

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

***“AVALIAÇÃO DA CARDIOPROTEÇÃO EM RATOS QUE
EXPRESSAM UMA PROTEÍNA DE FUSÃO PRODUTORA DE
ANGIOTENSINA-(1-7) [TGR(A1-7)3292]”***

Ana Paula Nadu

**Belo Horizonte – MG
Dezembro 2006**

Ana Paula Nadu

**“AVALIAÇÃO DA CARDIOPROTEÇÃO EM RATOS QUE
EXPRESSAM UMA PROTEÍNA DE FUSÃO PRODUTORA DE
ANGIOTENSINA-(1-7) [TGR(A1-7)3292]”**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Ênfase em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. S. Santos

Belo Horizonte
2006

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão Arterial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação do Professor Dr. Robson Augusto Souza Santos e na vigência de auxílios concedidos pela CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRONEX.

Agradecimentos

À Deus, pela minha existência...

À minha família, pela tolerância e paciência em todos os momentos.

Ao Professor Robson Augusto Souza dos Santos, pela confiança, oportunidades e exemplo de profissional.

Aos colegas do laboratório de hipertensão, pela amizade ao longo do caminho.

Ao Anderson José Ferreira e José Roberto Silva pela pronta disponibilidade em ajudar.

Aos técnicos e secretárias do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelos auxílios.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelos conhecimentos adquiridos.

**“O caminho de cada um é feito pelos próprios passos,
mas a beleza da caminhada depende dos que vão conosco”.**

José Geraldo Vasconcelos Silva

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III

Ang IV – Angiotensina IV

Ang-(1-5) – Angiotensina-(1-5)

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)

Ang-(2-8) – Angiotensina-(2-8) sinônimo de Ang III

Ang-(2-10) – Angiotensina-(2-10)

Ang-(3-8) – Angiotensina-(3-8) sinônimo de Ang IV

Ang-(3-7) – Angiotensina-(3-7)

Ang-(3-10) – Angiotensina-(3-10)

A-779 – D-[Ala]⁷-Angiotensina-(1-7) – Antagonista do receptor Mas

ANP – Peptídeo natriurético atrial

Aogen - Angiotensinogênio

AT₁ – Receptor do subtipo 1 da Ang II

AT₂ – Receptor do subtipo 2 da Ang II

BNP – Peptídeo Natriurético Cerebral

Bk – Bradicinina

BSA – Albumina de soro bovina

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

LISTA DE ABREVIATURAS

CHO – Células de ovário de hamnster chinês

CMV – Promotor do citomegalovírus

cpm – Contagens por minuto

D-Pro⁷-Ang-(1-7) – Antagonista seletivo do receptor Mas

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2

EPM – Erro padrão da média

FBS – Soro fetal bovino

FC – Frequência cardíaca

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HFBA – Ácido heptafluorbutírico

ICB-UFMG – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

iECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IgG – Imunoglobulina

Mas – Protooncogene *Mas*

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

NEP 24.11 – Endopeptidase neutra 24.11

NO – Óxido nítrico

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

pb – pares de bases

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCP – Prolilcarboxipeptidase

PD 123319 – Antagonista seletivo do receptor do subtipo 2 da Ang II

PEP - Prolilendopeptidase

RIE - Radioimunoensaio

RNA – Ácido ribonucléico

RPA – Ribonuclease protection assay

rpm – Rotações por minuto

RT – Reação de retrotranscrição

SD – Sprague-Dawley

SDS – Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE – SDS - Polyacrylamide gel electrophoresis

SRA – Sistema renina angiotensina

TAE – Tampão tris-acetato-edta

TFA - Ácido trifluoroacético

TGF β – Fator de crescimento transformante β

TG ou TGR - Rato transgênico

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

Vol. - volume

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ilustração simplificada das vias de formação dos peptídeos do SRA..... | 4 |
| Figura 2 - Representação esquemática das principais ações da Ang II via receptores AT ₁ e AT ₂ e Ang-(1-7) via receptor Mas..... | 9 |
| Figura 3 - Relação peso VE/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 44 |
| Figura 4 - Análise morfométrica de cardiomiócitos no VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 44 |
| Figura 5 - Relação peso VD/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 45 |
| Figura 6 - Relação peso Átrios/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 46 |
| Figura 7 – Gel representativo da expressão do transgene analisada por RT-PCR no VE dos animais SD e TG..... | 47 |

Lista de Figuras

- Figura 8** - Concentração de Ang II em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO, medida por RIE após extração em colunas C₁₈ 49
- Figura 9** - Concentração de Ang II do plasma de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas C₁₈..... 50
- Figura 10** - Concentração de Ang-(1-7) em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO, medida por RIE após extração em colunas C₁₈..... 51
- Figura 11** - Expressão do gene para angiotensinogênio analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... 52
- Figura 12** - Expressão do mRNA para ECA2 analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... 53
- Figura 13** – Expressão do mRNA para receptor AT₁ analisada por PCR em tempo real em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... 54

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 14 - Expressão do mRNA para receptor Mas analisada por PCR em tempo real em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 55 |
| Figura 15 – Concentração de ANP no plasma de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas Sep-Pack C ₁₈ | 57 |
| Figura 16 – Concentração de ANP nos átrios de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE..... | 58 |
| Figura 17 – Expressão do mRNA para ANP analisada por RPA em amostras de átrios de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 60 |
| Figura 18 – Expressão do mRNA para CORIN analisada por RPA em amostras de átrios de ratos SD e TG, antes e depois do tratamento com ISO..... | 61 |
| Figura 19 - Expressão de colágeno III analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 63 |
| Figura 20 – Deposição de colágeno III na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... | 64 |

Lista de Figuras

- Figura 21** – Imunolocalização de colágeno III no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO, observadas em microscopia confocal..... 65
- Figura 22** - Expressão de colágeno I analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... 67
- Figura 23** - Deposição de colágeno I na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO..... 68
- Figura 24** - Imunolocalização de colágeno I no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO observadas em microscopia confocal..... 69
- Figura 25** – Deposição de fibronectina na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. 71
- Figura 26** - Imunolocalização de fibronectina no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO observadas em microscopia confocal..... 72

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Composição do coquetel de inibidores de proteases..... | 25 |
| Tabela 2 - Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang II..... | 29 |
| Tabela 3 - Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang-(1-7)..... | 30 |
| Tabela 4 - Soluções e volumes utilizados para RIE de ANP..... | 32 |
| Tabela 5 – Curva padrão para dosagem de proteína..... | 33 |
| Tabela 6 – Óligos utilizados na RT-PCR..... | 36 |
| Tabela 7 - Óligos utilizados na PCR em tempo real..... | 36 |
| Tabela 8 – Descrição dos anticorpos utilizados para imunofluorescência..... | 41 |
| Tabela 9 – Peso relativo das câmaras cardíacas e coração total | 42 |

Sumário

| | |
|--|----|
| Resumo | I |
| Abstract..... | II |
| 1- Introdução | |
| 1.1 - Sistema renina-angiotensina | 1 |
| 1.2 – Hipertrofia cardíaca: visão geral..... | 10 |
| 1.3 – Hipertrofia cardíaca e Sistema Renina-Angiotensina: visão geral..... | 13 |
| 1.4 – Utilização de modelos transgênicos para estudo fisiopatológico..... | 16 |
| 2 – Objetivos | |
| 2.1 – Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 – Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 – Material e Métodos | |
| 3.1 – Material..... | 20 |
| 3.1.2 – Animais..... | 20 |
| 3.1.3 – Equipamentos..... | 20 |
| 3.1.4 – Drogas e Reagentes..... | 21 |
| 3.2 – Métodos..... | 24 |
| 3.2.1 – Hipertrofia..... | 24 |
| 3.2.2 – Coleta de tecidos e plasma..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3 - Homogeneização de tecidos, extração de amostras e dosagens dos peptídeos..... | 25 |
| A – Homogeneização do ventrículo esquerdo..... | 25 |
| B – Extração de angiotensinas do plasma e ventrículo esquerdo em colunas Bond Elut C ₁₈ | 26 |
| C – Homogeneização dos átrios..... | 27 |
| D – Extração do ANP do plasma em colunas Sep-Pack C ₁₈ | 27 |
| E – Radioimunoensaio..... | 27 |
| E.1 – Radioimunoensaio para Angiotensina II..... | 28 |
| E.2 – Radioimunoensaio para Angiotensina-(1-7)..... | 29 |
| E.3 – Radioimunoensaio para ANP..... | 31 |
| F – Dosagem de Proteínas..... | 32 |
| 3.2.4 – Retro-transcrição (RT), Reação da polimerase em cadeia (PCR), Reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR - Real Time) e Ribonuclease Protection Assay (RPA)..... | 33 |
| A – Extração do RNA total..... | 33 |
| B – Tratamento do RNA total com DNase..... | 34 |
| C – RT-PCR..... | 34 |
| D – Ribonuclease Protection Assay..... | 37 |
| 3.2.5 – Métodos Histométricos..... | 39 |
| 3.2.6 – Imunofluorescência..... | 39 |
| 4 – Análise estatística..... | 41 |

5 - Resultados

| | |
|--|-----------|
| 5.1 – Análise dos pesos relativos e morfometria das câmaras cardíacas... | 42 |
| 5.2 – Análise da expressão do transgene determinado por RT-PCR..... | 47 |
| 5.3 – Análise dos níveis de angiotensinas e outros fatores relacionados ao SRA..... | 48 |
| 5.4 – Análise dos níveis e expressão do peptídeo natriurético atrial | 56 |
| 5.5 – Análise dos componentes da matriz extracelular – colágeno I, colágeno III, fibronectina..... | 62 |
| 6 – Discussão..... | 73 |
| 7 – Conclusões..... | 87 |
| 8 – Referências Bibliográficas..... | 88 |
| 9 – Anexo..... | 98 |

Resumo

A Ang-(1-7) é descrita como um fragmento biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina, tendo diversas de suas ações contrárias aquelas descritas para Ang II. Estudos recentes têm demonstrado que a Ang-(1-7) apresenta efeitos antiproliferativos e cardioprotetores. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel da Ang-(1-7) na hipertrofia do ventrículo esquerdo. Nesse estudo foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley (SD) e ratos machos que superexpressam Ang-(1-7) [TGR(A1-7)3292]. Os ratos foram tratados com injeções diárias de isoproterenol (2mg/Kg/dia, i.p.) durante 7 dias. Após o período de tratamento, os ratos foram sacrificados e foram coletados o VE e o plasma para posteriores análises. Os VE foram utilizados para análise morfométrica e imunofluorescência, dosagens de Ang II e Ang-(1-7), e expressão de mRNA para angiotensinogênio, ECA2, receptores Mas e AT₁, colágenos I e III. O plasma foi utilizado para dosagens de Ang II e ANP. Os ratos TG apresentaram menor hipertrofia do VE, acompanhada por menor formação de matriz intersticial em resposta ao ISO. A concentração cardíaca de Ang II estava diminuída no VE dos ratos TG. Em contraste, as concentrações plasmáticas de Ang II estavam aumentadas. Os ratos TG apresentaram diminuição da expressão do mRNA para angiotensinogênio e aumento da expressão do mRNA para ECA2 no VE. Os ratos TG não apresentaram alterações na expressão do mRNA para os receptores Mas e AT₁. Os níveis de ANP estavam aumentados no plasma dos ratos TG. Em resposta ao ISO, as características bioquímicas observadas foram mantidas inalteradas nos ratos TG. Os dados sugerem que a Ang-(1-7) induz importantes alterações bioquímicas no coração e no plasma dos ratos TG, reforçando a hipótese de que ela pode modular o SRA e outros sistemas peptídicos, favorecendo a proteção de órgãos alvos do sistema cardiovascular.

Abstract

Angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)) is now considered to be a biologically active member of the renin-angiotensin system. The functions of Ang-(1-7) are often opposite to those attributed to the main effector component of the renin-angiotensin system, Ang II. Recently it has been suggested that Ang-(1-7) has cardioprotective properties. In the present study, we investigated the effect of Ang-(1-7) on cardiac hypertrophy. Heart hypertrophy was induced in male Sprague-Dawley (SD) and TG rats [TGR(A-7)3292] by daily injection of isoproterenol (2 mg/Kg i.p, 7 days). Control groups received daily injection of vehicle (0.9 % NaCl 0.1 ml/100g i.p, 7 days). At the end of the 7-day period, the rats were killed by decapitation and the heart and blood were immediately collected. The atria and right ventricle were dissected. Wet weights of the left ventricles were recorded and normalized for body weight. The left ventricles were used for morphometric analyzes and quantification of collagen I, III and fibronectin proteins by immunofluorescence using confocal microscopy. Angiotensins were determined by radioimmunoassay (RIA) in plasma and left ventricles. In addition, atrial natriuretic peptide was also determined by RIA in the plasma. The isoproterenol-induced hypertrophy was attenuated in TG rats. The expression of collagen I, III and fibronectin proteins in the extracellular matrix were also attenuated in isoproterenol-treated TG rats left ventricles. Expression of left ventricle angiotensinogen, ACE2, collagen I, III, Mas and AT₁ receptors mRNA levels were assessed by semi-quantitative polymerase chain reaction. The cardiac Ang II level was significantly decreased in the TG rats. In contrast, the plasma Ang II levels were significantly increased in TG animals. Angiotensinogen mRNA in the left ventricle was significantly decreased in TG rats while ACE2 mRNA was significantly increased in TG rats. No significant changes were observed for Mas receptor mRNA levels and AT₁ receptor mRNA levels in the left ventricles of TG rats. A significant increase of plasma ANP concentration was observed in TG rats. Isoproterenol did not change the biochemical alterations observed in the TG rats before the treatment. These results reinforce the hypothesis that Ang-(1-7) plays an important site-specific role within renin-angiotensin system and others peptidic systems.

1 - INTRODUÇÃO

Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) foi descoberto há mais de um século e ainda é amplamente estudado. Em 1897, Tigerstedt e Bergmann isolaram uma substância pressora a partir do rim de coelho capaz de elevar a pressão arterial, que eles denominaram de renina. Em 1940, Braún-Menéndez e cols isolaram uma substância vasoconstritora do sangue venoso renal de cão com constrição da artéria renal, tendo sido denominada por eles de hipertensina. Na mesma época, Page e Helmer após infusão dessa substância em um animal normal observaram uma resposta vasoconstritora, sendo denominada por eles de angiotonina. Posteriormente outros grupos mostraram tratar-se do mesmo componente, no caso um peptídeo. Como eram as mesmas substâncias, os termos foram agregados e adotou-se o termo angiotensina. Estudos futuros que se seguiram contribuíram para esclarecer o mecanismo de formação das angiotensinas e sua importância na fisiologia cardiovascular (Handa e cols, 2000).

Hoje, muito se sabe a respeito do SRA, seus componentes e sua interação com outros sistemas peptídicos. A angiotensina II (Ang II ou Ang (1-8)) é o principal peptídeo do SRA. Ela é formada a partir da clivagem do angiotensinogênio de origem hepática pela renina de origem renal, formando angiotensina I (Ang I ou Ang(1-10)). Essa por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) formando a Ang II, especialmente no leito vascular pulmonar que recebe todo o débito cardíaco. Uma vez formada a Ang II atua em seus receptores específicos em órgãos-alvos regulando a pressão arterial, a homeostase cardiovascular e o equilíbrio hidroeletrólítico, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Dzau e cols, 1988; Krieger e Santos, 1998; Santos e cols, 2005, Paul e cols, 2006).

A Ang II liga-se com alta afinidade em seus receptores localizados na superfície celular. Dois tipos principais de receptores são bem caracterizados AT₁ e AT₂, ambos com distribuição heterogênea em tecidos periféricos e cerebrais. Os dois receptores diferem em seus mecanismos de sinalização e atividades biológicas (Ardaillou e cols, 1999; Unger e cols, 2002).

O receptor AT₁ é um receptor com 7 domínios transmembrana, acoplado a proteína G. Sua sinalização envolve fosfolipase A, C e D, inositol fosfato, canais de cálcio e uma variedade de serina/treonina e tirosina kinase (Unger e cols, 2002). Ele está presente em tecidos somáticos e cerebrais, predominantemente em órgãos e tecidos envolvidos no balanço eletrolítico e regulação da pressão sanguínea, como glândulas adrenais, células do músculo liso vascular, rim e coração. Sua estimulação medeia também o crescimento e proliferação de células do músculo liso vascular, estando também implicado em várias doenças cardiovasculares, renais e cerebrais, tais como hipertrofia do ventrículo esquerdo, hipertrofia da camada média vascular, arritmias cardíacas, aterosclerose e glomerulosclerose (Unger e cols, 2002).

O receptor AT₂ também é uma proteína com 7 domínios transmembrana e possui aproximadamente 34% de homologia com o receptor AT₁. Eles estão presentes em alta densidade em todos os tecidos durante o desenvolvimento fetal e são menos abundantes em tecidos adultos, estando expressos em altas concentrações na medula adrenal, útero, ovários, endotélio vascular e áreas específicas do cérebro. Sua expressão está também elevada na insuficiência cardíaca, nos processos de reparo após infarto, em lesões de pele e no sistema nervoso. Sendo assim, o receptor AT₂ parece estar envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, angiogênese, regeneração tecidual e apoptose (Unger e cols, 2002).

A Ang II é o principal produto ativo do SRA, porém, na última década muito se descobriu a respeito dos fragmentos de angiotensinas que podem ser gerados no sistema cardiovascular a partir da Ang I e da Ang II. Ambas passam por clivagens seqüenciais gerando uma “família” de peptídeos com atividade biológica. Recentes observações indicam que importantes ações periféricas e centrais do SRA podem ser mediadas por essas seqüências menores dos peptídeos angiotensinérgicos, incluindo Angiotensina-III [Ang III ou Ang-(2-8)], Angiotensina-IV [Ang IV ou Ang-(3-8)] e Angiotensina-(1-7).

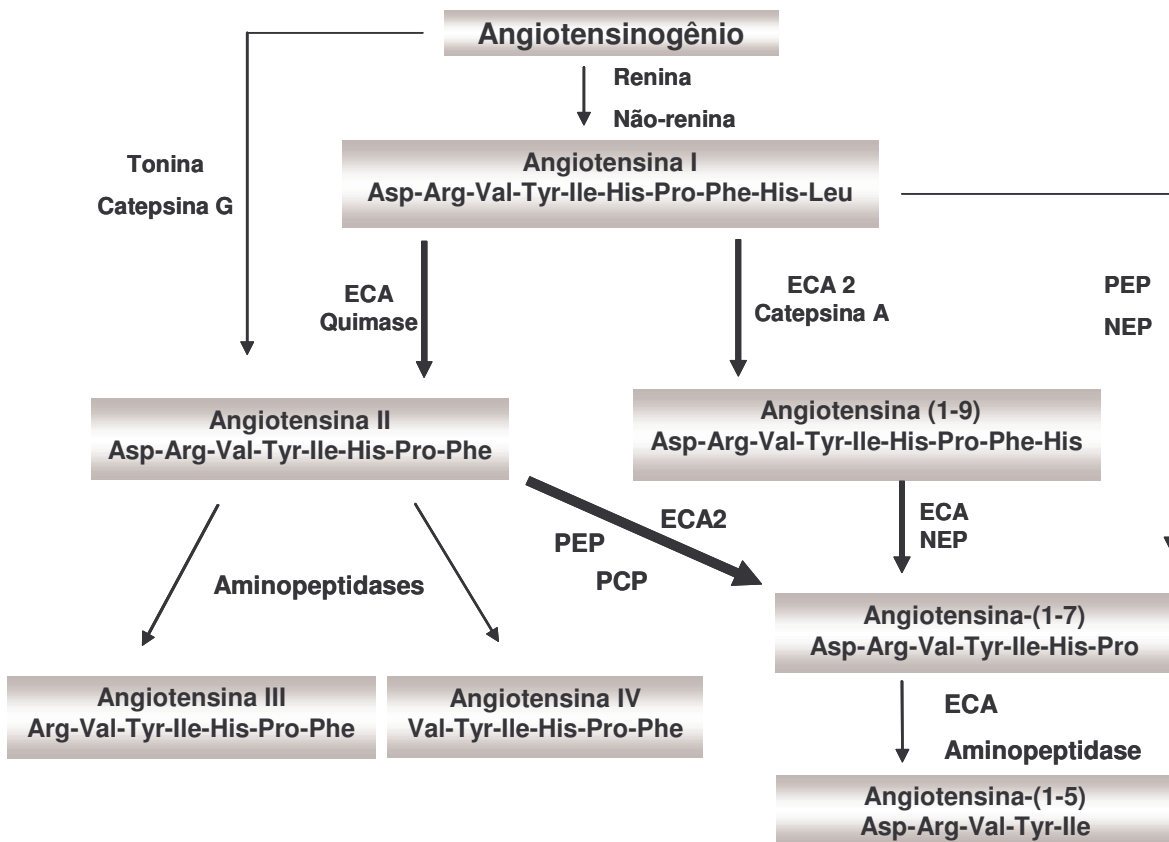


Figura 1. Ilustração simplificada das vias de formação dos peptídeos do SRA. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; PEP, prolilendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra; PCP, prolilcarboxipeptidase. Modificado de: Ferreira A.J.; Santos R.A.S. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*(2005) 38: 499-507.

A angiotensina-(1-7) é um dos peptídeos da “família” das angiotensinas que possui atividade biológica, sendo formada por uma via independente da ECA somática. Recentemente foi descoberta em humanos e roedores uma nova enzima análoga a ECA com alta especificidade para clivar angiotensinas. A ECA2, como foi denominada, possui 805 aminoácidos em sua estrutura, inclui uma seqüência N-terminal e um único sítio catalítico, apresentando 42% de homologia com a ECA somática, possuindo diferenças no que diz respeito à especificidade de substrato e sua atividade não ser alterada pelos inibidores clássicos da ECA. No sistema cardiovascular, a expressão da ECA2 ocorre predominantemente nas células endoteliais das artérias, arteríolas e vênulas no coração e no rim. Em humanos, a ECA2 foi também descrita no trato gastrointestinal e em camundongos tem sido descrita também no pulmão (Gembardt e cols, 2005). A ECA2 funciona como uma carboximonopeptidase com hidrólise preferencial entre resíduos de prolina e região C-terminal da molécula. A afinidade catalítica da ECA2 não está limitada aos peptídeos do SRA. Ela também possui alta eficiência catalítica por outros peptídeos tais como apelina-13 e apelina-32 e alguns metabólitos de cininas, neurotensina e peptídeos relacionados, e em peptídeos opióides como dimorfina. Esses produtos têm uma variedade de funções e assim a ECA2 pode ter um papel chave na inflamação, neurotransmissão e funções cardiovasculares (Katovich e cols, 2005).

No sistema cardiovascular a ECA2 cliva a Ang I gerando o peptídeo até o momento considerado inativo Ang-(1-9), que pode posteriormente ser convertido a Ang-(1-7) e essa por sua vez pode ser inativada pela ECA somática ou outras peptidases ao resíduo inativo Ang-(1-5). A ECA2 pode também metabolizar diretamente a Ang II para gerar Ang-(1-7). Nem a Ang-(1-9) nem a Ang-(1-7) podem ser hidrolisadas pela ECA2. Essas ações sugerem ser a ECA2 a principal via de formação da Ang-(1-7) (Tipnis e cols, 2000, Donoughe e cols, 2000, Vickers e cols,

2002). A Ang-(1-7) juntamente com a Ang II, são considerados os principais efetores do SRA.

Para selar definitivamente o papel da Ang-(1-7) como importante peptídeo com ações biológicas distintas dentro do SRA, estudos usando o antagonista seletivo das ações da Ang-(1-7), o D-[Ala⁷]-Ang-(1-7) (A-779), forneceram evidências de um receptor para a Ang-(1-7) distinto dos receptores AT₁ e AT₂ da Ang II. Santos e cols (2003) caracterizaram o receptor específico para Ang-(1-7). Nesse trabalho, utilizando técnicas de binding, foi demonstrada a ausência de ligação da Ang-(1-7) em cortes renais de camundongos knockout (KO) para o protooncone *Mas*, e observou-se ausência da ação antidiurética da Ang-(1-7). O efeito vasorrelaxante da Ang-(1-7) foi completamente abolido em anéis aórticos dos camundongos KO para o *Mas*. Tais evidências e outras que se seguiram indicam o *Mas* como o receptor funcional para Ang-(1-7) (Pinheiro e cols, 2004; Lemos e cols, 2005; Santos e cols, 2006).

Vários trabalhos têm demonstrado que a Ang-(1-7) atua como um peptídeo contrarregulador dentro do sistema renina-angiotensina, atuando em múltiplos pontos. A Ang-(1-7) pode atuar como um modulador da ECA tanto no domínio amino-terminal da enzima, no qual atua como substrato, como no domínio c-terminal no qual atua como um inibidor (Deddish e cols, 1998; Tom e cols; 2001). Além de inibir a ECA a Ang-(1-7) inibe as ações da Ang II competindo pela ligação em receptores AT₁ (Ueda e cols, 2000; Roks e cols, 1999; Rowe e cols, 1995; Mahon, 1994), altera a sinalização dos efeitos da Ang II possivelmente por alterar a disponibilidade de cálcio intracelular (Chansel e cols 2001). Além disso, a Ang-(1-7) antagoniza os efeitos deletérios da Ang II sobre o aparelho cardiovascular pela potenciação dos efeitos da bradicinina (Paula e cols, 1995; Li e cols, 1997; Faria e cols, 2005). A Ang-(1-7) e seu derivativo Sar¹-Ang-(1-7) antagonizam os efeitos

pressores da Ang II no homem (Ueda e cols, 2000) e ratos (Bovy e cols, 1989). A contração produzida pela Ang II em artérias isoladas de coelhos e humanos também é reduzida pela Ang-(1-7)(Bovy e cols, 1989; Roks e cols, 1999). Sampaio e cols (2003) demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) em ratos anestesiados promoveu uma diminuição da resistência periférica total com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo regional para mesentério, cérebro, pele e rins. Foram observados também, um aumento no índice cardíaco e volume sistólico. Essas alterações foram atenuadas na presença do A-779.

No sistema nervoso central a Ang-(1-7) pode agir como um modulador nas áreas relacionadas com o controle da pressão arterial. Campagnole-Santos e cols (1992), Henriger-Walther e cols (2001), demonstraram que a Ang-(1-7) produziu facilitação do controle barorreflexo da frequência cardíaca.

Estudos recentes têm demonstrado que a Ang-(1-7) apresenta efeitos antiproliferativos e cardiprotetores, contrários aos observados para Ang II. Strawn e cols (1999) demonstraram que a Ang-(1-7) reduz o crescimento das células do músculo liso vascular após lesão. Animais que sofreram injúria vascular e foram infundidos com Ang-(1-7) apresentaram menor proliferação da camada íntima quando comparados aos animais tratados com veículo. Machado e cols (2001) demonstraram o efeito antiangiogênico da Ang-(1-7) utilizando o modelo de esponjas em camundongos. A formação de novos vasos foi abolida na presença de A-779 e inibidores da síntese de óxido nítrico. O uso de antagonista de receptores AT₁ e AT₂ não foi capaz de reverter esse processo.

Nos últimos cinco anos as pesquisas envolvendo as ações da Ang-(1-7) especificamente no coração e/ou seus constituintes têm acrescentado importantes informações àquelas já descritas. Ferreira e cols (2001) demonstraram que a Ang-(1-7) em baixas concentrações diminuiu a incidência e duração das arritmias

decorrentes de isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos. Esse efeito cardioprotetor foi bloqueado pelo antagonista específico, A-779. Loot e cols (2002), com modelo experimental de insuficiência cardíaca (infarto do miocárdio), demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) preservou o funcionamento cardíaco, a perfusão coronariana e o funcionamento endotelial aórtico, amenizou a deteriorização do miocárdio caracterizada por mudança na pressão diastólica final. Essas mudanças foram acompanhadas pela manutenção do fluxo coronariano e vasodilatação induzida pela bradicinina. E ainda, a infusão crônica de Ang-(1-7) manteve a densidade de capilares no miocárdio, e reverteu a disfunção endotelial presente na aorta desses ratos infartados. Averill e cols (2003) demonstraram pela primeira vez a localização da Ang-(1-7) em animais submetidos ao infarto com 4 semanas de remodelamento cardíaco. A área infartada apresentou menor imunoreatividade para Ang-(1-7) quando comparada com a área ao redor do infarto e demonstrou a localização restrita da Ang-(1-7) no citoplasma dos miócitos cardíacos. Tallant e cols (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) inibiu o crescimento dos cardiomiócitos através da ativação do receptor Mas, modulando a síntese de proteínas e a atividade de MAPKs envolvidas com a hipertrofia de miócitos. Iwata e cols (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) se liga a receptores específicos nos fibroblastos cardíacos, reduzindo os efeitos pró-fibróticos e hipertróficos da Ang II.

Tais achados demonstram o papel antiproliferativo e cardioprotetor da Ang-(1-7) em condições onde existe ativação do SRA. Diante de tais evidências estudos adicionais para avaliar os efeitos da Ang-(1-7) em patologias cardíacas são importantes para ampliar a compreensão do papel desse peptídeo no sistema cardiovascular.

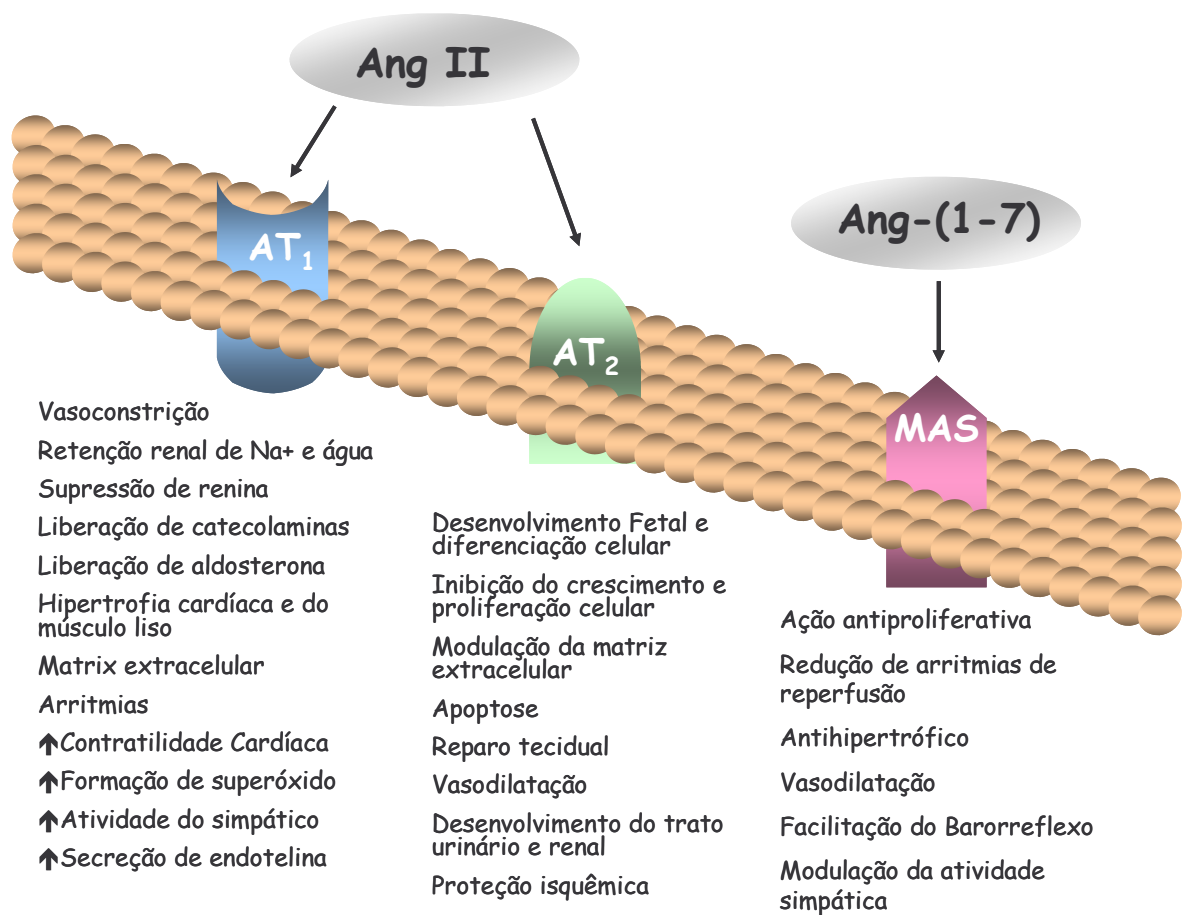


Figura 2. Representação esquemática das principais ações da Ang II via receptores AT₁ e AT₂ e Ang-(1-7) via receptor Mas.

Hipertrofia Cardíaca: visão geral

A hipertrofia cardíaca constitui um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. Essa adaptação pode ser em resposta ao aumento da necessidade metabólica que impõe um aumento do débito cardíaco, condição essa observada em resposta ao exercício; indução hormonal por tiroxina e isoproterenol; aumento de carga pressórica ou de volume, condição observada em patologias como hipertensão; ou resultante de mecanismos intrínsecos de natureza genética, como as hipertrofias que podem ocorrer na ausência de sobrecargas. O resultado do aumento do trabalho do coração traduz-se em aumento da massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo. Quando associada à hipertensão arterial, a hipertrofia cardíaca assume grande importância aumentando o risco de ocorrência de morte súbita, arritmias ventriculares, isquemia do miocárdio e disfunção ventricular sistólica e diastólica (Mill, 2001; Díez e cols, 2005).

Sendo a hipertrofia cardíaca um importante mecanismo adaptativo do coração e sendo um fator de risco de mortalidade, diversos modelos experimentais indutores de hipertrofia são utilizados visando explicar os mecanismos envolvidos e sua manutenção.

Os modelos *in vivo* são normalmente utilizados para estudar a hipertrofia cardíaca induzida por processos patológicos e fisiológicos. Na hipertrofia induzida por hipertensão, são induzidas alterações na função renal provocando mudanças no sistema renina-angiotensina-aldosterona ou aumentando-se a retenção de sódio. Na hipertrofia em resposta ao infarto, ocorre uma resposta à perda de massa do miocárdio. Na hipertrofia por indução hormonal, dois modelos são comumente

utilizados, resultantes de tratamento com hormônio tireoidiano ou com agentes simpatomiméticos, como o isoproterenol (Mill, 2001).

O processo hipertrófico em geral vem acompanhado de alterações morfológicas no tecido cardíaco, alterações essas observadas nas células que compõem o tecido e também na matriz intersticial. Tomam parte nesse processo a expressão de *protooncogens* e outros gens que regulam o crescimento, a diferenciação celular, os estímulos à produção de colágenos e alterações em função do crescimento dos fibroblastos (Oigman, 2000). Nesse novo padrão de expressão gênica estão incluídos também os gens que modificam a composição dos sarcômeros, destacando-se o aumento da proporção da isoforma V3 da miosina em relação a isoforma V1, os gens que aumentam a eficiência do metabolismo energético e os gens que alteram a expressão dos componentes do SRA próprio do coração, incluindo a ECA, o angiotensinogênio e o receptor AT₁. Em fases mais avançadas da hipertrofia cardíaca, observam-se também alterações na expressão de gens codificadores de fatores natriuréticos, do trocador Na⁺/Ca⁺, diminuição da expressão dos gens codificadores da ATPase do retículo sarcoplasmático e dos receptores β-1 adrenérgicos. (Mill, 2001).

O estímulo inicial que desencadeia o processo de re-expressão gênica pode ser químico ou mecânico. Muitos agentes químicos, como agonistas β-adrenérgicos, o hormônio tireoidiano, Ang II, TGF-β (fator de crescimento transformante β), IGdF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e endotelina-1 são fortes estimulantes da síntese protéica no miocárdio sendo assim indutores de hipertrofia (Komuro , 2001; Franchini, 2001, Williams, 2001).

Durante algum tempo um candidato a exercer esse papel foi a Ang II. Hamawaki e cols (1998) demonstraram que o bloqueio dos receptores AT₁ atenuava significativamente a hipertrofia produzida pela injeção de Ang II e também as

hipertrofia resultantes da administração dos agentes citados anteriormente. Porém posteriormente, essa hipótese não foi confirmada uma vez que camundongos desprovidos de receptores AT_1 ainda desenvolvem hipertrofia importante em resposta a vários estímulos químicos e mesmo à sobrecarga hemodinâmica.

Além das alterações morfológicas que ocorrem no miócito em resposta as alterações descritas anteriormente, o estroma conjuntivo também tem um papel importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Além dos cardiomiócitos, no estroma encontra-se também grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, sendo essas, o principal determinante da distensibilidade das paredes cardíacas. Os principais componentes da matriz intersticial do coração são os tipos de fibras colágenas, proteoglicanos, fibronectina e elastina, além de outras glicoproteínas (Mill, 2001).

São encontrados no coração os colágenos do tipo I, III, IV, V e VI. Acredita-se que o colágeno I constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, o tipo III constitui cerca de 12 %, os tipos IV, V e VI compõem os 8 % restantes. O colágeno tipo I é o mais rígido de todos sendo o principal responsável pela rigidez e resistência à deformação das câmaras cardíacas. O colágeno tipo III tem papel importante na manutenção do alinhamento dos feixes de miócitos e conferem elasticidade ao tecido. Esses dois colágenos associados formam uma rede fibrilar no tecido cardíaco importante para a sustentação dos cardiomiócitos e vasos coronários, conferindo ao tecido, características físicas únicas (Burlew e Weber 2000). As fibras colágenas de maior rigidez podem aumentar em determinados tipos de hipertrofia, podendo provocar deficiência no processo de relaxamento do miocárdio, levando ao aparecimento da insuficiência diastólica (Díez e cols, 2005).

A deposição de tecido fibroso no miocárdio pode gerar fibrose perivascular e fibrose intersticial. A fibrose perivascular caracteriza-se por acúmulo de colágeno na

camada adventícia das artérias e arteríolas intramiocárdicas, em resposta a agressões tóxicas / infecciosas ao miocárdio e diabetes. A fibrose intersticial aparece como uma progressão da fibrose perivascular ou secundariamente à deposição de fibras colágenas à distância da rede vascular. (Mill, 2001).

São ainda pouco conhecidos os mecanismos que controlam a quantidade de colágeno na matriz extracelular cardíaca, qual o tipo de colágeno e sua distribuição. Sabe-se que a quantidade de colágeno na matriz depende de um balanço entre os processos de síntese e degradação, dentre outros, o sistema renina-angiotensina-aldosterona estimula a formação da matriz cardíaca, tanto a Ang II como a aldosterona estimulam a síntese de colágenos fibrilares. Em contrapartida, os peptídeos natriuréticos, bradicina e óxido nítrico são fatores que facilitam a degradação dos colágenos fibrilares. (Burlew e Weber, 2000).

Hipertrofia cardíaca e SRA: visão geral

O SRA tem sido proposto como um dos possíveis sistemas que contribuem para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Trabalhos têm mostrado que a Ang II pode estimular o crescimento agudo em resposta a infusão do peptídeo, a síntese protéica em corações isolados na ausência de sobrecarga mecânica e pode promover hipertrofia quando infundida em doses subpressoras (Lorell, 1999).

Outros trabalhos têm demonstrado a participação do SRA cardíaco na hipertrofia. Mazzolai e cols (1998), utilizando camundongos transgênicos que superexpressam angiotensinogênio no coração demonstraram que esses animais desenvolvem hipertrofia cardíaca sem sinais de fibrose independentemente de hipertensão associada, sugerindo que a Ang II local é importante mediador das respostas hipertróficas *in vivo*. Respostas estas que foram bloqueadas com o uso de antagonista AT₁. Paradis e cols (1999) utilizando camundongos transgênicos que

superexpressam receptores AT_1 em cardiomiócitos, demonstraram que independente de alterações hemodinâmicas a Ang II pode induzir diretamente hipertrofia dos cardiomiócitos, seguida por deposição de colágeno no interstício e remodelamento cardíaco. Nesse trabalho, o aumento do número de receptores nos cardiomiócitos foi suficiente para iniciar e manter a hipertrofia cardíaca e o remodelamento.

O papel direto da Ang II na hipertrofia miocárdica é evidenciado por suas interações com seus receptores AT_1 aumentando o cronotropismo; com os receptores celulares miocárdicos gerando uma resposta hiperplásica e/ou aumentando a síntese protéica celular; com os nervos miocárdicos modulando a liberação de catecolaminas e possivelmente estimulando a hipertrofia; com as células endoteliais do vaso e do miocárdio regulando a liberação de fatores endoteliais; e com os receptores intracelulares influenciando o metabolismo celular (Santos e cols, 1999).

Um dos modelos que tem sido utilizado para estudar o papel do SRA na hipertrofia cardíaca é o tratamento com isoproterenol. A participação do SRA na hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol tem sido descrita por vários autores. Nagano e cols (1992) demonstraram que a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol está associada com o aumento dos níveis de angiotensina plasmática e tecidual. Ainda no mesmo trabalho demonstrou que a infusão de isoproterenol em ratos nefrectomizados bilateralmente, de forma semelhante, aumentou o peso do ventrículo esquerdo e os níveis teciduais de Ang II, porém sem alterar os níveis plasmáticos dessa angiotensina, sugerindo então que a Ang II tecidual (cardíaca) pode ser responsável pela hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida pelo isoproterenol.

Golomb e cols (1994) demonstraram que o losartan, um bloqueador de receptor AT_1 de Ang II não preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, sugerindo que a Ang II não medeia a indução da hipertrofia cardíaca pelo isoproterenol, mas contribui para a manutenção do processo.

Tais conclusões opostas foram mais tarde abordadas por Leenen e cols (2001). Nesse trabalho os autores demonstraram que a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol está associada com aumento da Ang II plasmática, mas não com aumento de Ang II cardíaca, contradizendo o que havia sido sugerido por Nagano e cols (1992). No mesmo trabalho o uso de losartan e quinalapril diminuiu os níveis de Ang II no ventrículo, mas não preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, sugerindo que o SRA cardíaco e tecidual não tem papel principal no início do processo hipertrófico, mas durante sua manutenção como já havia sido sugerido por Golomb e cols. (1994).

Grimm e cols. (1997), utilizando uma única administração de isoproterenol demonstraram que duas semanas após o uso do fármaco houve aumento significativo da atividade de renina plasmática, nos níveis de aldosterona e atividade da ECA cardíaca, sugerindo a ativação do sistema circulante e tecidual durante o período inicial da hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol. Em outro trabalho Grimm e cols. (1999) demonstraram que o uso de bloqueador de receptores AT_1 resultou na regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo e modulação da produção de proteínas da matriz intersticial no tecido cardíaco.

Utilização de modelos transgênicos para estudo fisiopatológico

Os avanços das técnicas de biologia molecular e bioquímica nos últimos anos permitiram o desenvolvimento de animais transgênicos com alterações direcionadas para o estudo dos componentes do SRA localizadas em diversos órgãos incluindo cérebro, adrenal, vasos, rins e coração. Vários animais transgênicos têm sido gerados para avaliar a importância funcional desse sistema na fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (Bader, 2002).

A fim de distinguir os efeitos diretos de peptídeos angiotensinérgicos em determinados órgãos daqueles promovidos por alterações hemodinâmicas, Methot e cols (1997) desenvolveram um novo método para o estudo do SRA. Por essa metodologia os peptídeos tem a possibilidade de serem liberados diretamente na via secretória pela ação da enzima endógena furina passando a serem produzidos constitutivamente pelas células de determinado órgão. Assim essa nova tecnologia é capaz de direcionar a produção de uma ampla variedade de peptídeos para tecidos e tipos de células específicas em animais transgênicos.

Em colaboração com o grupo do Dr. Michael Bader do Max-Delbruck-Center na Alemanha, Santos em 1998, utilizando essa metodologia, criou um animal transgênico que superexpressa Ang-(1-7) sem a necessidade de manipulação gênica dos clássicos componentes do SRA como o angiotensinogênio, renina, Ang I, ECA e Ang II. A estrutura desse DNA possui uma seqüência gênica que codifica o peptídeo sinalizador da renina humana, o que assegura secreção; uma porção de IgG de camundongo que provém massa e possui importantes sítios de ligações necessários para as realizações de subseqüentes ensaios bioquímicos; uma seqüência para o segmento de pro-renina humana que funciona como um espaçador molecular essencial para facilitar a interação da enzima com o sítio de clivagem; o sítio de clivagem para a enzima endógena Furina e a seqüência

correspondente a Ang-(1-7) seguida por uma cauda Poly A que confere estabilidade ao mRNA. Para direcionar a expressão desse DNA em células de mamíferos, foi utilizado o promotor CMV.

A expressão do transgene para Ang-(1-7) nesses animais mostrou-se restrita aos testículos apesar da utilização de um promotor inespecífico. Esse órgão passou a funcionar como uma fonte secretora localizada a qual está oferecendo uma contínua produção desse peptídeo.

Posteriormente, a caracterização bioquímica dessa linhagem transgênica – [TGR A1-7(3292)] - demonstrou um aumento de Ang-(1-7) nos testículos por volta de 4,5 vezes com um aumento dos níveis plasmáticos de aproximadamente 2,5 vezes sem diferença artério-venosa, permanecendo os níveis desse peptídeo inalterado nos demais órgãos, restringindo dessa forma as ações da Ang-(1-7), nesse modelo, ao sistema circulante (Santos e cols, 2004).

Os primeiros experimentos fisiológicos realizados nesses ratos demonstraram uma diminuição das arritmias de reperfusão em corações isolados, uma melhora na função cardíaca após isquemia-reperfusão e maior frequência cardíaca. Análises de telemetria demonstraram ausência de alterações na PAM, PAS e PAD, elevação da frequência cardíaca e aumento de dP/dT durante os períodos diurno e noturno (Santos e cols, 2004).

Em outro estudo, Botelho-Santos (2004), utilizando ratos anestesiados, demonstrou que essa linhagem apresentou aumento da bradicardia reflexa associada a aumento do tônus vagal cardíaco, um aumento do fluxo sanguíneo com diminuição da resistência vascular nos rins, pulmões, adrenais, testículos, baço, tecido adiposo marrom e cérebro, e um aumento do volume sistólico e índice cardíaco.

Como já mencionado anteriormente existem crescentes evidências que a Ang-(1-7) desempenha um papel cardioprotetor, incluindo ação antihipertrófica e antiproliferativa. Até o presente momento, no entanto, os estudos para avaliação das ações da Ang-(1-7) foram realizados associados ao aumento agudo desse peptídeo. Os ratos TGR(A1-7)3292 representam uma ferramenta útil para o estudo dos efeitos do aumento crônico da Ang-(1-7) em distúrbios cardiovasculares.

Assim nesse estudo nos procuramos entender melhor o papel da Ang-(1-7) na hipertrofia cardíaca utilizando ratos TGR(A1-7)3292 que superexpressam Ang-(1-7).

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar o efeito do aumento crônico da Angiotensina-(1-7) circulante no desenvolvimento e características da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol, utilizando ratos transgênicos [TGR(A1-7)3292].

2.2- Objetivos Específicos

- Comparar a hipertrofia cardíaca em ratos SD e transgênicos da linhagem [TGR(A1-7)3292] tratados com isoproterenol;
- Avaliar a formação de matriz intersticial no tecido cardíaco dos ratos SD e transgênicos da linhagem [TGR(A1-7)3292] tratados com isoproterenol;
- Avaliar a participação do SRA circulante e local e peptídeos relacionados ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em ratos SD e transgênicos da linhagem [TGR(A1-7)3292] tratados com isoproterenol;
- Avaliar a expressão de angiotensinogênio, ECA2, dos receptores Mas e AT₁, peptídeo natriurético atrial (ANP), colágenos I e III, e o transgene no coração de ratos SD e transgênicos [TGR(A1-7)3292] tratados com isoproterenol.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.2 - Animais

Para esse estudo foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley Hannover (SD) e ratos transgênicos da linhagem [TGR(A1-7)3292] com idade de 12-14 semanas, pesando 280-300g, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão Arterial - Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB-UFMG.

3.1.3 - Equipamentos

- Contador Gama
- Espectrofotômetro
- Centrífuga evaporadora (Eppendorf, Alemanha)
- Ph metro
- Banho-Maria
- HPLC (Shimadzu, Japão)
- Homogeneizador (Turax)
- Ultra-som Vibra Cell (Sonics & Materials Inc.)
- Centrífugas com velocidades e capacidades diferentes
- Colunas Bond-Elut fenilsílica (Varian, Inc., EUA)
- Balança analítica Precision PR-100 (Spec)
- Balança analítica AM 5500 Automarte (Marte)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Agitador de tubos (Quimis)
- Cuba de eletroforese (Biometra)
- Cuba de eletroforese para RPA (Biometra)
- Fonte de voltagem (Biometra)
- Estufa incubadora (Function Line, Heraeus Instruments)
- Estufa incubadora com agitação (Certomat H, B. Braun)
- Termo Mix (Eppendorf, Alemanha)
- Luz ultravioleta (SVL, França)

- Luz ultravioleta acoplada a uma máquina fotográfica (MWG-Biotech, Alemanha)
- Kit Qiagen Plasmid Midi and Maxi (Qiagen, Alemanha)
- Colunas Quick Spin para purificação de DNA marcado (Roche)
- Secador de gel a vácuo
- Filme sensível ao ^{32}P type BAS-III acompanhado de cassete (Fuji, Japão)
- Fujix BAS 2000 acompanhado de software (Fuji, Japão)
- Câmera digital (Axioplan Color, Zeiss)
- Microscópio Axioplan 2 (Zeiss)
- Programa de análise de imagens KS 400 3.0 (Zeiss)
- Microscópio confocal Zeiss 510 (Meta, EUA)
- Material e instrumental cirúrgico: tesouras, pinças anatômicas, pinça dente de rato, bisturi.
- Guilhotina manual
- Vidraria e material de laboratório: balões volumétricos, béqueres, provetas, pipetas graduadas, pipetas automáticas, placas de Petri, eppendorf, ponteiras, tubos de polietileno.

3.1.4 - Drogas e Reagentes

- TRIzol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Clorofórmio (Merck, Alemanha)
- Isopropanol (Merck, Alemanha)
- Dnase I (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Hexanucleotídeos randômicos (pd(N)₆ sodium salt) (Amersham, Inglaterra)
- dNTPs (MBI Fermentas, Alemanha)
- Rnasin inhibitor (Promega, EUA)
- Transcriptase reversa M-MLV (Promega, EUA)
- DTT (Promega, EUA)
- 5x First Strand Buffer (Promega, EUA)
- Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- 10x PCR Buffer minus Mg (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Marcador Phi X174 DNA/BsuRI (HaeIII) (MBI Fermentas, Alemanha)

- Marcador Lambda DNA/HindIII (MBI Fermentas, Alemanha)
- Loading Buffer (MBI Fermentas, Alemanha)
- Agarose (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Enzima de restrição Bgl2 (Amersham, Inglaterra)
- Enzima de restrição PVU II (Amersham, Inglaterra)
- 10x buffer L (Amersham, Inglaterra)
- 10x buffer T (Amersham, Inglaterra)
- Diethylpyrocarbonato (DEPC) (Sigma, EUA)
- Brometo de etídio (Amresco, EUA)
- Tampão de transcrição otimizado 5x (Promega, EUA)
- T7 polimerase (Promega, EUA)
- ^{32}P UTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
- Kit RPA II TM (Ambion, Inc)
- Uréia (Sigma, EUA)
- Acryl/bisAcryl 40 % (19:1) (Roth, Alemanha)
- Persulfato de amônio (Sigma, EUA)
- TEMED (Sigma, EUA)
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Sigma, EUA)
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (Merck, Alemanha)
- Tampão SDS 3X
- SDS (Sigma, EUA)
- Poliacrilamida 40% (Acryl 38,96 %/bisAcryl 1,04 %) (Amresco, EUA)
- Marcador Low range (PM 6.500 a 66.000) (Sigma, EUA)
- Ácido Clorídrico (Merck, Alemanha)
- Isoproterenol (Sigma, EUA)
- Parahidroximercúrio benzoato (POHHgBz) (Sigma, EUA)
- 1, 10-fenantrolina (Sigma, EUA)
- Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) (Sigma, EUA)
- Pepstatin A (Sigma, EUA)
- Ácido etilenodinitrilotetraacético (EDTA) (Merck, Alemanha)
- Ácido trifluoroacético (Sigma, EUA)
- Acetonitrila (Merck, Alemanha)
- Ácido heptafluorobutírico (Sigma, EUA)
- Metanol (Merck, Alemanha)

- Etanol (Merck, Alemanha)
- Lysozima (Sigma, EUA)
- Tris (Sigma, EUA)
- Azida sódica (Sigma, EUA)
- Ácido acético (Merck, Alemanha)
- Anticorpo para a Ang II – (Cleveland Clinic Foundation – EUA)
- Anticorpo para a Ang-(1-7) (Cleveland Clinic Foundation – EUA)
- Ang II (Bachem, Alemanha)
- Ang-(1-7) (Bachem, Alemanha)
- Iodo - ^{125}I – (Amersham Biosciences)
- Dextran (Sigma, EUA)
- Carvão ativado (Sigma, EUA)
- Albumina bovina (BSA) PM 203,43 (Sigma, EUA)
- Salina 0,9 %
- Tissue Tek OCT compound (Miles, USA)
- Glico-metacrilato (JB-4TM Polysciences)
- PBS
- Glicerina
- Tris (Sigma, EUA)
- Tween 20 (Sigma, EUA)

3.2 – Métodos

3.2.1 - Indução da Hipertrofia

A hipertrofia cardíaca foi induzida em animais SD e transgênicos da linhagem TGR(A1-7)3292 utilizando-se injeção intraperitoneal de Isoproterenol (ISO), durante 7 dias na dose de 2mg/kg/dia. Como controle foi utilizada injeção de salina a 0,9%, 0,1 ml/kg/dia.

3.2.2 - Coleta de Tecidos e Plasma

Ao término do período de tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação, seguindo-se de coleta de aproximadamente 3 ml de sangue para determinação dos níveis de angiotensinas e peptídeo atrial natriurético (ANP) em tubo de polietileno mantido em gelo contendo coquetel de inibidores de proteases (tabela 1). Cada tubo continha 420 µl do coquetel (140 µl para 1 ml de sangue). O sangue foi centrifugado por 10 min a 2.500 rpm à 4°C e o plasma foi separado e congelado a -20° C para posterior extração de angiotensinas e ANP. O coração foi retirado e separado em átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Os tecidos foram pesados para determinação macroscópica da hipertrofia, sendo esse resultado da razão peso do órgão/peso corporal (mg/g). Posteriormente o VE foi utilizado para dosagem de angiotensinas, análises morfométricas e análises da expressão dos diversos genes. Os átrios foram utilizados para dosagem e expressão do ANP. Os átrios e ventrículos esquerdos que foram utilizados para essas análises foram mantidos à temperatura de – 80° C.

Tabela 1 - Coquetel de Inibidores de Proteases

| Inibidor enzimático | Volume utilizado por ml/mg de sangue ou tecido |
|---|---|
| Para-hidroximercúrio-benzoato (pOHHgHz) 1 mM | 10 µl |
| Orto-fenantrolina 30 mM | 50 µl |
| Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) 1 mM | 10 µl |
| Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA) 7,5 % | 50 µl |
| Pepstatin A 1 mM | 20 µl |

As soluções de pOHHgBz e PMSF foram preparadas no dia da coleta, e as demais soluções, preparadas nos dias anteriores ficando essas estocadas, sendo pepstatin A e orto-fenantrolina conservados em freezer - 20° C e EDTA 7,5% mantido em geladeira. O coquetel de inibidores de proteases foi preparado em período imediatamente anterior à coleta do sangue.

3.2.3 - Homogeneização de tecidos, extração de amostras e dosagens dos peptídeos.

A - Homogeneização do ventrículo esquerdo.

O coração foi rapidamente coletado, separado, pesado e congelado em nitrogênio líquido, sendo mantidos a temperatura de – 80° C até o momento da homogeneização. O ventrículo esquerdo foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador (Turax) utilizando-se 10 ml de solução de etanol ácido (HCl 0,045 N/etanol) na presença de 1.400 µl de coquetel de inibidores de proteases como descrito anteriormente e 10 µl de BSA 5% em água deionizada. Amostras dos homogenatos foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford

(Bradford, 1976). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm à 4° C. O sobrenadante foi vertido para tubo de polietileno lavado com BSA 0,1 % e foi realizada liofilização em centrífuga evaporadora por 12-10 horas até formação de resíduo. Depois de liofilizado, o resíduo foi ressuspendido seqüencialmente em 750 µl de água miliq, soluções de TFA 0,2% e TFA 0,1%. Para a completa dissolução desses resíduos foi utilizado aparelho de ultra-som (Vibra Cell, Sonics e Materials Inc). O sobrenadante resultante foi transferido para tubo de polietileno lavado com BSA 0,1% e logo após as angiotensinas foram extraídas em colunas C₁₈ - Bond Elut, novamente secas em centrífuga evaporadora e estocadas até o radioimunoensaio (RIE).

B - Extração de angiotensinas do plasma e ventrículo esquerdo em colunas Bond Elut - C₁₈.

Para obter as angiotensinas do plasma e tecido utilizou-se a extração em colunas Bond Elut. As colunas foram pré-ativadas com 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% e 10 ml de HFBA 0,1%. Com uma seringa aplicou-se pressão na coluna para que o líquido passasse por ela. Após pré-ativação, as colunas foram ativadas usando-se: 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1%, 10 ml de HFBA 0,1%, 3 ml de BSA 0,1%/HFBA 0,1%, 10 ml de ACN 10%/HFBA 0,1%, 3 ml de HFBA 0,1%. Após ativação da coluna as amostras foram aplicadas, seguindo-se de lavagem seqüencial com 20 ml de HFBA 0,1% e 3 ml de ACN 20%/HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluidos com 3 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1%. As amostras de plasma antes de serem aplicadas na coluna, foram centrifugadas por 20 min/2.500 rpm/4° C. As amostras foram secas em centrífuga evaporadora por 10-12 horas e após, foram congeladas até o RIE.

C - Homogeneização dos Átrios.

Os átrios direito e esquerdo foram coletados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a homogeneização. Os átrios foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador (Turax) em 2 ml de solução de ácido acético 0,1 M, contendo inibidores de proteases: EDTA 10^{-5} M, Pepstatin A 10^{-5} M e PMSF 10^{-5} M. Foi retirada uma alíquota para posterior dosagem de proteínas. As amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante foi separado e congelado a -80°C até o RIE.

D - Extração de ANP do plasma em colunas Sep-Pack C₁₈.

A extração do ANP do plasma foi feita em colunas Sep-Pack C₁₈. As amostras foram passadas pela coluna adaptando-se uma seringa à coluna o que permitiu aplicar uma pressão positiva, seguindo o seguinte protocolo: ativação da coluna aplicando-se 8 ml de acetonitrila, seguida da aplicação de 8 ml de acetato de amônio à 0,2% pH 4. Aplicação de 1 ml de amostra. Lavagem da coluna com 5 ml de acetato de amônio à 0,2%; eluição das amostras com 3 ml de solução contendo 60% de acetonitrila /40% de acetato de amônio. As amostras foram coletadas em tubo de polietileno lavado com BSA 0,1%. As amostras foram secas de 10 -12 horas em centrífuga evaporadora e estocados a -20°C até a realização do RIE.

E- Radioimunoensaio.

Foram coletadas amostras de sangue e tecido para realização de radioimunoensaio (RIE) para dosagens de angiotensinas – Ang II, Ang-(1-7). Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG (Botelho e cols, 1994).

E.1 - Radioimunoensaio para Angiotensina II.

Para obtenção dos valores de Ang II por radioimunoensaio foram utilizadas as seguintes soluções:

I - Tampão do ensaio: Tris-HCl 0,1 M, EDTA 15 mM e lysozima 0,1%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de água deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3 N e o volume completado para 500 ml em balão volumétrico com água deionizada.

II - Tampão II: NaCl 0,9%, BSA 0,1%, Ácido acético 0,03% . Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de água deionizada e o volume acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva padrão.

III - Anticorpo policlonal (1:250.000): Preparado a partir de uma solução estoque com título 1:50.000 em tampão do ensaio. Este anticorpo foi novamente diluído em tampão do ensaio para obter uma solução final na diluição de 1:250.000. Este anticorpo apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com Ang I e Ang-(1-7), 0,002% de reatividade cruzada com Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com Ang-(2-8), Ang-(3-8) e Ang-(4-8).

IV - ¹²⁵I Ang II: marcada, purificada e diluída em tampão do ensaio para uma concentração final de 6000 cpm para cada 0,1 ml.

V - Curva padrão: As concentrações dos padrões utilizados foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 pg/0,2 ml diluídos em tampão II, utilizando-se balão volumétrico preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/ml.

VI - Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação 18-22 horas. O carvão ativado e o dextran foram dissolvidos em tampão Tris, pH 7,4. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.

VII – Técnica

Cada ensaio seguiu o seguinte protocolo

Tabela 2 - Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang II.

| Soluções (µl) | Total | Branco | Po | Padrão | Amostra |
|-------------------------|-------|--------|-----|--------|---------|
| Tampão do ensaio | 1.100 | 100 | – | – | – |
| Tampão II | 200 | 200 | 200 | – | 100 |
| Pontos da curva | – | – | – | 200 | – |
| Amostra | – | – | – | – | 100 |
| ¹²⁵ I Ang II | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Anticorpo | – | – | 100 | 100 | 100 |
| Volume final | 1400 | 400 | 400 | 400 | 400 |

P0 – Valor de referência
¹²⁵I Ang II – Ang II radiodada.

Após a adição das respectivas soluções nos tubos eles foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Após a incubação foi adicionado 1 ml de suspensão de carvão em todos os tubos, exceto no tubo total, centrifugados a 4° C em 2.500 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e contado no contador gama.

E.2 - Radioimunoensaio para Angiotensina-(1-7).

Para obtenção dos valores de Angiotensina-(1-7) por radioimunoensaio foram utilizadas as seguintes soluções:

I - Tampão do ensaio: Tris-HCl 50 mM , BSA 0,1% , NaCl 50 mM, Ázida Sódica 0,02% . Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,5 com HCl 3 N e o volume completado para 500 ml em balão volumétrico com H₂O deionizada.

II – Tampão II: NaCl 0,9% , BSA 0,1%, Ácido acético glacial 0,03%. Os reagentes foram dissolvidos em 500 ml de água deionizada e o volume acertado em balão

volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva padrão.

III - Anticorpo policlonal (título 1:20.000). Preparado a partir de solução estoque de reconstituição 1:500, pela dissolução em tampão do ensaio. Esse anticorpo apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e Ang II, 0,001% de reatividade cruzada com Ang-(2-7), Ang-(3-7), 0,08% de reatividade cruzada com Ang-(4-7) e 0,005% com Ang-(1-5).

IV - ^{125}I Ang-(1-7): marcada, purificada e diluída com tampão do ensaio, para uma concentração de 6000 cpm para cada 0,1 ml.

V – Curva Padrão: As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 pg/0,1 ml, diluídos em tampão II utilizando-se balão volumétrico, preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/ml.

VI - Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran após incubação de 18-22 horas. O carvão ativado e o dextran foram dissolvidos em tampão do ensaio. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo por 1 hora antes do uso.

VII – Técnica

Cada ensaio seguiu o seguinte protocolo:

Tabela 3 - Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang-(1-7).

| Soluções (µl) | Total | Branco | P0 | Padrão | Amostra |
|----------------------------|-------|--------|-----|--------|---------|
| Tampão II | - | 100 | 100 | – | – |
| Tampão do ensaio | 1300 | 200 | 100 | 100 | 100 |
| Pontos da curva | – | – | – | 100 | – |
| Amostra | – | – | – | – | 100 |
| ^{125}I Ang-(1-7) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Anticorpo | – | – | 100 | 100 | 100 |
| Volume final | 1400 | 400 | 400 | 400 | 400 |

P0 – Valor de referência

^{125}I Ang-(1-7) – Ang radiodada.

Após adição das respectivas soluções nos tubos esses foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Após a incubação foi adicionado 1 ml de suspensão de carvão em todos os tubos exceto no tubo total e todos foram centrifugados a 4° C em 2.500 rpm por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e contado no contador gama.

E.3 – Radioimunoensaio para ANP.

I -Tampão do ensaio: fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,14 M, albumina bovina 0,1%, azida sódica 0,01%, triton X-100 0,1%. Os reagentes foram dissolvidos em 400 ml de água deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3 N e o volume completado para 500 ml em balão volumétrico com água deionizada. Tampão usado para as diluições do anticorpo e peptídeo radioativo, reconstituição e diluição das amostras do plasma e átrios respectivamente.

II – Anticorpos policlonais 1:60.000 diluído em tampão do ensaio.

III – ¹²⁵I ANP: marcado, purificado e diluído em tampão do ensaio para uma concentração de 10.000 cpm para cada 0,1 ml.

IV – Curva padrão: As concentrações de padrão utilizadas foram de 1.560, 780, 390, 195, 97,5, 48, 24, 12, 6, 3, 1,5 pg/0,1 ml adiluído em tampão do ensaio, preparadas a partir de uma solução estoque de 5 µg/µl.

V – Solução de polietilenoglicol 6,25%: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de polietilenoglicol 6,25% em água ao final da incubação.

VI – Técnica

Cada ensaio seguiu o seguinte protocolo.

Tabela 4 - Soluções e volumes utilizados para RIE de ANP

| | Soluções (µl) | Total | Branco | P0 | Padrão | Amostra |
|--------|--------------------|-------|--------|-----|--------|---------|
| 1º dia | Tampão do ensaio | – | 200 | 100 | – | – |
| | Padrão | – | – | – | 100 | – |
| | Amostra | – | – | – | – | 100 |
| | 1º Anticorpo | – | – | 100 | 100 | 100 |
| 2º dia | ¹²⁵ ANP | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3º dia | 2º Anticorpo* | – | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | SCN (Soro coelho)* | – | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Volume final | 100 | 500 | 500 | 500 | 500 |

*Após adição foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

P0 – Valor de referência.

Ao final dos períodos de incubações, foi adicionado 0,5 ml de polietilenoglicol a 6,25% em água. Os tubos foram então centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm, 4º C, e a radioatividade determinada por contador gama.

F - Dosagem de Proteínas

A determinação da proteína foi feita com o objetivo de corrigir e padronizar os resultados da concentração tecidual de angiotensinas e ANP por miligrama de proteína. Foi retirado 100 µl do homogenato para posterior dosagem de proteína. As amostras foram diluídas quando necessário, sendo usados 10 µl no ensaio que foi feito em duplicata. Foram adicionados às amostras, 40 µl de água miliq e 2,5 ml de

Comassie Blue. Foi utilizada albumina soro bovina (BSA) na concentração de 1 mg/ml para construção da curva padrão.

A curva padrão foi realizada de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 5 – Curva padrão para dosagem de proteína

| Pontos da Curva | Vol. Proteína | Vol. água | Vol. Comassie Blue |
|-----------------|---------------|-----------|--------------------|
| Branco | - | 50,0 µl | 2,5 ml |
| 2,5 µg | 2,5 µl | 47,5 µl | 2,5 ml |
| 5,0 µg | 5,0 µl | 45,0 µl | 2,5 ml |
| 10,0 µg | 10,0 µl | 40,0 µl | 2,5 ml |
| 20,0 µg | 20,0 µl | 30,0 µl | 2,5 ml |
| 40,0 µg | 40,0 µl | 10,0 µl | 2,5 ml |

Após adição de Comassie Blue, as amostras foram agitadas e deixadas à temperatura ambiente por 10 min, e então lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nanômetros. Os cálculos foram feitos a partir das absorbâncias obtidas.

3.2.4 - Retro-transcrição (RT), Reação da polimerase em cadeia (PCR), Reação da polimerase em cadeia em tempo real (PCR - Real Time) e Ribonuclease protection assay (RPA).

A - Extração de RNA total

A extração de RNA total do ventrículo e átrios de ratos SD e transgênicos foi realizada através da homogeneização desses órgãos em presença de TRIzol Reagent na proporção de 1 ml para cada 5 - 100 mg de tecido, conforme especificação do fabricante. Foi adicionado a cada homogenato 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de TRIzol, seguido de agitação e centrifugação a 12.000 rpm, 15 min, 4^o C. A solução resultante consiste de três fases, estando o RNA

presente na fase aquosa. O sobrenadante contendo o RNA foi transferido para outro frasco e esse ácido nucléico foi precipitado com 0,5 ml de álcool isopropílico para cada 1 ml de TRIzol novamente centrifugado a 12.000 rpm, 10 min, 4° C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% a 4° C para cada 1 ml de TRIzol e centrifugado a 7.500 rpm, 5 min, 4° C. O RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1 % de dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração foi determinada em espectrofotômetro na absorvância de 260 nm. O RNA foi aliquoteado e estocado a - 80° C.

B - Tratamento do RNA total com DNase

As amostras do RNA total foram tratadas com DNase I para eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico. Para cada amostra constituída de 2 µg de RNA foi realizada uma reação com os seguintes componentes: 1 µl de 10x PCR Buffer minus Mg, 4 µl de MgCl₂ 50 mM, 200 µl de DNase I 250, 1 µl RNA - 1µg, e água DEPC suficiente para completar o volume pré-estabelecido de 10 µl . Foi adicionado 1 µl EDTA 2,5 mM após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente com o objetivo de desativar a reação juntamente com o aquecimento a 65° C por 10 minutos, seguido de 1 minuto em gelo. O produto dessa reação foi utilizado para a retrotranscrição.

C - RT-PCR

A fim de determinar a expressão do angiotensinogênio, ECA2, colágenos I e III e o construct da angiotensina-(1-7) no coração dos animais SD e transgênicos, o RNA total tratado com DNase foi retrotranscrito utilizando-se 2 µg de RNA total incubados na presença de 3 µl de hexanucleotídeos randômicos (RH) (132,5 ng/µl), 1 mM de dNTPs, 40 U de Rnasin, 200 U da transcriptase reversa M-MLV e 10 mM de

DTT em um volume final de 30 μ l, sendo 6 μ l de 5x First Strand Buffer. Esta reação foi composta de duas etapas, sendo a primeira a 37° C com duração de 1 hora e a segunda a 65° C durante 5 minutos. A PCR foi realizada com 10 μ l da reação de RT em um volume final de 50 μ l de reação contendo 1 μ M dos óligos sense e anti-sense correspondentes a cada gene estudado (tabela 7), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 2 mM de MgCl₂ e 5 μ l de 10x PCR Buffer minus Mg. A reação de PCR foi realizada em quatro etapas, a saber: primeiro, 95° C durante 4 minutos; segundo, 30 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos na temperatura específica de cada óligo e 1 minuto a 72° C; terceiro, 7 minutos 72° C e quarto, 4° C infinito. A localização dos óligos foi definida de modo que o produto da amplificação foi uma seqüência característica e única. Para normalização das amostras foi utilizado como controle interno o GAPDH. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação. Na PCR foi utilizado água ao invés de cDNA . Após a reação de PCR 10 μ l de cada amostra correspondente aos tecidos dos animais SD e transgênicos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de brometo de etídio. O brometo de etídio se liga a moléculas de DNA e quando ativado pela luz ultravioleta emite fluorescência. A leitura do gel foi realizada em aparelho Núcleo Vision, o qual permite a quantificação do DNA.

A fim de determinar a expressão dos receptores Mas e AT₁ foi utilizado o PCR em tempo real. O cDNA obtido da etapa de RT (2 μ l) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR quantitativa tiveram um volume final de 20 μ l e foram feitas em duplicatas, utilizando 14 μ l do Master Mix de SYBR Green (Applied Biosystem), 2 μ l de cada *primer* na concentração de 1 nmol/ μ l, e 2 μ l de cDNA. O aparelho para reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem, EUA),

sendo realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60° C. Foi utilizado como controle interno o GAPDH.

Tabela 6 – Óligos utilizados na RT-PCR

| | Seqüência de nucleotídeos | Tamanho dos fragmentos (bp) |
|----------------|---|-----------------------------|
| hRENEX2 IG5 | Sense 5' GGACCAAGCCTGGCCATGTCC 3' Antisense 5' CATCACCCATCGAGAGAACC 3' | 450 |
| Aogen | Sense 5' ACA CCC CTG CTA GTC AGG TG 3' Antisense 5' ACC CCC TCT AGT GGC AAG TT 3' | 211 |
| ECA2 | Sense 5' CAA AGT TCA CTT GCT TCT TGG 3' Antisense 5' TAC TGT AAA TGG TGC TCA TGG 3' | 261 |
| Colágeno I | Sense 5' TGC CGT GAC CTC AAG ATG TG 3' Antisense 5' CAC AAG CGT GCT GTA GGT GA 3' | 462 |
| Colágeno III | Sense 5'AGA TCA TGT CTT CAC TCA AGT C 3' Antisense 5' TTT ACA TTG CCA TTG GCC TGA 3' | 463 |
| GAPDH | Sense 5'TTG TTG CCA TCA ACG ACC CC 3' Antisense 5' ATG AGC CCT TCC ACA ATG CC 3' | 341 |

Tabela 7 - Óligos utilizados na PCR em tempo real

| | Seqüência de nucleotídeos para Real Time PCR |
|--------------------------|---|
| Receptor Mas | Sense 5' TGA CCA TTG AAC AGA TTG CCA 3' Antisense 5' TGT AGT TTG TGA CGG CTG GTG 3' |
| Receptor AT ₁ | Sense 5' TCT CAG CAT CGA TCG CTA CCT 3' Antisense 5' AGG CGA GAC TTC ATT GGG TG 3' |
| GAPDH | Sense 5' ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G 3' Antisense 5'GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A 3' |

D - Ribonuclease Protection Assay (RPA)

Inicialmente foi feita uma reação de restrição utilizando o DNA purificado da maxi-prep contendo o DNA para ANP, CORIN com o objetivo de linearizar os plasmídeos.

Foram utilizados 10 µl do 10x Buffer T, 10 µg de DNA, 25 U de enzima de restrição específica para cada seqüência de DNA e água suficiente para um volume final de 50 µl. A linearização do plasmídeo foi confirmada através de corrida de 1 µl da reação de transcrição em gel de agarose 1%. O vetor linearizado foi então purificado utilizando-se kit de purificação Quiagen. A concentração do vetor purificado foi determinada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 260 nm.

Os plasmídeos linearizados e purificados foram utilizados para a geração de sondas radioativas através de transcrição *in vitro*. Essa reação consistiu de 0,5µg de DNA, 5 µl de tampão de transcrição 5x, 1µl de ATP 10 mM, 1µl de CTP 10 mM, 1 µl de GTP 10 mM, 2,5 µl de DTT 100 mM, 1 µl de Rnasin 40 U/µl, 1 µl de T7 ou SP6 polimerase, 3 µl de ³²P UTP e água DEPC para um volume final de 25 µl. Essa reação foi incubada a 37° C por 1 hora. Após esse período, foi adicionado 1 µl de Dnase/Rnase free (1000 U/µl) seguido por mais 15 minutos de incubação a 37° C. Todo o volume dessa reação foi purificado usando-se Quick Spin Columns For Radiolabeled DNA Purification da Roche. Foram adicionados 250 µl de tampão de eluição nos tubos contendo as sondas purificadas e uma alíquota de 1 µl foi contada em contador gama. Ainda para verificar a qualidade das sondas, uma outra alíquota dos probes foi aplicada em gel de poliacrilamida 5%. Uma vez confirmada a qualidade das sondas, essas foram estocadas a - 20° C até a etapa de hibridização.

O passo seguinte foi a preparação das amostras de RNA. Cada amostra foi composta de 40 µg de RNA de átrios e ventrículo esquerdo, que foram liofilizadas em centrífuga evaporadora.

Para a hibridização foram utilizados 60.000 cpm dos probes específicos e 30.000 cpm do marcador ribossomal L 32 utilizado como controle interno e 20 µl de tampão de hibridização. Foram utilizados 20 µg de Yeast RNA liofilizado como um segundo controle. Para cada reação foram utilizadas 4 amostras desse RNA, sendo que em 2 das amostras foram adicionados Rnase e outros 2 tubos permaneceram livres da enzima conservando assim intactos os probes. Todos os tubos foram brevemente agitados e centrifugados, aquecidos a 95 ° C por 5 minutos e novamente agitados e centrifugados e então incubados a 42 - 45° C overnight.

Ao término da incubação, foram adicionados 200 µl de tampão de digestão contendo Rnase em cada amostra, com exceção dos 2 controles já citados. Nesses controles foram adicionados 200 µl de tampão. Os tubos foram brevemente agitados, centrifugados e incubados por 1 hora a 37° C. Depois dessa incubação, foram adicionados 300 µl de solução de inativação em todos os tubos e novamente os tubos foram agitados, centrifugados e incubados por 30 minutos a - 20° C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos a 4° C. Ao fim dessa etapa um precipitado foi visualizado e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado em cada tubo 8 µl de tampão de corrida, as amostras foram aquecidas novamente a 95° C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 5%. Após 2 horas de corrida, o gel foi transferido para um papel de filtro e submetido à secagem por 2 horas a 80° C. O gel após seco foi exposto a filme autoradiográfico por 12 horas. Esse filme então foi revelado e seguiu-se a quantificação do mRNA no software TINA 2.0.

3.2.5 - Métodos Histométricos

O coração foi retirado e foram extraídas fatias transversais da base do ventrículo esquerdo, contendo parede ventricular e septo. O material foi fixado por imersão em solução de paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2-7,4), durante 24 horas à temperatura ambiente. Após, seguiu-se desidratação utilizando-se gradiente crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 100%), infiltração e inclusão em resina a base de glico-metacrilato (JB-4TM Polysciences). Posteriormente a montagem dos blocos, as amostras foram submetidas a microtomia em secções de 2 µm com intervalos de 20 cortes. Depois de corados pela técnica de Rosenfeld (Rosenfeld, 1947), os cortes foram submetidos à microscopia eletrônica. Percorreu-se toda a secção do ventrículo esquerdo com objetiva de imersão em óleo (100x) para captação de imagens digitalizadas de cardiomiócitos seccionados longitudinalmente, com núcleo visível e limites celulares definidos. Para cada animal foram analisados de 50 a 100 cardiomiócitos. Para digitalização das imagens utilizou-se câmera digital (Axioplan Color, Zeiss) acoplada a microscópio Axioplan 2 da Zeiss e o programa de análise de imagens KS 400 3.0 da Zeiss. Tais procedimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Neurobiologia da Profa. Elisabeth Ribeiro da Silva Camargo do Departamento de Morfologia dessa instituição.

3.2.6 - Imunofluorescência

Visualização e quantificação da deposição de fibras colágenas e fibronectina no tecido cardíaco.

Para essa análise utilizaram-se fragmentos do ventrículo esquerdo de animais controles e transgênicos. Após a retirada das amostras, o tecido foi colocado em Tissue Tek (OCT compound, Miles, USA) e imediatamente congelado em nitrogênio

líquido e armazenados a -80°C . Secções de $7\ \mu\text{m}$ de espessura foram obtidas em criostato à -20°C . Foram feitos secções alternadas das amostras, coletadas em lâminas de vidro tratadas com silano a 2%, fixadas por imersão em Metanol (Merk P. A.) por 10 minutos e secas em temperatura ambiente por 10 minutos.

Após a fixação os cortes foram banhados em PBS por 10 min e em seguida foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo utilizando-se BSA 1%, Tween 20 0,1% em PBS durante 40 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente. Terminado o período de bloqueio, as secções foram incubadas com os respectivos anticorpos primários diluídos em BSA 0,1%, Tween 20 0,1% em PBS (Tabela 8). Os cortes foram incubados em câmara úmida, overnight a 4°C . A retirada dos anticorpos primários dos cortes foi feita utilizando-se 4 banhos de PBS durante 5 minutos cada, e então foi feita a incubação com anticorpo secundário, que foi diluído em BSA 0,1%, Tween 20 0,1% em PBS durante 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Novamente as secções foram imersas em 4 banhos de PBS durante 5 minutos, as lâminas foram secas e montadas utilizando-se solução de glicerina 90%, Tris 1 M 10%, pH 9,0. Em todas as análises foram realizados controles negativos, que consistiu da incubação do anticorpo secundário na ausência do anticorpo primário. Os cortes foram então submetidos à microscopia confocal Zeiss 510 Meta.

Para a quantificação dos colágenos I, III e fibronectina foi medida a intensidade de fluorescência no miocárdio. As imagens foram analisadas em escala de cinza através do programa Image Tool 2.0. A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade “Nível de cinza”, que varia do valor de zero (preto) ao valor de 255 (branco). Quanto mais próximo do valor de 255, maior a intensidade de fluorescência. Os parâmetros do microscópio confocal utilizados foram os mesmos para as amostras de animais SD, TG e os controles dos anticorpos secundários,

tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e passível de comparação.

Tabela 8 – Descrição dos anticorpos utilizados para imunofluorescência.

| Anticorpo | Especificação | Diluição | Fonte |
|-------------|--|----------|---------------------------|
| Primários | Policlonal, coelho anti colágeno I humano | 1:400 | Research Diagnostics Inc. |
| | Policlonal, coelho anti colágeno III humano | 1:400 | Rockland. |
| | Policlonal, coelho anti fibronectina humano | 1:600 | Rockland. |
| Secundários | Policlonal, burro anti cabra conjugado a Cy5 | 1:400 | JacksonImmuno Research |
| | Policlonal, burro anti-(IgG de coelho) conjugado a Alexa fluor | 1:400 | Molecular Probes |

4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média dos valores individuais de cada grupo. Os dados de hipertrofia cardíaca foram analisados utilizando “Two-Way” ANOVA seguido de análise de Bonferroni. Os demais parâmetros foram analisados utilizando Teste *t* de Student. Os níveis de significância foram fixados em $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 – Análise dos pesos relativos e morfometria das câmaras cardíacas.

Após 1 semana de tratamento com injeções diárias de isoproterenol, os ratos foram sacrificados por decapitação. O coração foi retirado e dissecado. O ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e átrios foram pesados, e uma fração do VE foi retirada para análise morfométrica. A tabela abaixo mostra o peso relativo médio das câmaras cardíacas e coração total dos grupos experimentais ao final do período de tratamento.

Tabela 9 – Peso relativo das câmaras cardíacas e coração total.

| | SD controle | SD ISO | TGR controle | TGR ISO |
|---------------|-------------|--------|--------------|---------|
| Átrios | 0,054 | 0,049 | 0,049 | 0,052 |
| VD | 0,054 | 0,068 | 0,065 | 0,082 |
| VE | 0,245 | 0,301 | 0,237 | 0,271 |
| Coração total | 0,353 | 0,418 | 0,351 | 0,405 |

Valores expressos em mg de tecido/g de peso corporal. Dados analisados de 6 a 8 animais em cada grupo.

A relação peso ventricular/peso corporal do VE dos ratos SD tratados com ISO estava significativamente aumentada quando comparada aos ratos que receberam veículo ($3,0 \pm 0,1$ vs $2,5 \pm 0,04$ mg/g em ratos tratados com salina, n=8 e n=6 respectivamente). Nos ratos TG o tratamento com ISO também induziu hipertrofia do VE ($2,7 \pm 0,06$ vs $2,4 \pm 0,03$ mg/g em ratos tratados com salina, n=8 e n=6 respectivamente). Porém a hipertrofia induzida pelo ISO nos ratos TG foi significativamente menor quando comparada com os ratos normais ($2,7 \pm 0,06$ vs $3,0 \pm 0,1$ mg/g, em ratos SD, n=8) (Fig.3).

Na análise morfométrica, as áreas das secções transversas dos cardiomiócitos estavam significativamente aumentadas nos ratos tratados com ISO em ambos os grupos quando comparados com os ratos que receberam veículo ($17,46 \pm 0,14$ vs $13,46 \pm 0,09$ μm em ratos SD tratados com salina, n=4, e $14,13 \pm 0,10$ vs $12,41 \pm 0,10$ μm em ratos TG tratados com salina, n=6 e n=4 respectivamente). Corroborando os dados obtidos com a análise relativa do VE, as áreas transversas dos cardiomiócitos estavam significativamente menores nos ratos TG tratados com ISO quando comparados com os ratos SD tratados com ISO ($14,13 \pm 0,10$ vs $17,46 \pm 0,14$ μm em ratos SD, n=6 e n=4 respectivamente) (Fig.4).

Hipertrofia Ventricular Esquerda

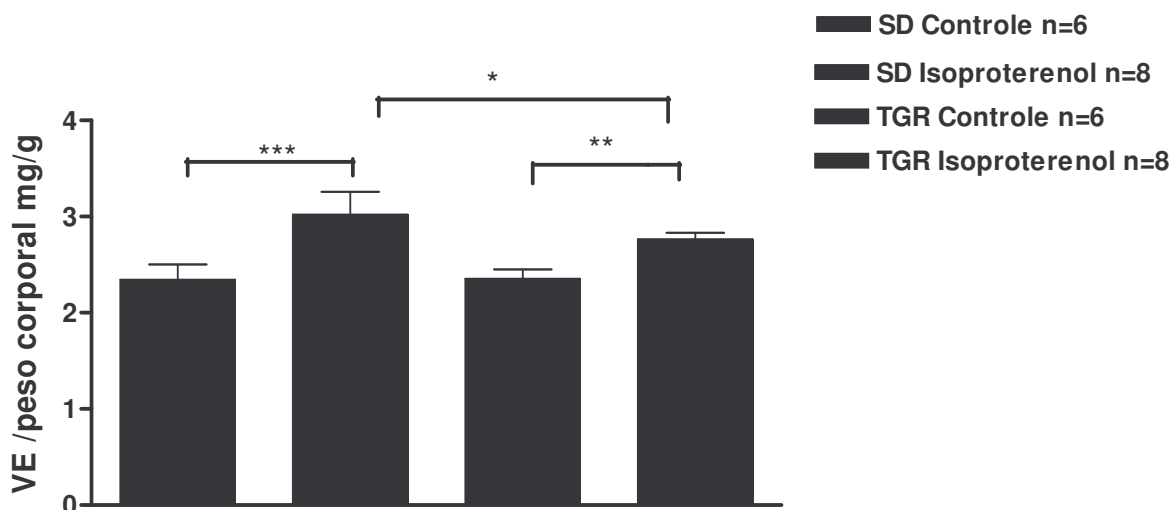


Figura 3 - Relação peso VE/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$.

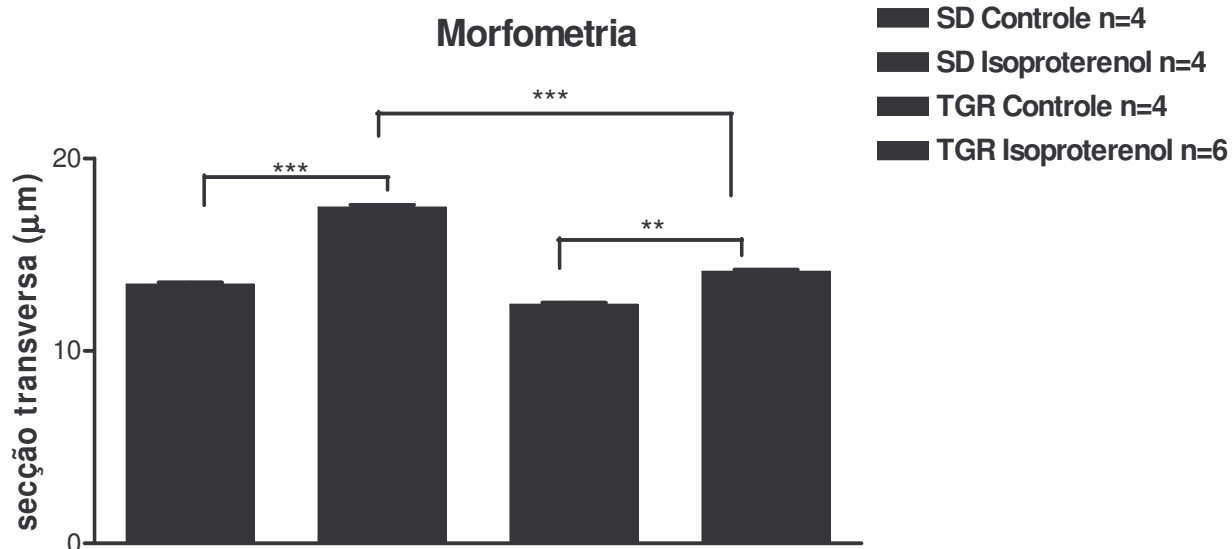


Figura 4 - Análise morfométrica de cardiomiócitos no VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Foram medidas 50 a 100 cardiomiócitos em cada animal. Os dados representam a média \pm EPM. (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$.

A análise da relação peso órgão/peso corporal do VD e átrios não demonstraram alterações significativas entre os ratos SD e TG. (Figs. 5 e 6).

Ventrículo Direito

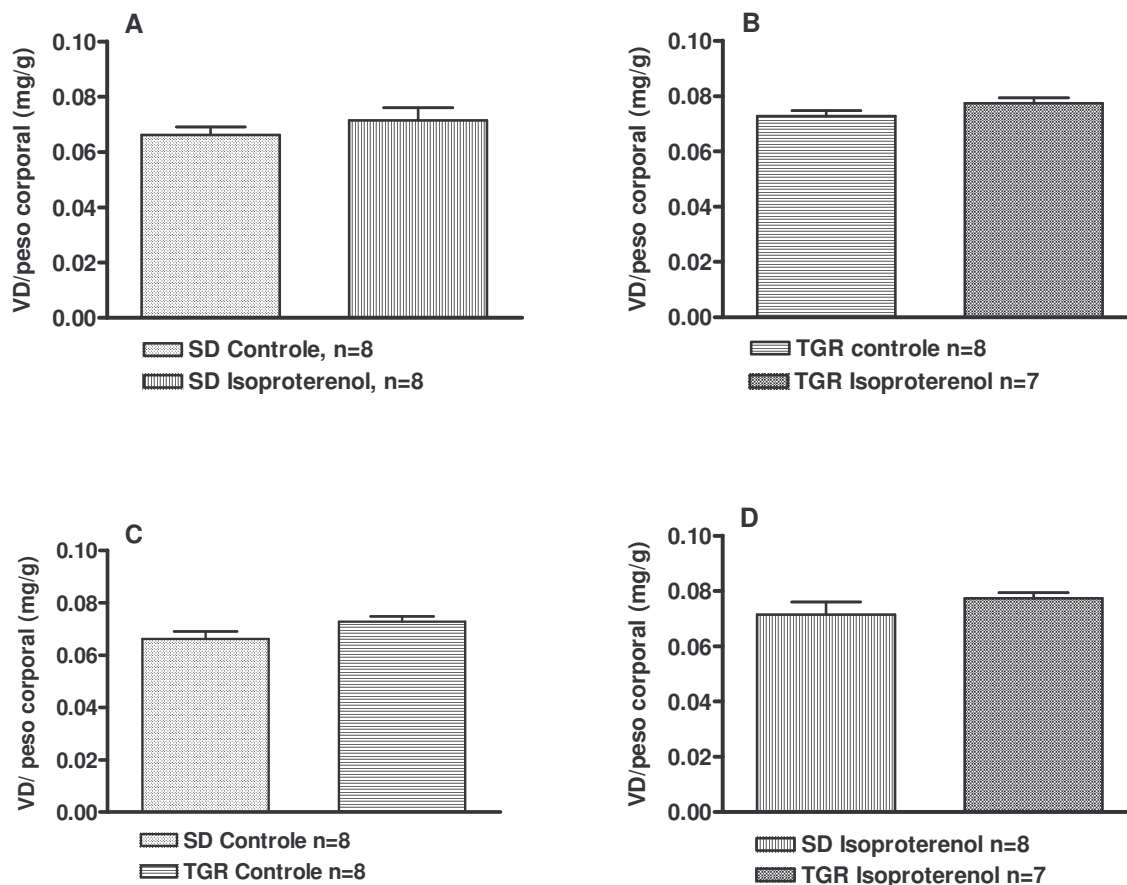


Figura 5 - Relação peso VD/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM.

Átrios

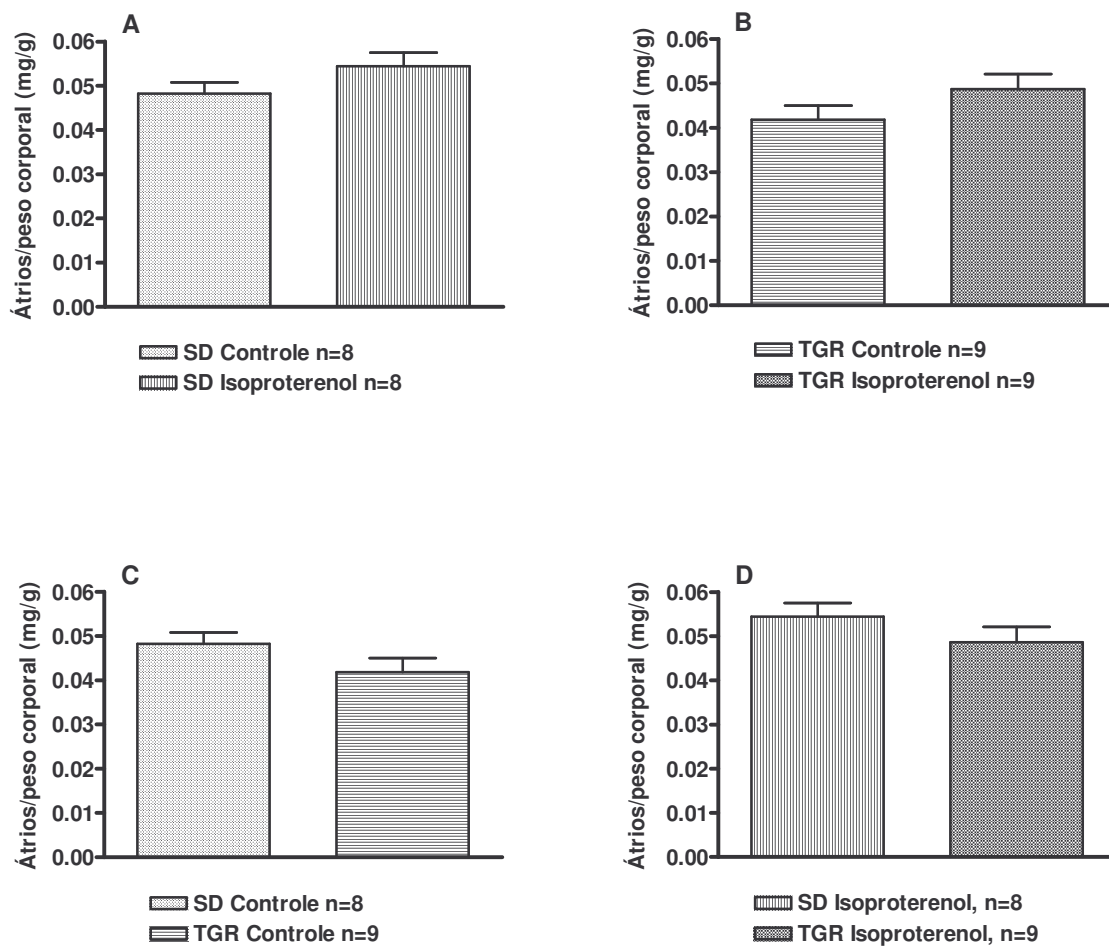


Figura 6 - Relação peso Átrios/peso corporal de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM.

5.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO TRANSGENE DETERMINADO POR RT-PCR.

A expressão do gene transgênico foi avaliada no VE dos ratos TG e SD após o tratamento com ISO. O transgene não sofreu alteração em sua expressão após o tratamento com ISO afastando dessa forma a possível produção local de Ang-(1-7) proveniente desse gene, ficando restrita aos testículos a fonte endógena dessa angiotensina. Foi utilizada como controle positivo amostra de testículo (test.) do rato TG (fragmento de \cong 450 bp)(Fig 7).

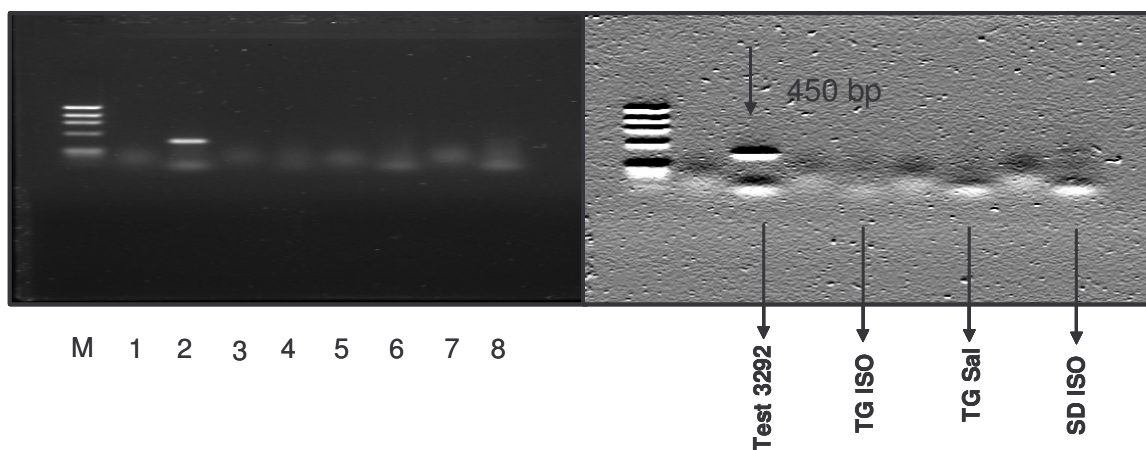


Figura 7 – Gel representativo da expressão do transgene analisada por RT-PCR no VE dos animais SD e TG.

5.3 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ANGIOTENSINAS E OUTROS FATORES RELACIONADOS AO SRA.

Os níveis cardíacos de Ang II estavam significativamente diminuídos nos ratos TG quando comparados aos ratos SD em condições basais ($0,77 \pm 0,04$ vs $1,05 \pm 0,07$ pg/mg de proteína em ratos SD, n=6)(Fig.8). Em contraste, os níveis plasmáticos de Ang II estavam significativamente aumentados nos ratos TG($112 \pm 12,37$ vs $76,69 \pm 10,14$ pg/ml de plasma em ratos SD, n=8)(Fig.9). O tratamento com ISO induziu um aumento dos níveis cardíacos de Ang II nos ratos SD ($1,23 \pm 0,05$, n=7 vs $1,052 \pm 0,07$ pg/mg de proteína em ratos tratados com salina, n= 6)(Fig.8) porém sem alterações dos níveis plasmáticos de Ang II.

O tratamento com ISO não promoveu alterações nos níveis cardíacos de Ang II nos ratos TG ($0,83 \pm 0,1$ n=7 vs $0,77 \pm 0,04$ pg/mg de proteína em ratos tratados com salina, n=8). Os níveis plasmáticos também permaneceram inalterados após o tratamento com ISO (Fig.9).

Ang II Ventrículo Esquerdo

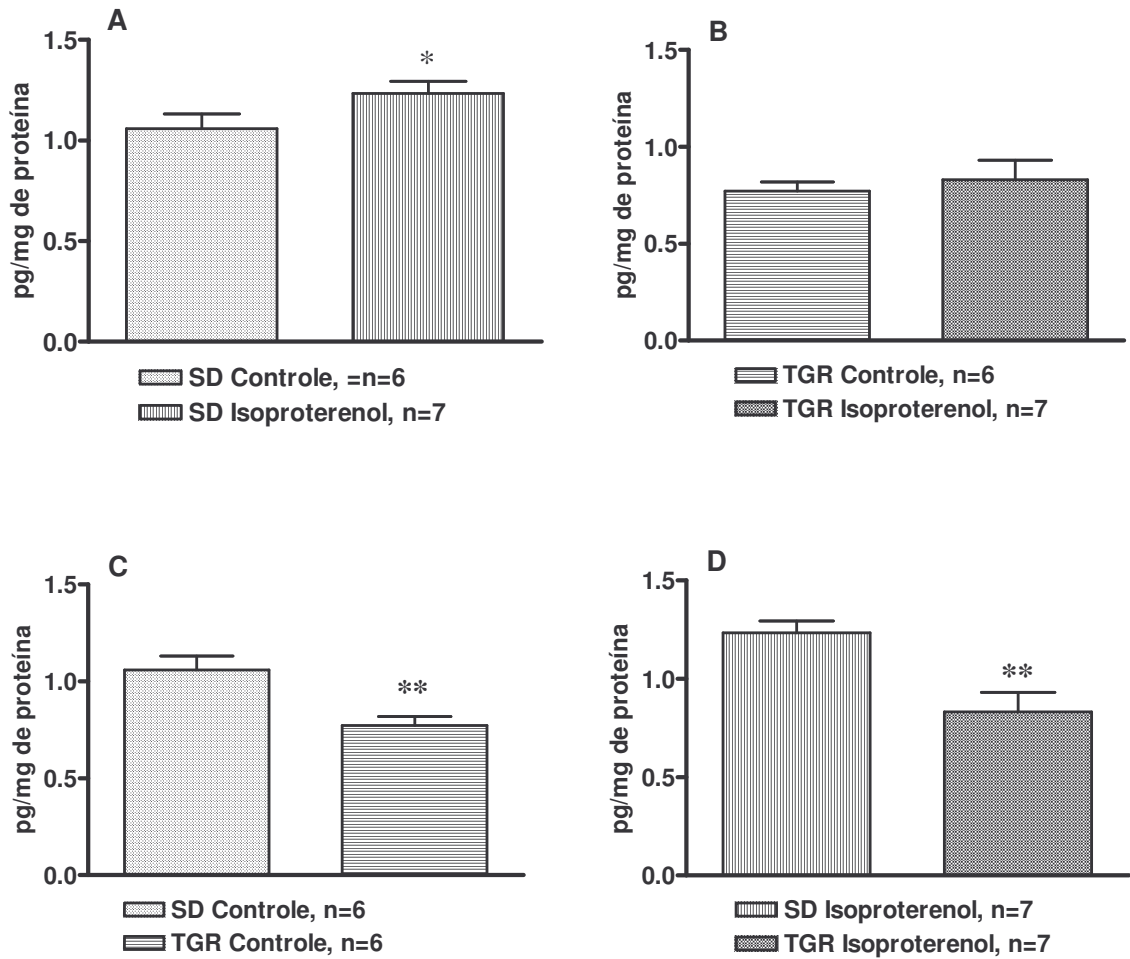


Figura 8 - Concentração de Ang II em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas C₁₈. Os valores estão expressos como picogramas do peptídeo por miligramas de proteínas. Os dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,003$.

Ang II Plasma

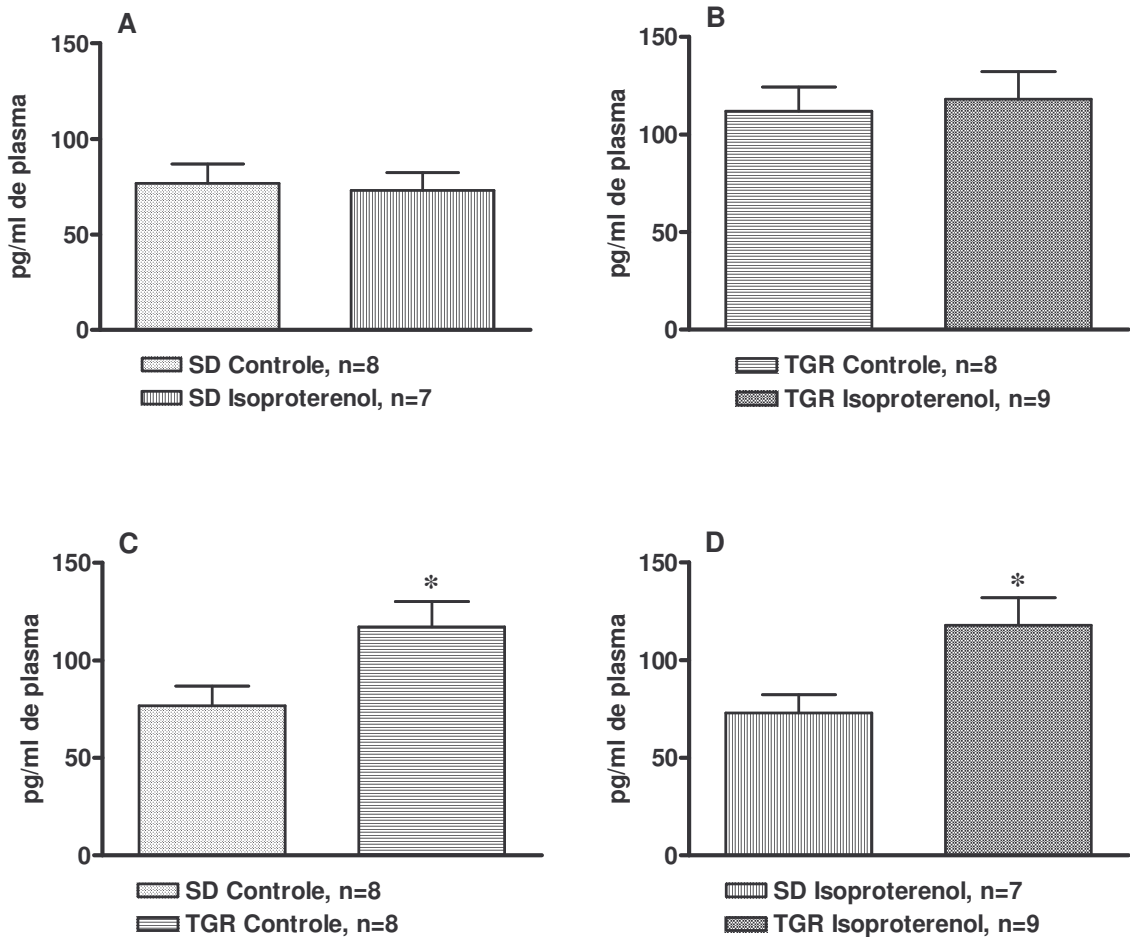


Figura 9 - Concentração de Ang II no plasma de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas C_{18} . Os valores estão expressos como picogramas do peptídeo por mililitros de plasma. Os dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

Não foram observadas alterações nos níveis cardíacos de Ang-(1-7) entre os ratos SD e TG em condições basais ($0,439 \pm 0,07$ vs $0,406 \pm 0,05$ em ratos TG, $n=6$ e $n=7$ respectivamente). O tratamento com ISO não promoveu alterações nos níveis cardíacos de Ang-(1-7) nos ratos SD ($0,621 \pm 0,13$ vs $0,439 \pm 0,07$ em ratos com salina, $n=6$). Os níveis cardíacos de Ang-(1-7) permaneceram inalterados nos ratos

TG tratados com ISO ($0,415 \pm 0,07$ vs $0,406 \pm 0,05$ em ratos com salina, $n=8$ e $n=7$ respectivamente).

Ang-(1-7) Ventrículo Esquerdo

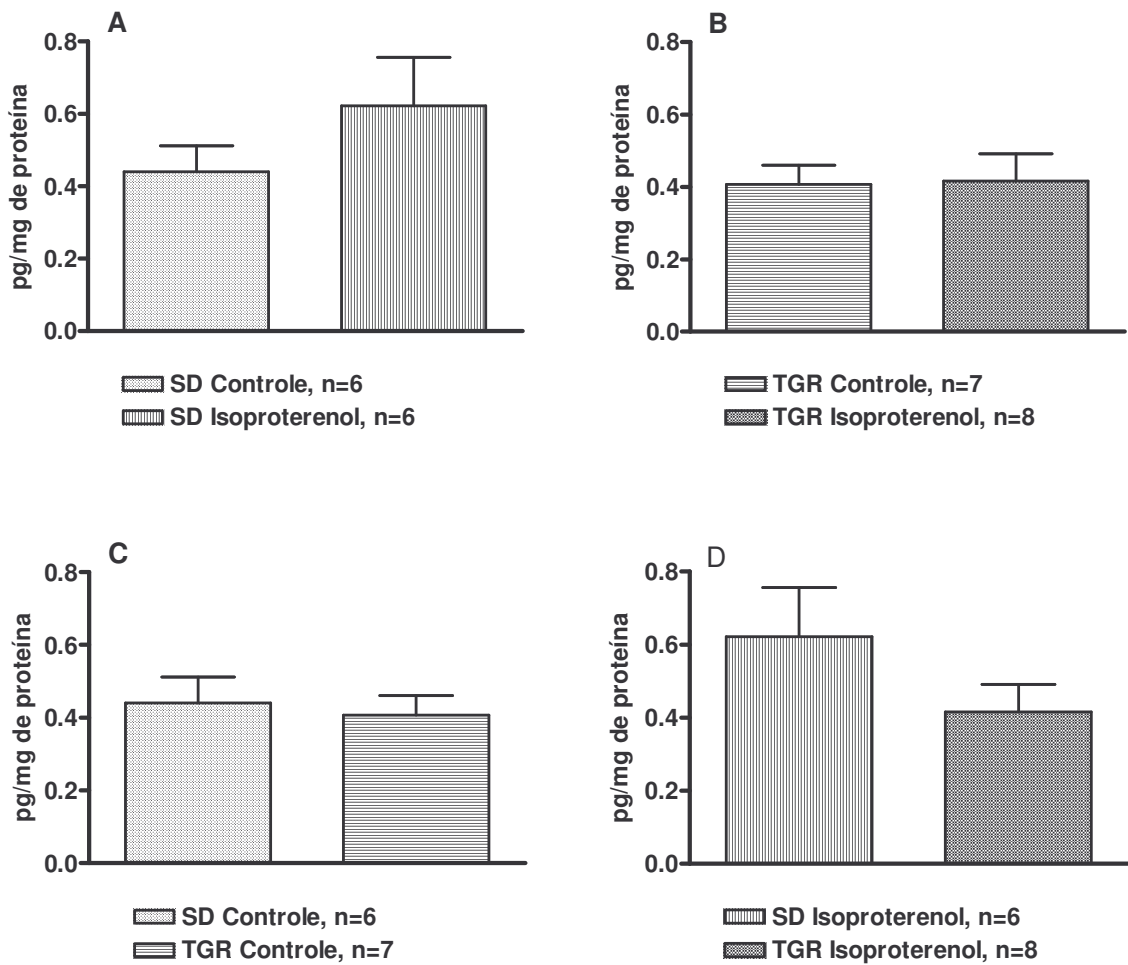


Figura 10 - Concentração de Ang-(1-7) em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas C₁₈. Os valores estão expressos como picogramas do peptídeo por miligramas de proteínas. Os dados representam a média \pm EPM.

A expressão de angiotensinogênio analisada por RT-PCR está diminuída nos animais TG quando comparados aos animais SD em condições basais ($0,031 \pm 0,001$ vs $0,046 \pm 0,01$ unidades arbitrárias em ratos SD, $n=3$). O tratamento com isoproterenol não alterou a expressão de angiotensinogênio nos animais TG quando comparados aos animais que receberam veículo (Fig. 11).

Expressão Angiotensinogênio RT-PCR

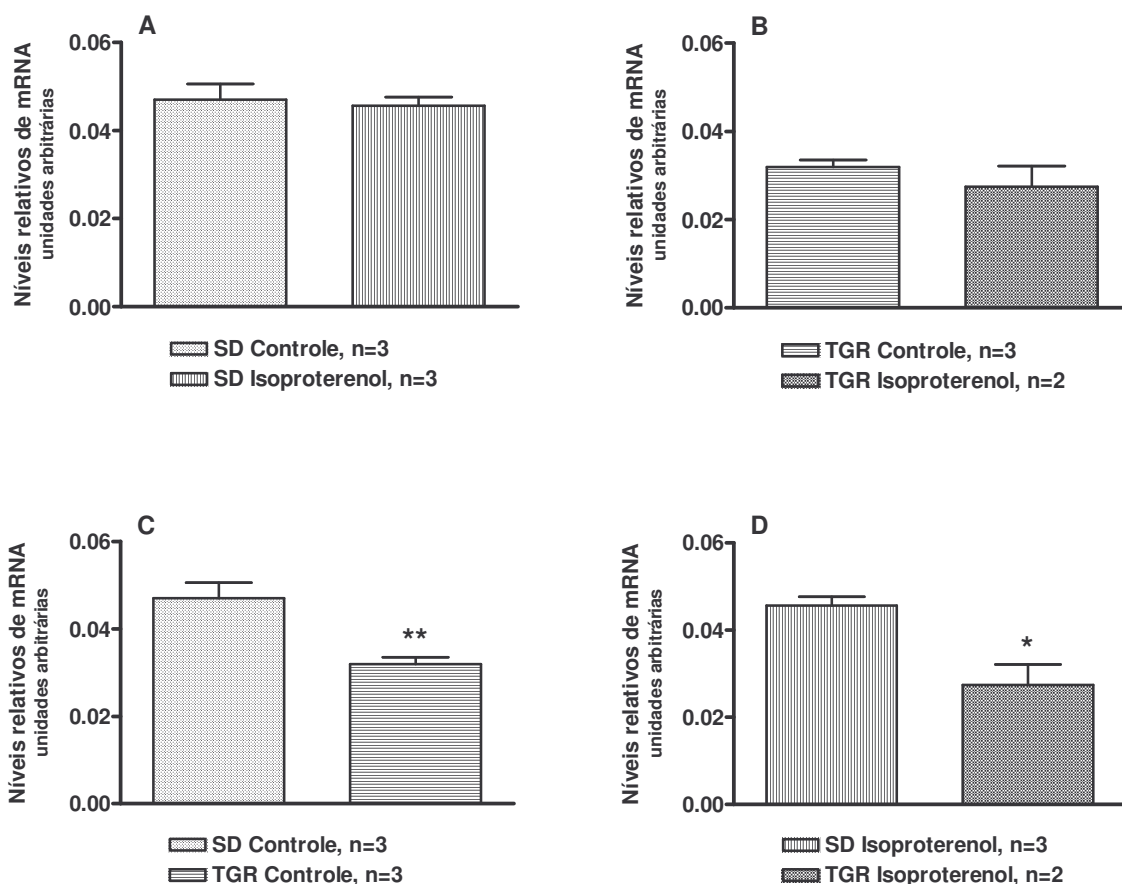


Figura 11 - Expressão do gene para angiotensinogênio analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM. (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Adicionalmente à diminuição do angiotensinogênio, foi observado aumento na expressão do gene para ECA2 no VE dos ratos TG em condições basais quando comparados aos ratos SD ($0,151 \pm 0,03$ vs $0,068 \pm 0,006$ em ratos SD, $n=4$). Nos ratos TG o tratamento com o ISO não alterou a expressão do gene para ECA2. Diferentemente do que ocorreu com os ratos TG, nos ratos SD foi observado um aumento da expressão do gene para ECA2 após o tratamento com o ISO ($0,068 \pm 0,006$ vs $0,142 \pm 0,013$ em ratos tratados com ISO $n=4$)(Fig.12).

Expressão ECA2 RT-PCR

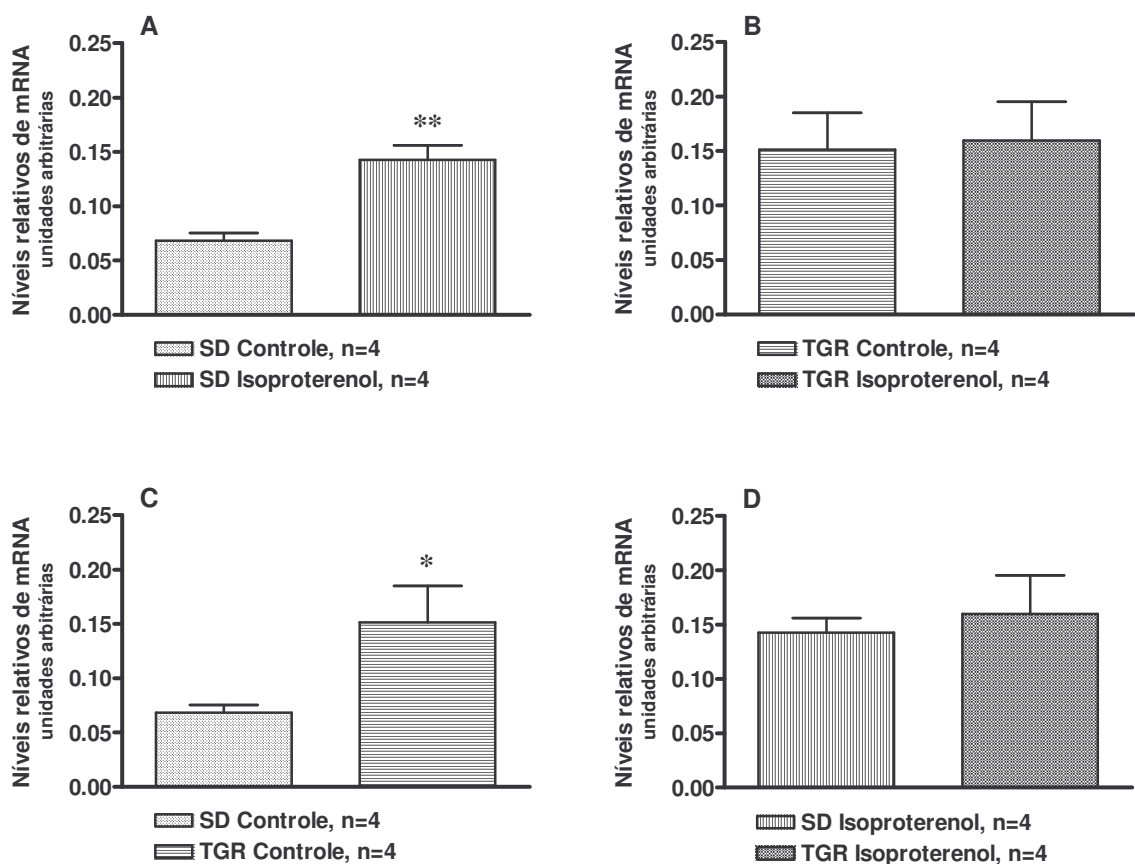


Figura 12 - Expressão do mRNA para ECA2 analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM. (**) $p < 0,001$; (*) $p < 0,05$.

A expressão do mRNA para o receptor AT₁ estava significativamente diminuída no VE dos ratos SD que receberam o ISO quando comparados aos seus controles que receberam veículo ($0,140 \pm 0,06$ vs $0,541 \pm 0,14$ em ratos tratados com salina, n=5). Dentre os ratos TG não houve alterações na expressão do mRNA para o receptor AT₁ após o tratamento com ISO ($0,479 \pm 0,16$ vs $0,483 \pm 0,14$ em ratos tratados com salina, n=5). Não houve diferenças na expressão do mRNA para o receptor AT₁ entre os ratos TG e SD em condições basais ($0,483 \pm 0,14$ vs $0,541 \pm 0,14$ em ratos SD, n=5)(Fig 13).

Expressão receptor AT₁ RT-PCR

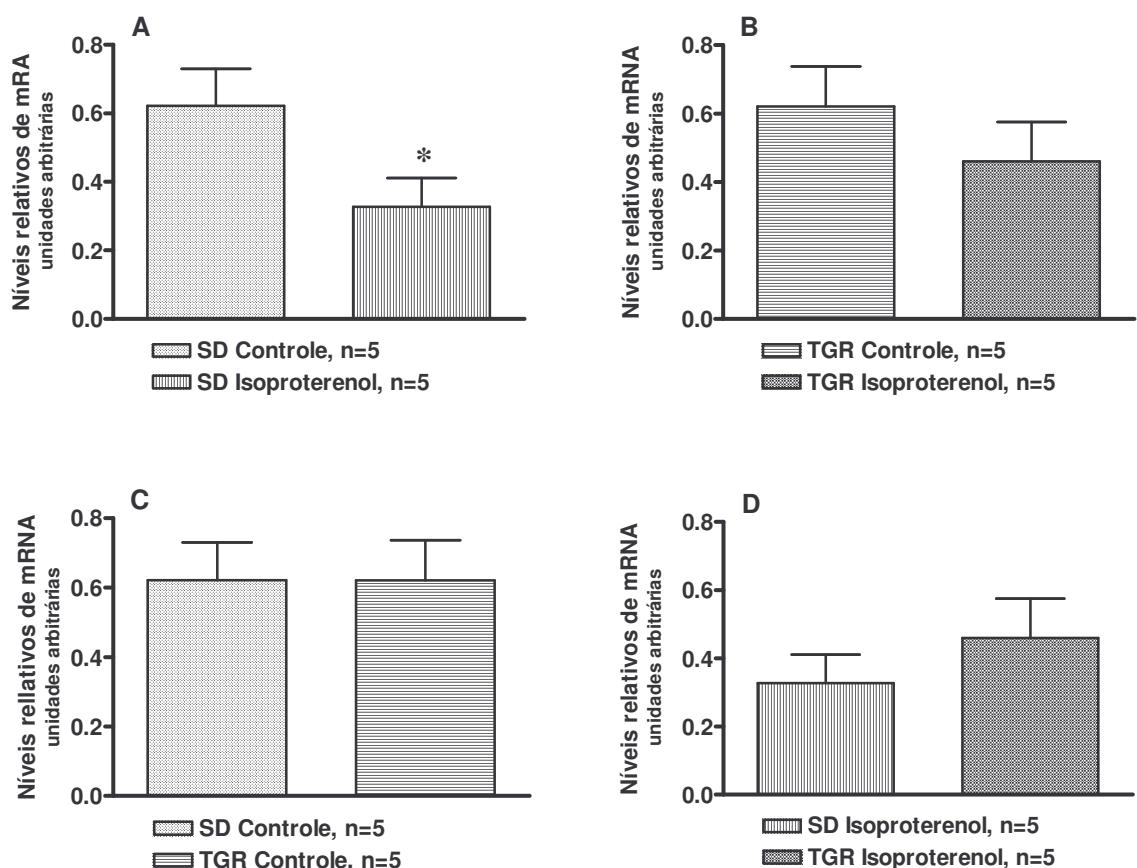


Figura 13 – Expressão do mRNA para receptor AT₁ analisada por PCR em tempo real em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a media \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

A expressão do mRNA para o receptor Mas no VE estava significativamente diminuída nos ratos SD que receberam o ISO quando comparados aos controles que receberam o veículo ($0,327 \pm 0,08$ vs $0,621 \pm 0,10$ em ratos com salina, $n=4$). Os ratos TG não apresentaram alterações na expressão do mRNA para o receptor Mas no VE em resposta ao ISO ($0,459 \pm 0,11$ vs $0,620 \pm 0,11$ em ratos com salina, $n=5$). Não houve diferenças na expressão do mRNA para o receptor Mas no VE dos ratos TG quando comparados os ratos SD em condições basais ($0,620 \pm 0,11$ vs $0,621 \pm 0,10$ em ratos SD, $n=4$ e 5 ratos)(Fig.14).

Expressão receptor MAS RT-PCR

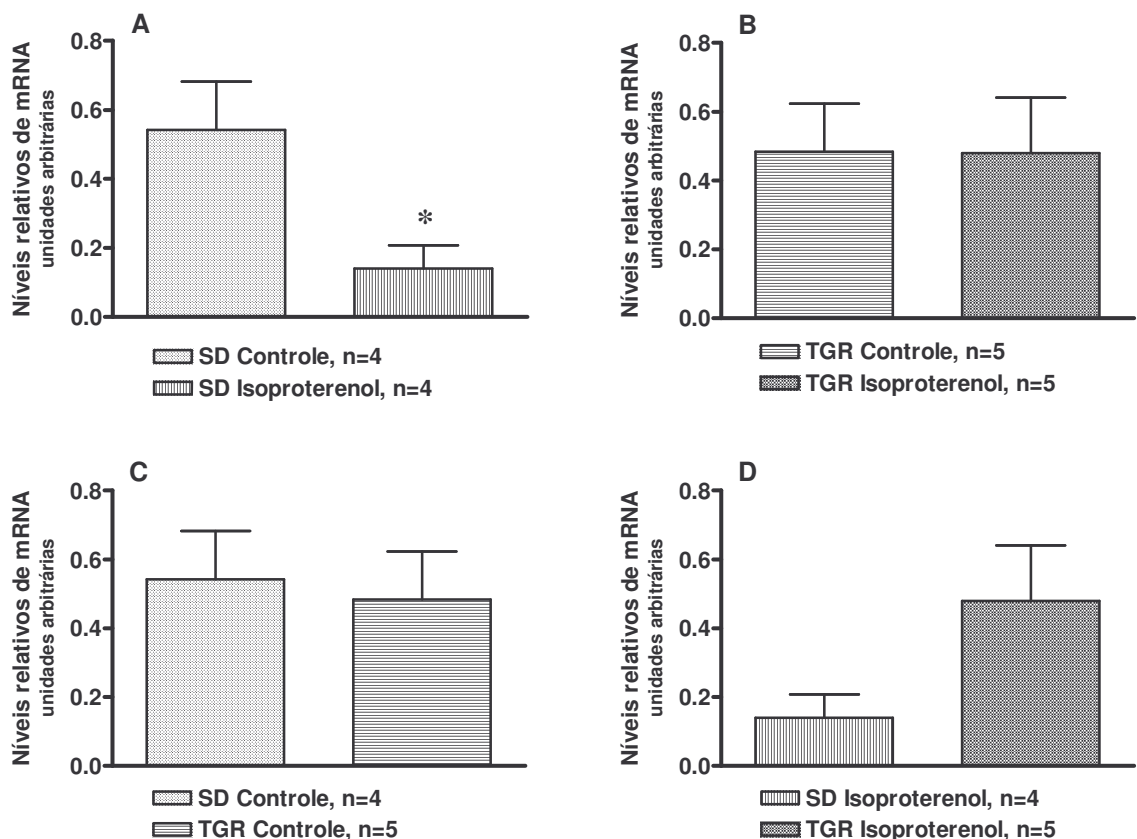


Figura 14 - Expressão do mRNA para receptor Mas analisada por PCR em tempo real em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a media \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

5.4 – ANÁLISE DOS NÍVEIS E EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO ATRIAL.

Como podemos observar na figura 15, os níveis plasmáticos de ANP estavam significativamente elevados nos ratos SD tratados com ISO quando comparados com os ratos que receberam veículo ($188,6 \pm 21,19$ n=9 vs $124,0 \pm 18,97$ pg/ml de plasma em ratos tratados com ISO, n=10, $p<0,01$). Surpreendentemente os ratos TG apresentaram elevados níveis de ANP no plasma quando comparados aos ratos SD em condições basais ($204,2 \pm 33,52$ n=7 vs $124,0 \pm 18,97$ pg/ml de plasma, n=9, $p<0,02$). Esse aumento dos níveis plasmáticos não foi alterado pelo tratamento com ISO nos ratos TG quando comparados aos ratos que receberam veículo ($201,4 \pm 28,25$ vs $204,2 \pm 33,52$ pg/ml de plasma, n=10 e n=7, respectivamente).

Paradoxalmente aos resultados observados nas amostras de plasma, os níveis de ANP nos átrios mostraram-se significativamente diminuídos nos ratos SD tratados com ISO em relação aos animais que receberam o veículo ($0,195 \pm 0,05$ vs $1,387 \pm 0,325$ ng/mg de proteína, n=10 e n=8, respectivamente). Os ratos TG apresentaram níveis diminuídos de ANP quando comparados com os ratos SD em condições basais ($0,157 \pm 0,03$ vs $1,387 \pm 0,32$ ng/mg de proteína, n=10 e n=8, respectivamente). Essa diminuição dos níveis de ANP permaneceu inalterada nos ratos TG após o tratamento com ISO quando comparados aos ratos que receberam veículo ($0,157 \pm 0,03$ vs $0,126 \pm 0,01$ ng/mg de proteína, n=10 vs n=13, respectivamente)(Fig. 16).

ANP Plasma

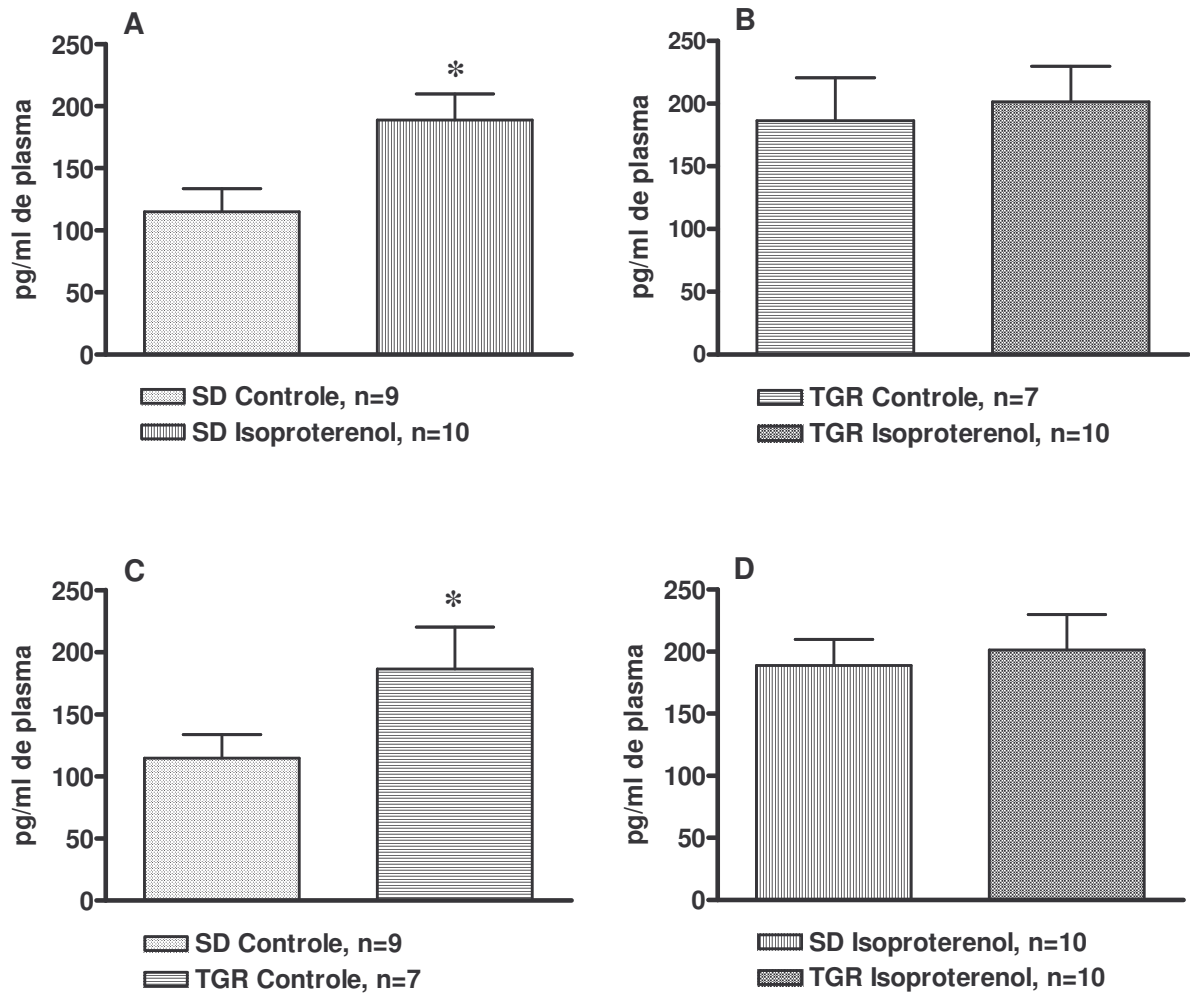


Figura 15 – Concentração de ANP no plasma de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE após extração em colunas Sep-Pack C₁₈. Os dados estão expressos como picogramas de ANP por mililitros de plasma. Os dados representam a média ± EPM. (*) $p < 0,05$.

ANP Átrios

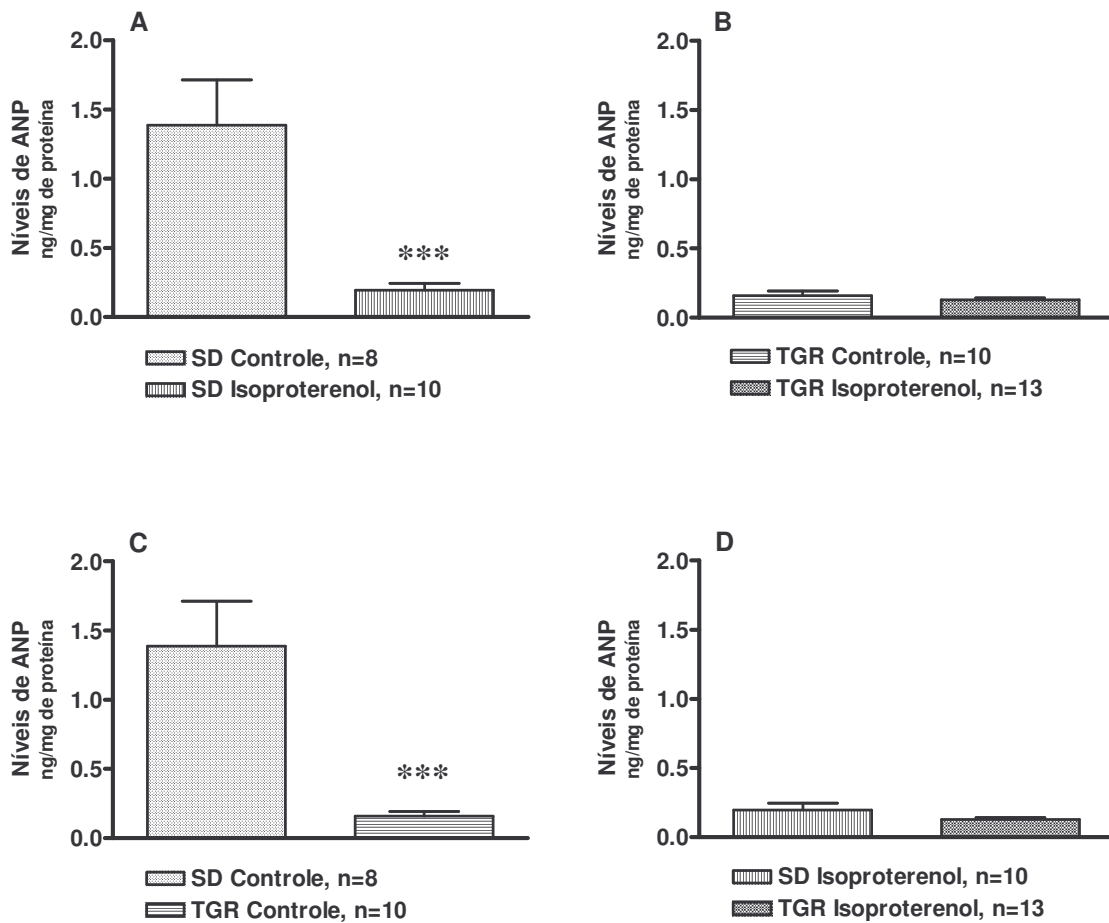


Figura 16 – Concentração de ANP nos átrios de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO medida por RIE. Os dados estão expressos como nanogramas de ANP por miligramas de proteínas. Os dados representam a média \pm EPM. (***) $p < 0,0001$.

Com o objetivo de esclarecer as alterações no perfil do ANP no plasma e átrios encontrados nos ratos TG, utilizamos o RPA para verificar a expressão dos genes responsáveis pela produção do ANP e enzima CORIN, sendo essa a enzima que converte o pro-ANP em peptídeo ativo. Foram utilizadas amostras de RNA total de átrios dos ratos SD e TG em condições basais e após o tratamento com ISO. A expressão do mRNA para ANP avaliado por RPA mostrou-se diminuída nos átrios dos ratos SD após o tratamento com ISO quando comparados aos ratos que receberam veículo ($0,689 \pm 0,103$ vs $1,101 \pm 0,08$ em ratos tratados com salina $n=3$). Os ratos TG apresentaram uma diminuição na expressão do mRNA para o ANP quando comparados com os ratos SD em condições basais ($0,421 \pm 0,137$ vs $1,101 \pm 0,08$ $n=3$). Essa diminuição da expressão do mRNA não foi alterada pelo tratamento com ISO nos ratos TG quando comparados aos ratos que receberam veículo ($0,466 \pm 0,121$ vs $0,421 \pm 0,137$ em ratos SD $n=3$)(Fig.17).

A expressão do mRNA para CORIN está diminuída nos átrios dos ratos SD após o tratamento com ISO quando comparados aos ratos que receberam o veículo ($0,050 \pm 0,01$ vs $0,118 \pm 0,01$ em ratos tratados com ISO, $n=3$). Os ratos TG apresentaram diminuição acentuada na expressão do mRNA para a CORIN quando comparados com os ratos SD em condições basais ($0,017 \pm 0,005$ vs $0,118 \pm 0,01$ em animais SD, $n=3$). O tratamento com ISO não alterou a expressão desse mRNA nos ratos TG (Fig. 18).

ANP - Átrios RPA

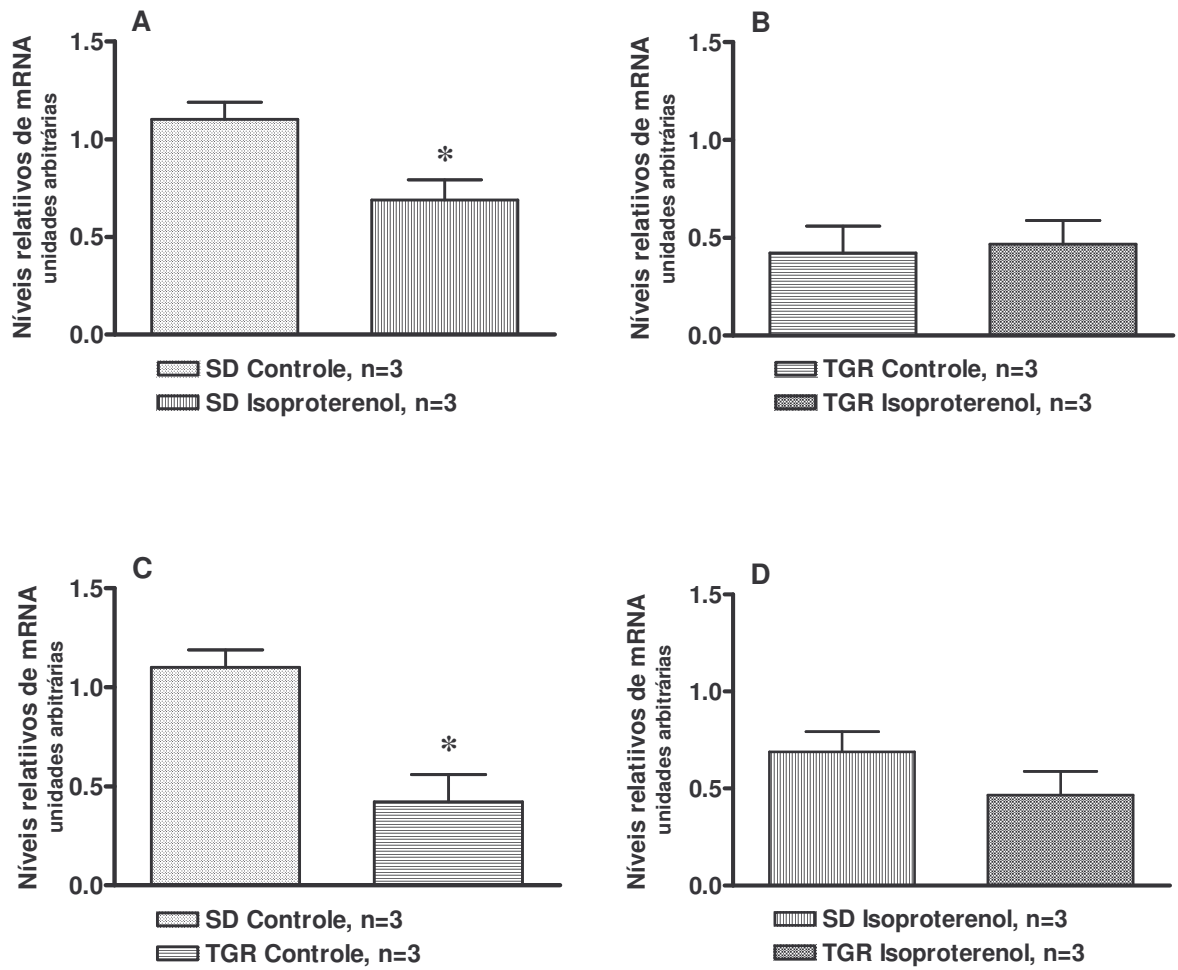


Figura 17 – Expressão do mRNA para ANP analisada por RPA em amostras de átrios de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

Corin - Átrios RPA

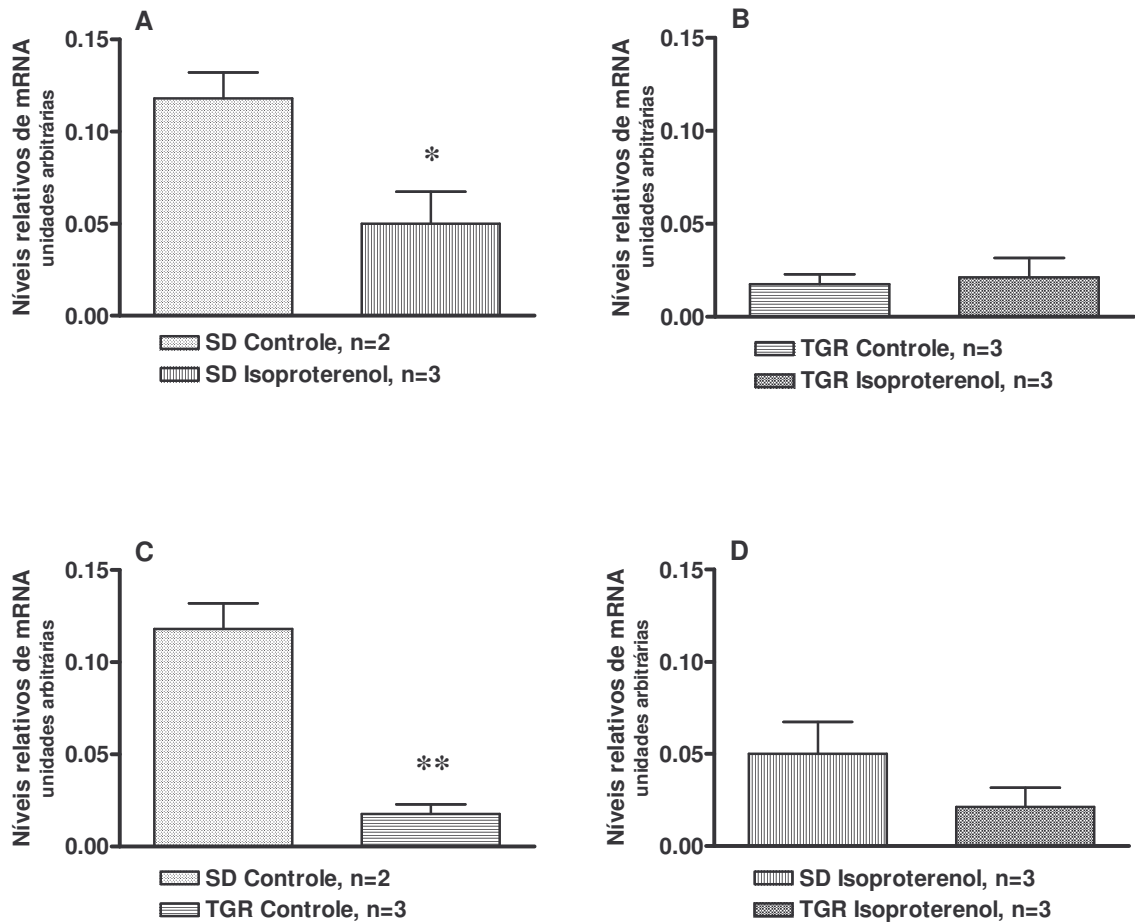


Figura 18 – Expressão do mRNA para CORIN analisada por RPA em amostras de átrios de ratos SD e TG, antes e depois do tratamento com ISO. Dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,002$.

5.5 – ANÁLISE DOS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR – COLÁGENO I, COLÁGENO III E FIBRONECTINA.

A deposição de colágeno na matriz cardíaca é influenciada pelo SRA. Em nosso modelo, a expressão de colágeno III analisada por RT-PCR em amostras de VE está aumentada nos ratos SD tratados com ISO quando comparadas aos ratos que receberam veículo ($0,717 \pm 0,05$ vs $0,531 \pm 0,04$ em ratos tratados com salina, $n=4$ e $n=5$ respectivamente). A expressão de colágeno III analisada por RT-PCR nos ratos TG não apresentou diferenças significativas, entretanto, a expressão de colágeno III está diminuída nos ratos TG tratados com ISO quando comparados aos ratos SD que receberam o mesmo tratamento ($0,538 \pm 0,01$ vs $0,717 \pm 0,05$ em animais SD, $n=3$ e $n=4$ respectivamente)(Fig. 19).

A técnica de imunofluorescência permitiu a observação específica de áreas na parede do VE marcadas com anticorpo para colágeno III. A deposição de colágeno III no VE mostrou-se significativamente diminuída nos ratos TG tratados com ISO quando comparados aos ratos SD tratados com ISO ($13,64 \pm 1,041$ vs $20,85 \pm 0,976$, $n=3$ animais). Nos ratos SD tratados com ISO, a deposição de colágeno III está significativamente aumentada quando comparados com os ratos que receberam veículo ($20,85 \pm 0,976$ vs $12,95 \pm 0,875$ em animais tratados com salina, $n=3$ animais). Nos ratos TG o aumento de deposição de colágeno III induzida pelo tratamento com ISO, foi abolido (Fig.20).

Colágeno III RT-PCR

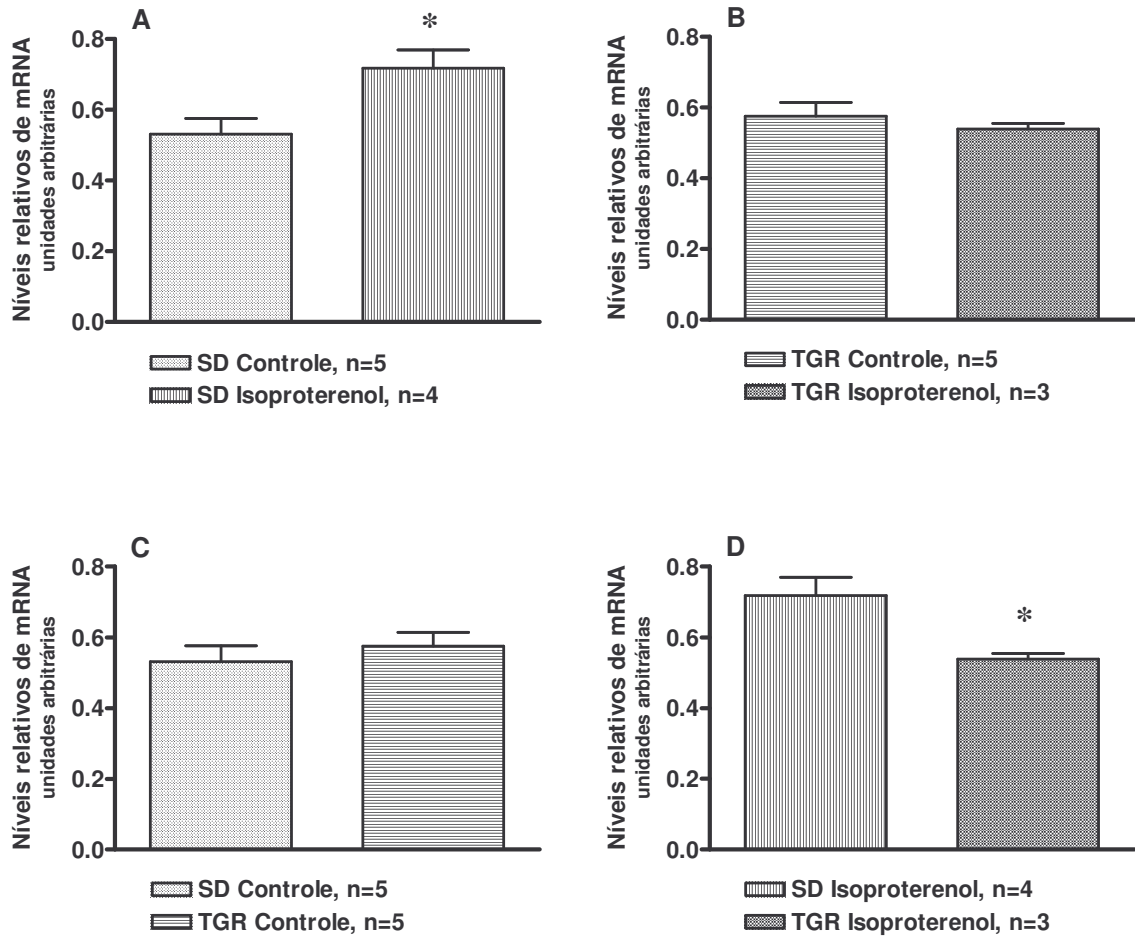


Figura 19 - Expressão do mRNA para colágeno III analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

Colágeno III Imunofluorescência

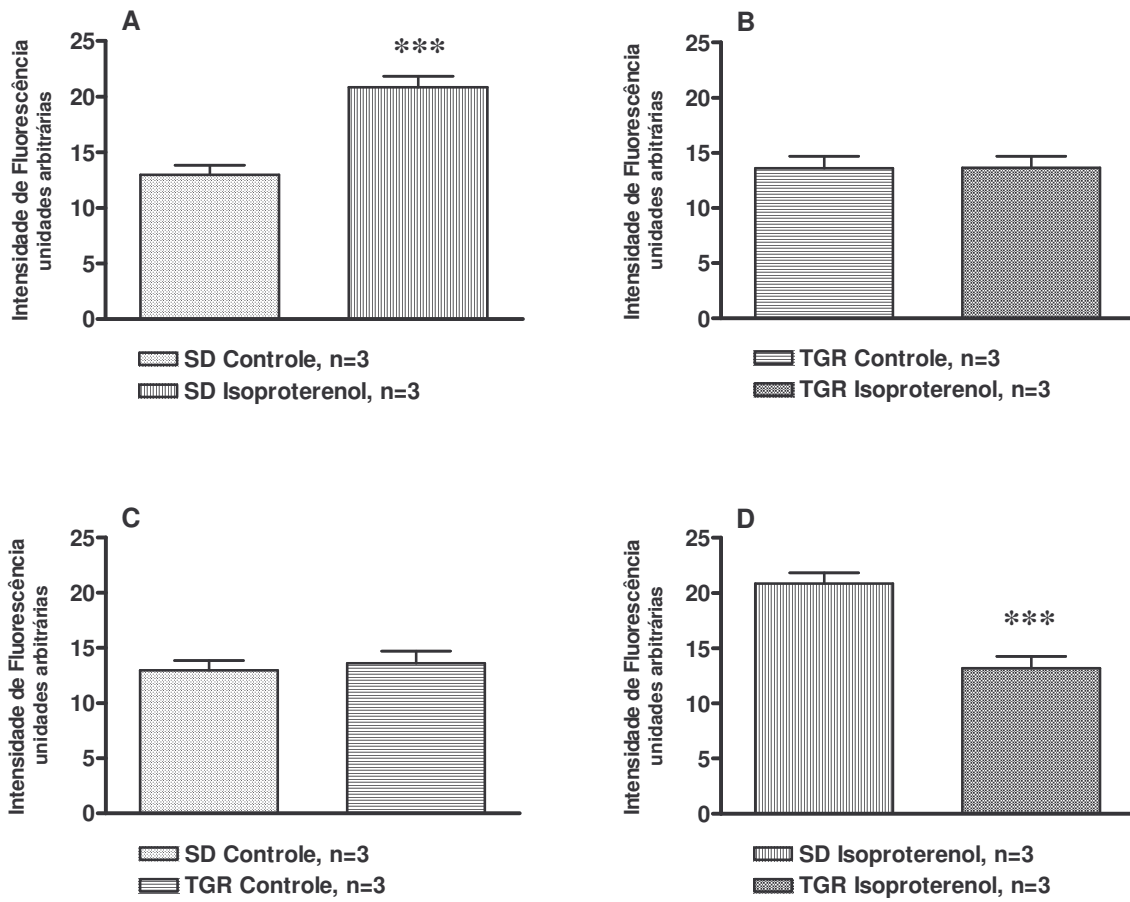


Figura 20 – Deposição de colágeno III na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM. (***) $p < 0,0001$.

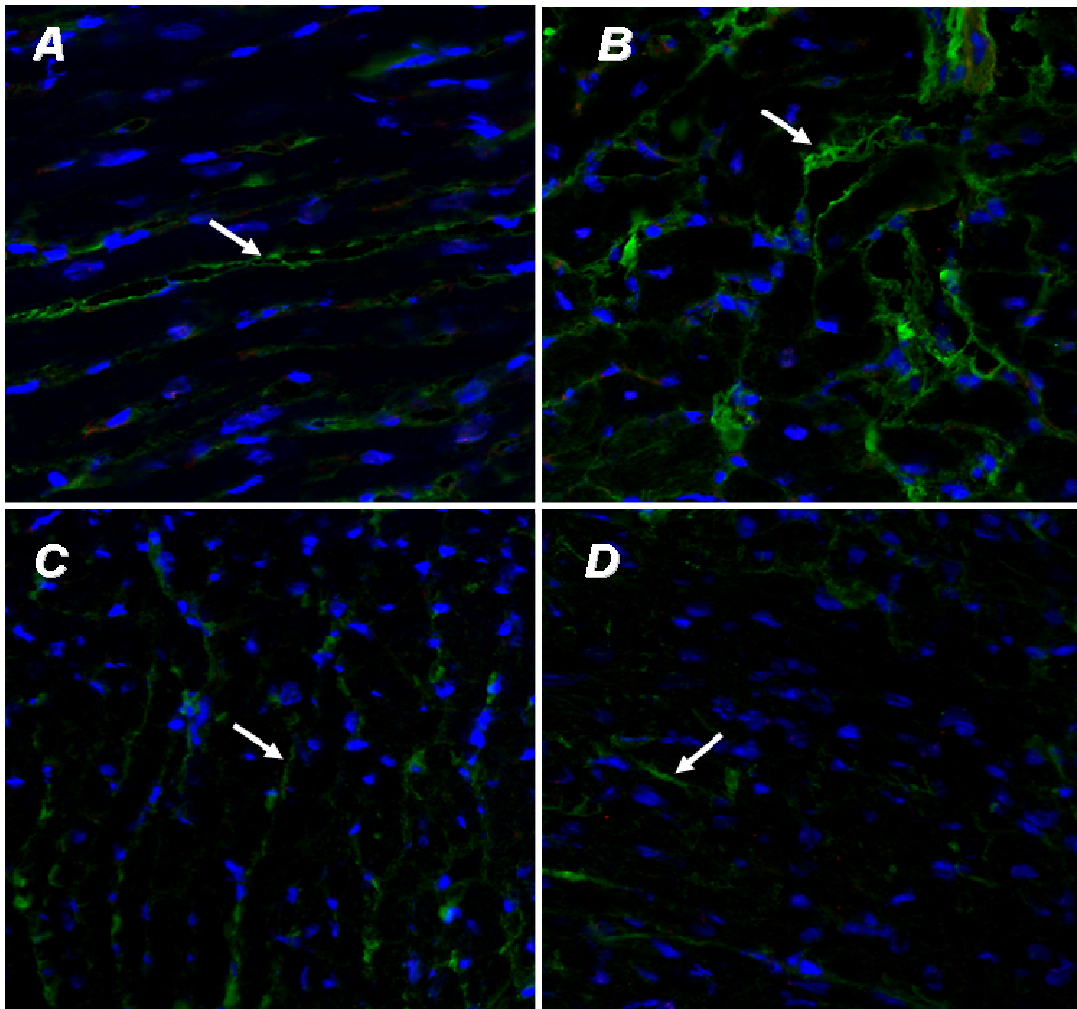


Figura 21 – Imunolocalização de colágeno III no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO observados em microscopia confocal. **A** (SD controle); **B** (SD ISO); **C** (TG controle); **D** (TG ISO). Aumento 40x. Em coloração azul: núcleo dos cardiomiócitos. Setas:colágeno III.

A expressão de colágeno I analisada por RT-PCR em amostras de VE não apresentou alteração significativa nos ratos SD tratados com ISO quando comparados aos ratos que receberam o veículo ($0,455 \pm 0,106$ vs $0,648 \pm 0,07$ em ratos tratados com ISO, $n=4$ e $n=5$ respectivamente). A expressão de colágeno I nos ratos TG tratados com ISO mostrou-se aumentada quando comparada com os ratos que receberam veículo ($0,373 \pm 0,03$ vs $0,693 \pm 0,08$ em ratos TG, $n=4$ e $n=5$ respectivamente), no entanto, não ocorreram diferenças de expressão gênica entre os ratos TG e SD que receberam o ISSO (Fig. 22).

A imunofluorescência para colágeno I no VE dos ratos SD tratados com ISO está significativamente aumentada quando comparada aos ratos que receberam veículo ($22,87 \pm 1,924$ vs $18,88 \pm 1,249$ em ratos SD com salina, $n=3$ ratos). Nos ratos TG o tratamento com ISO também induziu aumento da deposição de colágeno I no VE ($18,52 \pm 0,961$ vs $13,18 \pm 0,777$ em ratos TG com salina, $n=3$ ratos). Porém a deposição de colágeno I induzida pelo ISO nos ratos TG foi significativamente menor quando comparada com aquela observada nos ratos SD ($18,52 \pm 0,961$ vs $22,87 \pm 1,924$ em ratos SD, $n=3$ ratos). Interessante observar que os ratos TG apresentaram menor marcação para colágeno I no VE em condições basais quando comparados com os ratos SD ($13,18 \pm 0,777$ vs $18,88 \pm 1,249$, $n=3$ ratos)(Fig. 23).

Colágeno I RT-PCR

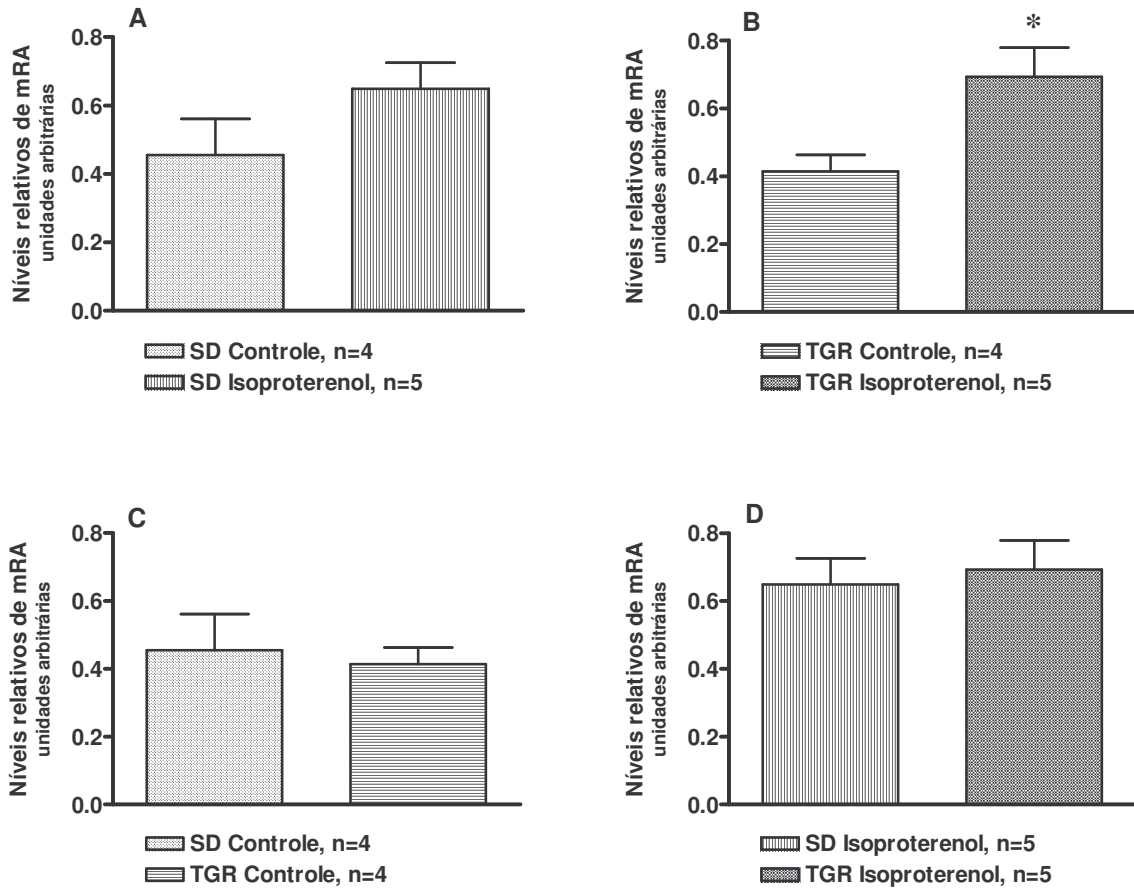


Figura 22 – Expressão do mRNA para colágeno I analisada por RT-PCR em amostras de VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$.

Colágeno I Imunofluorescência

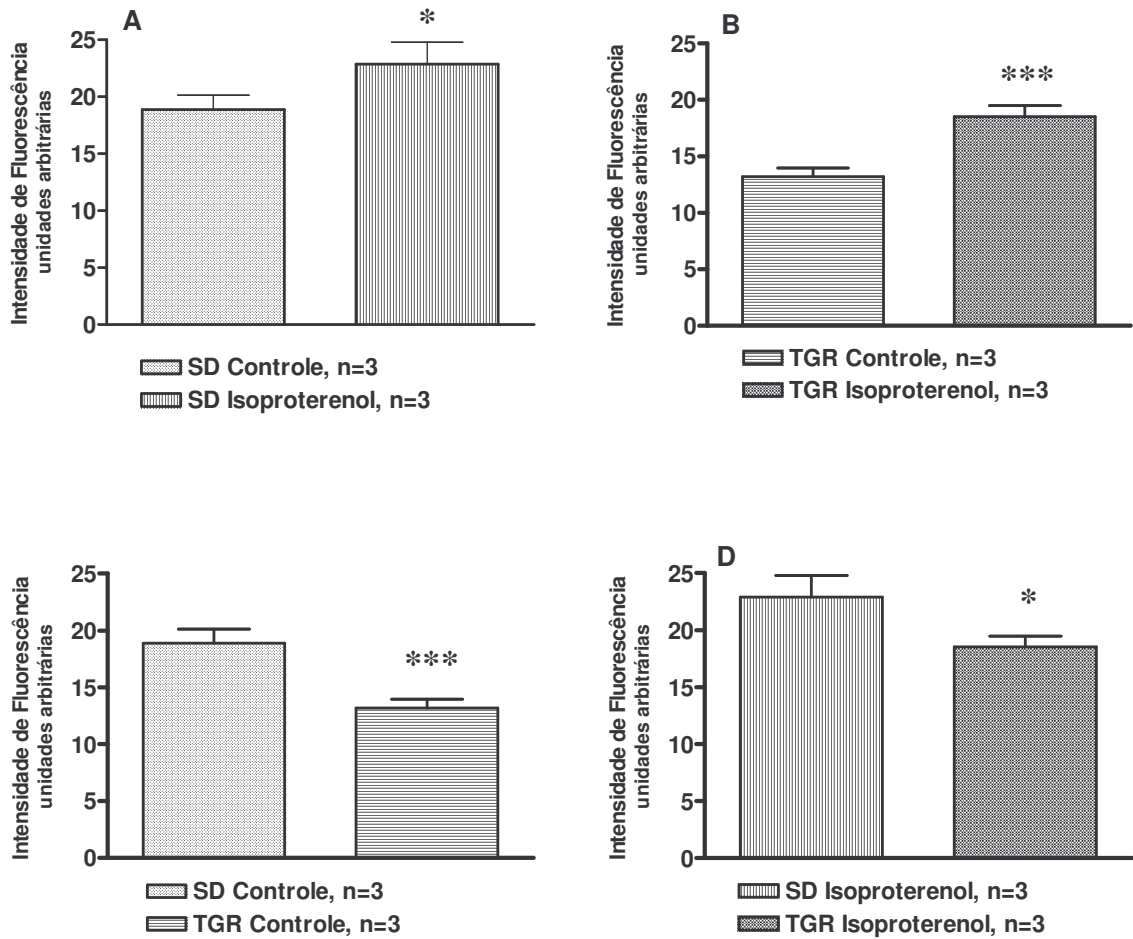


Figura 23 - Deposição de colágeno I na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,0001$.

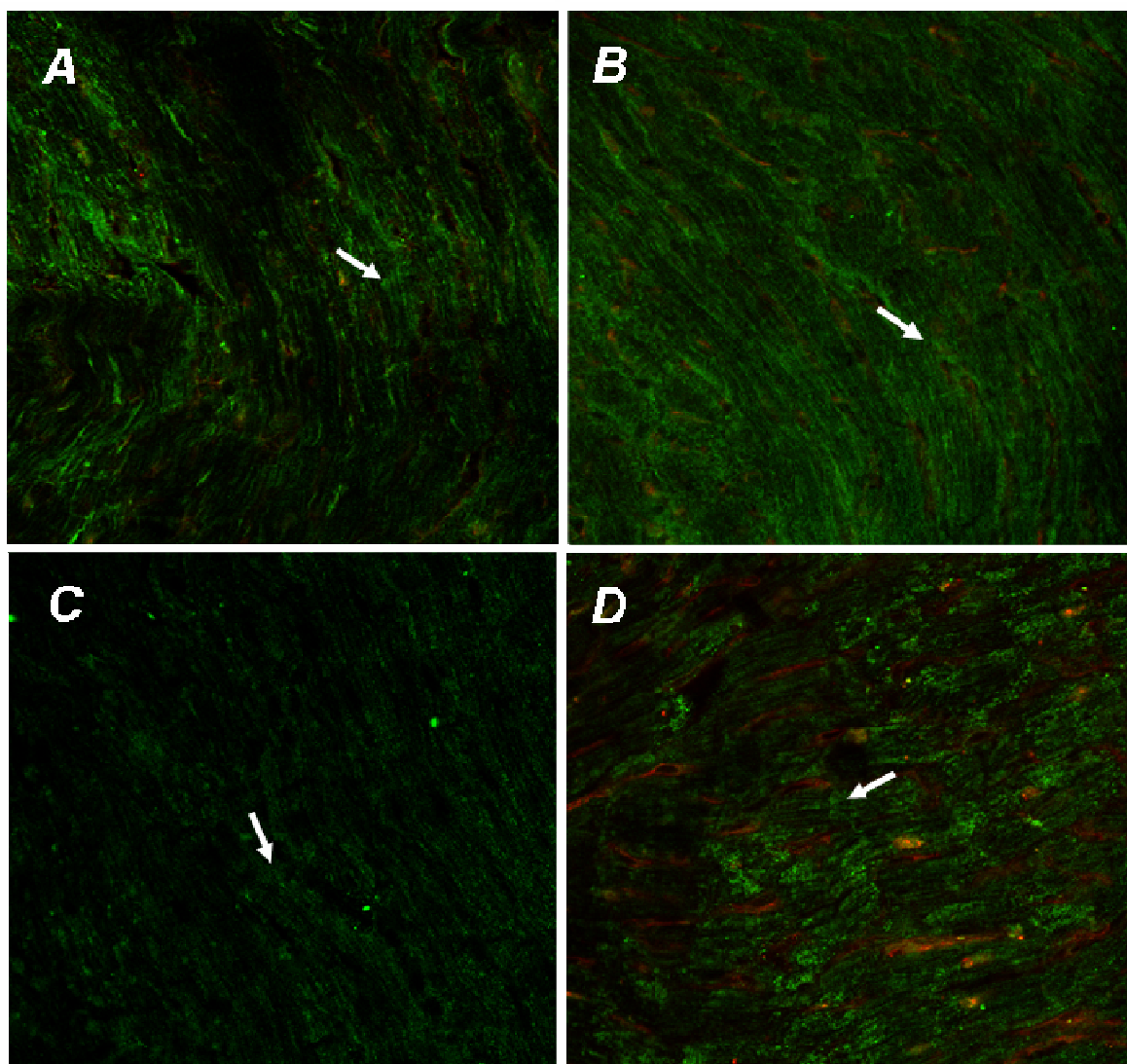


Figura 24 – Imunolocalização de colágeno I no ventrículo esquerdo de ratos SD e TGR antes e depois do tratamento com ISO observados em microscopia confocal. **A** (SD controle); **B** (SD ISO); **C** (TGR controle); **D** (TGR ISO). Aumento 40x. Em coloração vermelha: células endoteliais. Setas: colágenos I.

A imunofluorescência para fibronectina no VE dos ratos SD tratados com ISO está significativamente aumentada quando comparada aos ratos que receberam veículo ($19,65 \pm 1,386$ vs $7,93 \pm 0,675$ em ratos SD com salina, $n=3$ ratos). Nos ratos TG o tratamento com ISO também induziu aumento da deposição de fibronectina no VE ($11,65 \pm 0,931$ vs $4,35 \pm 0,361$ em ratos TG com salina, $n=3$ ratos). Porém a deposição de fibronectina induzida pelo ISO nos ratos TG foi significativamente menor quando comparada com os ratos SD ($11,65 \pm 0,931$ vs $19,65 \pm 1,386$ em ratos SD, $n=3$ ratos). Interessante observar que os ratos TG apresentaram menor marcação para fibronectina no VE em condições basais quando comparados com os ratos SD ($4,350 \pm 0,361$ vs $7,931 \pm 0,675$, $n=3$ ratos) (Fig. 25).

Fibronectina Imunofluorescência

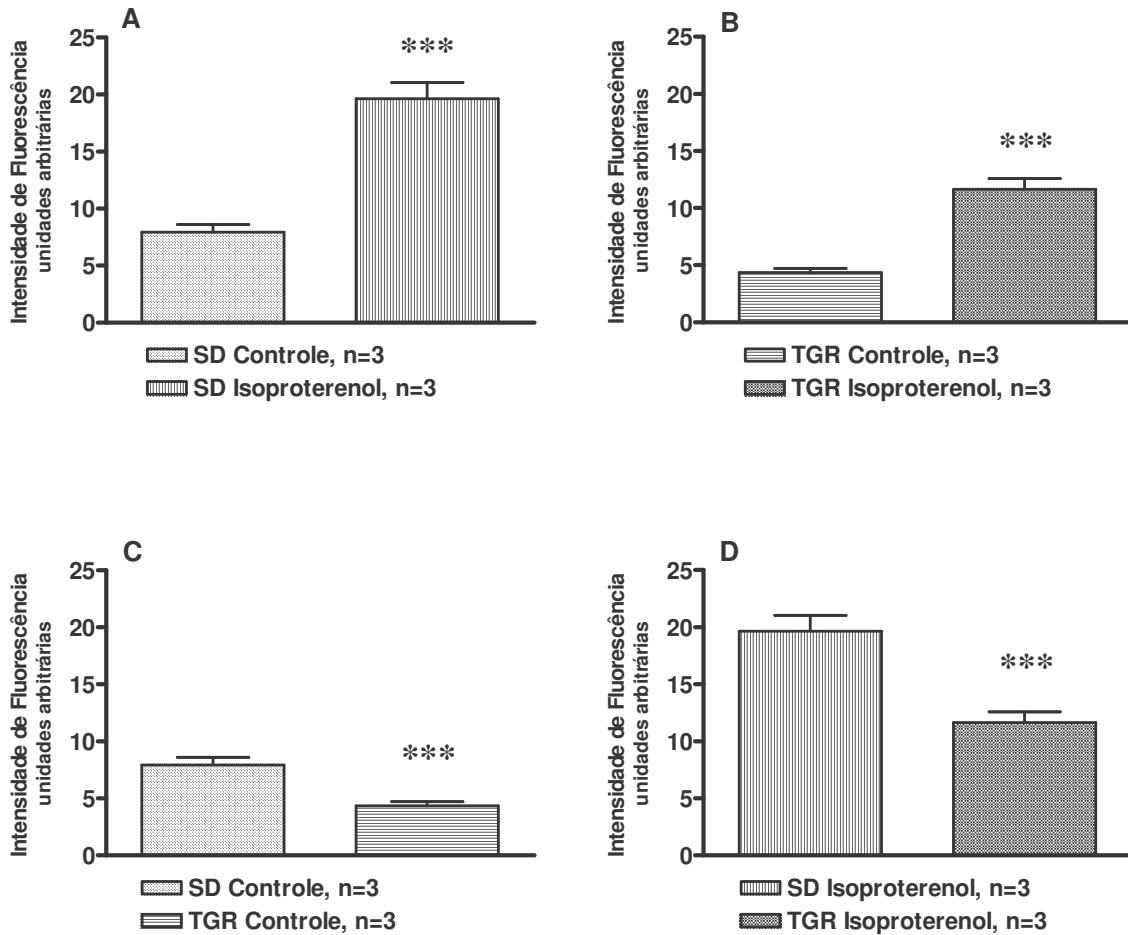


Figura 25 – Deposição de fibronectina na matriz intersticial do VE de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO. Os dados representam a média \pm EPM.

(***) $p < 0,0001$.

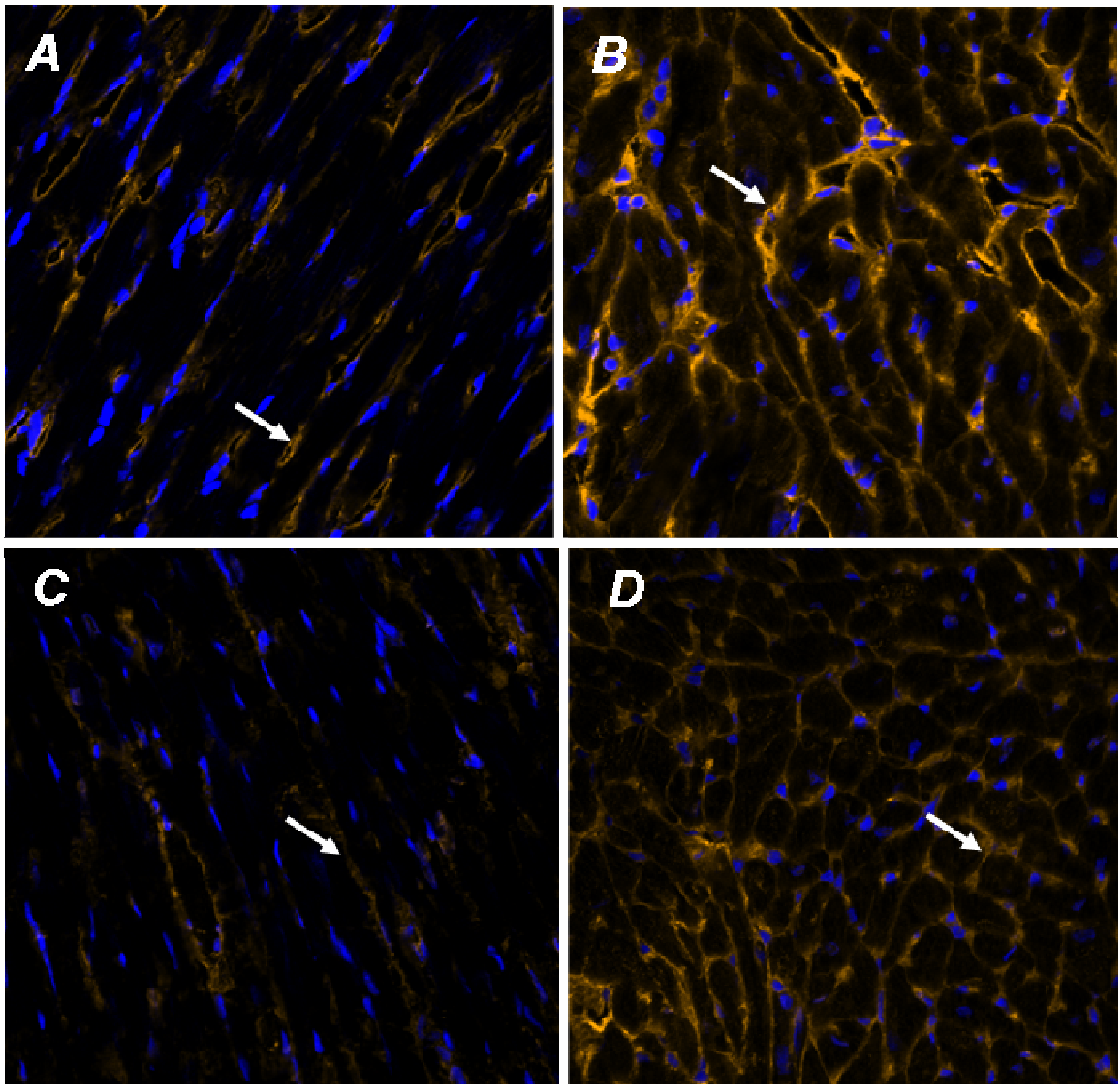


Figura 26 – Imunolocalização de fibronectina no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG antes e depois do tratamento com ISO observados em microscopia confocal. **A** (SD controle); **B** (SD ISO); **C** (TG controle); **D** (TG ISO). Aumento 40x. Em coloração azul: núcleo dos cardiomiócitos. Setas: fibronectina.

6 – DISCUSSÃO

Nesse estudo nós procuramos entender melhor o papel da Ang-(1-7) na hipertrofia cardíaca, utilizando um modelo de rato transgênico que apresenta um aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7)[TGR(A1-7)3292]. Esses ratos foram gerados a partir da técnica descrita por Methot e cols, 1997, onde é possível direcionar a expressão de uma proteína de fusão permitindo assim a liberação de peptídeos de interesse em determinado órgão. Os ratos TGR(A1-7)3292 apresentam um aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) de aproximadamente 2,5 vezes sem diferença artério-venosa. Dessa forma esse modelo transgênico constitui uma ferramenta útil para avaliar os efeitos de um aumento crônico moderado da Ang-(1-7).

Os achados do nosso estudo demonstraram que os ratos transgênicos com superexpressão de Ang-(1-7) apresentaram menor hipertrofia do ventrículo esquerdo em resposta ao tratamento com isoproterenol. Esses animais apresentaram também alterações na deposição de matriz intersticial em resposta ao isoproterenol, regulação diferencial nos níveis de angiotensina II no plasma e tecido cardíaco, nos níveis e expressão do peptídeo atrial natriurético e nos níveis de expressão do angiotensinogênio e ECA2, no coração.

A análise do VE realizada nos ratos SD e TG após o tratamento com ISO demonstrou que a relação peso do órgão/peso corporal nos ratos SD e TG, estava aumentada em relação aos seus respectivos controles, porém os animais TG que foram tratados com ISO apresentaram um menor valor relativo quando comparados os animais SD que receberam o ISO. Portanto, essa análise indireta sugeriu que os animais TG desenvolveram menor hipertrofia do VE. Adicionalmente a essa análise foi feita a morfometria dos cardiomiócitos, e os resultados observados confirmaram

os dados obtidos com o peso relativo dos ventrículos esquerdos. Os animais TG tratados com ISO apresentaram uma menor secção transversa dos cardiomiócitos quando comparados aos animais SD que receberam o mesmo tratamento, demonstrando uma atenuação na hipertrofia do VE nos ratos TG com superexpressão de Ang-(1-7)(Santos e cols, 2004 – Publicação em anexo).

O primeiro estudo a demonstrar a participação da Ang-(1-7) no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca foi realizado por Loot e cols (2002). Nesse trabalho a infusão de Ang-(1-7) por oito semanas foi capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em animais submetidos ao infarto do miocárdio, preservou o funcionamento endotelial aórtico e o fluxo coronariano. Em trabalho mais recente, Tallant e cols (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) foi capaz de inibir a síntese protéica em cardiomiócitos neonatos, desencadeada por diferentes indutores de crescimento celular como FBS e endotelina 1. Essas respostas foram bloqueadas na presença do antagonista A-779, sugerindo assim a participação do receptor Mas. Ainda nesse trabalho, foi demonstrado a capacidade da Ang-(1-7) em diminuir a atividade de MAPKs. A análise dos nossos resultados juntamente com os obtidos por Loot e Tallant, nos permite sugerir que a Ang-(1-7) pode ser capaz de atenuar o crescimento dos cardiomiócitos resultando em menor hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida pelo isoproterenol.

Evidências adicionais têm demonstrado que o coração é um importante sítio de ações da Ang-(1-7) especialmente em situações onde é necessário proteger e/ou melhorar a funcionalidade do coração. Neves e cols (1997) utilizando estudo em corações isolados perfundidos com concentrações elevadas de Ang-(1-7) (27nM e 210nM), demonstraram uma redução do fluxo coronariano e aumento das arritmias de reperfusão. Almeida e cols (2000) utilizando uma concentração menor de Ang-(1-7) (2,2nM), demonstraram que em corações isolados de ratos a Ang-(1-7) aumentou

o efeito vasodilatador da BK por mecanismos relacionados a liberação de NO e prostaglandinas e que esse efeito foi bloqueado na presença de A-779. Ferreira e cols (2001) utilizando uma concentração ainda menor de Ang-(1-7)(0,22nM), observaram uma diminuição da incidência e duração das arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos. Esses efeitos cardioprotetores foram bloqueados pelo A-779. Averill e cols (2003) demonstraram que na insuficiência cardíaca decorrente de infarto do miocárdio houve um aumento da imunoreatividade para Ang-(1-7) na área ao redor do infarto e que essa expressão foi restrita aos cardiomiócitos. Portanto, tais achados apontam para a possibilidade da Ang-(1-7) estar envolvida na regulação funcional do tecido cardíaco por ação direta bem como indireta.

Uma das possibilidades para explicar a cardioproteção observada nos ratos TGR(A1-7)3292 seria que o tratamento com isoproterenol induzisse a expressão do transgene no coração, aumentando a concentração local de Ang-(1-7). No entanto, essa possibilidade foi descartada pela observação de que o tratamento não alterou a expressão do transgene. Essa observação foi reforçada pela ausência de alteração dos níveis de Ang-(1-7) no coração. Uma outra possibilidade seria a alteração da concentração local de Ang II, como observado por Mendes e cols (2005) com infusão de curto prazo de Ang-(1-7) em ratos wistar.

A regulação dos componentes da matriz intersticial em diversas patologias é influenciada pelo SRA. A homeostase da matriz extracelular depende dos processos de síntese e degradação dos colágenos fibrilares e fibronectina, assim como da duplicação e sobrevivência dos fibroblastos. Ao sofrer uma injúria a matriz e o espaço intersticial tornam-se um microambiente onde estão presentes macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e diversas moléculas que podem ser estimuladoras ou supressoras das respostas celulares. No SRA a Ang II é um produto para o qual foi mostrada atividade estimulatória ou inibitória do crescimento celular quando

interage com seus receptores AT₁ ou AT₂, podendo modular o processo de fibrose no coração (Bouzegrhane e Thibault, 2002; Sun e Weber, 2003). A presença de fibrose no miocárdio de animais que sofreram ou não danos cardíacos indicam que mecanismos humorais são responsáveis por esse processo (Dostal, 2001).

A análise conjunta da expressão do mRNA por RT-PCR e da deposição de colágeno III, por imunofluorescência no ventrículo esquerdo de ratos SD e TG demonstrou um aumento da expressão do mRNA para colágeno III nos animais SD que receberam o ISO quando comparados aos seus controles que receberam o veículo. Esse aumento da expressão de colágeno III corresponde a um aumento da deposição de colágeno III na matriz intersticial, avaliada por imunofluorescência. Os ratos TG que receberam o ISO não apresentaram aumento na expressão do mRNA para o colágeno III o que também corresponde a ausência de alterações na deposição de colágeno III na matriz intersticial em resposta ao ISO. A comparação entre os ratos SD e TG tratados com ISO, demonstrou que os animais TG após o tratamento com ISO apresentam uma menor deposição de colágeno III na matriz intersticial (Figs. 19 e 20)

Para o colágeno I não foi observado um aumento estatisticamente significativo da expressão do mRNA para essa proteína nos ratos SD que receberam o ISO em relação aos seus respectivos controles, apesar da clara tendência ao aumento dessa expressão. Por outro lado a imunofluorescência no VE desses ratos demonstrou um aumento significativo da deposição de colágeno I nos ratos SD que receberam o ISO em relação aos ratos que receberam veículo.

Nos ratos TG que receberam o ISO foi observado um aumento da expressão do mRNA para colágeno I quando comparados aos seus respectivos controles. Esse aumento de expressão do mRNA para colágeno I nos ratos TG correspondeu a um aumento da deposição dessa proteína no tecido cardíaco. Esse aumento foi

significativo em relação aos ratos TG que receberam o veículo, porém, a deposição de colágeno I foi significativamente menor quando comparada àquela observada nos ratos SD que receberam o ISO (Figs. 22 e 23). Uma importante alteração observada nos ratos TG foi a diminuição dessa proteína em relação aos ratos SD em condições basais.

A análise obtida para a fibronectina por imunofluorescência no VE demonstrou que em ambos os animais tratados com ISO houve um aumento na deposição dessa proteína em relação aos controles que receberam veículo. Entretanto nos ratos TG essa deposição foi menor que nos ratos SD. Interessantemente os TG apresentavam também uma diminuição nos níveis de fibronectina em condições basais em relação aos ratos SD (Fig. 25).

A presença de fibrose intersticial observada nos ratos SD está em acordo com dados da literatura que demonstram que o processo hipertrófico em diversos modelos vem acompanhado de alterações no conteúdo de colágeno I, colágeno III e fibronectina caracterizando assim a fibrose tecidual. Esse processo pode ser desencadeado pela Ang II circulante e/ou local interagindo com seu receptor AT_1 . Em geral essa ação pró-fibrótica é mediada por fatores de crescimento como $TGF\beta_1$ (Sun e Weber, 2003, Dostal, 2001). Além da ativação de fatores de crescimento, a Ang II pode modular também a atividade das enzimas envolvidas na degradação dos colágenos e fibronectina no coração, diminuindo a atividade dessas enzimas e favorecendo dessa forma o acúmulo de tecido fibroso (Weber, 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o uso de inibidores de ECA e antagonista de receptor AT_1 atenua e/ou reverte a fibrose cardíaca (Varo e cols, 2000; Weber, 2001; Lijnen e cols, 2004). Uma vez que o uso dessas duas classes de drogas favorece a formação de Ang-(1-7), essa atenuação da fibrose poderia não ser somente em resposta a uma menor ação da Ang II, mas também por uma ação

direta da Ang-(1-7) no processo de fibrose. Nossos dados e outros da literatura dão um importante suporte para essa hipótese.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a participação da Ang-(1-7) no desenvolvimento de fibrose do miocárdio. He e cols (2004) e Wang e cols (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) atenuou a hipertrofia cardíaca e a fibrose em ratos submetidos a sobrecarga de pressão. Grobe e cols (2006) demonstraram em outro modelo de hipertensão (DOCA-SAL) que a Ang-(1-7) foi capaz de atenuar a fibrose cardíaca. Iwata e cols (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) inibe a ação pró-fibrótica da Ang II em cultura de fibroblastos. E finalmente, Santos e cols (2006) demonstraram que camundongos KO para o receptor Mas apresentam um aumento na expressão de colágenos I, III e fibronectina no ventrículo esquerdo, sugerindo fortemente que a ação anti-fibrótica da Ang-(1-7) ocorre através do receptor Mas.

Interessantemente a análise da expressão do mRNA para o receptor Mas demonstrou que não existem diferenças na expressão do receptor entre os ratos SD e TG em condições basais. Entretanto, em resposta ao tratamento com o ISO, foi observada uma diminuição da expressão para o receptor Mas nos ratos SD enquanto que nos ratos TG a expressão para o receptor Mas permaneceu inalterada. Essa observação sugere a possibilidade de que pelos menos partes das alterações induzidas pelo ISO estejam relacionadas à redução da expressão do Mas e que o aumento da Ang-(1-7) poderia impedir essa redução. No entanto, alterações semelhantes de expressão foram observadas para o receptor AT₁.

Uma das possibilidades que poderia explicar os dados obtidos nos ratos TG em relação a formação de matriz intersticial estão a de que a Ang-(1-7) poderia inibir diretamente a secreção dos colágenos e fibronectina ou a ativação dos fibroblastos; poderia aumentar a degradação dos colágenos e fibronectina através da ativação das metaloproteinases; e inibir as ações de vários fatores pró-fibróticos como TGF_β,

endotelina-1 e a própria Ang II (Grobe e cols, 2006). A modulação da Ang II em resposta a Ang-(1-7) é particularmente interessante nesse modelo TG, uma vez que foi observada uma diminuição dos níveis de Ang II no VE dos animais TG, o que poderia explicar o fato desses animais TG apresentarem uma diminuição de colágeno I e fibronectina em condições basais. Esses dados conjuntamente com os obtidos por Santos e cols (2006) sugerem que a Ang-(1-7) pode exercer um papel essencial na regulação da matriz extracelular cardíaca.

De maneira interessante os ratos TG apresentaram uma diminuição significativa dos níveis cardíacos de Ang II em condições basais quando comparados aos ratos SD. Dentre os mecanismos que poderiam explicar a diminuição de Ang II no VE dos ratos TG estariam alterações em componentes do SRA local. A diminuição de Ang II observada no VE dos ratos TG pode estar relacionada à regulação do angiotensinogênio nesse tecido. Na verdade a expressão de mRNA para o angiotensinogênio no VE analisada por RT-PCR está diminuída nos ratos TG quando comparada a dos ratos SD em condições basais. Menor síntese de angiotensinogênio poderia levar a uma menor formação de Ang II nesse tecido, como observado em nosso estudo. Mendes e cols (2005), após infusão de Ang-(1-7) com minibombas osmóticas observaram uma diminuição da expressão de angiotensinogênio no fígado, porém nesse estudo não foram realizadas análises para avaliar a expressão do angiotensinogênio no coração.

Outro fator que poderia contribuir para a menor concentração de Ang II no VE dos ratos TG seria o aumento da ECA2. A análise realizada com a utilização de RT-PCR para ECA2 no VE de ratos SD e TG, mostrou um aumento na expressão do mRNA para ECA2 nos ratos TG em condições basais em comparação a dos ratos SD. Esta observação também está de acordo com a de Mendes e cols (2005), que demonstraram um aumento na expressão de ECA2 em ratos infundidos com Ang-(1-

7). A ECA2 tem sido descrita como a principal enzima envolvida na formação de Ang-(1-7) a partir da Ang II. Camundongos *knockout* para ECA2 apresentam acentuado aumento nos níveis teciduais e plasmáticos de Ang II, sugerindo o importante papel da ECA2 em hidrolizar a Ang II. (Cracrower e cols, 2002. Zisman e cols, 2003). Em síntese, os dados obtidos com a expressão do mRNA para o angiotensinogênio e ECA2 sugerem que a combinação de redução do angiotensinogênio e aumento da ECA2 podem estar diretamente relacionadas a diminuição da concentração cardíaca de Ang II nos ratos TG. Esses dados também sugerem que a Ang-(1-7) em concentrações moderadas, pode exercer ações regulatórias através de mecanismos de “*feedback*” distintos em diferentes componentes do sistema SRA.

Contrariamente ao observado no coração, e não menos interessante, os níveis plasmáticos de Ang II estavam significativamente aumentados nos animais TG em condições basais. Essas alterações também foram observadas por Mendes e cols (2005) com a administração de Ang-(1-7) por minibombas osmóticas. Essa regulação diferencial da Ang II no plasma dos ratos TG envolve alterações bioquímicas ainda não totalmente esclarecidas. O aumento dos níveis plasmáticos de Ang II não pode ser explicado com base em alterações no SRA circulante, uma vez que os ratos TG não apresentam mudanças na atividade de renina e ECA no plasma e nem da ECA no pulmão (Ferreira e cols, 2004 – Tese). É improvável que a Ang II presente no plasma dos ratos TG seja proveniente de algum outro tecido, uma vez que na caracterização bioquímica dessa linhagem, não foi encontrada nenhuma alteração nos níveis de Ang II nos testículos, rins, átrios, ventrículo direito, pulmões, adrenais (Ferreira, 2004 - Tese). Outros estudos envolvendo a avaliação das outras enzimas que podem influenciar o SRA e que também podem formar Ang II são

necessários para melhor entendimento das alterações bioquímicas que estão presentes nos ratos TG.

Os níveis de Ang II no VE dos ratos SD em resposta ao ISO estavam significativamente aumentados em comparação aos ratos que receberam o veículo. Diversos autores têm demonstrado por diferentes evidências a ativação do SRA durante o processo de hipertrofia do VE (Nagano e cols, 1992, Golomb e cols, 1994, Leenen e cols, 2001, Grimm e cols, 1998 e 1999, Oliveira e Krieger, 2005). Nossos dados confirmam e ampliam dados já existentes na literatura no que diz respeito aos níveis de Ang II no tecido cardíaco e sua possível contribuição para a hipertrofia cardíaca, uma vez que não houve alteração nos níveis de Ang II no plasma. Apesar dos níveis de Ang II estarem elevados no tecido cardíaco, não foi observada nenhuma alteração na expressão do mRNA para o angiotensinogênio em resposta ao tratamento com ISO.

Em relação a ECA2, foi observado no VE dos ratos SD um aumento na expressão do mRNA para ECA2 após o tratamento com ISO. Diversos estudos têm demonstrado um aumento na expressão da ECA2 em situações onde é necessária a proteção do tecido cardíaco, sugerindo um papel para essa enzima como um importante regulador da função cardíaca. A via metabólica para a formação da Ang-(1-7) a partir da Ang II poderia explicar o aumento da expressão da ECA2 nos animais SD com hipertrofia do VE. A expressão do gene para ECA2 está aumentada em ratos com infarto do miocárdio, com localização inicial na borda do infarto e posteriormente no miocárdio intacto (Burrell e cols, 2005). A presença da proteína ECA2 foi detectada em cardiomiócitos de corações humanos com insuficiência cardíaca, e ainda foram detectados um aumento na formação de Ang-(1-7) nos extratos de corações com insuficiência cardíaca (Zisman e cols, 2003). Tais achados reforçam a hipótese de que a ECA2 é um importante mediador da fisiologia do

coração. Em nosso modelo, estudos adicionais são necessários para avaliar a atividade da ECA2 e confirmar tal hipótese.

Nos ratos TG, os níveis cardíacos de Ang II, a expressão do mRNA para o angiotensinogênio e ECA2, e ainda os níveis plasmáticos de Ang II permaneceram completamente inalterados em resposta ao tratamento com o isoproterenol. Mesmo diante da utilização de um agente que induz ativação do SRA, essa ausência de alterações, sugere fortemente a participação da Ang-(1-7) como um importante modulador do SRA local e circulante.

Foi observado que os ratos transgênicos apresentam aumento dos níveis de ANP no plasma e diminuição dos níveis atriais desse peptídeo quando comparados aos animais SD em condições basais. Alterações de síntese, secreção e degradação do ANP podem ser consequência direta ou resposta às alterações bioquímicas decorrentes do aumento crônico da Ang-(1-7).

O ANP é removido da circulação por dois mecanismos principais: internalização pelo receptor de clearance (receptor C) e clivagem proteolítica pela endopeptidase neutra (NEP 24.11). O receptor C é amplamente distribuído estando presente em grande quantidade nos rins e possui alta afinidade pelo ANP. Uma vez o ANP ligado ao receptor C, ocorre a internalização do complexo peptídeo-receptor e hidrólise do ANP nos lisossomos, podendo o receptor C ser reciclado para superfície celular e ser novamente utilizado para remover outras moléculas do ANP da circulação. Esse processo de internalização é constitutivo e independente do ligante. Um possível fenômeno que pode estar ocorrendo nos ratos TG é uma alteração desse processo de remoção do ANP. A exposição prolongada do receptor C ao ANP pode desencadear alterações metabólicas que resultem em “*down-regulation*” do receptor (Anand-Srivastava, 2005). Com um menor número de receptores expostos na membrana mais lenta seria a remoção do peptídeo do plasma.

Juntamente com o receptor de clearance a NEP 24.11, constitui um outro mecanismo enzimático para inativação do ANP. A NEP hidroliza o ANP abrindo sua estrutura em anel inativando assim o peptídeo (McGraft e de Bold, 2005; Potter e cols, 2006). Portanto uma alteração na atividade catalítica dessa enzima poderia levar ao acúmulo de ANP no plasma. Para confirmar tais hipóteses serão necessários estudos adicionais para avaliar essas possibilidades.

Diversos estudos têm comprovado que o estímulo inicial que promove a liberação de ANP é através do estiramento da parede do coração em resposta ao aumento de sobrecarga de volume (Dietz, 2005; Su e cols, 1999). No entanto, nesse modelo transgênico nenhuma alteração relacionada a um aumento de sobrecarga hemodinâmica foi observado. Por outro lado, os ratos TG apresentam um aumento de frequência cardíaca, o que poderia constituir um estímulo para liberação do ANP. Rankin e cols (1986) demonstraram que a taquicardia induzida por “pacing” no átrio direito resultou em aumento de ANP no plasma de coelhos, e que o aumento do ANP estava relacionado ao grau de taquicardia induzida. Christensen e cols (1988) demonstraram em cães que a associação de expansão de volume e taquicardia levam a liberação de ANP e que essa liberação estava fortemente relacionada à tensão no átrio e/ou stress desenvolvido durante cada sístole atrial. King e Ledsome (1991) sugeriram que o stress na parede que ocorre durante a sístole atrial é um fator importante na liberação de ANP durante a taquicardia. Christensen e Leistad (1997) demonstraram durante a taquicardia um aumento da pressão atrial sem alterações nas dimensões da câmara atrial e aumento de ANP no plasma.

Além do possível efeito direto da Ang-(1-7) na secreção de ANP e da contribuição do estímulo mecânico, fatores humorais tais como agonistas adrenérgicos, endotelina-1, angiotensina II, fator de crescimento transformante- β dentre outros, também podem participar no processo de secreção do ANP. A esse

respeito foram avaliados somente os níveis de Ang II nesses ratos e como já mencionado esses animais apresentam diminuição de Ang II no VE e aumento dos níveis circulantes desse peptídeo, podendo esse aumento no plasma constituir um estímulo para a liberação do ANP. Os mecanismos pelos quais a Ang II promove a liberação do ANP não são totalmente conclusivos. Dietz (1988) demonstrou que Ang II e ADH aumentam os níveis de ANP no plasma em resposta a alterações de pressão em ambos átrios. Lachance e Garcia (1988), também demonstraram em ratos que a liberação de ANP em resposta a Ang II está correlacionado a alterações de pressão do que os mecanismos via receptores. Christensen e cols (1989) demonstraram em cães que durante a infusão de Ang II ocorre aumento de ANP no plasma e que esse aumento está relacionado à pressão atrial desenvolvida durante a sístole. Volpe e cols (1991) demonstraram em coelhos, que a liberação de ANP em resposta a Ang II ocorre independente de efeito pressor. Focaccio e cols (1993), também argumentaram a favor da liberação de ANP independente de alterações hemodinâmicas. Em nosso modelo transgênico experimentos futuros são obviamente necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais essa possível secreção aumentada de ANP está ocorrendo.

A diminuição dos níveis do ANP encontrados nos átrios dos ratos TG poderia refletir a rapidez com que o peptídeo está sendo secretado, ou seja, a taxa de secreção estaria excedendo a taxa de armazenamento resultando em níveis diminuídos do ANP nesse tecido. Esse processo de secreção juntamente com alterações no metabolismo do ANP poderia explicar o aumento do peptídeo encontrado no plasma. A redução da expressão do mRNA para o ANP e enzima CORIN nos átrios, que está de acordo com o aumento do ANP plasmático, favorece a hipótese de que esse aumento seja devido a um menor clearance desse peptídeo.

Os resultados já descritos na literatura a respeito da participação do ISO na liberação do ANP não são totalmente conclusivos. Agnoletti e cols (1990) demonstraram que a infusão de isoproterenol levou a hipertrofia das câmaras cardíacas, com diminuição dos estoques teciduais e aumento do ANP no plasma. Lachance e Garcia (1991) sugeriram que ISO sozinho não é o estímulo mais importante para a liberação do ANP sendo necessária a associação com algum outro mecanismo como o aumento da pressão atrial. Agnoletti e cols (1992) sugeriram que a liberação de ANP mediada pelo ISO não está relacionada as alterações mecânicas causadas pelo ISO mas por mecanismos mediados pelos receptores β -adrenérgicos. Em resposta ao tratamento com ISO, foram observados um aumento do ANP no plasma nos ratos SD e diminuição do peptídeo no tecido atrial. Nos animais TG os níveis plasmáticos e atriais do ANP em resposta ao ISO permaneceram sem alterações.

A expressão do mRNA para ANP e enzima CORIN nos ratos SD em resposta ao ISO mostrou-se controversa as observações já descritas na literatura. Em resposta ao ISO foi observado uma diminuição do mRNA para o ANP e CORIN. Nos ratos TG a expressão do mRNA para ANP e CORIN também estavam diminuídos em resposta ao ISO. Novamente aqui, podemos argumentar a favor de mecanismos de “*feedback*” negativo tomando parte nesse processo, uma vez que existe um aumento de mesma magnitude nos níveis plasmáticos de ANP nos ratos SD e TG após o tratamento com ISO. Assim, possíveis mecanismos de regulação gênica podem estar acontecendo em resposta ao aumento do ANP no plasma.

Em resumo, no presente estudo foi demonstrado que a linhagem transgênica com superexpressão da Ang-(1-7) [TGR(A1-7)3292] apresenta atenuação da hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, associada a menor deposição de colágenos e fibronectina no coração. Os dados sugerem que a resposta hipertrófica

e fibrótica observadas nos ratos TG podem ser, pelo menos em parte, devido ao bloqueio do aumento dos níveis cardíacos de Ang II.

Adicionalmente à regulação da Ang II cardíaca, as alterações observadas para o peptídeo natriurético atrial podem ter favorecido a atenuação do processo de remodelamento cardíaco observado nos ratos TG, uma vez que já foi demonstrado que camundongos deficientes em ANP e camundongos com deleção do receptor para o ANP desenvolvem hipertrofia e fibrose (Mori e cols, 2004; D'Souza e cols, 2004).

O aumento crônico da Ang-(1-7) nos ratos TG induziu alterações bioquímicas relacionadas à regulação da Ang II cardíaca nesses ratos. Essas alterações bioquímicas envolvem a diminuição da expressão do angiotensinogênio e aumento da expressão da ECA2 cardíaca.

Nossos dados reforçam a hipótese de que a Ang-(1-7) é um peptídeo biologicamente ativo, atuando como um contraregulador das ações da Ang II, com importante ação cardioprotetora.

7 – CONCLUSÕES

- Os ratos transgênicos com superexpressão de Ang-(1-7) apresentaram menor hipertrofia do VE em resposta ao isoproterenol;
- Os ratos TG apresentam menor expressão de colágeno I e fibronectina no VE em condições basais. Essa alteração correspondeu também a menor formação de matriz intersticial em condições basais e em resposta ao isoproterenol;
- Os ratos TG apresentam menor expressão de colágeno I no VE em resposta ao isoproterenol. Essa alteração correspondeu também a menor formação de matriz intersticial;
- Os ratos TG apresentam diminuição dos níveis cardíacos de Ang II, que pode ser pelo menos parcialmente explicada, pela diminuição da expressão de angiotensinogênio e aumento de expressão de ECA2 no VE;
- Os ratos TG apresentam aumento dos níveis plasmáticos de ANP.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnoletti, G., A. F. Panzali, *et al.* Effects of prolonged infusions of atrial natriuretic peptide and isoproterenol on the mechanical and endocrine function of isolated atria. Cardioscience, v.1, n.3, Sep, p.217-23. 1990.

Agnoletti, G., A. Rodella, *et al.* Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. Am J Physiol, v.262, n.1 Pt 2, Jan, p.H285-92. 1992.

Almeida, A. P., B. C. Frabregas, *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. Braz J Med Biol Res, v.33, n.6, Jun, p.709-13. 2000.

Anand-Srivastava, M. B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. Peptides, v.26, n.6, Jun, p.1044-59. 2005.

Ardailou, R. Angiotensin II receptors. J Am Soc Nephrol, v.10 Suppl 11, Jan, p.S30-9. 1999.

Averill, D. B., Y. Ishiyama, *et al.* Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. Circulation, v.108, n.17, Oct 28, p.2141-6. 2003.

Bader, M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. J Mol Cell Cardiol, v.34, n.11, Nov, p.1455-62. 2002.

Botelho, L. M., C. H. Block, *et al.* Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. Peptides, v.15, n.4, p.723-9. 1994.

Bouzeqrhane, F. e G. Thibault. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? Cardiovasc Res, v.53, n.2, Feb 1, p.304-12. 2002.

Bovy, P. R., A. J. Trapani, *et al.* A carboxy-terminus truncated analogue of angiotensin II, [Sar1]angiotensin II-(1-7)-amide, provides an entry to a new class of angiotensin II antagonists. J Med Chem, v.32, n.3, Mar, p.520-2. 1989.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Braun-Menendez, E., J. C. Fasciolo, *et al.* The substance causing renal hypertension. J Physiol, v.98, n.3, Jul 24, p.283-298. 1940.

Britto, R. R., R. A. Santos, *et al.* Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. Hypertension, v.30, n.3 Pt 2, Sep, p.549-56. 1997.

Burlew, B. S. e K. T. Weber. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. Cardiol Clin, v.18, n.3, Aug, p.435-42. 2000.

Burrell, L. M., J. Risvanis, *et al.* Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. Eur Heart J, v.26, n.4, Feb, p.369-75; discussion 322-4. 2005.

Campagnole-Santos, M. J., S. B. Heringer, *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. Am J Physiol, v.263, n.1 Pt 2, Jul, p.R89-94. 1992.

Chansel, D., S. Vandermeersch, *et al.* Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. Eur J Pharmacol, v.414, n.2-3, Mar 2, p.165-75. 2001.

Christensen, G., A. Ilebekk, *et al.* The release mechanism for atrial natriuretic factor during blood volume expansion and tachycardia in dogs. Acta Physiol Scand, v.134, n.2, Oct, p.263-70. 1988.

_____. Release of atrial natriuretic factor during infusion of isoproterenol and angiotensin II. Am J Physiol, v.257, n.4 Pt 2, Oct, p.R896-900. 1989.

Christensen, G. e E. Leistad. Atrial systolic pressure, as well as stretch, is a principal stimulus for release of ANF. Am J Physiol, v.272, n.2 Pt 2, Feb, p.H820-6. 1997.

Crackower, M. A., R. Sarao, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature, v.417, n.6891, Jun 20, p.822-8. 2002.

D'souza, S. P., M. Davis, *et al.* Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. Pharmacol Ther, v.101, n.2, Feb, p.113-29. 2004.

Deddish, P. A., B. Marcic, *et al.* N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. Hypertension, v.31, n.4, Apr, p.912-7. 1998.

Dietz, J. R. The effect of angiotensin II and ADH on the secretion of atrial natriuretic factor. Proc Soc Exp Biol Med, v.187, n.3, Mar, p.366-9. 1988.

_____. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. Cardiovasc Res, v.68, n.1, Oct 1, p.8-17. 2005.

Diez, J., A. Gonzalez, *et al.* Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, v.2, n.4, Apr, p.209-16. 2005.

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

Dostal, D. E. Regulation of cardiac collagen: angiotensin and cross-talk with local growth factors. Hypertension, v.37, n.3, Mar, p.841-4. 2001.

Dzau, V. J., D. W. Burt, *et al.* Molecular biology of the renin-angiotensin system. Am J Physiol, v.255, n.4 Pt 2, Oct, p.F563-73. 1988.

Faria-Silva, R., F. V. Duarte, *et al.* Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. Hypertension, v.46, n.4, Oct, p.948-52. 2005.

Ferreira, A. J. Caracterização em nível genômico, bioquímico e fisiológico de um modelo de rato transgênico que superexpressa angiotensina-(1-7).. Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004. 162 p.

Ferreira, A. J. e R. A. Santos. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). Braz J Med Biol Res, v.38, n.4, Apr, p.499-507. 2005.

Ferreira, A. J., R. A. Santos, *et al.* Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, Sep, p.665-8. 2001.

Focaccio, A., M. Volpe, *et al.* Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. Circulation, v.87, n.1, Jan, p.192-8. 1993.

Franchini, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. Revista Brasileira de Hipertensão, v.8, p.125-42. 2001.

Gembardt, F., A. Sterner-Kock, *et al.* Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. Peptides, v.26, n.7, Jul, p.1270-7. 2005.

Golomb, E., Z. A. Abassi, *et al.* Angiotensin II maintains, but does not mediate, isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. Am J Physiol, v.267, n.4 Pt 2, Oct, p.H1496-506. 1994.

Grimm, D., D. Elsner, *et al.* Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. Cardiovasc Res, v.37, n.1, Jan, p.91-100. 1998.

Grimm, D., S. R. Holmer, *et al.* Effects of beta-receptor blockade and angiotensin II type I receptor antagonism in isoproterenol-induced heart failure in the rat. Cardiovasc Pathol, v.8, n.6, Nov-Dec, p.315-23. 1999.

Grobe, J. L., A. P. Mecca, *et al.* Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.290, n.6, Jun, p.H2417-23. 2006.

Hamawaki, M., T. M. Coffman, *et al.* Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. Am J Physiol, v.274, n.3 Pt 2, Mar, p.H868-73. 1998.

Handa, R. K. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. J Am Soc Nephrol, v.11, n.8, Aug, p.1377-86. 2000.

He, J. G., Y. Y. Huang, *et al.* [Effects of angiotensin-(1-7) on remodeling of myocardial collagen network in pressure-overloaded rats]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, v.16, n.9, Sep, p.523-6. 2004.

Heringer-Walther, S., E. N. Batista, *et al.* Baroreflex improvement in shr after ace inhibition involves angiotensin-(1-7). Hypertension, v.37, n.5, May, p.1309-14. 2001.

Iwata, M., R. T. Cowling, *et al.* Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.6, Dec, p.H2356-63. 2005.

Katovich, M. J., J. L. Grobe, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 as a novel target for gene therapy for hypertension. Exp Physiol, v.90, n.3, May, p.299-305. 2005.

King, K. A. e J. R. Ledson. Atrial dynamics, atrial natriuretic factor, tachycardia, and blood volume in anesthetized rabbits. Am J Physiol, v.261, n.1 Pt 2, Jul, p.H22-8. 1991.

Komuro, I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. Jpn Circ J, v.65, n.5, May, p.353-8. 2001.

Krieger, E. M. Angiotensinas - aspectos fisiológicos. . Hipertensão, v.1, p.1-10. 1998.

Lachance, D. e R. Garcia. Atrial natriuretic factor release by angiotensin II in the conscious rat. Hypertension, v.11, n.6 Pt 1, Jun, p.502-8. 1988.

_____. Atrial natriuretic factor release during acute infusion of isoproterenol in the conscious rat. Regul Pept, v.33, n.1, Mar 26, p.31-8. 1991.

Leenen, F. H., R. White, *et al.* Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.281, n.6, Dec, p.H2410-6. 2001.

Lemos, V. S., D. M. Silva, *et al.* The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. J Cardiovasc Pharmacol, v.46, n.3, Sep, p.274-9. 2005.

Li, P., M. C. Chappell, *et al.* Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. Hypertension, v.29, n.1 Pt 2, Jan, p.394-400. 1997.

Lijnen, P. J., V. V. Petrov, *et al.* Collagen production in cardiac fibroblasts during inhibition of angiotensin-converting enzyme and aminopeptidases. J Hypertens, v.22, n.1, Jan, p.209-16. 2004.

Loot, A. E., A. J. Roks, *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. Circulation, v.105, n.13, Apr 2, p.1548-50. 2002.

Lorell, B. H. Role of angiotensin AT1, and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and disease. Am J Cardiol, v.83, n.12A, Jun 17, p.48H-52H. 1999.

Machado, R. D., R. A. Santos, *et al.* Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.280, n.4, Apr, p.R994-R1000. 2001.

Mahon, J. M., R. D. Carr, *et al.* Angiotensin(1-7) is an antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. J Hypertens, v.12, n.12, Dec, p.1377-81. 1994.

Mazzolai, L., J. Nussberger, *et al.* Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. Hypertension, v.31, n.6, Jun, p.1324-30. 1998.

Mcgrath, M. F. e A. J. De Bold. Determinants of natriuretic peptide gene expression. Peptides, v.26, n.6, Jun, p.933-43. 2005.

Mendes, A. C., A. J. Ferreira, *et al.* Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. Regul Pept, v.125, n.1-3, Feb 15, p.29-34. 2005.

Methot, D., M. C. Lapointe, *et al.* Tissue targeting of angiotensin peptides. J Biol Chem 1997. 12994-9 p.

Mill, J. G. Hipertrofia Cardíaca. Revista Brasileira de Hipertensão, v.18, p.63-75. 2001.

Mori, T., Y. F. Chen, *et al.* Volume overload results in exaggerated cardiac hypertrophy in the atrial natriuretic peptide knockout mouse. Cardiovasc Res, v.61, n.4, Mar 1, p.771-9. 2004.

Nagano, M., J. Higaki, *et al.* Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. Hypertension, v.19, n.6 Pt 2, Jun, p.708-12. 1992.

Neves, L. A., A. P. Almeida, *et al.* Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. Braz J Med Biol Res, v.30, n.6, Jun, p.801-9. 1997.

_____. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. Biochem Pharmacol, v.50, n.9, Oct 26, p.1451-9. 1995.

Oigman, W. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. . Revista Brasileira de Hipertensão, v.3, p.261-7. 2000.

Oliveira, E. M. e J. E. Krieger. Chronic beta-adrenoceptor stimulation and cardiac hypertrophy with no induction of circulating renin. Eur J Pharmacol, v.520, n.1-3, Sep 27, p.135-41. 2005.

- Paradis, P., N. Dali-Youcef, *et al.* Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.2, Jan 18, p.931-6. 2000.
- Paul, M., A. Poyan Mehr, *et al.* Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiol Rev, v.86, n.3, Jul, p.747-803. 2006.
- Paula, R. D., C. V. Lima, *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. Hypertension, v.26, n.6 Pt 2, Dec, p.1154-9. 1995.
- Pinheiro, S. V., A. C. Simoes E Silva, *et al.* Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. Hypertension, v.44, n.4, Oct, p.490-6. 2004.
- Potter, L. R., S. Abbey-Hosch, *et al.* Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. Endocr Rev, v.27, n.1, Feb, p.47-72. 2006.
- Rankin, A. J., C. A. Courneya, *et al.* Tachycardia releases atrial natriuretic peptide in the anesthetized rabbit. Life Sci, v.38, n.21, May 26, p.1951-7. 1986.
- Roks, A. J., P. P. Van Geel, *et al.* Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. Hypertension, v.34, n.2, Aug, p.296-301. 1999.
- Rosenfeld, G. Corante óptico para hematologia e citologia clínica. Memórias do Instituto Oswaldo Butantan, v.20, p.330-334. 1947.
- Rowe, B. P., D. L. Saylor, *et al.* Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. Regul Pept, v.56, n.2-3, Apr 14, p.139-46. 1995.
- Sampaio, W. O., A. A. Nascimento, *et al.* Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.6, Jun, p.H1985-94. 2003.

Santos, G. A. B. Reflexos cardiovasculares e hemodinâmica sistêmica e local em ratos que expressam uma proteína de fusão produtoa de angiotensina-(1-7) [TGR(A1-7)3292]. Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005. 121 p.

Santos, R. A., C. H. Castro, *et al.* Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, v.47, n.5, May, p.996-1002. 2006.

Santos, R. A., A. J. Ferreira, *et al.* Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. Physiol Genomics, v.17, n.3, May 19, p.292-9. 2004.

_____. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. Expert Opin Investig Drugs, v.14, n.8, Aug, p.1019-31. 2005.

Santos, R. A., A. C. Simoes E Silva, *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.14, Jul 8, p.8258-63. 2003.

Strawn, W. B., C. M. Ferrario, *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. Hypertension, v.33, n.1 Pt 2, Jan, p.207-11. 1999.

Su, X., G. Brower, *et al.* Differential expression of natriuretic peptides and their receptors in volume overload cardiac hypertrophy in the rat. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.10, Oct, p.1927-36. 1999.

Sun, Y. e K. T. Weber. RAS and connective tissue in the heart. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.6, Jun, p.919-31. 2003.

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

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem, v.275, n.43, Oct 27, p.33238-43. 2000.

Tom, B., R. De Vries, *et al.* Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. Hypertension, v.38, n.1, Jul, p.95-9. 2001.

Ueda, S., S. Masumori-Maemoto, *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. Hypertension, v.35, n.4, Apr, p.998-1001. 2000.

Unger, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. Am J Cardiol, v.89, n.2A, Jan 24, p.3A-9A; discussion 10A. 2002.

Varo, N., M. J. Iraburu, *et al.* Chronic AT(1) blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.35, n.6, Jun, p.1197-202. 2000.

Vickers, C., P. Hales, *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J Biol Chem, v.277, n.17, Apr 26, p.14838-43. 2002.

Volpe, M., P. Pepino, *et al.* Modulatory role of angiotensin-II in the secretion of atrial natriuretic factor in rabbits. Endocrinology, v.128, n.5, May, p.2427-31. 1991.

Wang, L. J., J. G. He, *et al.* Chronic administration of angiotensin-(1-7) attenuates pressure-overload left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, v.25, n.5, May, p.481-7. 2005.

Weber, K. T. Cardioreparation in hypertensive heart disease. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, Sep, p.588-91. 2001.

Williams, B. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. Am J Cardiol, v.87, n.8A, Apr 19, p.10C-17C. 2001.

Zisman, L. S., R. S. Keller, *et al.* Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. Circulation, v.108, n.14, Oct 7, p.1707-12. 2003.

(Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005; Paul, Poyan Mehr *et al.*, 2006)

(Averill, Ishiyama *et al.*, 2003)

(Braun-Menendez, Fasciolo *et al.*, 1940; Bradford, 1976; Rankin, Courneya *et al.*, 1986; Christensen, Ilebekk *et al.*, 1988; Dietz, 1988; Lachance e Garcia, 1988; Christensen, Ilebekk *et al.*, 1989; Agnoletti, Panzali *et al.*, 1990; King e Ledsoe, 1991; Lachance e Garcia, 1991; Volpe, Pepino *et al.*, 1991; Agnoletti, Rodella *et al.*, 1992; Nagano, Higaki *et al.*, 1992; Focaccio, Volpe *et al.*, 1993; Botelho, Block *et al.*, 1994; Golomb, Abassi *et al.*, 1994; Neves, Almeida *et al.*, 1995; Britto, Santos *et al.*, 1997; Christensen e Leistad, 1997; Methot, Lapointe *et al.*, 1997; Neves, Almeida *et al.*, 1997; Grimm, Elsner *et al.*, 1998; Grimm, Holmer *et al.*, 1999; Su, Brower *et al.*, 1999; Almeida, Frabregas *et al.*, 2000; Varo, Iraburu *et al.*, 2000; Dostal, 2001; Leenen, White *et al.*, 2001; Weber, 2001; Bouzegrhane e Thibault, 2002; Crackower, Sarao *et al.*, 2002; Loot, Roks *et al.*, 2002; Sun e Weber, 2003; Zisman, Keller *et al.*, 2003; D'souza, Davis *et al.*, 2004; He, Huang *et al.*, 2004; Lijnen, Petrov *et al.*, 2004; Mori, Chen *et al.*, 2004; Santos, Ferreira *et al.*, 2004; Burrell, Risvanis *et al.*, 2005; Dietz, 2005; Iwata, Cowling *et al.*, 2005; Mcgrath e De Bold, 2005; Mendes, Ferreira *et al.*, 2005; Oliveira e Krieger, 2005; Tallant, Ferrario *et al.*, 2005; Wang, He *et al.*, 2005; Grobe, Mecca *et al.*, 2006; Potter, Abbey-Hosch *et al.*, 2006; Santos, Castro *et al.*, 2006)(Dzau, Burt *et al.*, 1988; Bovy, Trapani *et al.*, 1989; Campagnole-Santos, Heringer *et al.*, 1992; Mahon, Carr *et al.*, 1994; Paula, Lima *et al.*, 1995; Rowe, Saylor *et al.*, 1995; Li, Chappell *et al.*, 1997; Deddish, Marcic *et al.*, 1998; Hamawaki, Coffman *et al.*, 1998; Krieger, 1998; Mazzolai, Nussberger *et al.*, 1998; Ardaillou, 1999; Lorell, 1999; Roks, Van Geel *et al.*, 1999; Strawn, Ferrario *et al.*, 1999; Burlew e Weber, 2000; Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Handa, 2000; Paradis, Dali-Youcef *et al.*, 2000; Tipnis, Hooper *et al.*, 2000; Ueda, Masumori-Maemoto *et al.*, 2000; Chansel, Vandermeersch *et al.*, 2001; Ferreira, Santos *et al.*, 2001; Heringer-Walther, Batista *et al.*, 2001; Komuro, 2001; Machado, Santos *et al.*, 2001; Tom, De Vries *et al.*, 2001; Williams, 2001; Bader, 2002; Unger, 2002; Vickers, Hales *et al.*, 2002; Sampaio, Nascimento *et al.*, 2003; Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003; D'souza, Davis *et al.*, 2004; Ferreira, 2004; Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004; Diez, Gonzalez *et al.*, 2005; Ferreira e Santos, 2005; Gembardt, Sterner-Kock *et al.*, 2005; Katovich, Grobe *et al.*, 2005; Lemos, Silva *et al.*, 2005; Santos, 2005)

(Rosenfeld, 1947; Oigman, 2000; Franchini, 2001; Mill, 2001; Anand-Srivastava, 2005; Santos, Ferreira *et al.*, 2005)