os benefícios da inibição destes receptores no tratamento da insuficiência cardíaca. A obesidade produz alterações cardiovasculares que precedem o desenvolvimento da IC em humanos. A avaliação da expressão de receptores P2X3 em um estágio anterior da falência cardíaca poderá contribuir para o entendimento de possíveis alterações da expressão deste receptor durante a evolução da doença. Portanto, o objetivo deste estudo será avaliar a expressão dos receptores P2X3 no coração, artérias mesentéricas (vasos de resistência) e aorta (vaso de condutância) de ratos controles, ratos com IC e ratos obesos. Serão utilizados ratos Wistar adultos (300 a 320 g). A IC será induzida pela ligadura da artéria coronária, e a expressão de receptores P2X3 será avaliada após seis semanas do procedimento cirúrgico. A obesidade será induzida por dieta hiperlipídica. Ratos hígidos receberão dieta hiperlipídica por seis semanas, que será composta por ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1. O coração, artéria mesentérica e aorta serão removidos e utilizados para a análise da expressão do receptor P2X3.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiometabólica Aplicada ao Exercício,



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas CCB/UFSC e coordenado atualmente pelo Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta.

Florianópolis, 14 de setembro de 2018

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Maria Alcina Martins de Castro
Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina