

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Departamento de Morfologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Identificação de Alterações Estruturais e de Vias de Sinalização em Corações de
Camundongos *Knockout* para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)

Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho

Belo Horizonte

Julho de 2011

Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho

Identificação de Alterações Estruturais e de Vias de Sinalização em Corações de Camundongos *Knockout* para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Belo Horizonte

Julho de 2011



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE**

Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho

205/2011/07
entrada
2º/2009
2009710376

Às **quatorze horas** do dia **18 de julho de 2011** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Identificação de Alterações Estruturais e de Vias de Sinalização em Corações de Camundongos Knockout para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)**", requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADA
Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto	UFVJM	APROVADA
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 18 de julho de 2011.**

Dr. Anderson José Ferreira

(orientador)

Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto

Dr. José Dias Corrêa Júnior

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador


Prof.ª Denise Carmona Cara Machado
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular, ICBA/UFMG

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

Laboratórios de Biologia Cardíaca e de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Laboratório de Sinalização Intracelular em Cardiomiócitos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, UFMG.

Contou com o auxílio das seguintes Agências de fomento:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedicatória

À minha mãe pela dimensão do seu amor, carinho e suavidade de uma pétala de rosa.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por aumentar a cada dia mais a minha fé o que me faz ver, de acordo com a sua vontade, o prazer de conviver;

A minha mãe pelo exemplo de amor ao próximo incondicional, pela força em todos os momentos, apoio em qualquer decisão e pela sua amizade;

Ao meu irmão Raphael, por me incentivar sempre a seguir em frente e a confiar no meu potencial me mostrando que é tudo mais simples do que pensamos; e aos meus irmãos Marcus e Gabriela que mesmo de longe se fazem presentes em todos os meus projetos;

A todos os meus familiares que estão sempre torcendo pela minha felicidade em quaisquer circunstâncias, especialmente a minha prima Camila pela grande amizade e por estar presente em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Anderson José Ferreira por todos os ensinamentos indescritíveis;

Ao Prof. Dr. Robson AS Santos pelos animais *Knockouts* e a Ilma pelo cuidado;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro pelo auxílio nos Western Blotting;

Aos meus amigos de Laboratório pela companhia, pelo incentivo e pela convivência. Bárbara Nogueira, Giselle Foureaux, Julliane Joviano, Liliane Diniz, Marcos Augusto, Marilda Luz, Patrícia Moraes, Renato Mendes, Tatiane Almeida, Tatiane Murça, Vanessa Andrade e Vinícius Braga. Os meus sinceros agradecimentos. Aprendi muito com vocês;

Aos amigos do Laboratório Biologia do Desenvolvimento Iria e Matheus, à Profa. Gerluza Aparecida Borges Silva e ao Francisco por todo o apoio técnico sempre respondendo a toda e qualquer urgência, o meu carinho;

Ao laboratório do Prof. Dr. José Dias Corrêa Junior, Prof. Dr. José Carlos Nogueira e Prof. Dr. Antônio Carlos Santana obrigada por me receberem logo no

início do projeto colocando a disposição todo o material e a atenção de vocês.
Ainda ao Héder, a Juliana e Marcela: obrigada pelo apoio e carinho de sempre;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do ICB, à Ivete e a Olga, por propiciarem o início das avaliações ultra estruturais;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, e a equipe formada pela Roberta, Kinulpe e Profa. Dra. Elizabeth Ribeiro por toda a dedicação e discussões sempre contribuindo para obtenção de boas imagens em eletrônica;

À toda a turma da Biologia Celular. A Violeta, Paula e Luíza obrigada pela amizade de vocês,

Aos colegas do Laboratório da Profa. Dra. Silvia Guatimosim, por me receberem tão bem e serem fundamentais para a conclusão deste trabalho, em especial a Amanda Borges e Mariana Gavioli, pela dedicação o meu muito obrigada.

A Coordenação do curso de pós-graduação na pessoa da Profa. Dra. Denise Carmona Cara Machado o meu sincero agradecimento;

Aos amigos e professores da Fisioterapia, em especial Fernanda Mundim, Bruna Guadagnin, Raquel Vendrix, Marina Machado, Clara Quintela, Virgilio Leite, Felipe Fill, Dra. Danielle Gomes, Dra. Walkyria Sampaio, Dr. Fabiano Siqueira e Dra. Sarah Drumond;

Ao Dr. Rodolfo Guillermo Vigil Verastegui e toda equipe da cirurgia cardíaca do IPSEMG por alimentar a minha paixão pela cardiologia;

A 2 Guedas, à Andréa Zago e ao Matheus Torres, por me mostrarem que com amigos de verdade tudo fica mais fácil;

A minha comunidade/família da Igreja Nossa Senhora Rainha, em especial aos amigos do Fanuel;

E por último, a quem possibilitou o início de tudo, confiando no meu potencial e preocupada com a minha formação, agradeço especialmente a Prof. Dra. Maria da Glória Rodrigues Machado por essa dissertação.

Pensar em pesquisa é pensar em metanóia. Uma condição sine qua non.

Danielle Coutinho

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1-INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Sistema Renina Angiotensina.....	01
1.2 – O receptor Mas de Angiotensina-(1-7).....	03
1.3 – Sistema Renina Angiotensina e Vias Metabólicas.....	05
2-JUSTIFICATIVA.....	09
3-OBJETIVOS.....	10
3.1 – Objetivo geral.....	10
3.2 – Objetivos específicos.....	10
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1 – Animais.....	11
4.2 – Técnica de <i>Microarray (Scanarray)</i>	11
4.3 – Análise da Estrutura Cardíaca.....	11
4.4 – Avaliação da Ultra estrutura do Coração.....	12
4.5 – Western Blotting.....	14
4.6 – Análise Estatística.....	16

5-RESULTADOS	17
5.1 – Análise dos Dados do <i>Microarray</i>	17
5.2 – Identificação de Possíveis Vias de Sinalização Alteradas nos Camundongos Deficientes para o Mas.....	17
5.3 – Avaliação de Algumas Proteínas Relacionadas com as Alterações Gênicas Observadas nos Animais Deficientes para o Mas.....	30
6-DISCUSSÃO	35
7-CONCLUSÃO	39
8-PERSPECTIVAS	40
9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema representativo dos eixos que compõem o sistema renina angiotensina

Figura 2 - Seqüência de aminoácidos do Mas de rato e sua posição na membrana celular

Figura 3 - Imagem representativa da metodologia aplicada para realização da quantificação das mitocôndrias

Figura 4 - Fotomicrografias representativas de fibras cardíacas dos animais com 12 semanas de idade

Figura 5 - Díâmetro médio dos cardiomiócitos da parede lateral do ventrículo esquerdo de animais com 12 semanas de idade

Figura 6 - Fotomicrografias representativas de fibras cardíacas dos animais com 24 semanas de idade

Figura 7 - Díâmetro médio dos cardiomiócitos da parede lateral do ventrículo esquerdo de animais com 24 semanas de idade

Figura 8 - Fotomicrografias eletrônicas de transmissão representativas de miocárdio de animais com 12 semanas de idade

Figura 9 - Número de mitocôndrias no coração de animais com 12 semanas de idade

Figura 10 - Fotomicrografias eletrônicas de transmissão representativas de miocárdio de animais com 24 semanas de idade

Figura 11 - Número de mitocôndrias no coração de animais com 24 semanas de idade

Figura 12 - Expressão da proteína AMPK α em corações de camundongos com 12 semanas de idade

Figura 13 - Expressão da proteína AMPK β 1 em corações de camundongos com 12 semanas de idade

Figura 14 - Expressão da proteína ERK1/2 em corações de camundongos com 12 semanas de idade

Figura 15 - Expressão da proteína p38 em corações de camundongos com 12 semanas de idade

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características gerais dos animais com 12 e 24 semanas

Tabela 2 - Perfil volumétrico das estruturas analisadas através da MET nos animais com 12 semanas de idade

Tabela 3 - Perfil volumétrico das estruturas analisadas através da MET nos animais com 24 semanas de idade

Tabela 4 - Relação de genes selecionados a partir dos dados do *microarray* relacionados com o metabolismo energético

Tabela 5 - Relação de genes selecionados a partir dos dados do *microarray* relacionados com a estrutura cardíaca

Lista de abreviaturas

SRA- Sistema Renina Angiotensina

ACC- Acetil-CoA carboxilase

Akt- Proteína quinase B

ALDH2- Aldeído desidrogenase mitocondrial 2

AMPK- proteína quinase ativada por AMP

AMPK α - Subunidade alfa da proteína quinase ativada por AMP

AMPK β - Subunidade beta da proteína quinase ativada por AMP

AMP- Adenosina monofosfato

Ang- Angiotensina

Ang-(1-7)- Angiotensina-(1-7)

Ang II- Angiotensina II

ATP- Adenosina trifosfato

AT₁- Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT₂- Receptor de angiotensina II do tipo 2

A-779- Antagonista seletivo do receptor de angiotensina-(1-7)

CETEA- Comitê de ética experimental em animais

CT- Comprimento da tibia

ECA- Enzima conversora de angiotensina

ECA2- Enzima conversora de angiotensina

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

EPM- Erro padrão da média

ERK- Quinase reguladora da sinalização extracelular

FADH- Flavina adenosina dinucleotídeo

g- Gramas

JNK- Quinase amino terminal c-Jun

KO- Knockout

M- molar

MAPKs- Proteínas quinases ativadas por mitógenos

Mas- Proto-oncogene Mas

mg- Miligramas

MgCl₂- Cloreto de magnésio

MKK3- Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno

mM- Milimolar

mg/cm- Miligramas por centímetro

mg/g- Miligramas por grama

mg/kg- Miligramas por quilograma

mg/mL- Miligramas por mililitro

n- Número de animais

NaCl- Cloreto de sódio

NADH- Nicotinamida adenosina difosfato oxidase (aceptor de elétrons)

NaF- Fluoreto de Sódio

Na_3VO_4 - Odium orto-vanadato

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ - Pirofosfato de sódio

nm- Nanômetros

PBS- Tampão fosfato-salino

PC- Peso do coração

pH- Potencial hidrogeniônico

PMSF- Fluoreto fenilmetilsulfonil

PVDF- Difluoreto de polivinildieno

p38- Proteína quinase ativada por mitógeno

RNA_m- Ácido ribonucléico mensageiro

ROS- Espécie reativa de oxigênio

rpm- Rotações por minuto

TBS-Tampão tris-salino

VE- Ventrículo esquerdo

WT- Wild type

°C- Graus Celsius

μm- Micrômetros

UI/kg- Unidades por quilograma

+ dT/dt- Índice de contratilidade

- dP/dt- Índice de relaxamento

Resumo

A Angiotensina(Ang)-(1-7) tem sido amplamente estudada por demonstrar em diferentes sistemas efeitos contra regulatórios ao da Ang II, assim apresentando-se como um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos. Tendo visto que as suas ações são mediadas via receptor Mas e que a deleção deste receptor causa diversas alterações funcionais cardíacas, o objetivo deste estudo foi identificar possíveis proteínas de sinalização no coração de animais deficientes para Mas que pudessem contribuir para as alterações estruturais e funcionais observadas nestes animais. Para isto utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 *knockouts* para o Mas (KO) e selvagens *Wild Type* (WT). Com posse dos dados obtidos com a técnica do *microarray*, selecionamos 272 genes com expressão alterada nos animais KO. A fim de refinar a nossa busca, avaliamos a estrutura e a ultra estrutura de corações de animais KO, utilizando técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente. Os animais com deficiência do Mas apresentaram menor peso corporal, diminuição do diâmetro dos cardiomiócitos e um aumento do número de mitocôndrias quando comparado com os WT. Diante destes dados, selecionamos dois grupos de genes: um relacionado com a estrutura cardíaca e o outro com o metabolismo energético do coração. Assim, identificamos através da técnica de western blotting, duas proteínas sinalizadoras diretamente relacionadas com o metabolismo energético (AMPK α e AMPK β 1) e outras duas relacionadas com a manutenção da estrutura cardíaca (ERK1/2 e p38). Os animais KO apresentaram diminuição na expressão da subunidade catalítica da AMPK (AMPK α) e um aumento na subunidade reguladora desta proteína (AMPK β 1), revelando um desequilíbrio nos níveis de ATP e, conseqüentemente, no metabolismo energético nas células cardíacas destes animais. Além disso, a expressão das MAPKs ERK1/2 e p38 estava significativamente aumentada nos corações dos animais KO. Assim, este estudo demonstra que o eixo Ang-(1-7)/Mas está diretamente envolvido na manutenção da estrutura e do metabolismo energético celular do coração, possivelmente através das vias de sinalização celular MAPK e AMPK.

Palavras chaves: Receptor Mas; Angiotensina-(1-7); Angiotensina II; Coração; *microarray*; AMPK e MAPK.

Abstract

Angiotensin(Ang)-(1-7) has been widely investigated due to its Ang II opposite effects in different organs. Consequently, Ang-(1-7) represents a potential target for new therapeutic approaches. Taking into consideration that its effects are mediated by the Mas receptor and that genetic ablation of the Mas causes cardiac dysfunction, the objective of this current study was to identify potential signaling proteins in hearts of Mas knockout mice that might be involved in the structural and functional alterations observed in these animals. We used C57BL/6 Mas knockouts (KO) mice and their controls Wild Type (WT). Using the data obtained in a microarray assay performed previously, we first selected 272 genes which the expression was up or down regulated in hearts of Mas deficient mice. To limit our search for specific genes involved in the cardiac alterations observed in KO mice, structural and ultra structural evaluations were performed using histological and transmission electron microscopy techniques, respectively. Mas deficient mice presented a lower body weight and cardiomyocyte diameter and a higher number of mitochondria in the heart when compared with WT mice. These findings allowed us to sort the genes into two groups: one related to the cardiac structure and another one related to the energy metabolism of the heart. Afterward, using the western blotting technique we identified two signaling proteins directly related to the energy metabolism (AMPK α and AMPK β 1) and other two signaling proteins associated to the maintenance of the cardiac structure (ERK1/2 and p38). Knockout mice presented a lower expression of the catalytic isoform of the AMPK complex (AMPK α) and a higher expression of the regulatory isoform of the AMPK complex (AMPK β 1), indicating an imbalance of the ATP levels and, consequently, disturbances in the energy metabolism of the cardiac cells of these animals. Furthermore, a higher expression of the MAPKs

ERK1/2 and p38 were observed in hearts of Mas deficient mice. Thus, our study demonstrated that the Ang-(1-7)/Mas axis is directly involved in the maintenance of the cardiac structure and of the energy metabolism of the heart, likely by regulating the expression of the signaling proteins MAPK e AMPK.

Keywords: Mas Receptor; Angiotensin-(1-7); Angiotensin II; Heart; microarray; AMPK e MAPK.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é formado por diversos peptídeos biologicamente ativos que atuam na regulação da pressão arterial, na homeostase hidroeletrolítica, no tônus vascular e na função celular (Vaajanen et al., 2008; Vaajanen et al., 2009). Ele é caracterizado por reações enzimáticas em cascata, na qual a renina, sintetizada pelas células justaglomerulares do rim, cliva o angiotensinogênio hepático e produz a Angiotensina (Ang) I, que por sua vez, é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Senanayake et al., 2007; Vaajanen et al., 2008; Fyhrquist & Saijonmaa, 2008; Ferreira et al., 2009). A Ang II exerce suas funções celulares interagindo com receptores de membrana nas células alvo, os chamados receptores AT₁ e AT₂ (Senanayake et al. 2007; Vaajanen et al., 2008; Vaajanen et al., 2009).

O SRA tem participação comprovada em diversas patologias, como hipertensão arterial sistêmica, cardiomiopatia dilatada, doença arterial coronariana, diabetes e hipertensão pulmonar (Bojestig et al. 2000; Kobori et al., 2007; Ferreira et al., 2009; Ferreira et al., 2011; Yoriko et al., 2009). O principal componente efetor do SRA responsável por desencadear alterações como fibrose, lesão vascular e hipertrofia através de ações vasoconstritoras e proliferativas é a Ang II (Senanayake et al., 2007; Zeng et al., 2009). Estudos demonstraram que este peptídeo, não é apenas um potente vasoconstritor e estimulador da liberação de aldosterona pelas glândulas supra-renais, mas também um fator de crescimento e modulador celular que influencia a apoptose, a proliferação celular, a fibrose tecidual e as respostas inflamatórias (Sramek et al., 1988; Vaajanen et al., 2008).

Atualmente, novos componentes estão sendo incorporados a este sistema, como, por exemplo, a ECA2, a Ang-(1-7) e o receptor Mas. A ECA2, descoberta em 2000 (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000), é uma enzima homóloga à ECA que converte, principalmente, a Ang II em Ang-(1-7), cujo receptor funcional é o Mas (Santos et al., 2003). Este receptor é uma proteína

com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G. Acredita-se que o SRA seja constituído por dois eixos contraregulatórios (Ferreira & Santos, 2005). O primeiro é formado pela ECA, Ang II e pelo receptor AT_1 . Este eixo está associado à vasoconstrição, proliferação celular, hipertensão e fibrose (Ferreira et al., 2010). O outro eixo é composto pela ECA2, Ang-(1-7) e pelo Mas e, uma vez ativado, induz mecanismos protetores (Figura 1). Assim, crescentes evidências indicam que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas desempenha um papel fundamental na homeostase cardiovascular e que alterações na sua expressão/função estão associadas com o desencadeamento das principais patologias cardíacas e vasculares (Ferreira et al., 2010).

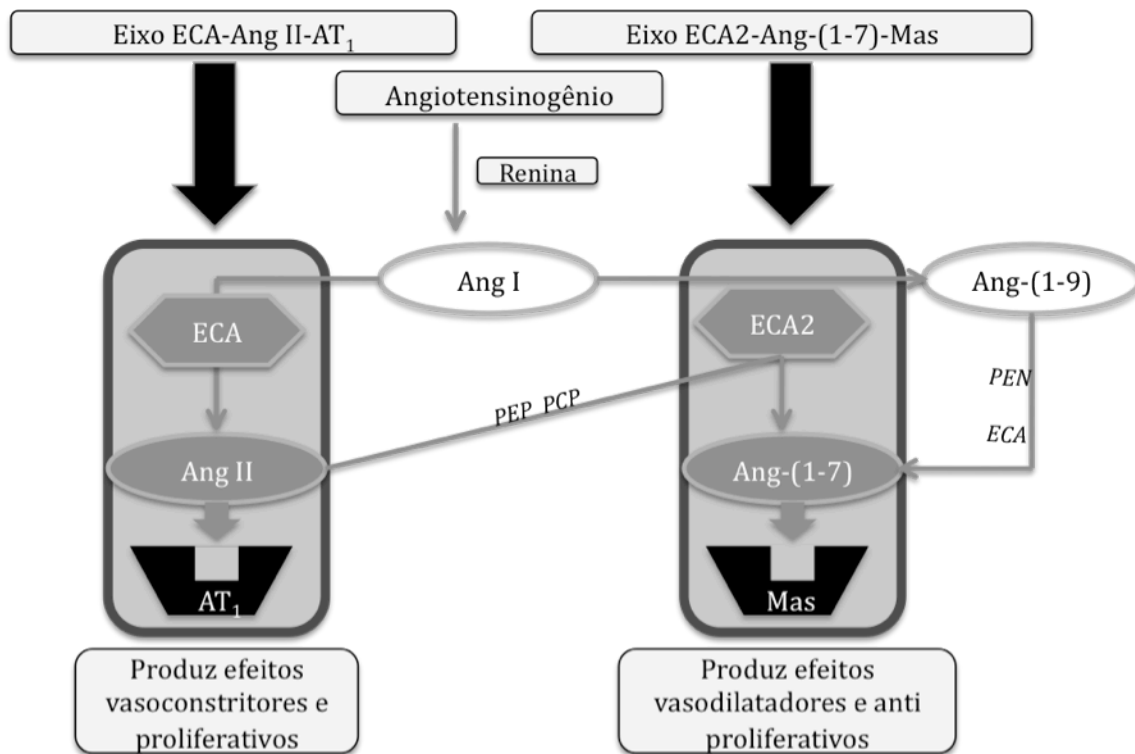


Figura 1 – Representação esquemática dos dois eixos contra regulatórios do Sistema Renina Angiotensina: ECA/Ang II/ AT_1 e ECA2/Ang-(1-7)/Mas (Modificado de Santos et al, 2006).

1.2 O receptor Mas de Angiotensina-(1-7)

Estudos iniciais utilizando o antagonista seletivo da Ang-(1-7), o A-779 (Santos & Campagnole-Santos, 1994), evidenciaram a existência de um sítio de ligação específico para este peptídeo distinto dos receptores AT₁ e AT₂ de Ang II (Ferrario et al., 1998; Santos & Campagnole-Santos, 1994). Entretanto, apenas recentemente foi demonstrado que este sítio de ligação corresponde ao receptor Mas (Santos et al., 2003). O protooncogene Mas, caracterizado inicialmente pelas suas propriedades tumorais (Young et al., 1986; Rabin et al., 1987), codifica uma proteína com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G (Figura 2) (Zohn et al., 1998). Em camundongos, o gene *Mas* foi localizado no cromossomo 17 e em ratos no cromossomo 1 (Cebra-Thomas et al., 1992, Al-Ubaidi et al., 1992). O RNA mensageiro para o Mas já foi detectado no coração, testículos, rins e cérebro (Metzger et al., 1995).

Tendo em vista o papel cardioprotetor da Ang-(1-7), corações isolados de camundongos deficientes para o Mas apresentam acentuada alteração na função cardíaca (Castro et al., 2006; Santos et al., 2006). Especificamente, estes animais apresentam importante redução na tensão sistólica e na dT/dt máxima e mínima, além de uma significativa diminuição na frequência cardíaca e um aumento da resistência coronariana vascular (Castro et al., 2006). Ademais, a dP/dt máxima do ventrículo esquerdo e o débito cardíaco são significativamente menores em camundongos *Mas knockout* quando avaliados por meio de um micro cateter de condutância inserido dentro do ventrículo esquerdo (Gembardt et al., 2003). Redução da variabilidade da frequência cardíaca associada a um aumento do tônus simpático também foi observada nestes animais (Walther et al., 2000). Estas alterações na função cardíaca podem ser explicadas, pelo menos parcialmente, por uma mudança acentuada na expressão de colágenos para um perfil pró-fibrótico (Santos et al., 2006). De fato, dados da literatura demonstram que a Ang-(1-7) induz efeitos anti-fibrótico e anti-trófico em células cardíacas *in vitro* por meio da ativação do receptor Mas (Iwata et al., 2005; Tallant et al., 2005). A Ang-(1-7), agindo através do Mas, libera óxido nítrico por uma via dependente do fosfatidilinositol-3 kinase/Akt, causando vasodilatação,

inibição do crescimento celular e contra regulando os efeitos proliferativos e vasoconstritores mediados pelo receptor do tipo 1 de Ang II (Santos et al., 2003; Sampaio et al., 2007; Dias-Peixoto et al., 2008).

Em experimentos realizados por Castro e colaboradores em 2006, o receptor Mas foi descrito como um novo componente chave a ser considerado no complexo mecanismo envolvido no processo de isquemia/reperfusão do miocárdio, pois este receptor parece desempenhar um papel importante na função cardíaca durante este processo. Foi observado que após a isquemia global do coração, os animais com deleção do receptor Mas apresentam uma alteração significativa na função contrátil cardíaca. Lesões por isquemia e reperfusão têm sido relacionadas com aumentos no conteúdo de cálcio intracelular (Daly et al., 1984;. Manning & Hearse, 1984; Fukuda et al., 2001). De fato, estudos sugerem que a Ang-(1-7) pode ser um modulador de canais iônicos (Gironacci et al., 1994, 2004; Bevilaqua et al., 2002) e que o tempo para o pico de corrente de cálcio é significativamente maior em camundongos deficientes para o Mas (Santos et al., 2006). Assim, estas observações sugerem que o eixo Ang-(1-7)/Mas desempenha um papel fundamental na recuperação da função contrátil do coração após a lesão por isquemia/reperfusão.

Em conjunto, estes resultados indicam que a Ang-(1-7) tem um papel importante na função cardíaca e que a interação deste peptídeo com o Mas é um passo importante para as suas ações no coração.

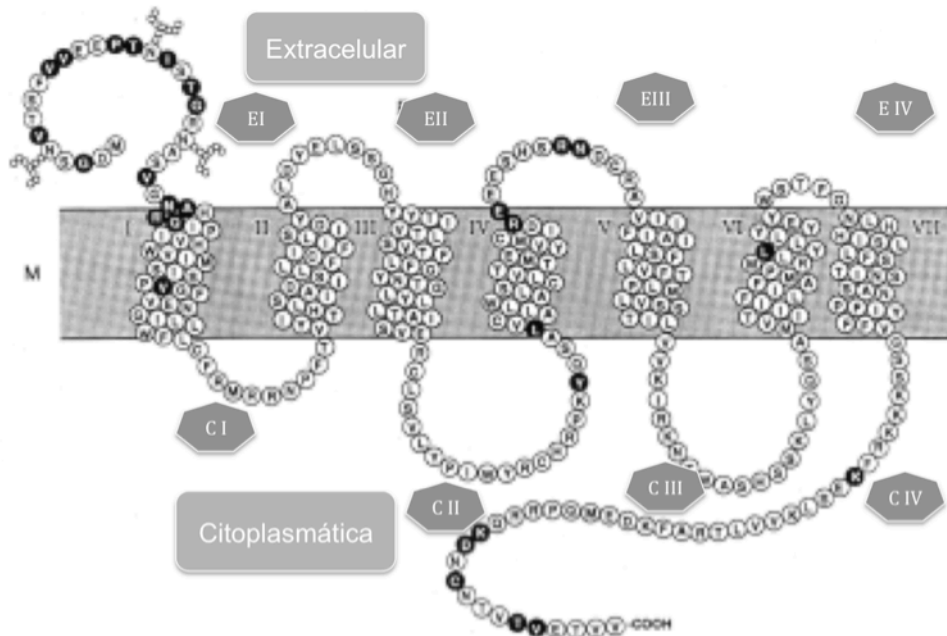


Figura 2 – Seqüência de aminoácidos do Mas de rato e sua posição na membrana celular (Modificado de Cebra-Thomas et al., 1992).

1.3 Sistema Renina Angiotensina e Vias Metabólicas

O SRA representa uma importante conexão entre as doenças cardíacas e metabólicas. Camundongos deficientes para o Mas, além das alterações cardíacas descritas no item anterior, também apresentam dislipidemia, baixa tolerância a glicose e resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, diminuição na captação de glicose pelas células do tecido adiposo e um aumento na massa deste tecido (Santos et al., 2008). Estas observações sugerem que a disrupção crônica do eixo Ang-(1-7)/Mas pode levar a um estado de Síndrome Metabólica. Os mecanismos pelos quais a ausência do Mas causa estas alterações no metabolismo celular ainda são pouco conhecidos, mas distúrbios na expressão e na função de várias proteínas sinalizadoras podem contribuir para este fenótipo. Entre as possíveis candidatas podemos citar, por exemplo, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK).

A AMPK tem sido identificada como um transdutor de sinal envolvido na regulação transcricional, reprimindo genes envolvidos no sistema de sinalização

da glicose em hepatócitos (Salt et al., 1998; Woods et al., 2000) e em genes envolvidos na regulação da captação da glicose e metabolismo de substratos no músculo esquelético (Holmes et al., 1999; Ojuka et al., 2000; Winder et al., 2000). A AMPK é ativada pelo estresse celular associado com a depleção de adenosina trifosfato (ATP) (Hardie & Carling, 1997) e é provável que ela seja um dos vários reguladores dos processos mitogênicos e metabólicos celulares (Mu et al., 2001). A regulação *in vivo* da AMPK e/ou alterações no seu substrato acetil-CoA carboxilase (ACC) estão relacionados com alterações no metabolismo energético e na transdução de sinal mitógeno em humanos após situações de estresse celular (M.Yu et al., 2003). Assim, ela é considerada uma via reguladora chave do metabolismo e está envolvida no controle da homeostase energética celular.

A AMPK é um importante sensor energético e regulador da homeostase metabólica e sua ativação leva a uma mudança do estado de consumo de energia para uma situação de produção de energia (Carling et al., 2004; Zhang et al., 2009). Esta quinase é uma proteína heteromérica constituída de uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (Stapleton et al., 1996; Hoehn et al., 2010). Ela pode mediar a captação de glicose independente da insulina em músculos e aumentar a oxidação de ácidos graxos. Além disso, a atividade desta quinase é inibida na presença de altas concentrações de glicose (Long et al., 2005; da Silva Xavier et al., 2003). Em corações, a AMPK está envolvida na cardiomiopatia diabética e sua ativação pode prevenir a disfunção cardíaca pós-isquêmica (Daniels et al., 2010; Paiva et al., 2011). Assim, a ativação da AMPK em situações de estresse metabólico estimula processos de geração de energia (Motoshima et al., 2006).

A energia que a célula precisa para se manter funcionando é gerada em grande parte na mitocôndria, na forma de ATP (Wallace et al., 1999). A produção de energia envolve diversas vias metabólicas, incluindo a quebra da glicose ou glicólise e a oxidação de lipídios. Estas duas vias vão produzir acetil-CoA que, no ciclo de Krebs, vai gerar NADH e FADH, que por sua vez serão utilizados na oxidação fosforilativa para produzir ATP (Weber et al., 2007). A

glicólise ocorre na matriz citoplasmática e as demais vias metabólicas ocorrem na mitocôndria. A glicólise e o ciclo de Krebs vão gerar pequena quantidade de ATP, sendo a oxidação fosforilativa a maior responsável pela produção do ATP consumido pela célula.

O estresse oxidativo pode induzir apoptose no miocárdio e é um mecanismo importante no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Giordano et al., 2005). Durante o estresse oxidativo, o equilíbrio redox intracelular é alterado e ocorre um aumento na produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode causar uma disfunção mitocondrial com conseqüente redução de ATP (Marin-Garcia et al., 2008). Assim, criando um ambiente favorável à ativação das proteínas AMPK que, por sua vez, pode estimular a ativação de outras proteínas quinases, como, por exemplo, as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK).

Recentes evidências sugerem que a AMPK pode ativar outras proteínas efetoras tais como p38 MAPK e proteínas quinases ativadas por mitógenos 3 (MKK3) (Xi et al., 2001), estabelecendo uma relação entre AMPK e as MAPK. Estas últimas são importantes mediadoras intracelulares em respostas relacionadas ao crescimento e diferenciação celular, sobrevivência e morte celular. No processo de maturação das células dendríticas de humano ou de rato, a ativação das MAPK desempenha um papel crucial (Nakahara et al., 2004; Arrighi et al., 2001). A Ang II é um ativador conhecido da via de sinalização destas quinases.

A via de sinalização das MAPK é uma via altamente conservada de quinases do tipo serina/treonina que consiste de pelo menos três grandes famílias [p38, quinase extracelular (ERK1/2) e c-Jun N-terminal quinase (JNK)]. Por transdução de sinais da superfície da célula para o núcleo, a família MAPK regula diversas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. A Ang II estimula diversas respostas celulares, ativando p38, ERK1/2 e JNK em muitas espécies (incluindo o ser humano e o rato) e tipos celulares, tais como, fibroblastos cardíacos, células peritoneais neoplásicas, células mesangiais e macrófagos (Scheuren et al., 2002; Kiribayashi et al., 2005;

Zhang et al., 2005; Gendron et al., 1999; Wang et al., 2008). Por outro lado, a Ang-(1-7) pode inibir a ativação das MAPK (Tallant et al., 2005;. Lapteva et al., 2001; Nahmod el al., 2003; Ferreira et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Análises de expressão gênica usando *microarrays* permitem uma avaliação simultânea dos níveis de expressão de milhares de genes de uma só vez. Em busca de genes cuja expressão pode estar afetada pela deficiência do Mas e que podem, assim, estar relacionados com a disfunção cardíaca e alterações estruturais do coração observadas em camundongos deficientes para este receptor, analisamos os resultados da expressão gênica diferencial entre os camundongos Mas *knockout* C57BL/6 e os seus controles do tipo selvagem. Assim, a utilização desta ferramenta pode ajudar na identificação de vias de sinalização intracelulares que podem ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca e nas alterações estruturais do coração consequentes da eliminação genética do receptor Mas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar possíveis proteínas sinalizadoras no coração que possam estar envolvidas na disfunção e alterações estruturais cardíacas decorrentes da deleção genética do receptor Mas.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os resultados do *microarray* obtido a partir de amostras de corações de camundongos controles e deficientes para o Mas.
- Avaliar a estrutura cardíaca de camundongos controles e deficientes para o Mas.
- Avaliar a ultraestrutura do coração de camundongos controles e deficientes para o Mas.
- Verificar possíveis alterações na expressão de proteínas sinalizadoras em corações de camundongos deficientes para o Mas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados neste trabalho camundongos selvagens *Wild type* (WT) e *knockouts* (KO) para o receptor Mas no *background* C57BL/6, com idades entre 10 e 14 semanas e entre 22 e 26 semanas, provenientes do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG. Os animais foram mantidos com dieta normal e com livre acesso à água e comida. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo número 130/11) (Anexo 1).

4.2 Técnica de *Microarray* (*Scan array*)

Para identificar genes cuja expressão é afetada pela deleção do Mas, utilizou-se a técnica de *Microarray*. Este procedimento foi realizado pelo laboratório do Dr. Michael Bader do Max-Delbrück Center, Berlim – Alemanha através de uma colaboração estabelecida com o nosso grupo de pesquisa. Em resumo, o perfil diferenciado de expressão de genes nos corações de camundongos WT (n=3) e KO (n=4) foi avaliado utilizando uma placa contendo aproximadamente 12.000 genes (Murine Affymetrix Genome U74v2). Nesta análise foram identificados genes que estavam reprimidos e genes que apresentavam superexpressão nos corações de camundongos com deleção do Mas.

4.3 Análise da Estrutura Cardíaca

A análise da estrutura cardíaca foi realizada através de dois métodos: índice de massa cardíaca e análise microscópica. Ao final da perfusão dos corações para a obtenção de material para a análise histológica e ultraestrutural,

estes órgãos foram pesados e os valores corrigidos pelo tamanho da tíbia (mg/cm) (n=6-7). Para a avaliação histológica do tecido cardíaco (n=4-5), fragmentos do ventrículo esquerdo foram coletados. As amostras foram fixadas em solução de Bouin 4% por 24 horas, adotando-se a seguinte relação: 4 horas para cada milímetro de espessura da peça. A seguir, elas foram desidratadas em série crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 3 banhos de álcool absoluto), diafanizadas em xilol (3 banhos de 20 minutos), embebidas em parafina líquida e incluídas. As secções foram realizadas em micrótomo manual (Microm HM335E) utilizando-se navalhas descartáveis e obtendo secções de 5µm de espessura. Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram submetidos à coloração pelo método de hematoxilina-eosina para a avaliação morfométrica do tecido muscular cardíaco. Foram obtidos 4 cortes de cada animal separados por uma distância de 40µm. Para cada animal foram capturadas imagens da parede livre do ventrículo esquerdo utilizando objetiva com magnificação de 40x, através da microcâmera JVC TK-1270/RGB. Para a análise morfométrica foi realizada a medida da secção transversa de aproximadamente 100 cardiomiócitos de cada animal utilizando o software ImageJ 1.43u. Somente foram avaliados cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis.

4.4 Avaliação Ultraestrutural do Coração

Para a análise ultraestrutural dos corações (n=4), os camundongos foram perfundidos e fixados com solução de glutaraldeído em tampão fosfato. O processo de perfusão do animal foi realizado de acordo com Chiarini-Garcia et al., 2011. Quinze minutos antes do início da perfusão para fixação do tecido, os camundongos foram heparinizados com heparina intraperitoneal na dose de 130 UI/kg de peso corporal. Em seguida, os animais foram anestesiados com tiopental na dose de 50mg/kg de peso corporal via intraperitoneal. Após a anestesia, os camundongos foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%) por 5 minutos para o processo de

exsanguinação. Seguida a limpeza dos vasos sanguíneos, foi perfundido a solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) para a fixação dos tecidos. Os animais foram perfundidos por 25-30 minutos e o coração então removido e pesado.

Fragmentos de corações, após lavagem em tampão fosfato, foram pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Após nova lavagem no mesmo tampão, o material foi desidratado gradualmente em acetona 50%, 70%, 80%, 90% e 95% uma vez, por 15 minutos, e 100% por duas vezes de 15 minutos. A seguir, o material a ser incluído foi impregnado com uma solução acetona/resina Polybed 812 (2:1) por 3 horas, (1:1) por 3 horas, (1:2) por 3 horas e Polybed 812 100% (*overnight*). Para polimerização, colocou-se o material em uma estufa a 60°C por 48 horas. Os cortes semifinos foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrotomo (Leica Ultracut EM UC6), coletados com espessura de 250 a 300nm e corados com solução aquosa de azul de toluidina 1%. Os cortes ultrafinos com espessura de 70 a 90nm também foram obtidos em um ultramicrotomo (Leica Ultracut EM UC6) utilizando-se uma navalha de diamante e coletados em grades de níquel de 300 *mesh*. A contrastação dos cortes foi feita utilizando solução aquosa de acetato de uranila saturada, nas quais as grades foram mergulhadas por 10 minutos. Após lavagens em água destilada, as grades foram mergulhadas em solução de citrato de chumbo, onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida, as telas foram lavadas em água destilada e colocadas em estufa a 37°C para secagem. As imagens dos cortes foram visualizadas e capturadas utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 - Spirit - FEI - 2006 alocado no Centro de Microscopia da UFMG. Foram obtidas 15 micrografias de cada animal no aumento de 6.000x. Em cada micrografia foi aplicado um grid, padronizando quadrantes com 2 cm de lado, o que resultou em 35 quadrados por imagem. Os vértices dos quadrados serviram como marcador pontual. Cada vértice que incidiu sobre uma estrutura foi contado e registrado. Após analisar as 15 micrografias de cada animal, o valor total de cada estrutura foi apresentado por média/animal. Para quantificação das estruturas foi utilizando as funções grid e

contagem de células do software ImageJ 1.43u. As estruturas avaliadas foram: miofibrila, mitocôndria, túbulo T, matriz extracelular, grânulo, núcleo, vaso e artefato.

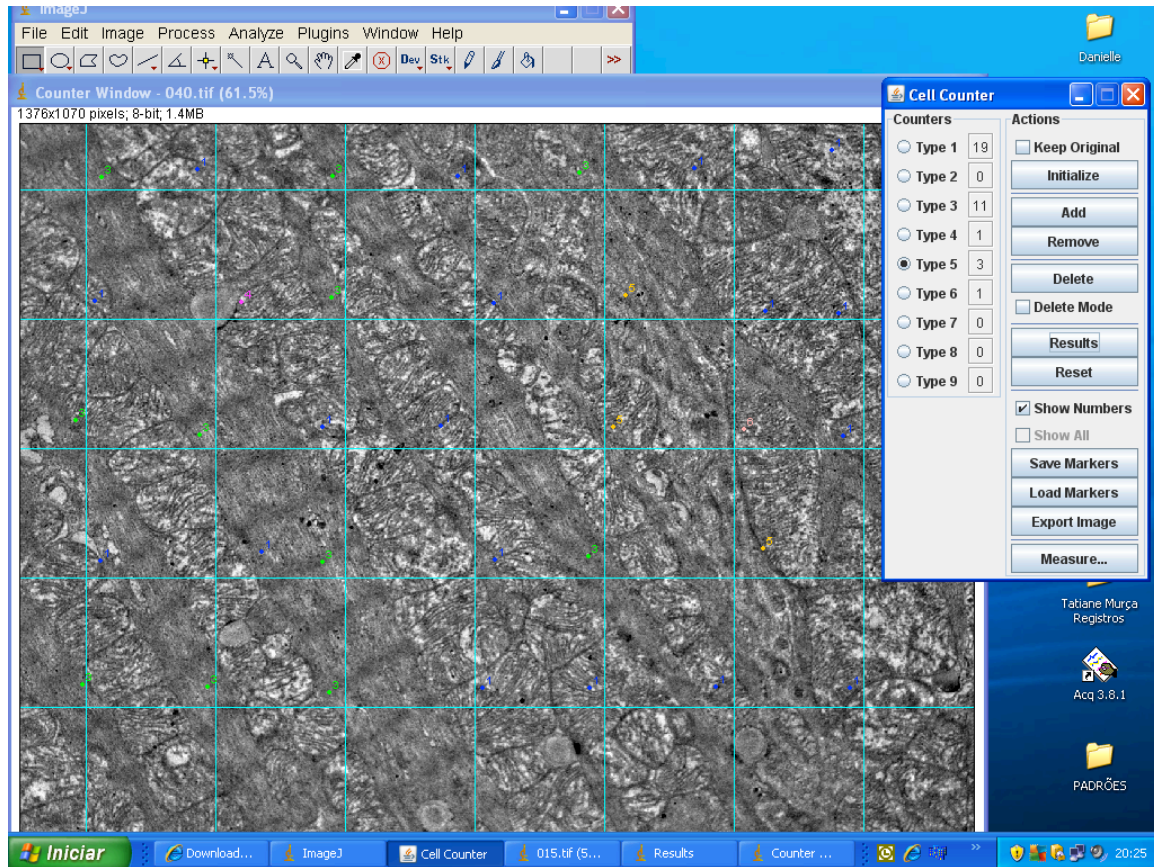


Figura 3 – Imagem representativa da metodologia aplicada para realização da quantificação das estruturas através da microscopia eletrônica de transmissão.

4.5 Western Blotting

Fragments de corações foram homogeneizados em tampão de lise (NaCl 100mM; Tris-base 50mM; EDTA-2Na 5mM; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ 50mM; MgCl_2 1mM pH=8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%; Triton x-100 0,3% e Sodium deoxycholate 0,5%) contendo inibidores de proteases (PMSF 200mM; benzamidina 15,7mg/mL e pepstatina 10 μM) e inibidores de fosfatases (NaF 20mM e Na_3VO_4 1mM). Ao fim deste processo, o conteúdo foi centrifugado por

12 minutos a 4°C e a 8.000 rpm. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford et al., 1976). Trinta microgramas de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris 2M pH=6.8, Glicerol 20%, SDS 30%, β -mercaptoetanol 25% e Azul de Bromofenol 0,1%) para separação em gel de SDS-PAGE [sodiumdodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida] na concentração de 10-15%, dependendo da massa molecular da proteína estudada, e gel de concentração a 4%. Para controle do peso molecular das proteínas foi utilizado um padrão de peso molecular (BIO-RAD). Após a separação das proteínas em gel, elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). As membranas foram lavadas com PBS-Tween ou TBS-Tween e colocadas por 1 hora em solução de bloqueio (PBS-Tween ou TBS-Tween com 5% de leite desnatado) a fim de bloquear ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* em câmara fria (4°C) com um dos seguintes anticorpos primários: anti-AMPK α fosforilada (n=5 WT e n=6 KO, 1:250, Cat# 9957, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-AMPK β_1 fosforilada (n=6 WT e n=5 KO, 1:1000, Cat# 9957, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-total AMPK α (n=5 WT e n=6 KO, 1:500, Cat# 9957, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-total AMPK β_1 (n=6 WT e n=5 KO, 1:2000, Cat# 9957, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-ERK1/2 fosforilada (n=4 WT e n=5 KO, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-total ERK1/2 (n=4 WT e n=5 KO, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); anti-p38 fosforilada (n=4 WT e n=5 KO, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); ou anti-total p38 (n=4 WT e n=5 KO, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA). Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS ou TBS contendo 0,2% de Tween 20 (5 vezes por 5 minutos cada) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 ou Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000, Sigma). As membranas foram novamente lavadas com PBS-T (5 vezes por 5 minutos cada). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus – Amersham Biotechnology). A intensidade das

bandas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™. A expressão das proteínas foi normalizada através da relação proteína fosforilada/proteína total.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com a utilização do software Graph Pad Prism 5. O teste estatístico empregado para a comparação entre as médias dos grupos foi o teste *t* de Student não pareado. Todos os resultados foram considerados significativos quando o *p* foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos Dados do *Microarray*

A análise da expressão de aproximadamente 12.000 genes nos corações de camundongos deficientes para Mas através da técnica do *Microarray* realizada pelo grupo do Dr. Michael Bader do Max-Delbrück Center, Berlim – Alemanha revelou que a expressão de 272 genes estava alterada nestes animais. Dentre estes genes, 181 estavam super expressos e 91 estavam com a sua expressão reduzida. Este resultado demonstra a eficiência desta técnica, pois foi possível excluir mais de 97% dos genes analisados utilizando apenas um protocolo experimental.

5.2 Identificação de Possíveis Vias de Sinalização Alteradas nos Camundongos Deficientes para o Mas

Embora a técnica de *microarray* tenha nos permitido reduzir o número de genes alvos para 272 (2,26% do total analisado), ainda assim este número é muito grande e a variedade de funções que eles estão envolvidos e as suas múltiplas correlações dificultaram a seleção de potenciais genes candidatos a serem mais profundamente explorados. Desta maneira, utilizamos de técnicas histológicas para identificar alguma alteração no coração dos animais KO que pudesse ser correlacionada com os diversos genes selecionados.

Inicialmente, a fim de avaliar as características gerais do coração do animal *Knockout* para o receptor de Ang-(1-7), realizamos medidas do peso do coração e do índice de massa cardíaca, através da relação peso do coração/comprimento da tíbia, além do peso corporal para as duas diferentes idades avaliadas. Os animais KO apresentaram redução do peso corporal quando comparado ao controle. Por outro lado, não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao peso do coração, comprimento da tíbia e a relação peso do coração/comprimento da tíbia (Tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal, peso do coração, comprimento da tíbia e relação peso do coração/comprimento da tíbia de camundongos WT e KO.

	3 Meses		6 Meses	
	WT	KO	WT	KO
Peso corporal (g)	24,4 ± 0,3	22,7 ± 0,6*	33,8±0,8	28,8±0,7*
Peso do coração (mg)	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,20±0,01	0,18 ± 0,01
CT (cm)	1,7 ± 0,02	1,6 ± 0,01	1,8 ± 0,01	1,8 ± 0,01
PC/CT (mg/cm)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,0	0,11±0,01	0,09 ± 0,01

Os dados são apresentados como média ± EPM. *p<0,05 comparado com os animais WT (Teste *t* de Student). n=7 para os animais de 3 meses e n=6 para os animais de 6 meses. PC: peso do coração e CT: comprimento da tíbia.

Sabendo que pequenas alterações durante a dissecação do coração podem afetar significativamente o peso do órgão, avaliamos o diâmetro dos cardiomiócitos através da técnica da morfometria utilizando cortes histológicos. Os resultados obtidos revelaram que os animais KO apresentam uma redução no diâmetro dos cardiomiócitos em relação aos controles nas duas idades estudadas (Figuras 4, 5, 6 e 7).

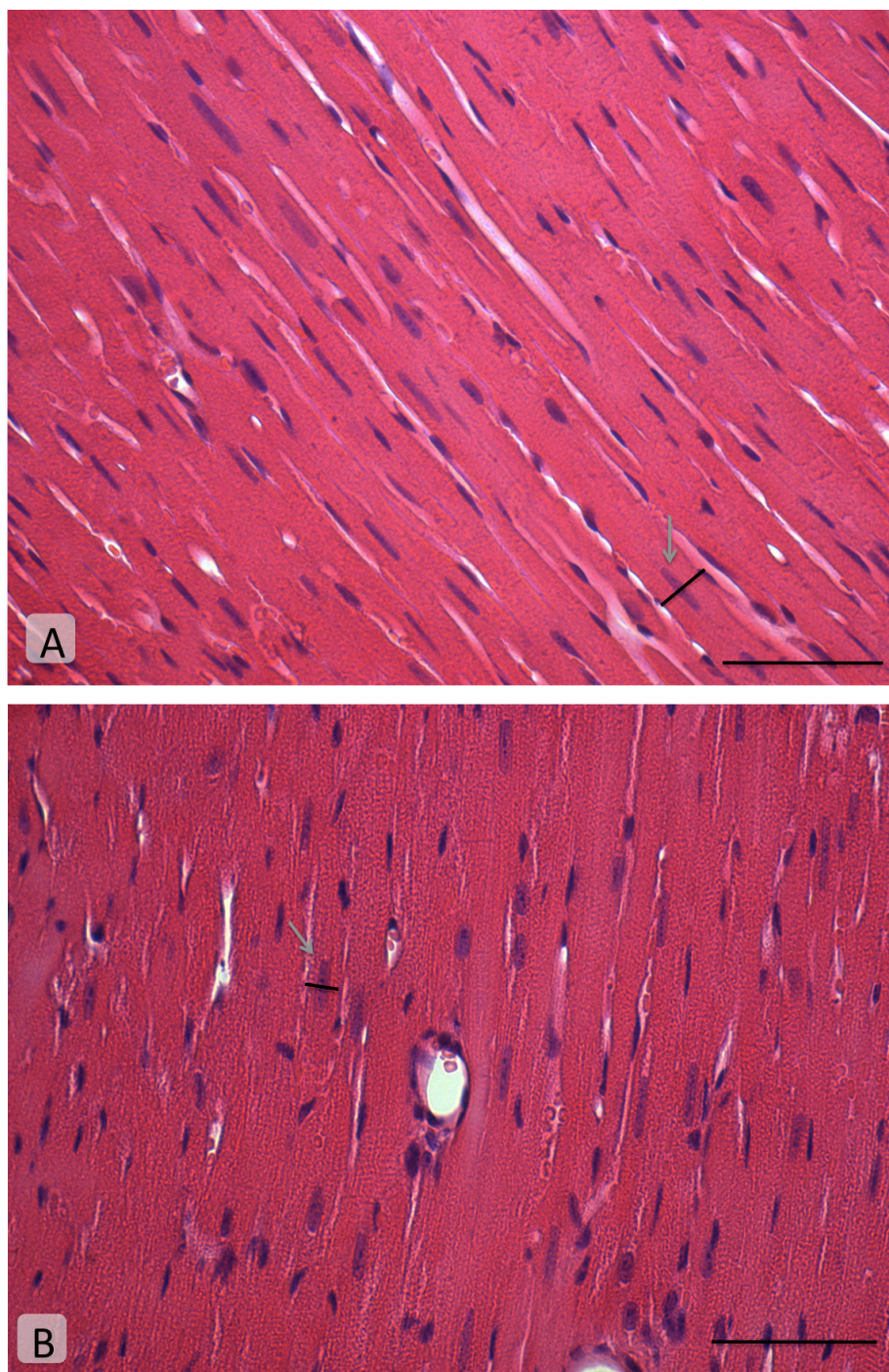


Figura 4: Fotomicrografias representativas de fibras cardíacas dispostas longitudinalmente de camundongos (A) selvagens e (B) *knockouts* com 12 semanas de idade. Coloração hematoxilina-eosina. Barra de escala de 50 μ m. Seta: diâmetro do cardiomiócito.

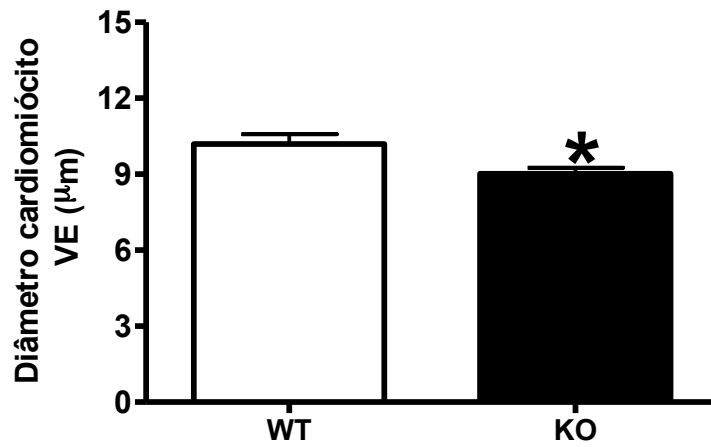


Figura 5: Diâmetro médio de cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo de animais selvagens (WT), n=5, e *knockouts* (KO), n=5, para o receptor Mas de Ang-(1-7) com 12 semanas de idade. Foram medidas aproximadamente 500 células por grupo. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. WT (Teste *t* de Student). VE=ventrículo esquerdo.

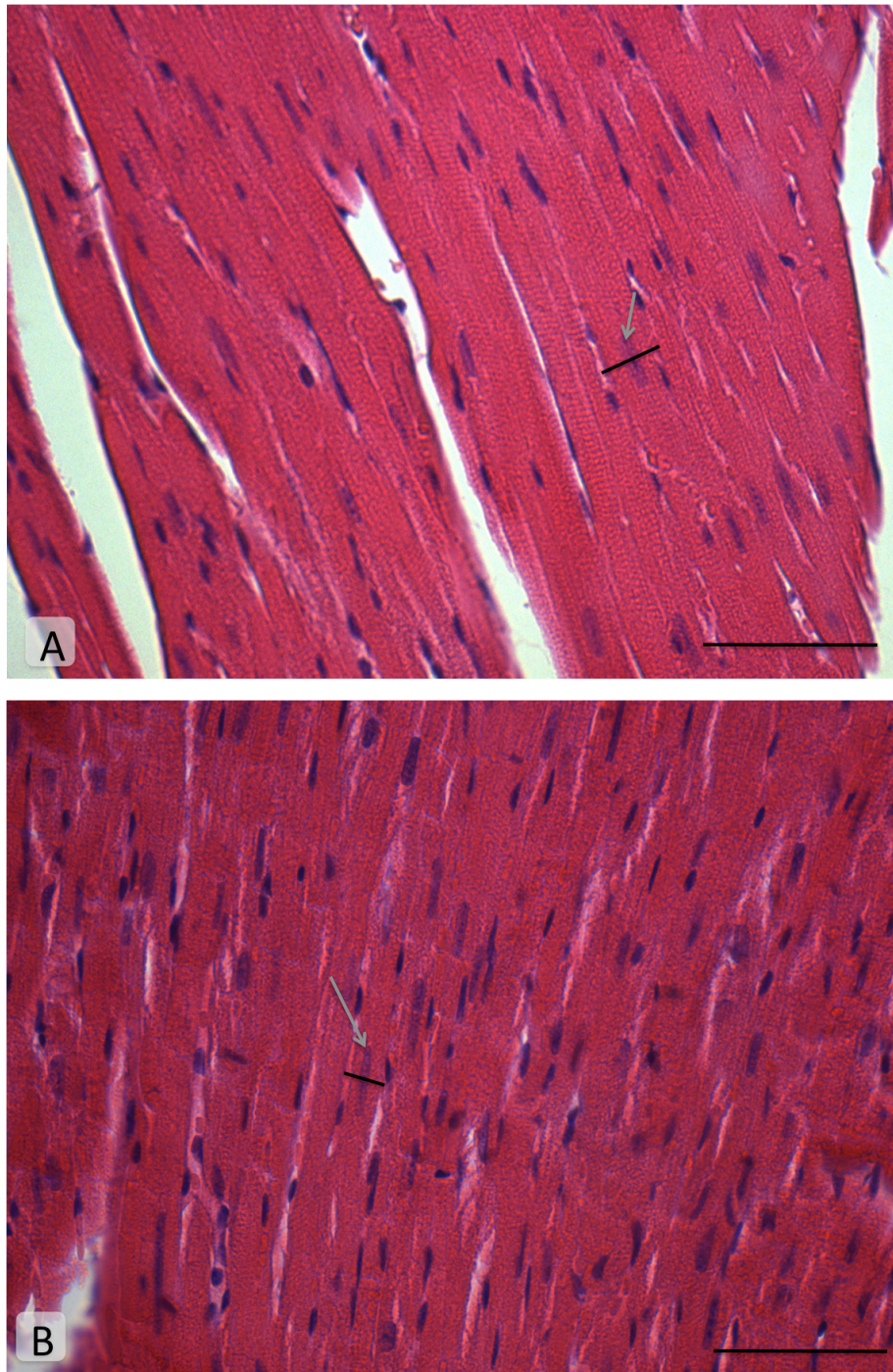


Figura 6: Fotomicrografias representativas de fibras cardíacas dispostas longitudinalmente de camundongos (A) selvagens e (B) *knockouts* com 24 semanas de idade. Coloração hematoxilina-eosina. Barra de escala de 50 μ m. Seta: diâmetro do cardiomiócito.

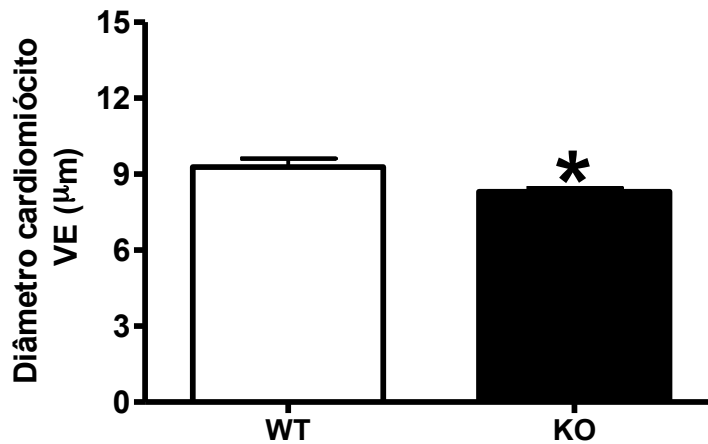


Figura 7: Diâmetro médio de cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo de animais selvagens (WT), n=4, e *knockouts* (KO), n=5, para o receptor Mas de Ang-(1-7) com 24 semanas de idade. Foram medidas aproximadamente 500 células por grupo. Os dados representam a média \pm EPM. *p<0.05 vs. WT (Teste t de Student). VE=ventrículo esquerdo.

Outra metodologia que utilizamos para identificar alterações nos corações dos animais KO que pudessem ser correlacionadas com os diversos genes selecionados foi a microscopia eletrônica de transmissão. Na avaliação da ultra estrutura dos animais discriminamos 8 diferentes estruturas: mitocôndrias, miofibrilas, túbulos T, matriz extracelular, núcleos, grânulos, vasos e artefatos. Dentre estas estruturas, a que apresentou uma alteração mais consistente foi a mitocôndria. Os animais KO apresentaram um maior número de mitocôndrias quando comparado com os selvagens, tanto nos camundongos com 12 semanas (Figuras 8 e 9) quanto nos de 24 semanas (Figuras 10 e 11).

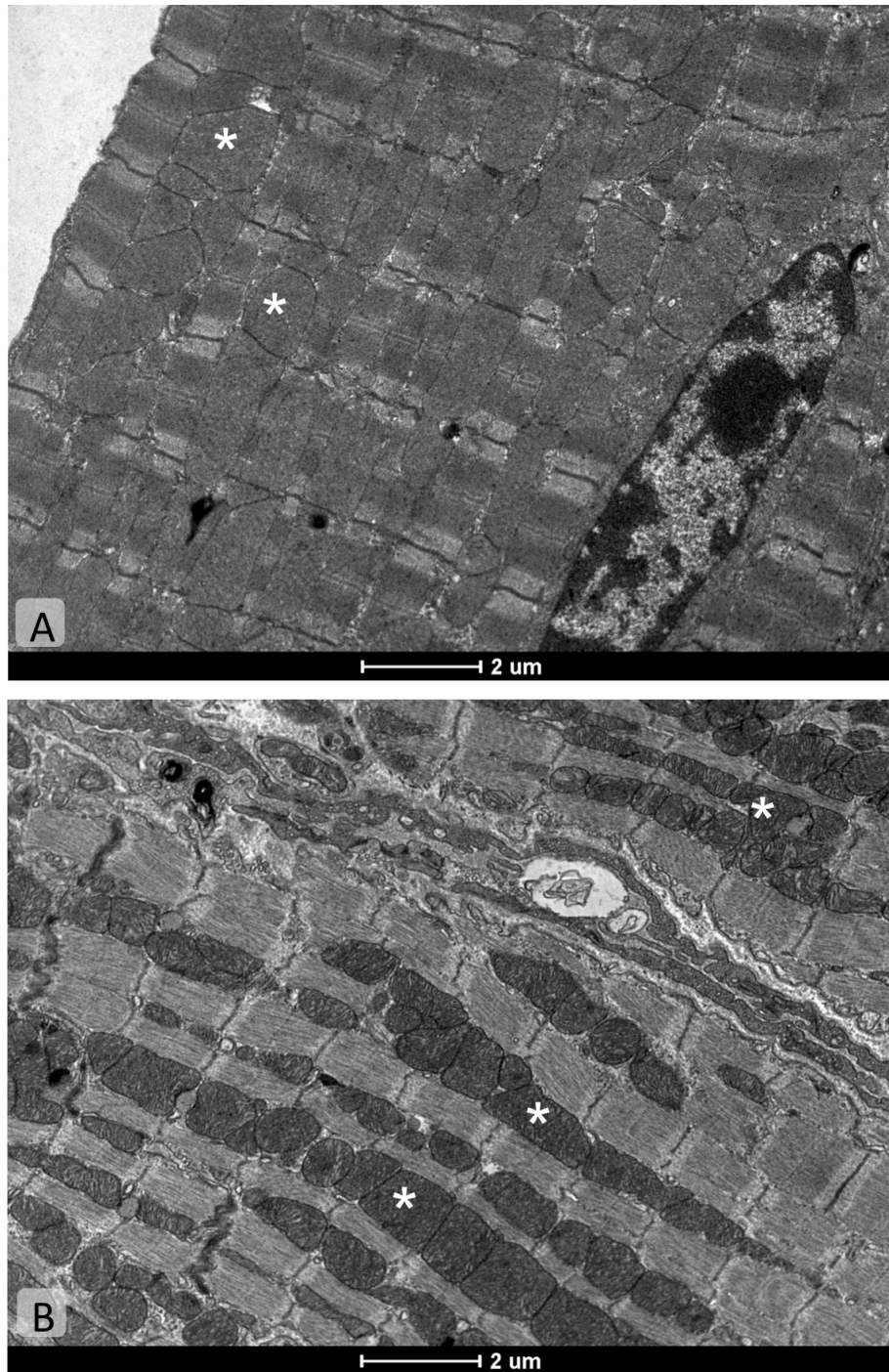


Figura 8: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão representativas de miocárdio de animais (A) selvagens e (B) *knockouts* com 12 semanas de idade. Os asteriscos brancos indicam mitocôndrias

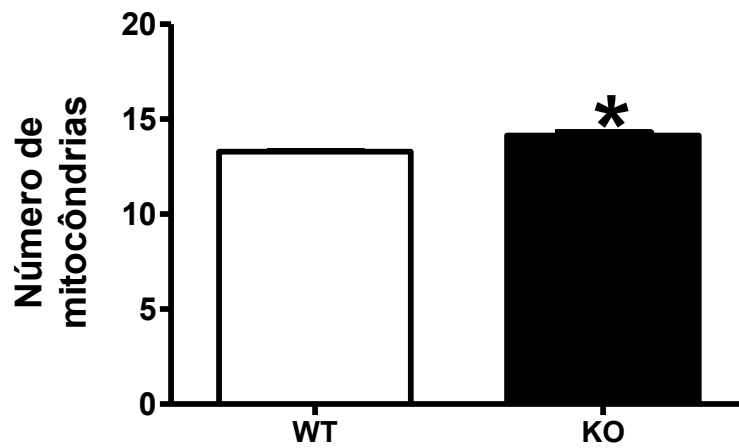
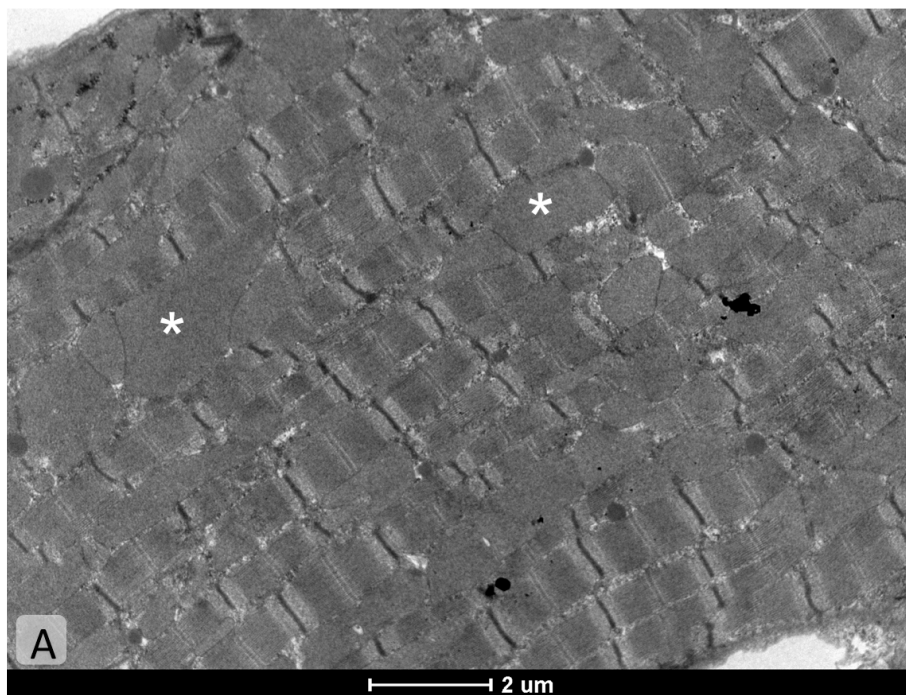


Figura 9: Número de mitocôndrias no coração de animais selvagens (WT), n=4, e *knockouts* (KO), n=4, na idade de 12 semanas. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. WT (Test *t* de Student).



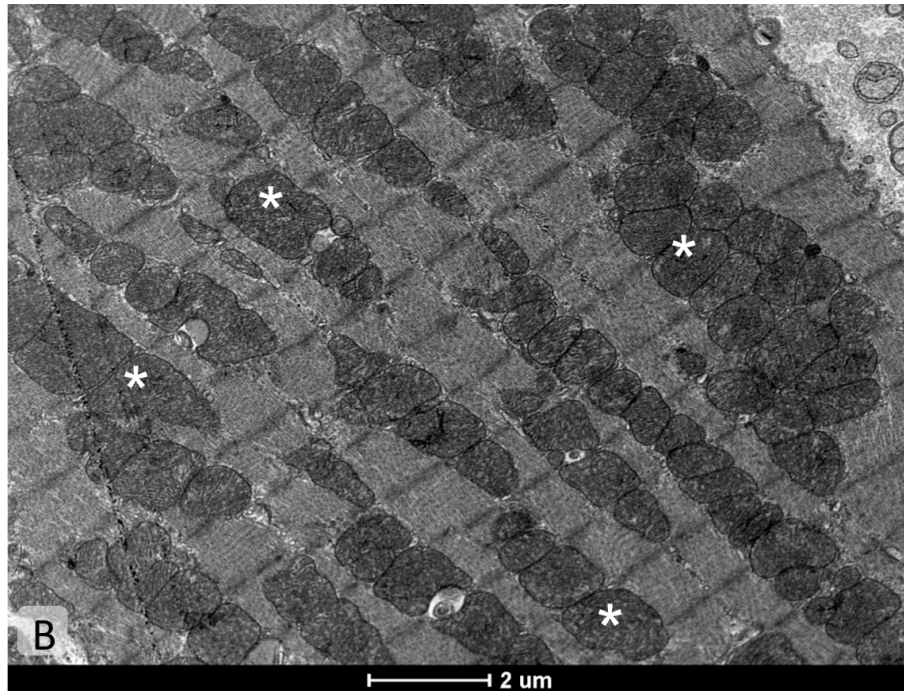


Figura 10: Fotomicrografias eletrônicas de transmissão representativas de miocárdio de animais (A) selvagens e (B) *knockouts* com 24 semanas de idade. Os asteriscos brancos indicam mitocôndrias

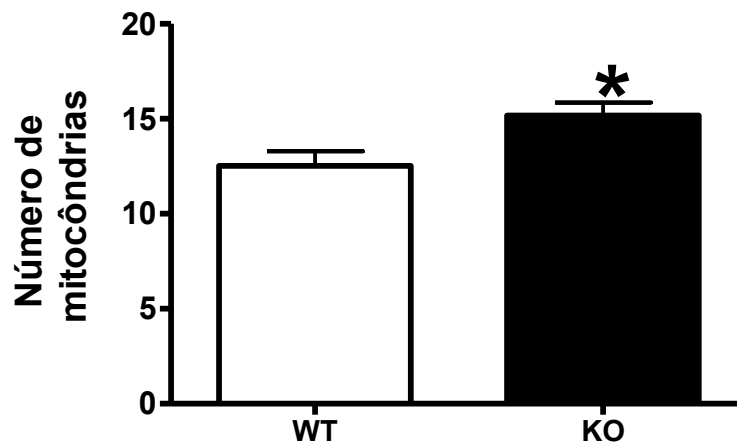


Figura 11: Número de mitocôndrias no coração de animais selvagens (WT), n=4, e *knockouts* (KO), n=4 na idade de 24 semanas. Os dados representam a média ± EPM. *p<0.05 vs. WT (Test *t* de Student).

Além das mitocôndrias, outras estruturas também foram quantificadas. Os grânulos e a matriz extracelular apresentaram-se aumentados nos animais KO com 12 semanas de idade (n=4) (Tabela 2). Já nos animais com 24 semanas, dentre as estruturas avaliadas, houve um aumento apenas no número de grânulos nos animais KO (n=4) (Tabela3).

Tabela 2: - Perfil volumétrico das estruturas analisadas através da MET nos animais com 12 semanas de idade.

	WT	KO
Miofibrilas	14,33 ± 0,55	12.40 ± 0.74
Túbulos T	0,89 ± 0,32	0,35 ± 0,12
Matriz extracelular	2,22 ± 0,40	4,11 ± 0,56 *
Grânulos	0,11 ± 0,08	0,71 ± 0,13 *
Núcleos	1,83 ± 0,17	1,08 ± 0,31
Vasos	0,73 ± 0,17	0,68 ± 0,12
Artefatos	0,73 ± 0,18	0,40 ± 0,10

Os dados representam a média ± EPM. *p<0.05 vs. WT (Teste *t* de Student)

Tabela 3: - Perfil volumétrico das estruturas analisadas através da MET nos animais com 24 semanas de idade.

	WT	KO
Miofibrilas	11,02 ± 1,24	10,53 ± 0,26
Túbulos T	1,18 ± 0,14	0,78 ± 0,12
Matriz extracelular	5,62 ± 0,87	5,49 ± 0,40
Grânulos	0,65 ± 0,06	1,08 ± 0,02 *
Núcleos	1,08 ± 0,31	0,47 ± 0,08
Vasos	0,61 ± 0,16	0,28 ± 0,19
Artefatos	0,63 ± 0,24	0,35 ± 0,11

Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. WT (Teste *t* de Student).

Diante destas alterações observadas nos animais deficientes para o Mas, realizamos uma reavaliação dos 272 genes selecionados pelo *microarray* utilizando como critério alguma possível correlação entre o SRA, metabolismo energético e estrutura cardíaca. Neste aspecto, dividimos os genes em dois grupos: um relacionado ao metabolismo energético com 34 genes (Tabela 4) e o outro relacionado à estrutura cardíaca com 15 genes (Tabela 5).

Tabela 4: Relação de genes selecionados a partir dos dados do *microarray* relacionados com o metabolismo energético.

Sigla	Nome	p
Genes com expressão reprimida		
Tst	Thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial	0,0490
Cry2	Cryptochrome 2 (photolyase-like)	0,0530
Osbpl11	Oxysterol binding protein-like 11	0,0422
Zfp259	Zinc finger protein 259	0,0139
Zfp292	Zinc finger protein 292	0,0442
Acads	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	0,0326
Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	0,0309
Atp5k	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e	0,0560
Kcnh2	Potassium voltage-gated channel, subfamily H(eag-related, member2)	0,0412
Genes com super expressão		
Cox17	Cytochrome c oxidase, subunit XVII assembly protein homolog (yeast)	0,0079
Bckdk	Branched chain ketoacid dehydrogenase kinase	0,0493
Adprh	ADP-ribosylarginine hydrolase	0,0559
Atp2a2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	0,0288
Hadhb	Hydroxyacyl-coenzymeA dehydrogenase/3-ketoacyl-coenzymeA thiola	0,0285
Pfkm	Phosphofructokinase, muscle	0,0313

Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	0,0548
Car4	Carbonic anhydrase 4	0,0007
Acads	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	0,0505
Atp5l	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g	0,0415
Atad1	ATPase family, AAA domain containing 1	0,0120
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0,0115
Idh2	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	0,0539
Mut	Methylmalonyl-coenzyme A mutase	0,0444
Mrps24	Mitochondrial ribosomal protein S24	0,0086
Dlat	Dyhydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydronase)	0,0338
Baz1b	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	0,0487
Rnf167	Ring finger protein 167	0,0054
Arfrp1	ADP-ribosylation factor related protein 1	0,0235
Abcb4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	0,0008
Kcnk3	Potassium channel, subfamily K, member 3	0,0534
Kcnd2	Potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	0,0304
Fah	Fumarylacetoacetate hydrolase	0,0503
Zfp62	Zinc finger protein 62	0,0518
Ard1	N-acetyltransferase ARD1 homolog (S. Cerevisiae)	0,0513

Tabela 5: Relação de genes selecionados a partir dos dados do *microarray* relacionados com a estrutura cardíaca.

Sigla	Nome	p
Genes com expressão reprimida		
Col14a1	Procollagen, type XVI, alpha 1	0,0336
Myo1d	Myosin ID	0,0231
Col6a2	Procollagen, type VI, alpha 2	0,0266

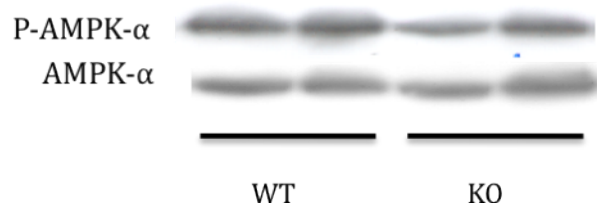
Genes com super expressão		
Map4k4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	0,0285
Itga7	Integrin alpha 7	0,0170
Kif5b	Kinesin family member 5B	0,0457
Pcdhga9/ Pcdhgb1	Protocadherin gamma subfamily A 9//protocadherin gamma subfamily	0,0449
Cdh5	Cadherin 5	0,0559
Lamc 1	Laminin gamma 1	0,0369
Myl7	Myosin, light polypeptide 7, regulatory	0,0136
Myl4	Myosin, light polypeptide 4	0,0371
Lamr1	Laminin receptor 1 (ribossomal protein SA)	
Catnb	Catenin beta	0,0135
Tubb2	Tubulin, beta2	0,0189
Actc1	Actin, alpha, cardiac	0,0038

5.3 Avaliação de Algumas Proteínas Relacionadas com as Alterações Gênicas Observadas nos Animais Deficientes para o Mas

A análise da expressão das proteínas AMPK α , AMPK β 1, ERK1/2 e p38 nos animais WT e KO foi realizada utilizando a técnica de western blotting. As AMPKs são proteínas sinalizadoras envolvidas no metabolismo energético celular através da regulação da síntese de ATP, enquanto as MAPKs estão envolvidas na regulação da estrutura das células. Os resultados obtidos mostraram que os níveis de fosforilação da AMPK α , a subunidade catalítica do complexo protéico, está significativamente diminuída nos animais KO em relação aos camundongos controles com 12 semanas de idade (Figura 12). Por outro lado, os níveis de fosforilação da AMPK β 1, uma subunidade regulatória do complexo protéico, apresentou um aumento significativo nos animais deficientes

para o Mas quando comparado com os animais WT com 12 semanas de idade (Figura 13).

A)



B)

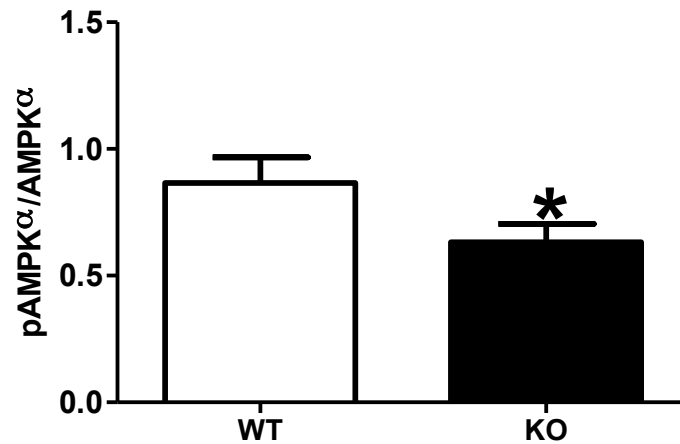
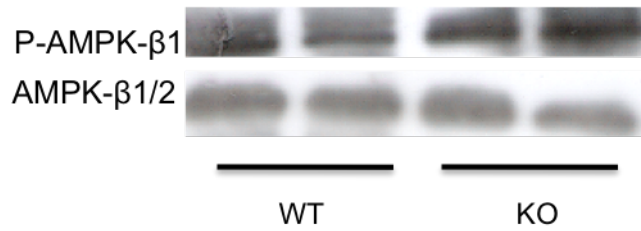


Figura 12: Níveis de fosforilação da proteína AMPK α em corações de camundongos WT (n=5) e KO (n=6) com 12 semanas de idade. A) Gel representativo do western blotting. (B) Análise quantitativa obtida através da relação densitométrica da forma fosforilada sobre a forma total da proteína. Os dados representam a média \pm EPM (Teste *t* de Student).

A)



B)

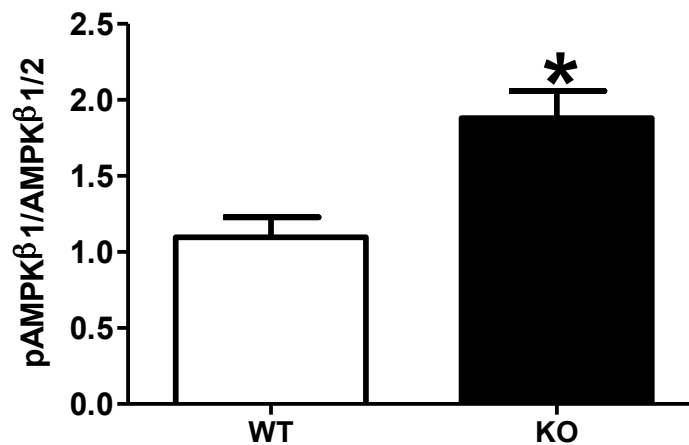
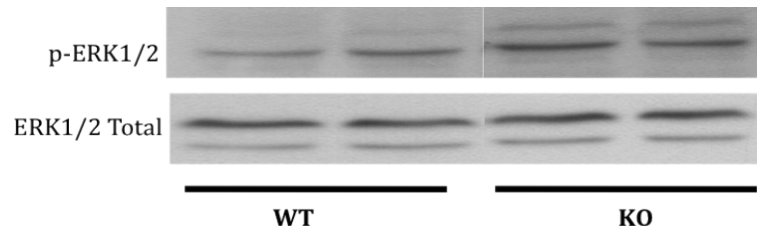


Figura 13: Níveis de fosforilação da proteína AMPKβ1 em corações de camundongos WT (n=6) e KO (n=5) com 12 semanas de idade. A) Gel representativo do western blotting. (B) Análise quantitativa obtida através da relação densitométrica da forma fosforilada sobre a forma total da proteína. Os dados representam a média ± EPM (Teste *t* de Student).

Em relação as MAPKs, os animais KO apresentaram um aumento significativo na expressão tanto da ERK1/2 (Figura 15) quanto da p38 (Figura 16) quando comparado com os animais controles com 12 semanas de idade.

A)



B)

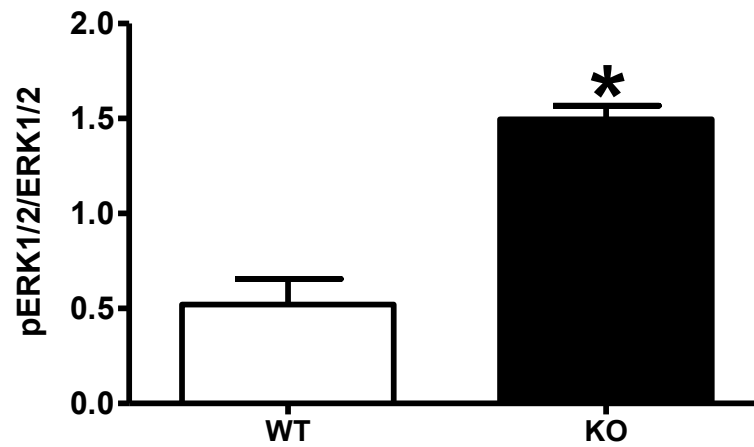
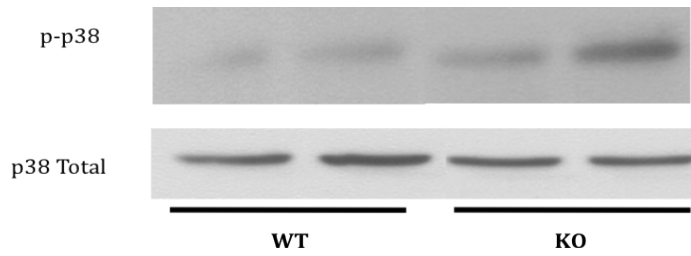


Figura 14: Níveis de fosforilação da proteína ERK1/2 em corações de camundongos WT (n=4) e KO (n=5) com 12 semanas de idade. A) Gel representativo do western blotting. (B) Análise quantitativa obtida através da relação densitométrica da forma fosforilada sobre a forma total da proteína. Os dados representam a média \pm EPM (Teste *t* de Student).

A)



B)

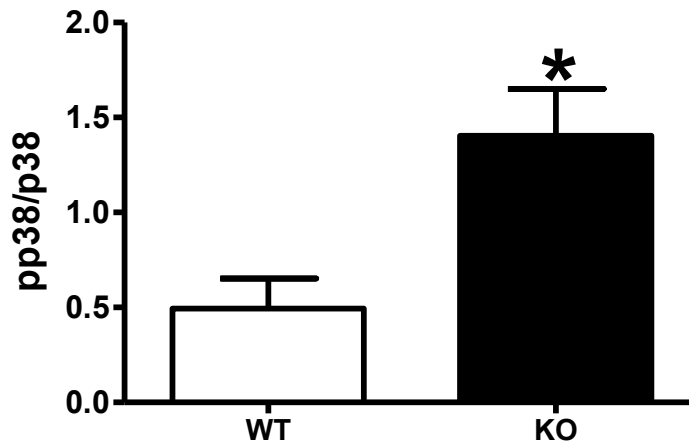


Figura 15: Níveis de fosforilação da proteína p38 em corações de camundongos WT (n=4) e KO (n=5) com 12 semanas de idade. A) Gel representativo do western blotting. (B) Análise quantitativa obtida através da relação densitométrica da forma fosforilada sobre a forma total da proteína. Os dados representam a média \pm EPM (Teste *t* de Student).

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, novos componentes têm sido acrescentados ao SRA ampliando o entendimento das patologias associadas a este sistema e criando boas perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas e terapias. Atualmente, a propedêutica mais adotada no tratamento das doenças cardíacas tem somente como alvo a Ang II através dos inibidores da ECA e dos antagonistas dos receptores AT₁. A Ang-(1-7), desde a sua descoberta na década de 80, tornou-se um centro de atenções de uma série de estudos envolvendo a fisiopatologia do sistema cardiovascular (Trask & Ferrario, 2007). Com as recentes descobertas do Mas como um receptor para este peptídeo e da ECA2, ambos completando o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, muitos esforços têm sido empregados no sentido de estabelecer este eixo como um regulador endógeno do eixo ECA/Ang II/AT₁. Definir o papel de cada elemento deste novo eixo é criar evidências que poderão nortear condutas mais específicas dentro da prática clínica (Ferreira & Santos, 2005).

O avanço da tecnologia e o desenvolvimento de novas técnicas experimentais, especialmente aquelas envolvendo a genética de animais de experimentação, como os modelos de animais transgênicos (*knockouts* ou com super expressão de algum gene), têm sido catalisadores do entendimento do papel de diversos componentes do SRA no organismo, como, por exemplo, o modelo de deleção do receptor Mas desenvolvido por Walther et al., 1998. No presente estudo utilizamos este modelo com o objetivo de identificar possíveis proteínas sinalizadoras no coração que possam estar envolvidas na regulação da estrutura e da função cardíaca mediada pela Ang-(1-7) via Mas. Assim, amostras de tecido cardíaco destes animais foram submetidas à técnica do *microarray* onde detectamos, dentre os milhares de genes analisados, uma porcentagem de 2,26% genes alterados (reprimidos ou super expressos). No entanto, apesar de termos conseguido uma expressiva redução na quantidade de genes candidatos a um estudo mais detalhado (mais de 97%), ainda assim outras estratégias foram necessárias para refinar a nossa busca por proteínas

alvos relacionadas com as disfunções cardíacas dos camundongos Mas KO, uma vez que a porcentagem 2,26% representa 272 genes.

Na avaliação das características gerais dos animais *Knockout* para o receptor de Ang-(1-7) detectamos que camundongos nas duas diferentes idades avaliadas (12 e 24 semanas) apresentam uma redução do peso corporal quando comparado aos controles. Esta alteração no peso corporal sugere que estes animais apresentam um distúrbio no seu metabolismo basal. De fato, Santos et al., 2008, demonstraram que estes animais possuem diversas alterações metabólicas que caracterizam um quadro de síndrome metabólica o que pode contribuir para a diferença de peso corporal observada.

Afim de investigar melhor as características dos corações dos camundongos com deleção do receptor Mas, realizamos uma avaliação morfométrica dos cardiomiócitos destes animais, uma vez que não observamos diferenças significativas entre os grupos no que se refere ao peso do coração e à relação peso do coração/comprimento da tibia. Assim, a análise histológica dos ventrículos esquerdos demonstrou uma redução no diâmetro dos cardiomiócitos nos animais KO nas idades de 12 e 24 semanas. Por outro lado, Santos et al., 2006, mostraram que estes animais apresentam uma grande alteração na expressão de proteínas da MEC resultado em um perfil pró-fibrótico. Especificamente, estes animais apresentam um aumento na expressão dos colágenos tipos I e III e da fibronectina e uma redução na expressão do colágeno tipo VI. Assim, em conjunto, estes dados demonstram que a ausência de alterações no peso do coração e na relação peso do coração/comprimento da tibia é o resultado da mudança em direções opostas do aumento da fibrose e da diminuição do diâmetro dos cardiomiócitos. É importante ressaltar que ambas as alterações podem contribuir para a disfunção cardíaca verificada nestes animais (Castro et al., 2006; Santos et al., 2006).

Ainda com o objetivo de refinar a nossa busca por potenciais genes que poderiam estar envolvidos nas alterações cardíacas observadas nos animais Mas KO, realizamos uma análise ultra estrutural dos corações destes animais. Nesta avaliação focamos nos seguintes parâmetros: mitocôndrias, miofibrilas,

túbulos T, matriz extracelular, núcleos, grânulos e vasos. Dentre estas estruturas, o parâmetro que apresentou um resultado mais consistente foi o número de mitocôndrias, importante organela celular envolvida na respiração celular e no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos. Desta maneira, os animais KO nas duas idades estudadas apresentaram um número aumentado de mitocôndrias. O coração por depender muito do metabolismo oxidativo para o seu funcionamento apresenta uma forte dependência do funcionamento e da estrutura das mitocôndrias (DiMauro et al., 1998; Weiwei et al., 2008; Hurley et al., 2010). Em relação às outras estruturas, os dados não foram conclusivos devido, principalmente, à qualidade da fixação dos tecidos, o que pode ter gerado um resultado sub ou super estimado. Assim, preferimos trabalhar apenas com o número de mitocôndrias por ser um dado que independe parcialmente da qualidade da fixação.

Frente a estes dados obtidos com as análises da estrutura e da ultra estrutura do coração dos animais KO, reavaliamos os 272 genes selecionados com o objetivo de identificar aqueles genes que poderiam estar relacionados com as alterações estruturais e metabólicas observadas nestes animais. Assim, selecionamos 49 genes (18% do total), sendo que 15 (5,51%) estavam relacionados com a estrutura cardíaca e 34 (12,5% do total) estavam envolvidos com o metabolismo energético.

O próximo passo natural do nosso trabalho foi investigar mais detalhadamente vias de sinalização intracelular relacionadas com a integridade da estrutura e metabolismo energético do coração. Assim, utilizamos a técnica de western blotting para avaliar a expressão das proteínas AMPK α , AMPK β 1, ERK1/2 e p38, sendo que as duas primeiras estão relacionadas com o metabolismo energético e as duas últimas com a estrutura cardíaca.

A AMPK é considerada um sensor do equilíbrio energético da célula e, por isto, está diretamente relacionada com a síntese de ATP (Zhang et al., 2006). Nossos resultados revelaram que a AMPK α , a subunidade catalítica do complexo protéico, está significativamente diminuída nos animais KO. Por outro lado, a expressão da AMPK β 1, uma subunidade regulatória do complexo

protéico, apresentou um aumento significativo nos animais deficientes para o Mas quando comparado com os animais WT na idade de 12 semanas. Estes dados mostram que a produção e/ou consumo de ATP podem estar alterados nestes animais. Sabendo que a ativação da AMPK é importante na prevenção da disfunção cardíaca pós-isquêmica (Daniels et al., 2010; Paiva et al., 2011), os nossos dados sugerem que as injúrias de isquemia/reperfusão observadas nos camundongos KO (Castro et al., 2006) podem estar relacionadas com as alterações na expressão destas quinases. De fato, o efeito antiarritmogênico e as ações benéficas da Ang-(1-7) na isquemia/reperfusão são bloqueados pelo antagonista específico do receptor Mas o A-779 (Ferreira et al., 2001; Ferreira et al., 2002; De Mello et al., 2004 e 2007), sugerindo uma relação entre Ang-(1-7), Mas e AMPK.

A via de sinalização das MAPK consiste de pelo menos três grandes famílias (ERK1/2, p38 e JNK). As análises de western blotting mostraram que tanto as proteínas ERK1/2 e p38 apresentaram-se aumentadas nos animais *knockouts* para o Mas. Essas proteínas são ativadas pela Ang II/AT₁ (Li et al., 2011) e podem induzir um acúmulo de matriz extracelular, o que pode contribuir para a insuficiência cardíaca. Por outro lado, essa situação pode ser inibida pela ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas (Ferreira et al., 2011). Assim, a Ang-(1-7), atuando via Mas, inibe a expressão das MAPKs levando a uma redução na expressão de proteínas da matriz extracelular (Santos et al., 2006) e, possivelmente, na síntese de proteínas levando a um efeito anti-trófico (Tallant et al., 2005, Iwata et al., 2005).

Em resumo, este estudo reforça a importância do papel biológico da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular via receptor Mas. A deleção genética do Mas leva a diversas alterações nas cascatas de sinalização intracelular, como as das proteínas AMPKs e MAPKs, o que pode contribuir para os distúrbios estruturais e funcionais observados nos corações dos animais KO.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que o eixo Ang-(1-7)/Mas está diretamente envolvido na manutenção da estrutura e do metabolismo energético celular do coração, possivelmente através das vias de sinalização celular MAPK e AMPK.

8. PERSPECTIVAS

São perspectivas deste trabalho:

- Validar os dados do *microarray* através da técnica do Real time PCR.
- Avaliar outras proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e na produção de ATP, assim como na função mitocondrial, nos animais KO.
- Avaliar os níveis de ATP e de ácidos graxos nos corações dos animais KO.
- Avaliar a atividade de canais de potássio dependentes de ATP nos animais KO.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Ubaidi M.R., D. Brock et al. (1992). "Assignment of the homolog of the MAS1 oncogene to mouse chromosome 17. *Genomics*. 13(2):487.

Arrighi J.F., M. Rebsamen et al. (2001). "A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers." *J Immunol*. 15;166(6):3837-45.

Bevilaqua E.R., C. Kushmerick et al. (2002). "Angiotensin 1-7 increases quantal content and facilitation at the frog neuromuscular junction." *Brain Res*. 15;927(2):208-11.

Bojestig, M., F. H. Nystrom, et al. (2000). "The renin-angiotensin-aldosterone system is suppressed in adults with Type 1 diabetes." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1(4): 353-356.

Bradford M.M.(1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*. 7;72:248-54.

Carling D." AMPK" *Curr Biol*. 23;14(6):R220.

Castro, C. H., R. A. S. Santos, et al. (2006). "Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart." *Life Sciences* 80(3): 264-268.

Cebra-Thomas J.A., J.Y. Tsai et al. (1992). "Localization of the Mas proto-oncogene to a densely marked region of mouse chromosome 17 associated with

genomic imprinting. *Genomics*.13(2):444-6. Erratum in: *Genomics* 1992 Sep;14(1):208.

Chen Z., J.S. Stamler. (2005). "Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase." *Trends Cardiovasc Med*. 2006 Nov;16(8):259-65.

Chiarini-Garcia H, G. G. Parreira et al. (2011). "Glycol Methacrylate Embedding for Improved Morphological, Morphometrical, and Immunohistochemical Investigations Under Light Microscopy: Testes as a Model." *Methods in Molecular Biology*.689(1): 3-18.

da Silva Xavier G., I. Leclerc et al.(2003). "Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochem J*. 1;371(Pt 3):761-74.

Daly P., J.L. Rouleau et al. (1984). "Acute effects of captopril on the coronary circulation of patients with hypertension and angina." *Am J Med*. 31;76(5B):111-5.

Daniels A., B. M. van et al. (2010). "Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling." *Acta Physiol (Oxf)*. 200(1):11-22.

Dias-Peixoto M. F., R..A.S. Santos. (2008). " Molecular Mechanisms Involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Pathway in Cardiomyocytes". *Hypertension* 52;542-548.

DiMauro S, M Hirano. (1998). "Mitochondria and heart disease". *Curr Opin Cardiol*. 13(3):190-7.

De Mello W.C..(2004).” Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump.” J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 5(4):203-8.

De Mello W.C., C.M. Ferrario et al.(2007). Beneficial versus harmful effects of Angiotensin (1-7) on impulse propagation and cardiac arrhythmias in the failing heart.“ J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 8(2):74-80.

Donoghue, M., F. Hsieh, et al. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." *Circ Res* 87(5): E1-9.

Fan W., K.G. Waymire et al. (2008). “A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*. 15;319(5865):958-62.

Ferrario, C. M., M. C. Chappell, et al. (1998). "Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis." *J Am Soc Nephrol* 9(9): 1716-1722.

Ferreira, A. J., R. A. Santos, et al. (2001). "Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion." *Hypertension* 38(3 Pt 2): 665-668.

Ferreira, A. J., R. A. Santos (2005). "Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)." *Braz J Med Biol Res* 38(4): 499-507.

Ferreira, A. J., T. L. Oliveira, et al. (2007). "Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991." *Life Sci* 81(11): 916-923.

Ferreira, A. J., V. Shenoy, et al. (2009). "Evidence for Angiotensin-converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Pulmonary

Hypertension." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 179(11): 1048-1054.

Ferreira A.J., R.A.S. Santos et al. (2009)." Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. Hypertension.55(2"):207-13.

Ferreira A.J., V. Shenoy. et al. (2010) Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases.Exp Physiol;96(3):287-94

Ferreira A.J., C.H. Castro et al. (2010). Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart." Ther Adv Cardiovasc Dis.4(2):83-96.

Ferreira, A. J., V. Shenoy, et al. (2011). "Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases." Exp Physiol 96(3): 287-294.

Fraga-Silva R.A., B.S. Sorg, et al. (2010). ACE2 activation promotes antithrombotic activity." Mol Med.16(5-6):210-5.

Fukuda N., Y. Kusakari et al. (2001). "[Regulation of Ca²⁺ sensitivity of contractile elements in cardiac muscle]." Clin Calcium. 11(6):707-13. Japanese.

Fyhrquist. F., O. Saijonmaa.(2008) "Renin-angiotensin system revisited." Journal of Internal Medicine 264; 224–236

Gembardt, F., D. Westermann, et al. (2003). "Deficiency in the G protein-coupled receptor Mas leads to cardiomyopathy and demonstrates the importance of the endogenous ligand angiotensin-(1-7) for the cardiac function." Naunyn-

Gendron L., L. Laflamme et al. (1999). "Signals from the AT₂ (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells." *Mol Endocrinol.* 13(9):1615-26.

Giordano F.J.(2005) "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." *J Clin Invest.* 115(3):500-8.

Gironacci M.M., E. Adler-Graschinsky et al.(1994). "Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [3H]norepinephrine from rat atria." *Hypertension.* 24(4):457-60.

Hardie D.G., D. Carling. (1997). "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" *Eur J Biochem.* 1;246(2):259-73.

Hoehn K.L., N. Turner et al. (2010). "Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity." *Cell Metab.* 11(1):70-6.

Holmes B.F., E.J. Kurth-Kraczek et al. (1999). "Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle." *J Appl Physiol.* 87(5):1990-5.

Hurley T.D., S .Perez-Miller et al.(2010)." Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant." *Nat Struct Mol Biol.* 17(2):159-64.

Iwata M., R.T. Cowling et al. (2005). "Angiotensin-(1-7) binds to specific

receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(6):H2356-63.

Kiribayashi K., T. Masaki et al.(2005). "Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK." *Kidney Int.* 67(3):1126-35. Erratum in: *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2934.

Kobori, H., M. Nangaku, et al. (2007). "The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease." *Pharmacol Rev* 59(3): 251-287.

Lapteva N., M. Nieda et al. (2001). "Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray." *Biochem Biophys Res Commun.* 27;285(4):1059-65.

Leal M.C., S.V. Pinheiro, A.J. Ferreira et al. (2009). "The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats." *J Anat.*;214(5):736-43.

Li L., D Fan et al. (2011). "Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF- β 1 pathways in cardiac fibroblasts." *Cardiovasc Res.* 91(1):80-9

Long Y.C., B.R. Barnes et al. (2005). "Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle." *Diabetologia.* 48(11):2354-64.

Luhtala S, A Vaajanen et al. (2009). "Activities of angiotensin-converting enzymes ACE1 and ACE2 and inhibition by bioactive peptides in porcine ocular tissues." *J Ocul Pharmacol Ther.*25(1):23-8.

M. Yu, K. S. Nigel et al. (2003). "Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise" *J Physiol* 546.2, pp. 327–335

Manning A.S., D.J. Hearse. "Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention." *J Mol Cell Cardiol.* 16(6):497-518.

Marín-García J., M.J. Goldenthal. (2008). "Mitochondrial centrality in heart failure." *Heart Fail Rev.* 13(2):137-50.

Metzger R., C. Keuneke et al. (1995). "Converting enzyme inhibitors differentially affect expression of genes of the renin-angiotensin system." *Clin Exp Hypertens.* 17(3):551-74.

Metzger R., M. Stoll et al. (1995). "The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells." *J Clin Invest.* 95(2):651-7.

Motoshima H., B.J. Goldstein et al. (2006). "AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer." *J Physiol.* 1;574(Pt 1):63-71.

Mu J., J.T. Brozinick et al (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." *Mol Cell.* 7(5):1085-94.

Nadu A.P., A.J. Ferreira et al. (2008). "Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR(A1-7)3292 rats." *J Am Soc Hypertens;* 2(5):341-8.

Nahmod K.A., M.E. Vermeulen et al. (2003). "Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II." *FASEB J.* 17(3):491-3.

Nakahara T., H. Uchi et al. (2004). "Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *Int Immunol.* 16(12):1701-9.

Ojuka E.O., L.A. Nolte et al. (2000). "Increased expression of GLUT-4 and hexokinase in rat epitrochlearis muscles exposed to AICAR in vitro." *J Appl Physiol.* 88(3):1072-5.

Paiva M.A., Z. Rutter-Locher, et al. (2011). "Enhancing AMPK activation during ischemia protects the diabetic heart against reperfusion injury." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300(6):H2123-34.

Rabin M., D. Birnbaum et al. (1987). "Human ros1 and mas1 oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements." *Oncogene Res.* 1(2):169-78.

Salt I.P., G. Johnson et al. (1998). "AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release." *Biochem J.* 1;335 (Pt 3):533-9.

Sampaio W.O, R.A. Souza dos Santos et al. (2007). "Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways." *Hypertension.* 49(1):185-92.

Santos, R. A., J. M. Brum, et al. (1990). "The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs." *Hypertension* 15(2 Suppl): I121-127.

Santos, R. A. and M. J. Campagnole-Santos (1994). "Central and peripheral actions of angiotensin- (1-7)." *Braz J Med Biol Res* 27(4): 1033-1047.

Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, et al. (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." *Regul Pept* 91(1-3): 45-62.

Santos, R. A. S., A. C. S. e Silva, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(14): 8258-8263.

Santos R.A.S., M. J. Campagnole-Santos, et al. (2006). "The Renin-Angiotensin System: Emerging Concepts". *Current Hypertension Reviews*. 2(3) 1573-4021

Santos S. H. S., J. F. Braga, et al. (2010). "Improved Lipid and Glucose Metabolism in Transgenic Rats With Increased Circulating Angiotensin-(1-7) " *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30;953-961.

Santos S. H. S., L. R. Fernandes et al. (2008). "Mas Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism" *DIABETES*. 57

Scheuren N., M. Jacobs et al. (2002). "Cyclooxygenase-2 in myocardium stimulation by angiotensin-II in cultured cardiac fibroblasts and role at acute myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol*. 34(1):29-37.

Senanayake P., J. Drazba et al. (2007). Angiotensin II and its receptor subtypes in the human retina". *Invest Ophthalmol Vis Sci*.48(7):3301-11.

Shenoy V., A.J. Ferreira et al. (2010)." The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*.15;182(8):1065-

72.

Sramek S.J., I.H. Wallow et al. (1988).” Ocular renin-angiotensin: immunohistochemical evidence for the presence of prorenin in eye tissue.” Invest Ophthalmol Vis Sci. 29(11):1749-52.

Stapleton D., K.I. Mitchelhill et al. (1996). “Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily.” J Biol Chem. 271(2):611-4.

Szöcs K., B. Lassègue et al. (2007). “Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation.” J Mol Cell Cardiol. 42(6):1111-8.

Tallant E.A., C.M. Ferrario et al. (2005).” Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor.” Am J Physiol Heart Circ Physiol. 289(4):H1560-6

Tipnis S.R., N.M. Hooper et al. (2000).” A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem. 275(43):33238-43.

Trask A.J., C.M. Ferrario. “Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments.” Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments.” Cardiovasc Drug Rev. 2007 Summer;25(2):162-74.

Tristano A. G., A. M. Castejon et al. (2007). Effects of statin treatment and withdrawal on angiotensin II-induced phosphorylation of p38 MAPK and ERK1/2 in cultured vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;353(1):11-7

Vaajanen A., E. Mervaala, et al. (2008). "Is There a Relationship Between Blood Pressure and Intraocular Pressure? An Experimental Study in Hypertensive Rats". *Current Eye Research* 33(4): 325-332.

Vaajanen A., S. Luhtala et al. (2008). Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure? *Ann Med.*40(6):418-27.

Vaajanen A., P. Lakkisto et al. (2010). "Angiotensin receptors in the eyes of arterial hypertensive rats. *Acta Ophthalmol.* 88(4):431-8.

Wallace D.C.(1999)." Mitochondrial diseases in man and mouse." *Science.* 5;283(5407):1482-8.

Walther T., N. Wessel et al. (2000). "Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene." *Braz J Med Biol Res.* 33(1):1-9.

Wang X., L. Zhou et al. (2007). "Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 12;352(2):463-8.

Weber J.(2007). "ATP synthase--the structure of the stator stalk." *Trends Biochem Sci.* 32(2):53-6.

Wenzel P., S. Schuhmacher et al. (2008). "Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction." *Cardiovasc Res.* 1;80(2):280-9.

Winder W.W., B.F. Holmes et al. (2000). "Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle." *J Appl Physiol.* 88(6):2219-26.

Woods A., D. Azzout-Marniche et al. (2000). "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase." *Mol Cell Biol.* 20(18):6704-11.

Xi X., J. Han et al. (2001). "Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem.* 276(44):41029-34.

Yamazato Y, A.J. Ferreira et al. (2009). "Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer". *Hypertension.* 54(2):365-71.

Young D., G. Waitches et al.(1986). "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains." *Cell.* 6;45(5):711-9.

Zeng W, W. Chen et al. (2009). "Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in rabbits." *Biochem Biophys Res Commun* ;389(1):138-44.

Zhang B.B., G. Zhou et al. (2009). "AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome." *Cell Metab.* 9(5):407-16.

Zhang L., M. Frederich et al. (2006). "Relationship between 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribotide and AMP-activated protein kinase activity in the perfused

mouse heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290(3):H1235-43.

Zohn I.E., M. Symons et al.(1998). "Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac." Mol Cell Biol.18(3):1225-35.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 130/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Identificação de possíveis alterações na expressão de proteínas sinalizadoras em corações de camundongos Knockout para o receptor MAS de Angiotensina - (1-7)**", que tem como responsável(is) **Anderson José Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 06/2011**.

Este certificado expira-se em **22/ 06/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 130/2011**, related to the project entitled "**Identification of possible alterations in expression of signaling proteins in hearts of MAS knockout mice**", under the supervisors of **Anderson José Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 22, 2011**.

This certificate expires in **June 22, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Junho de 2011.


Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)