

## 1. Revisão de Literatura

### 1.1-O Sistema renina-angiotensina

Na visão clássica, o sistema renina-angiotensina (SRA) age endocrinamente, sendo que a renina (enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal) cliva o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em angiotensina I (um decapeptídeo) que por sua vez é clivada em angiotensina II pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Esta enzima está presente na superfície vascular e tem como seu principal ponto anatomofuncional o leito vascular pulmonar, o qual recebe 100% do débito cardíaco (Peach, 1977).

Na visão moderna o sistema renina-angiotensina é o principal agente regulador da pressão arterial basal sendo composto por peptídeos vasoativos com ações hipertensivas e anti-hipertensivas que agem de modo endócrino, parácrino e autócrino (Simões-e-Silva e cols, 1997; Santos e cols, 2000).

Este sistema tem mostrado ter participação no surgimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão, doenças coronarianas, miocardites e insuficiência cardíaca (Dostal e cols, 1999). Os dois principais peptídeos ativos deste sistema são a angiotensina-II (Ang-II) e angiotensina (1-7) Ang-(1-7), os quais exercem ações, na maioria das vezes, antagônicas sobre a saúde cardiovascular (Machado e cols, 2000), podendo exercer papel fundamental no surgimento da hipertensão essencial (Benter e cols, 1995). (figura 1).

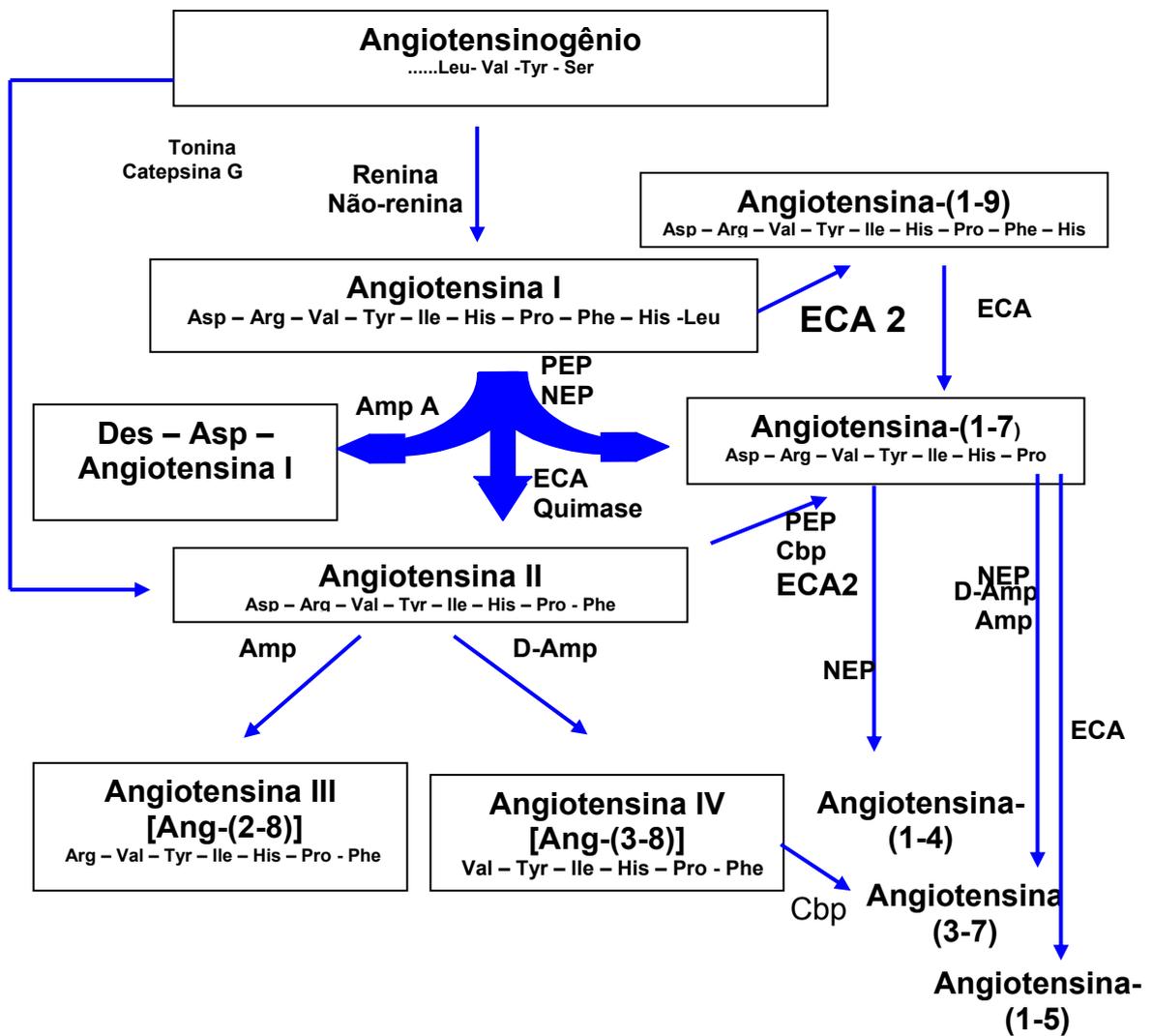


Figura 1. Ilustração simplificada da cascata proteolítica de formação e de degradação dos principais peptídeos angiotensinogênicos biologicamente ativos. ECA – enzima conversora de angiotensina (2); Amp A – aminopeptidase A; Amp – aminopeptidase; Cbp – carboxipeptidase; D-Amp – Dipeptidil-amino-peptidase; NEP – endopeptidase neutra; PCP – prolil-carboxipeptidase; PEP – Proil-endopeptidase.

A Ang II, peptídeo classicamente conhecido deste sistema, promove ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos. Nos estudos de Bono e cols, (1962) a infusão endovenosa deste peptídeo em indivíduos normotensos sadios promoveu aumento na pressão arterial de repouso, sendo este aumento 50 vezes maior que o mesmo experimento com infusão de noradrenalina.

Recentemente tem se mostrado que o papel da Ang II no controle da pressão arterial é o resultado da interação deste peptídeo com os diversos sistemas fisiológicos. No sistema nervoso central a Ang II estimula a área rostral ventrolateral do bulbo (área pressora) (Andreatta e cols, 1988) e facilita a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas exercendo uma comunicação de feedback positivo entre sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina, sendo que estas ações se reforçam mutuamente (Fagard e cols, 1984). A Ang II aumenta o volume sanguíneo de três formas: 1- estimula a hipófise posterior a liberar ADH, que atua nos túbulos distais via receptor V2 reabsorvendo água, e, além disso, é um potente vasoconstritor via receptor V1. 2- estimula a liberação aldosterona na zona glomerulosa renal 3- interfere no comportamento atuando no órgão subfornical aumentando o apetite por sódio e água (Ferrario e cols, 1988). Nos tecidos periféricos a Ang II promove redução da sensibilidade dos barorreceptores, o que reduz a eficácia no controle da variação da pressão arterial a cada ciclo cardíaco (Oparil e cols, 1988). Em adição, promove vasoconstrição potente e proliferação endotelial (Machado e cols, 2000).

A Ang-(1-7) é um outro produto final do sistema renina-angiotensina, que, na maioria das vezes, exerce ações antagônicas à Ang II (Santos e cols, 2000; Ferrario e cols, 1997). A Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade do barorreceptor (Campagnole-Santos e cols, 1992) e potencializa o efeito vasodilatador da bradicinina (Paula e cols, 1995; Abbas e cols, 1997; Fernandes e cols, 2001) e do óxido nítrico (Porsti e cols, 1994; Brosnihan e cols, 1996; Machado e cols, 2001; Heitsch e cols, 2001).

A administração de bloqueadores do sistema renina-angiotensina tem sido utilizada no combate à hipertensão e às doenças cardiovasculares associadas (Campbell, 2002), sendo os de maior relevância: 1-os inibidores da ECA, reduzindo a conversão de angiotensina I em ang-II e 2-os antagonistas do receptor AT1 da Ang II, diminuindo as ações hipertensivas deste peptídeo (Iyer e cols, 1998). Em adição, a utilização dos inibidores da ECA (Fernandes e cols, 2005) e antagonistas da Ang II, via receptor AT1 (Iyer e cols, 1998) aumentam as concentrações plasmática de Ang-(1-7) otimizando assim seus efeitos cardioprotetores, tais como redução da degradação da Ang-(1-7) em angiotensina-(1-5) (Chappell e cols, 1998) e degradação da bradicinina (Fernandes e cols, 2005), pois tanto a Ang-(1-7) (Ferrario e cols, 1998; Yamada e cols, 1998) como a bradicinina (Chappell e cols, 1998) são inativadas pela ECA. Recentemente, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) foi descrita na literatura como a principal enzima capaz de clivar a Ang II em Ang-(1-7) e clivar a ang-I em ang-1-9 e, finalmente, em Ang-(1-7) (Donoghue e cols, 2000; Eriksson e cols, 2002; Vickers e cols, 2002; Crackower e cols, 2002; ; Campbell, 2003).

### *1.2-Sistema renina-angiotensina e o coração*

O principal motivo do estudo da formação local dos componentes do sistema renina-angiotensina e seus receptores no coração pode estar relacionado ao fato de que a Ang II pode promover danos ao tecido cardíaco sem exercer seus efeitos clássicos de elevação na pressão arterial sistêmica (Mazzolai e cols, 1998). Animais transgênicos que superexpressam o receptor AT1 no coração exibem uma significativa hipertrofia cardíaca falecendo após alguns dias (Hoffman e cols, 1996). Além disso, nos estudos de Kang e cols, (1999) animais que expressam angiotensinogênio exclusivamente no fígado e cérebro desenvolvem hipertensão sem apresentar alterações na estrutura cardíaca.

Alguns estudos mostram que o tecido cardíaco tem uma alta eficiência em captar da circulação as enzimas e os demais componentes do sistema renina-angiotensina. A renina, por exemplo, parece ser facilmente captada na

circulação coronariana (Muller e cols, 1998). Entretanto, diversos estudos mostram a presença de um sistema renina-angiotensina local no coração (Campbell, 1987; Lindpainter e cols, 1990; Schunkert e cols, 1990). Estudos mostram que a síntese de renina no coração está aumentada em condições patológicas como no infarto do miocárdio (Clausmeyer e cols, 2000). A descoberta de outras enzimas no coração, como as quimases que convertem a angiotensina I diretamente em Ang II, representa uma via alternativa da ECA presente neste órgão. Esta via alternativa parece ser importante para indivíduos que utilizam inibidores da ECA, pois a disponibilidade de Ang II no coração parece ser essencial para formação da Ang-(1-7). Os estudos de Zisman e cols, (2003) em coração intacto de humanos mostraram que ocorre uma menor formação de Ang-(1-7) devido a uma menor disponibilidade de Ang II. Portanto, a ECA 2 parece utilizar principalmente a Ang II como substrato para formação de Ang-(1-7) no coração (Donoghue e cols, 2000; Tipnis e cols, 2000).

### *1.3-Angiotensina II e o coração*

O potente efeito proliferativo da Ang II foi descrito por Schelling e cols, (1979) que mostraram um aumento brusco na proliferação de células de linhagem na presença de Ang II. Este efeito proliferativo, no entanto, foi completamente abolido na presença de um antagonista inespecífico da Ang II, saralasin. No coração a Ang II estimula o crescimento de células musculares lisas em cultura (Kato e cols, 1991), aumenta a proliferação do fibroblasto (Crabos e cols, 1994; Sun e cols, 1997; Kawano e cols, 2000; Gonzalez e cols, 2002; Shivakumar e cols, 2003) e promove a hipertrofia dos miócitos (Sadoshima & Izumo, 1993). Além disso, a Ang II promove vasoconstrição coronariana, participando assim no processo de arritmia cardíaca (Ferreira e cols, 2001).

As ações da Ang II são mediadas pelos receptores AT1 e AT2, os quais foram descritos como receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G (Kim & Iwao, 2000). Via receptor AT1, a Ang II contribui diretamente para os efeitos deletérios no remodelamento cardíaco tendo papel importante no processo de hipertrofia (Senbonmatsu, 2003), arritmias (Ferreira e cols, 2001) e

fibrose (Sadoshima e cols, 1993; Brilla e cols, 1994). Via receptor AT<sub>2</sub> a Ang II promove efeitos antagônicos como vasodilatação (Tsutsumi e cols, 1999), inibição da proliferação celular induzida pela estimulação dos receptores AT<sub>1</sub> e indução de apoptose (Stoll e cols, 1995; Tanaka e cols, 1995), sendo que estes efeitos parecem ser mediados pela formação de cininas, NO e GMPc (Tsutsumi et al., 1999). Entretanto os efeitos da Ang II via receptor AT<sub>2</sub> ainda são controversos.

#### *1.4-Angiotensina-(1-7) e o coração*

A síntese local de Ang-(1-7) no coração foi primeiramente detectada em cães após isquemia aguda do miocárdio (Santos e cols, 1990). Desta forma, surgiam as primeiras evidências de que o dano tecidual cardíaco é um estímulo para formação local de um sistema contrarregulatório mediado pela Ang-(1-7), sendo a ECA 2 a principal enzima envolvida na formação deste peptídeo no coração (Crackower e cols, 2002).

Desde então, diversos estudos têm mostrado que, além de inibir o efeito pressor sistêmico, a Ang-(1-7) inibe os efeitos deletérios locais da Ang II. A ação local da Ang-(1-7) especificamente no coração tem sido proposta em diversos trabalhos. Dentre estes, recentemente Grobe e cols, (2006) mostraram que a Ang-(1-7) previne o surgimento de fibrose cardíaca sem alteração dos níveis pressóricos sistêmico de ratos hipertensos. Sendo assim, o coração tem sido considerado um dos principais alvos de estudo das ações da Ang-(1-7). A Ang-(1-7) diminui a duração do período de isquemia durante a reperfusão do miocárdio após o colapamento da coronária esquerda e melhora a contratilidade cardíaca nestas condições (Ferreira e cols, 2001; Santos e cols, 2004). Loot e cols, (2002) mostraram que após o infarto do miocárdio a infusão crônica de Ang-(1-7) por 8 semanas atenuou o processo de falência cardíaca e melhorou a função endotelial aórtica em ratos. Animais transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) tinham os níveis plasmáticos deste peptídeo aumentados em 2,5 vezes e apresentaram melhora significativa de todos os parâmetros da função

cardíaca após a isquemia aguda do miocárdio (Santos e cols, 2004). Os mecanismos pelos quais a Ang-(1-7) antagoniza as ações da Ang II ainda não estão estabelecidos. Os poucos estudos da literatura sugerem que este peptídeo exerce este papel cardioprotetor por diferentes mecanismos que envolvem: potencialização da vasodilatação coronariana via bradicinina e óxido nítrico (Brosnihan e cols, 1996), redução das concentrações de Ang II no miocárdio (Mendes e cols, 2005), down-regulation dos receptores AT1 e redução de sua expressão gênica (Clark e cols, 2001).

### *1.5-Receptor Mas*

Em um número crescente de estudos tem sido mostrado que os efeitos da Ang-(1-7) não são abolidos pelo bloqueio dos receptores AT1 e AT2, sugerindo a presença de um receptor específico para a Ang-(1-7) (Benter e cols, 1993; Porsti e cols, 1994; Brosnihan e cols, 1996). Em concordância com estes achados, uma forma modificada da Ang-(1-7), a [D-Ala7]-Ang-(1-7), na qual a prolina da posição 7 é substituída pela D-Ala, bloqueou seletivamente os efeitos da Ang-(1-7) (Santos e cols, 1994; Tallant e cols, 1999).

Apenas recentemente Santos e cols, (2003) mostraram evidências funcionais de que este peptídeo age via receptor Mas. O receptor Mas foi primeiramente caracterizado como um receptor órfão, acoplado a proteína G, com sete domínios transmembrana e baixa atividade oncogênica (Young e cols, 1986).

Nos estudos de Santos e cols, (2003), foi mostrado através de experimentos de *binding* no rim, que em camundongos knockout para o receptor Mas, a Ang-(1-7) apresentou baixa afinidade. Em um outro experimento, a ang-1-7 se ligou com alta afinidade em células de linhagem transfectadas com o receptor Mas. Em adição, foi verificado que a Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas promovendo a liberação de ácido aracdônico, efeito que não foi bloqueado pelos antagonistas dos receptores AT1 e AT2 sendo bloqueado apenas com o antagonista específico do receptor Mas (A779).

## *1.6-Receptor Mas no coração*

Diversos estudos têm mostrado que a Ang-(1-7), via receptor Mas, tem efeitos anti-hipertrofico e anti-fibrótico no coração. Estudos recentes de Santos e cols, (2006) utilizando um modelo de camundongos knockout para o receptor Mas mostraram baixa reatividade da Ang-(1-7) em fatias do ventrículo esquerdo destes animais. Além disso foi mostrado que camundongos knockout para o receptor Mas apresentam redução da contratilidade, aumento da síntese de colágeno I e III, fibronectina e redução do colágeno VI favorecendo assim o surgimento de disfunção sistólica e diastólica independentemente de alterações da pressão arterial. Tallant e cols, (2005) identificaram a presença do receptor Mas em cardiomiócitos de ratos neonatos sugerindo que a Ang-(1-7) pode agir diretamente através do seu receptor no processo contrátil e na hipertrofia dos miócitos. Em adição, estudos têm mostrado que os efeitos da Ang-(1-7) de melhora da função contrátil após isquemia (Ferreira e cols, 20001), potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (Almeida e cols, 2000), dentre outros, são abolidos pelo antagonista seletivo do receptor Mas, A779. Os estudos de (Iwata e cols, 2005) mostraram que no fibroblasto cardíaco de animais neonatos a Ang-(1-7) tem efeito anti-proliferativo sendo este antagonizado pela incubação das células com A779.

## *1.7-Expressão do receptor Mas no coração em diferentes condições*

### *1.7.1- O envelhecimento*

Entre as alterações estruturais cardíacas que ocorrem com o envelhecimento podemos citar a redução da perfusão do miocárdio (Hachamovitch e cols, 1989), arritmias cardíacas (Carre e cols, 1992), menor complacência ventricular e aórtica que estão diretamente ligadas ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (Hachamovitch e cols, 1989; Michel e cols, 1994; Rodeheffer e cols, 1984; Assayag e cols, 1997; McMurray & Stewart, 2000).

Diversas alterações morfológicas e funcionais estão envolvidas no remodelamento cardíaco durante o envelhecimento. A consequência direta destas mudanças é um aumento significativo da sobrecarga mecânica no coração senescente, sendo a principal adaptação do coração nessas condições, a hipertrofia ventricular esquerda que pode culminar na insuficiência cardíaca (O'Rourke e cols, 1987; Wei, 1992).

Observa-se no miocárdio de indivíduos senescentes um aumento da deposição de matrix extracelular, apoptose de cardiomiócitos, hipertrofia das células remanescentes e maior deposição de células adiposas. Nas coronárias, observa-se a degradação da matriz extracelular, especialmente das fibras de elastina, produzindo diminuição da elasticidade da parede vascular, conferindo-lhe maior rigidez (Lakatta, 1993).

Uma característica marcante do coração senescente é o relaxamento mais lento, que causa um enchimento ventricular incompleto durante a diástole tornando assim o coração do idoso altamente dependente da contração atrial durante o final da diástole. A perda da contração atrial regular, como na fibrilação atrial, compromete adicionalmente o enchimento ventricular e reduz o débito cardíaco, sendo esta disfunção diastólica importante causa de insuficiência cardíaca no idoso (Chen e cols, 1998). Os estudos de Zhou e cols, (1998), sugerem que um dos eventos celulares responsáveis por esse fenômeno no envelhecimento é um retardo na inativação dos canais de cálcio tipo L, aumentando a magnitude do influxo de cálcio em cada ciclo cardíaco e prolongando a duração do potencial de ação celular, o que pode ser importante para preservar a função contrátil. Outro mecanismo proposto neste estudo é que a dissociação do cálcio dos miofilamentos no citoplasma e a sua recaptação para o retículo sarcoplasmático estejam diminuídos com a senescência, contribuindo para a disfunção diastólica do idoso. Além disso, estudos mostram que a redução da contratilidade miocárdica em função da idade também ocorre como consequência de doenças associadas, principalmente hipertensão e doença arterial coronária, comuns na população idosa (Chen e cols, 1998).

Já é bem estabelecido que o envelhecimento é acompanhado por diversas alterações estruturais e funcionais cardíacas que levam ao dano tecidual e, possivelmente, à falência cardíaca. Entretanto as bases moleculares que governam estas alterações ainda são pouco conhecidas. A expressão gênica dos receptores do sistema renina-angiotensina no coração tem mostrado estar alterada com o processo de envelhecimento podendo assim, modular as alterações morfológicas e funcionais cardíacas que ocorrem com a senilidade. Os dados da literatura mostram que no coração a expressão do receptor AT2 aumenta durante o período neonatal e diminui rapidamente após o nascimento (Grady e cols, 1991). Em relação ao receptor AT1 estudos mostram que sua expressão no coração aumenta durante o desenvolvimento da doença cardíaca, como, por exemplo, no infarto do miocárdio (Nio e cols, 1995). De modo semelhante, a expressão do receptor AT1 aumenta com o envelhecimento sugerindo que estas alterações possam favorecer o surgimento das doenças cardíacas que ocorrem com a senilidade (Assayag e cols, 1997; Heymes e cols, 1998). Além disso, é relatado que as alterações decorrentes do envelhecimento podem variar regionalmente de acordo com a expressão de diferentes receptores nas câmaras cardíacas. Os estudos de Heymes e cols, (1998) mostraram que o aumento da expressão do receptor AT1 no coração de ratos senis ocorreu apenas no ventrículo esquerdo.

Este trabalho tem como um dos objetivos verificar se a expressão do receptor Mas está alterada nos diferentes estágios de maturação do tecido cardíaco.

#### 1.7.2- A hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico aeróbio

Desde a década de 50 existem estudos mostrando que o treinamento físico aeróbio está associado com uma redução da incidência de doenças cardiovasculares (Morris e cols, 1953). Esses benefícios têm sido amplamente estudados em modelos experimentais animais sendo constatado tanto em ratos normotensos (Cox e cols, 1985) como hipertensos (Schaible e cols, 1986). A hipertrofia cardíaca é uma das principais adaptações fisiológicas do treinamento aeróbio, sendo a intensidade do exercício fator determinante do seu

desenvolvimento. Estudos de Nutter e cols, (1981), mostraram que o exercício de baixa intensidade (50% Vo<sub>2</sub>máx) não gera hipertrofia cardíaca e alteração de contratilidade. Entretanto, o treinamento físico de alta intensidade (70-85% do Vo<sub>2</sub>máx) leva ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, também conhecida como “coração de atleta”. O surgimento deste tipo de hipertrofia ocorre principalmente por um aumento da pré-carga com conseqüente aumento da tensão diastólica, sendo estes fatores determinantes para o desenvolvimento de fibras em série e aumento do tamanho das câmaras cardíacas, gerando assim a hipertrofia cardíaca excêntrica (Oliveira & Krieger, 2002).

Com relação ao Sistema renina-angiotensina, estudos mostram que a Ang II, via receptor AT1 estimula o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Sakata e cols, 2001) e a Ang-(1-7), via receptor Mas, inibe o surgimento da hipertrofia cardíaca (Tallant e cols, 2005). Os efeitos do treinamento físico sobre os peptídeos e receptores do sistema renina-angiotensina ainda não estão elucidados. Alguns trabalhos sugerem que a redução da atividade da renina plasmática (Hayashi e cols, 2000; Zamo e cols, 2004) e concentração da Ang II (Braith e cols, 1999) podem estar envolvidos com a cardioproteção promovida pelo treinamento físico, particularmente em patologias cardíacas.

O eixo Ang-(1-7) / receptor Mas tem chamado atenção de vários pesquisadores devido ao seu papel na melhora da função cardíaca. Estudos recentes têm mostrado que a Ang-(1-7) melhora a performance cardíaca. Sampaio e cols, (2003) mostraram que a infusão aguda de Ang-(1-7) aumenta o débito cardíaco e o volume sistólico. Santos e cols, (2004) verificaram um aumento da contratilidade cardíaca (dP/dt) em um modelo experimental de ratos transgênicos [TGR(A1-7)3292] que apresentam aumento de 2,5 vezes nas concentrações plasmáticas de Ang-(1-7).

Entretanto o comportamento deste peptídeo bem como a expressão do receptor Mas no coração em resposta ao treinamento físico aeróbio ainda não está estabelecido. Estudos recentes de Gomes-Filho, (2004) mostraram que tanto ratos Wistar como SHR desenvolveram hipertrofia cardíaca após um treinamento aeróbio de natação. Através da técnica de radioimunoensaio foi

constatado que as concentrações plasmáticas de Ang-(1-7) não estavam alteradas após o treinamento físico tanto em ratos Wistar como SHR. Entretanto, a concentração tecidual de Ang-(1-7) no ventrículo esquerdo de ratos SHR teve um aumento de cerca de 2 vezes após o treinamento. Além disso, esses animais apresentaram um aumento da expressão do mRNA do receptor Mas, sendo, portanto, indicativo de que a expressão do receptor Mas poderia estar alterada após o treinamento físico aeróbio em ratos SHR.

### 1.7.3- A hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento crônico com isoproterenol

A estimulação do receptor  $\beta$ -adrenérgico é essencial para a contratilidade cardíaca, entretanto, a estimulação crônica do receptor  $\beta$ -adrenérgico como ocorre na hipertrofia cardíaca patológica e falência cardíaca promove, necrose (Teerlink e cols, 1994), alterações da matriz intersticial (Grimm e cols, 1998), *down-regulation* do receptor  $\beta$ -adrenérgico (Kudej e cols, 1997) dentre outros, sendo os mecanismos que promovem esses danos ainda pouco conhecidos. Estudos mostram que na hipertrofia cardíaca promovida por aumento da estimulação  $\beta$ -adrenérgica ocorre aumento significativo da atividade do sistema renina-angiotensina endógeno e tecidual cardíaco (Grimm e cols, 1998), particularmente a ECA (Busatto e cols, 1999) e a Ang II (Nagano e cols, 1992). Desta forma, além da utilização de antagonistas do receptor  $\beta$ -adrenérgico, a administração de antagonistas do sistema renina-angiotensina como inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1 tem mostrado exercer efeitos cardioprotetores nestas condições (Basso e cols, 1995).

A hipertrofia cardíaca causada pela administração crônica de isoproterenol é um modelo experimental clássico de hipertrofia patológica, cujo aumento da Massa ventricular é seguido por um aumento de necrose e fibrose cardíaca (Benjamin e cols, 1989). Estes estudos mostram que a infusão crônica de isoproterenol em doses que variam entre 0,125 a 5  $\mu$ g/dia durante 7 dias em ratos resulta em um aumento marcante na relação do peso do coração e Massa corporal, necrose e fibrose. Os estudos de Allard e cols, (1990) mostraram que ratos submetidos ao tratamento crônico com isoproterenol desenvolveram uma hipertrofia cardíaca de cerca de 20% com aumento de até 7% do colágeno intersticial no miocárdio.

Vários estudos mostram que o sistema renina-angiotensina participa de forma importante no remodelamento cardíaco patológico ( Dzau, 1993; Parmley, 1998; Bader e cols, 2001; Ruiz-Ortega e cols, 2001), entretanto, poucos estudos têm investigado as possíveis alterações na expressão de receptores e peptídeos circulantes após o tratamento crônico com isoproterenol. Diferente da hipertrofia cardíaca fisiológica onde ocorre o crescimento do miócito cardíaco com a inserção de sarcômeros em série e poucas alterações da matrix intersticial, a hipertrofia cardíaca patológica é caracterizada pelo crescimento do miócito cardíaco com inserção de sarcômeros em paralelo e proliferação da matrix intersticial seguida de fibrose que, em conjunto, levam à disfunção sistólica e diastólica (Schaper , 1998; Burlew & Weber , 2000).

Estudos recentes mostraram que a Ang-(1-7) tem efeito anti-fibrótico (Iwata e cols, 2005) e, também, inibe o crescimento de cardiomiócitos (Tallant e cols, 2005) via receptor Mas. Em adição, estudos de Santos e cols, (2004) mostraram que em uma linhagem de ratos que apresentam aumento da expressão de Ang-(1-7) no plasma tiveram maior resistência em desenvolver hipertrofia cardíaca e menor fibrose após tratamento com isoproterenol (2 µg/dia durante 7 dias). Entretanto, ainda não está estabelecido se a expressão do receptor Mas está alterada após o tratamento crônico com isoproterenol.

Desta forma, este trabalho justifica-se no fato de que apenas recentemente tem sido realizado trabalhos que buscam identificar a presença do receptor Mas em diferentes tipos celulares cardíacos, como o miócito ventricular e o fibroblasto. Além disso, o presente trabalho tem como objetivo verificar as possíveis alterações da expressão do receptor Mas nas diferentes câmaras cardíacas e em resposta a diferentes condições fisiológicas e patológicas. Dentre estas foram avaliadas a expressão do receptor Mas no coração de ratos em diferentes idades e na hipertrofia cardíaca desencadeada pelo treinamento físico e pela administração de isoproterenol.

## **2. Objetivos**

### *2.1-Objetivo geral*

Verificar a presença e comparar a expressão do receptor Mas no tecido cardíaco de ratos em diferentes condições fisiológicas e patológicas.

### *2.2-Objetivos específicos*

- Identificar a expressão do receptor Mas no cardiomiócito de ratos adultos
- Quantificar a expressão do receptor Mas no cardiomiócito de ratos em diferentes idades
- Avaliar as alterações da expressão do receptor Mas no tecido cardíaco e nas câmaras cardíacas de ratos em diferentes idades
- Investigar as alterações da expressão do receptor Mas em um modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica (treinamento físico aeróbio) e patológica (tratamento com isoproterenol) no ventrículo esquerdo de ratos Wistar.

### **3. Material e métodos**

#### **- Animais**

Para a identificação do receptor Mas no cardiomiócito foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade. Para caracterização do receptor Mas no cardiomiócito foram utilizados ratos Wistar de diferentes idades (21 dias, 3 meses e 12 meses).

Para analisar as alterações da expressão do receptor Mas no coração e nas diferentes câmaras cardíacas com o envelhecimento foram utilizados ratos Wistar machos de diferentes idades (neonatos, 7 dias, 21 dias, 3 meses, 12 meses e 18 meses) .

Para analisar as alterações da expressão do receptor Mas no coração em resposta ao treinamento físico e ao tratamento crônico com isoproterenol foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade.

#### **- Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares**

Para a obtenção dos cardiomiócitos foi utilizado o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido como descrito por Mitra R. & Morad M. (1985). Os cardiomiócitos isolados podiam ser utilizados em experimentos por um prazo de até 6 horas após o isolamento.

#### **- Treinamento Físico**

#### **- Determinação da intensidade do exercício**

Este estudo consistiu de um protocolo de carga progressiva até exaustão para determinar a intensidade do exercício. Os ratos tiveram um período adaptativo

ao meio aquático de quatro dias durante quinze minutos por dia sem sobrecarga.

Antes da realização do teste os ratos foram pesados para que, a partir da Massa corporal total dos mesmos fossem confeccionadas sobrecargas relativas a 2% da Massa corporal.

O teste foi realizado individualmente, na mesma raia, com água na temperatura de  $31^{\circ} \text{C} \pm 1$  considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do animal (Azevedo e cols, 2003). A partir do momento em que o rato, com uma sobrecarga de 2% afixada na cauda, foi lançado na água, disparou-se o cronômetro. O teste foi de caráter contínuo, pois não havia necessidade de retirar o animal da água quando era implementada uma sobrecarga equivalente a 2% da Massa corporal do animal a cada três minutos (tabela 1), até a exaustão. O estado de exaustão foi caracterizada pela imersão do mesmo por 4 segundos não conseguindo retornar à superfície.

Tabela 1: Relação entre duração (min) e sobrecarga (%) no teste de carga progressiva.

Duração (min)	Sobrecarga (%)
0' – 3'	2
3' – 6'	4
6' – 9'	6
9' – 12'	8
12' – 15'	10
15' – 18'	12
Até exaustão	x

A cada 3 minutos do teste adiciona-se uma sobrecarga de 2% na cauda do animal até, o mesmo entrar em exaustão. min. = minutos.

## - Protocolo de treinamento físico

A figura 2 mostra de forma ilustrativa como foram realizadas as dez semanas de treinamento físico. Os ratos foram submetidos a diferentes tempos e intensidades de treinamento, durante as dez semanas do experimento. Os mesmos eram pesados no início de cada semana, às segundas-feiras pela manhã, antes de iniciarem o exercício (pesagem extra de cada animal foi realizada nos dias dos testes, quando a mesma não era realizada no dia de semana). Os animais treinaram de segunda à sexta-feira no período da manhã. Objetivando evitar qualquer diferença em relação à natação dos animais na piscina, alteraram-se as raias a cada dia de treinamento e, para minimizar a influência do estresse no resultado, todos os grupos foram transportados diariamente ao local da realização do treinamento. Foram realizados testes de exaustão, considerados como dia de treinamento. Após a primeira semana (quatro dias de adaptação e um teste de carga máxima no quinto dia) os animais descansaram 72 horas e, na segunda semana, foi iniciado o protocolo de treinamento físico propriamente dito. Nessa semana os animais se exercitaram 5 dias, 40 minutos a 50% da carga máxima (CM). Na terceira semana o protocolo foi repetido com um acréscimo de 20 minutos no tempo de exercício. Na 4ª semana os animais exercitaram 5 dias, 40 minutos a 60% da CM. Na 5ª semana o protocolo foi repetido porém a 70% da CM. Na 6ª e 7ª semanas os animais se exercitaram 5 dias, 40 minutos, a 80% da CM. Na 8ª, 9ª e 10ª semanas os animais se exercitaram 5 dias, 60 minutos, a 80% da CM. Após 72 horas foi realizado um novo teste de carga máxima.

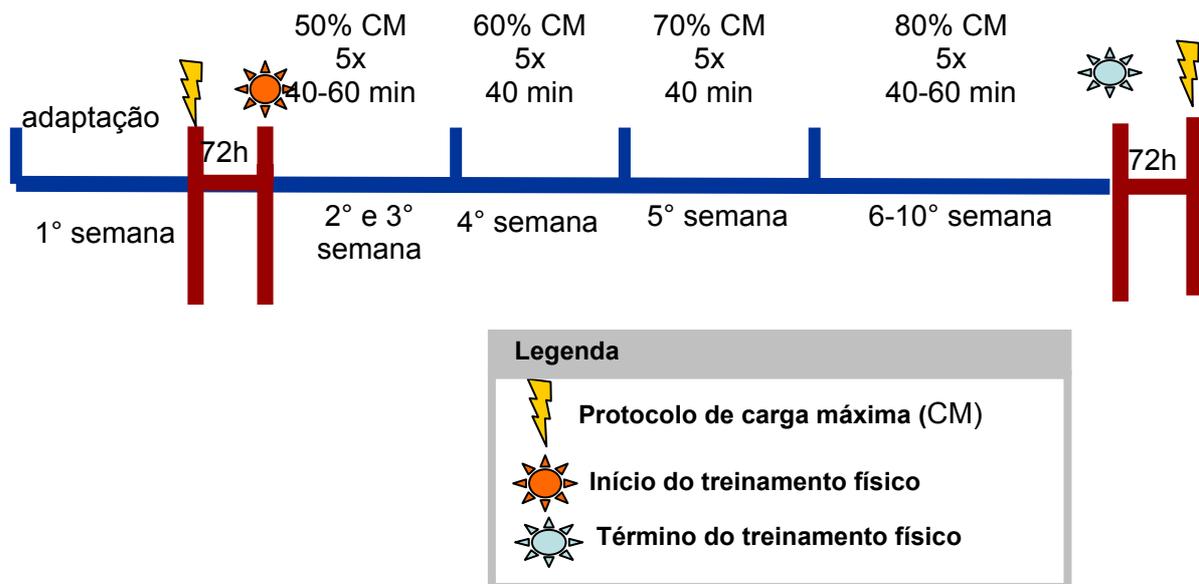


Figura 2- Esquema ilustrativo do protocolo de dez semanas do treinamento físico.

#### - Tratamento com isoproterenol

Os animais foram tratados com isoproterenol (2 mg/Kg/dia durante 7 dias, com administração subcutânea) ou placebo (salina) e sacrificados no dia seguinte da última aplicação. O coração foi retirado, pesado e as câmaras cardíacas foram separadas. O ventrículo esquerdo foi utilizado para extração de proteínas.

#### - Western Blotting

As células cardíacas ou o coração isolado foram homogeneizadas em tampão de lise (50mM pirofosfato de sódio, 50mM NaF, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM HEPES pH=7.4, 0.5 % Triton 100, 1:100 de 100mM PMSF em isopropanol, 1:1000 de 1mg/mL leupeptina, 1:1000 de 1mg/mL aprotinina). As proteínas foram quantificadas e diluídas (5µg/mL) em tampão de amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfato-poliacrilamida) em concentração de 7-10%,

dependendo da Massa molecular da proteína estudada, e 4% o gel de concentração. Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (PBS-Tween com 5% de leite desnatado) afim de bloquear ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, por 2 horas a temperatura ambiente, com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-Mas (1:1000), anti- $\beta$ -actina (1:10000, Sigma) e anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS contendo 0.2% de Tween 20 (PBS-T, 15 minutos por quatro vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:2000, Sigma). As membranas foram novamente lavadas em PBS-T (15 minutos por quatro vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus – Amersham Biotechnology) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant <sup>TM</sup>.

#### - Imunofluorescência

As células foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% (em PBS) durante 15 minutos, permeabilizadas e lavadas com solução de bloqueio (saponina 5 mg/ml BSA 5% em PBS) por 1 hora e, em seguida, incubadas com anticorpo primário (1:25) anti-Mas durante 24 horas a 4°C. As células foram então lavadas 4 vezes durante 15 minutos com solução de bloqueio e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 594 durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após este período as células foram lavadas 4 vezes durante 15 minutos com solução de bloqueio. Em seguida as células foram montadas em lâminas com Anti-Fade (Molecular Probes) e recobertas com lamínulas.

#### - Análise das Imagens

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal com filtros específicos de excitação e emissão para cada composto fluorescente utilizado através de um Microscópio Confocal Zeiss 510 Meta.

#### - Anticorpo Anti-Receptor Mas

O anticorpo Anti-Receptor Mas foi produzido em camundongo knockout para o receptor Mas utilizando como antígeno uma sequência de 12 aminoácidos correspondentes ao domínio N-terminal da proteína MAS. Esta sequência tem 100% de homologia em camundongo e 91,6% de homologia em rato e é específica para o receptor Mas. Camundongos knockout para o receptor Mas foram submetidos a 3 injeções do antígeno em um intervalo de 15 dias entre as aplicações. Imediatamente após a 3<sup>a</sup> injeção a titulação do anticorpo foi determinada pelo método de Elisa. Em seguida, os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com tumor de Ehrlich. Após 3 a 5 dias o líquido peritoneal foi removido, centrifugado e a titulação do anticorpo foi determinada no sobrenadante por Elisa. Este anticorpo foi utilizado recentemente em um estudo no qual um anticorpo comercial (Mas Anti-humano) foi utilizado como controle positivo (Sampaio e cols, 2007).

#### - Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Os testes realizados foram t de Student ou Anova seguido do teste de Bonferroni. A significância foi estabelecida para um  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1-Expressão do receptor Mas no cardiomiócito

Com o objetivo de identificar a presença do receptor Mas no cardiomiócito de ratos adultos, as células foram isoladas e lisadas para a extração de proteínas a serem utilizadas no western blot. Os resultados de western blot mostram que o receptor Mas está presente no cardiomiócito de ratos wistar de 3 meses (fig. 3). Como controle positivo foram utilizadas amostras do testículo.

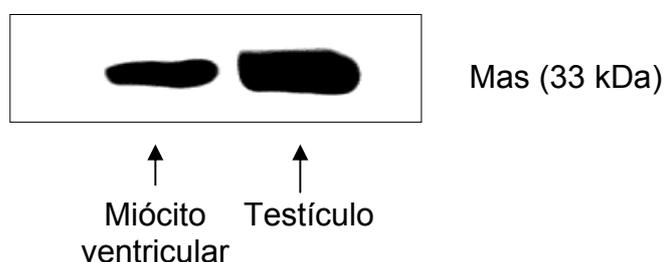


Figura 3- Expressão do receptor Mas no cardiomiócito de rato Wistar (3 meses). Amostra de testículo extraída do mesmo animal foi utilizada como controle positivo.

Além disso, foram utilizadas as técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal para identificar a localização do receptor Mas no cardiomiócito isolado de ratos de 21 dias, 3 meses e 12 meses (figura 4). Os resultados a seguir mostram que o receptor Mas está localizado principalmente no sarcolema do cardiomiócito. Pode se verificar que a expressão deste receptor parece estar diminuída no cardiomiócito de ratos neonatos, aumentando com o envelhecimento.

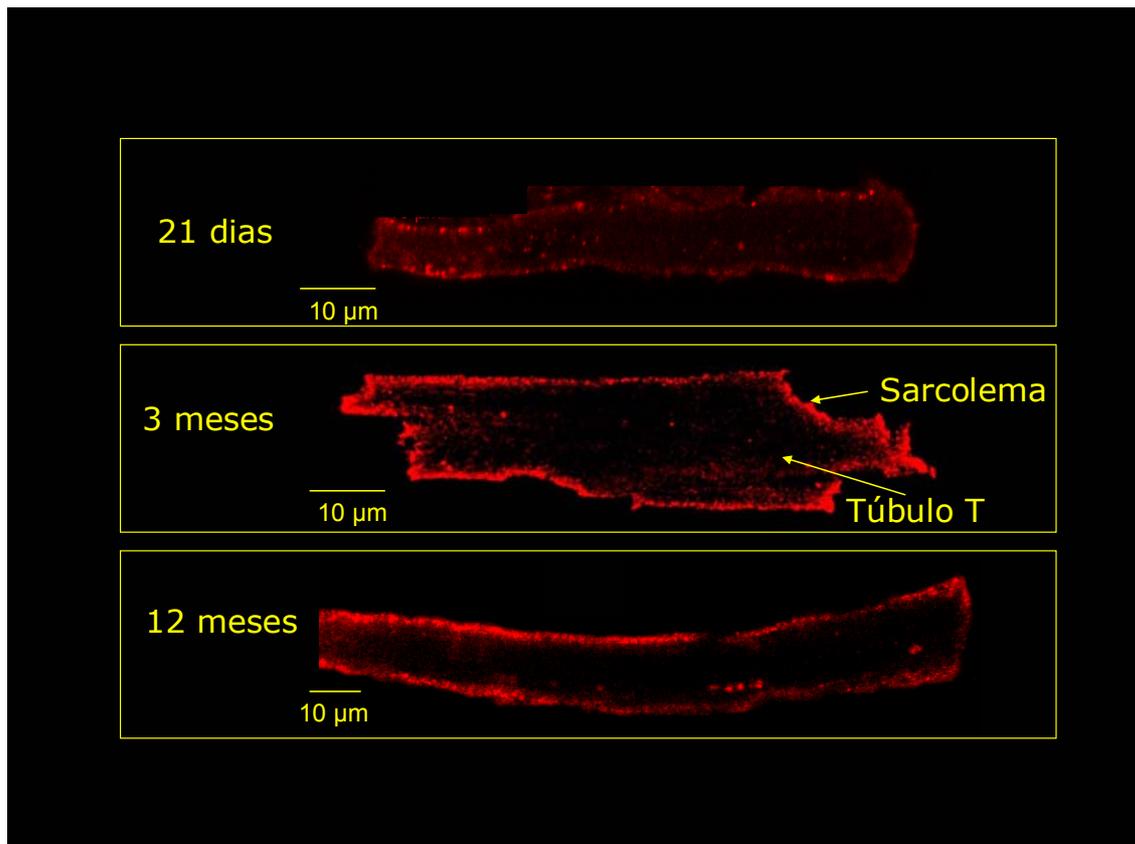


Figura 4- Imunolocalização do receptor Mas no miócito ventricular isolado de ratos Wistar de 21 dias, 3 meses e 12 meses. O receptor Mas foi encontrado principalmente na superfície do sarcolema, com pouca ou nenhuma expressão no túbulo T.

Para validar a especificidade do resultado apresentado na fig. 4 foi realizada a incubação das células com apenas o anticorpo secundário (controle negativo). Os resultados mostram que quando as células foram incubadas apenas com o anticorpo secundário a marcação era muito fraca ou ausente, confirmando assim a especificidade dos anticorpos utilizados (fig. 5).

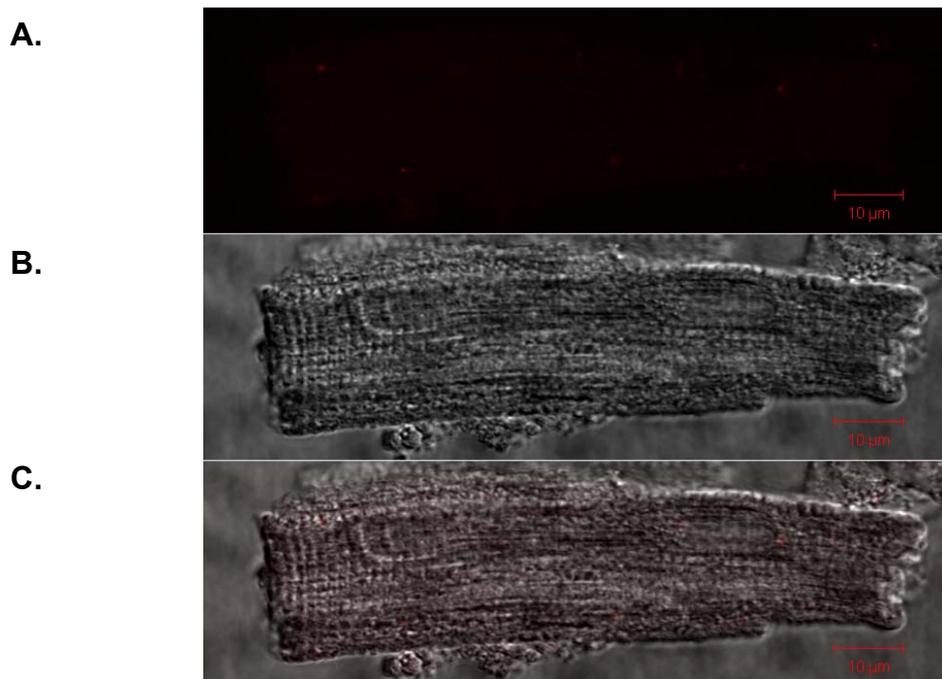
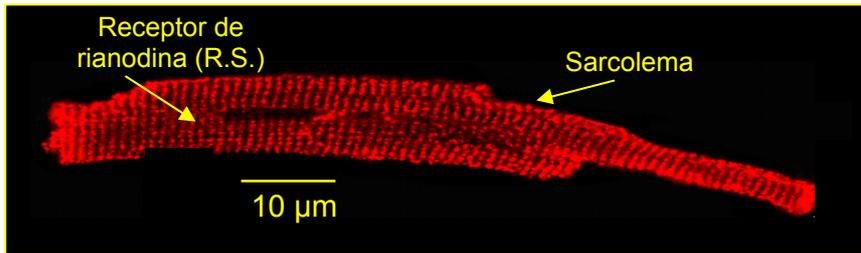


Figura 5- Controle negativo. **A.** A incubação dos cardiomiócitos apenas com anticorpo secundário mostra a pouca ou nenhuma reatividade inespecífica deste anticorpo. **B.** Imagem da célula cardíaca obtida através da luz transmitida. **C.** Sobreposição das imagens obtidas em **A.** e **B.**

Também foi realizada incubação das células com anticorpo anti-receptor de rianodina, um receptor encontrado no interior da célula, mais especificamente no retículo sarcoplasmático, e anti-canal de cálcio tipo L, localizado no túbulo T cardíaco, para ter a garantia de que a solução com os anticorpos primário e secundário estava penetrando no citoplasma da célula. Os resultados com anticorpo anti-receptor de rianodina e anti-canal de cálcio tipo L mostram sua localização no retículo sarcoplasmático e túbulos T, respectivamente, confirmando a eficácia do protocolo de permeabilização celular utilizado (figura 6).

**A.**



**B.**

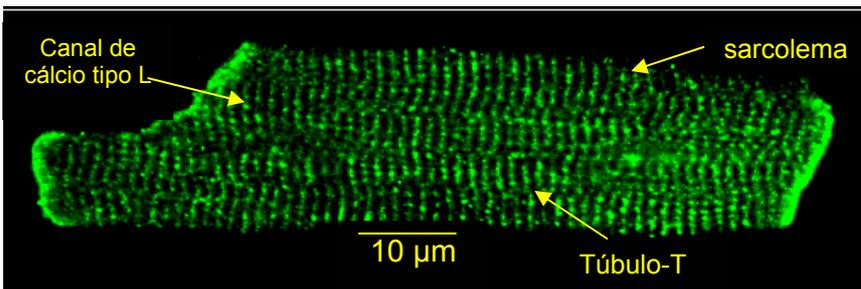


Figura 6- Localização do receptor de rianodina no retículo sarcoplasmático (**A**) e do canal de cálcio tipo L (**B**) no túbulo-T/sarcolema de cardiomiócito de rato adulto com 3 meses de idade.

#### 4.2-Expressão do receptor Mas no coração de ratos em diferentes idades

Conforme mencionado anteriormente, a expressão do receptor parece estar aumentada na célula cardíaca com o envelhecimento. Portanto, com objetivo de verificar se esse aumento da expressão do receptor Mas com o envelhecimento ocorreria em todo o tecido cardíaco, foram extraídas amostras de tecido cardíaco de ratos em diferentes idades. Os resultados obtidos a partir da técnica de western blot mostram a expressão do receptor Mas no coração de ratos Wistar em diferentes idades. A figura 7 mostra que com o envelhecimento a expressão do receptor Mas no coração aumenta progressivamente alcançando um platô na fase adulta (3, 12 e 18 meses), sendo maior no coração dos ratos de 3, 12 e 18 meses quando comparado com ratos recém-nascido, de 7 dias e 21 dias de idade.

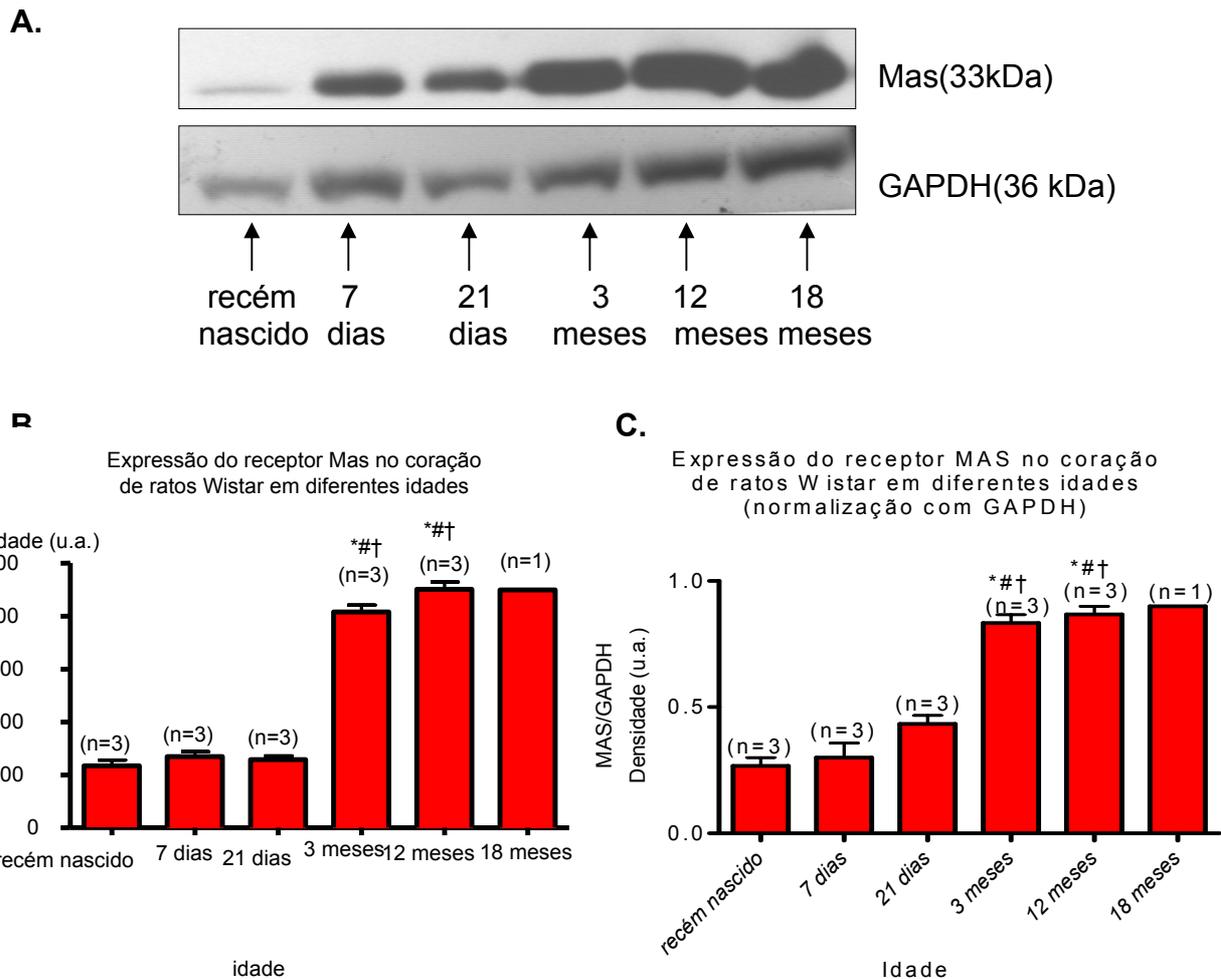


Figura 7- Expressão do receptor Mas no coração de ratos Wistar em diferentes idades. **A.** Western blot representativo de 3 experimentos independentes (Mas e GAPDH). **B.** O gráfico de barras mostra que a expressão proteica do receptor Mas aumenta com o envelhecimento no coração. n = número de amostras. \*  $P < 0.05$  - 3 e 12 meses vs recém-nascido. #  $P < 0.05$  - 3 e 12 meses vs 7 dias. †  $P < 0.05$  - 3, 12 meses vs 21 dias. **C.** O gráfico de barras mostra a expressão do receptor Mas no coração após a normalização com GAPDH, confirmando os resultados apresentados em **B.** (u.a. = unidades arbitrárias).

#### 4.2-Expressão do receptor Mas nas diferentes câmaras cardíacas

Para verificar se o aumento da expressão do receptor Mas no coração com o envelhecimento reflete uma alteração na expressão deste receptor nas diferentes câmaras cardíacas foi realizada a separação dos átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo de animais nas diferentes idades (21 dias, 3, 12 e 18 meses). A figura 8 mostra que a expressão do receptor Mas foi similar entre

as diferentes câmaras cardíacas, sendo este resultado semelhante para todas as idades (Figuras 8-11). Portanto, esses resultados mostram que o aumento da expressão do receptor Mas no coração com o envelhecimento não reflete um aumento de sua expressão em uma câmara cardíaca específica.

### Câmaras cardíacas de ratos Wistar de 21 dias

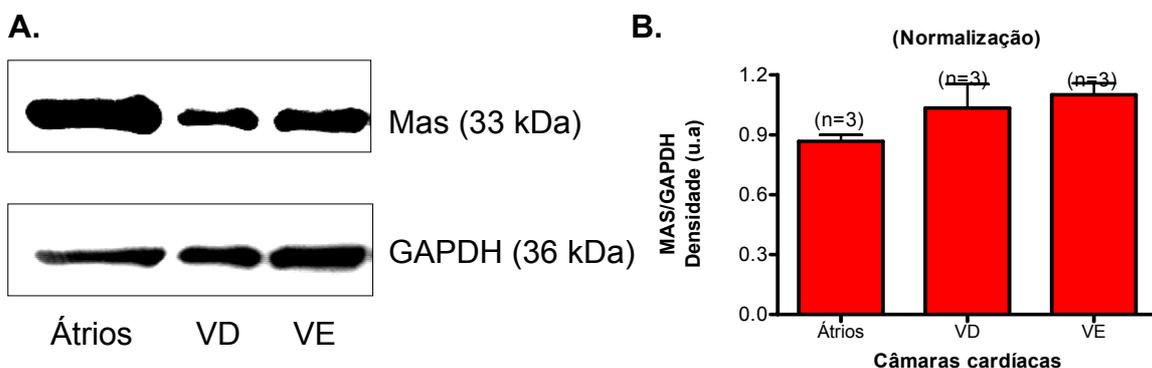


Figura 8- Expressão do receptor Mas nas câmaras cardíacas de ratos Wistar de 21 dias. **A.** Western blot representativo de 3 experimentos independentes. **B.** O gráfico de barras mostra que a expressão proteica do receptor Mas é semelhante nas diferentes câmaras cardíacas. n = número de amostras. u.a.= unidades arbitrárias.

### Câmaras cardíacas de ratos Wistar de 3 meses

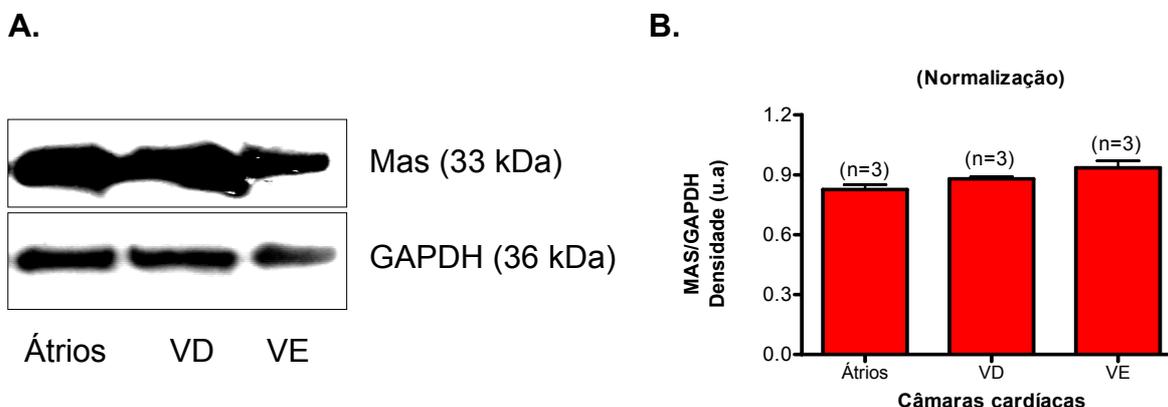


Figura 9- Expressão do receptor Mas nas câmaras cardíacas de ratos Wistar de 3 meses. **A.** Western blot representativo de 3 experimentos independentes. **B.** O gráfico de barras mostra que a expressão proteica do receptor Mas é semelhante nas diferentes câmaras cardíacas. n = número de amostras.

### Câmaras cardíacas de ratos Wistar de 12 meses

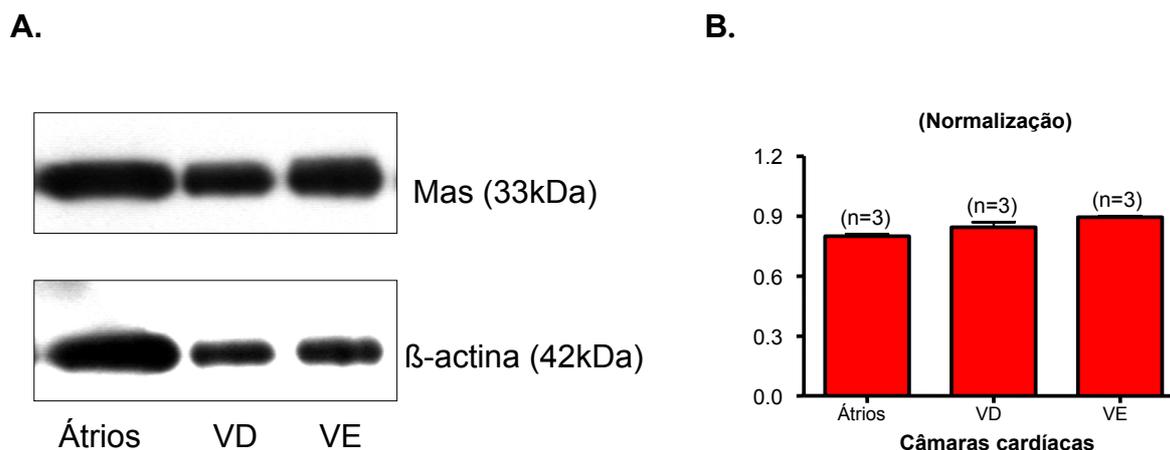


Figura 10- Expressão do receptor Mas nas câmaras cardíacas de ratos Wistar de 12 meses **A.** Western blot representativo de 3 experimentos independentes. **B.** O gráfico de barras mostra que a expressão proteica do receptor Mas é semelhante nas diferentes câmaras cardíacas. n = número de amostras.

### Câmaras cardíacas de ratos Wistar de 18 meses

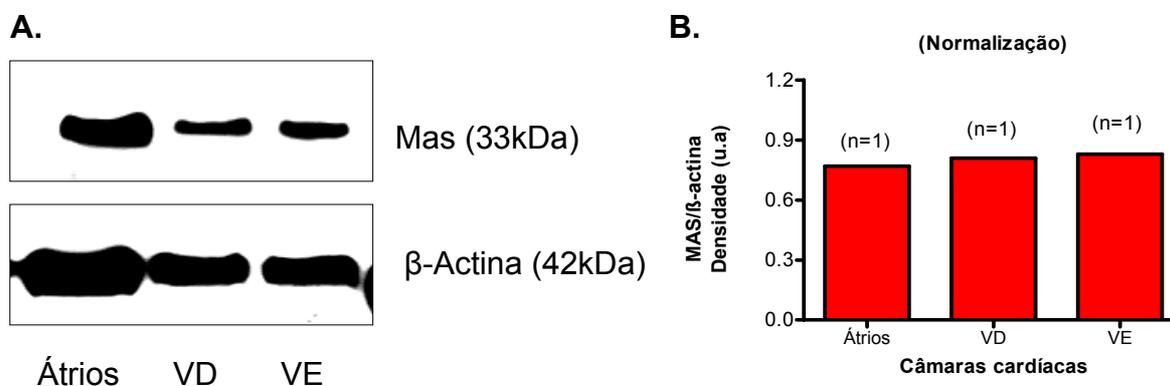


Figura 11- Expressão do receptor Mas nas câmaras cardíacas de rato Wistar de 18 meses **A.** Western blot representativo de 1 experimento **B.** O gráfico de barras mostra que a expressão proteica do receptor Mas é semelhante nas diferentes câmaras cardíacas. n = número de amostras.

Com o intuito de verificar as possíveis alterações da expressão do receptor Mas em outros modelos de remodelamento cardíaco, utilizando-se ratos Wistar, foram realizados protocolos de indução de hipertrofia cardíaca fisiológica, através do treinamento físico aeróbio, e hipertrofia cardíaca patológica, através

da administração crônica de isoproterenol. Para isso a expressão do receptor Mas foi analisada apenas no ventrículo esquerdo, pois esta é a principal câmara onde ocorrem as alterações anatomo-funcionais nestes modelos experimentais.

#### 4.4- Expressão do receptor Mas no coração após o treinamento físico

A tabela 2 mostra que os ratos Wistar submetidos ao treinamento físico não apresentaram diferenças significativas no peso corporal e no peso do coração em relação aos ratos Wistar não treinados, entretanto quando foi feita a relação entre o peso do coração em miligramas (mg) pelo peso corporal em gramas (gr) foi demonstrado que os animais treinados apresentaram hipertrofia cardíaca significativa.

Tabela 2- Peso corporal em gramas – Pc (gr); Peso do coração em gramas - Coração (gr) e relação entre o peso do coração em miligramas e o peso corporal em gramas – Coração (mg) / Pc (gr) em ratos não treinados e treinados. \* p < 0,05.

	<b>Sedentário</b>	<b>Treinados</b>
Pc (gr)	444,5 ± 5,44 (4)	408,3± 12,74 (6)
Coração (gr)	1,53 ± 0,02 (4)	1,56 ± 0,03 (6)
Coração / Pc (mg/gr)	3,41± 0,02 (4)	3,84 ± 0,10* (6)

A figura 12 mostra que os ratos Wistar submetidos ao treinamento físico desenvolveram hipertrofia cardíaca de cerca de 12 %.

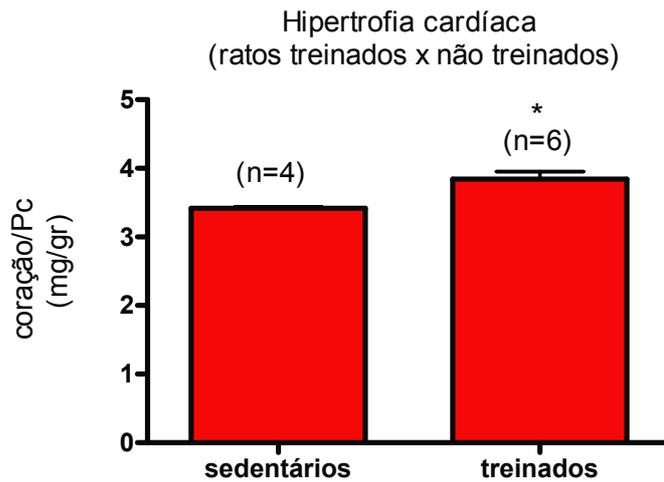


Figura 12- Relação entre o peso do coração em miligramas (mg) pelo peso corporal (Pc) em gramas (gr) de ratos sedentários e treinados submetidos ao treinamento aeróbio (Wistar T). \*  $p < 0,05$ .

Em adição, a figura 13 mostra que os ratos Wistar submetidos ao treinamento físico aumentaram em cerca de 87% o tempo atingido no teste de carga máxima sugerindo assim a eficiência do método de treinamento físico utilizado para induzir hipertrofia cardíaca fisiológica e melhora da capacidade aeróbia .

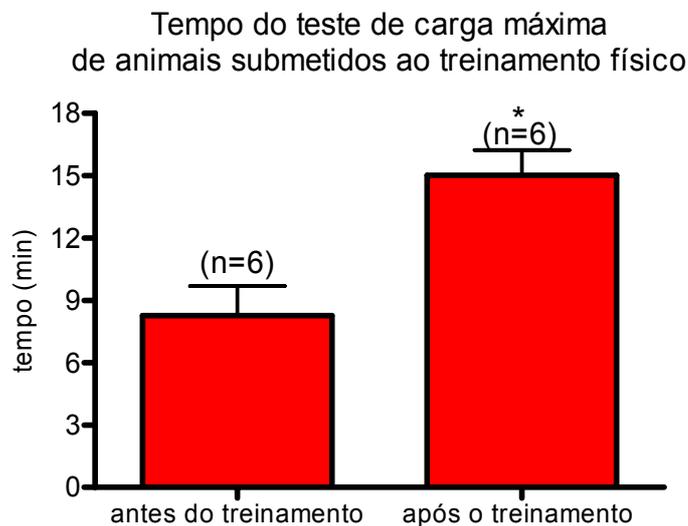


Figura 13- Tempo total atingido no teste de carga máxima antes e após o protocolo de treinamento físico. \*  $p < 0,05$ .

A figura 14 mostra que expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo não é diferente entre ratos não treinados e treinados.

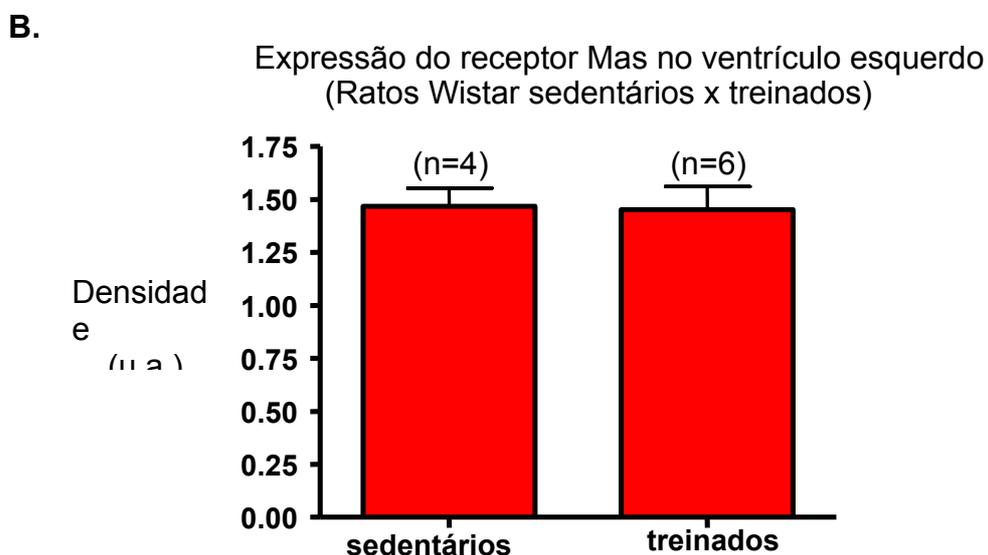
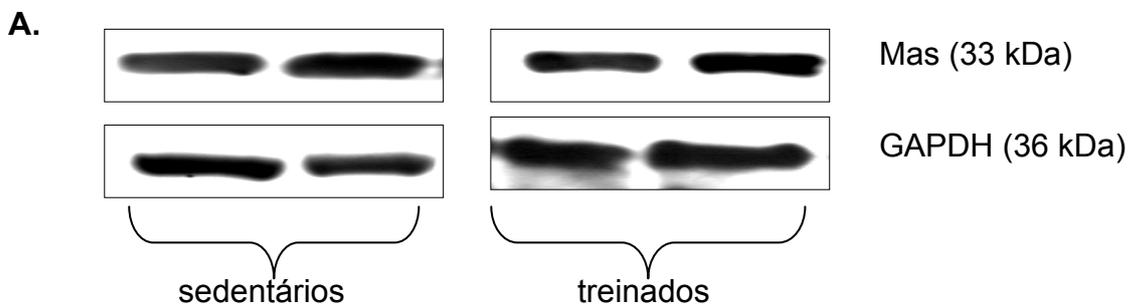


Figura 14- Expressão do receptor Mas no coração de ratos Wistar não treinados e treinados. **A.** Western blot representativo de 3 experimentos independentes (MAS e GAPDH). **B.** O gráfico de barras mostra a expressão protéica do receptor Mas após a normalização com GAPDH (u.a. = unidades arbitrárias).

#### 4.5- Expressão do receptor Mas no coração de ratos tratados com isoproterenol

A tabela 3 mostra que os ratos Wistar submetidos ao tratamento de 7 dias com isoproterenol (Wistar iso) apresentaram aumento significativo no peso corporal, peso do coração e na relação entre o peso do coração em miligramas (mg)

pelo peso corporal em gramas (gr), quando comparado a ratos Wistar tratados com salina (controle).

Tabela 3- Peso corporal em gramas – Pc (gr); Peso do coração em gramas - Coração (gr) e relação entre o peso do coração em miligramas e o peso corporal em gramas – Coração (mg) / Pc (gr) em ratos Wistar tratados com salina e isoproterenol. \*  $p < 0,05$ .

	controle	tratados com isoproterenol
Pc (gr)	336,5 ± 3,84 (4)	397,0 ± 4,26* (4)
Coração (gr)	1,19 ± 0,06 (4)	1,74 ± 0,05* (4)
Coração /pc (mg/gr)	3,55 ± 0,17 (4)	4,40 ± 0,10* (4)

A figura 15 mostra que os ratos Wistar submetidos ao tratamento de 7 dias com isoproterenol desenvolveram hipertrofia cardíaca significativa de aproximadamente 23%.

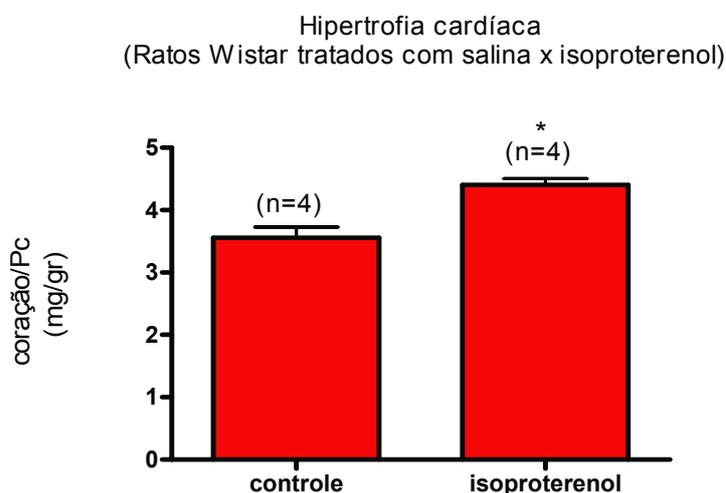
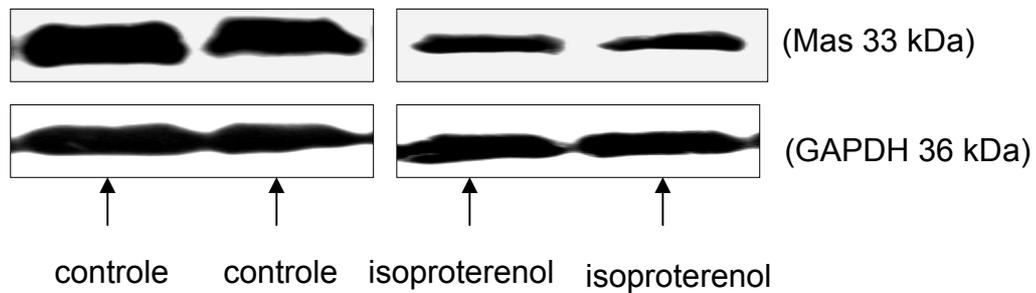


Figura 15- Relação entre o peso do coração em miligramas (mg) pelo peso corporal (Pc) em gramas (gr) de ratos Wistar tratados com salina e ratos Wistar submetidos ao tratamento com isoproterenol. \*  $p < 0,05$ .

A figura 16 mostra que expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo é menor em ratos Wistar tratados com isoproterenol, quando comparada a ratos Wistar tratados com salina (controle).

**A.**



**B.**

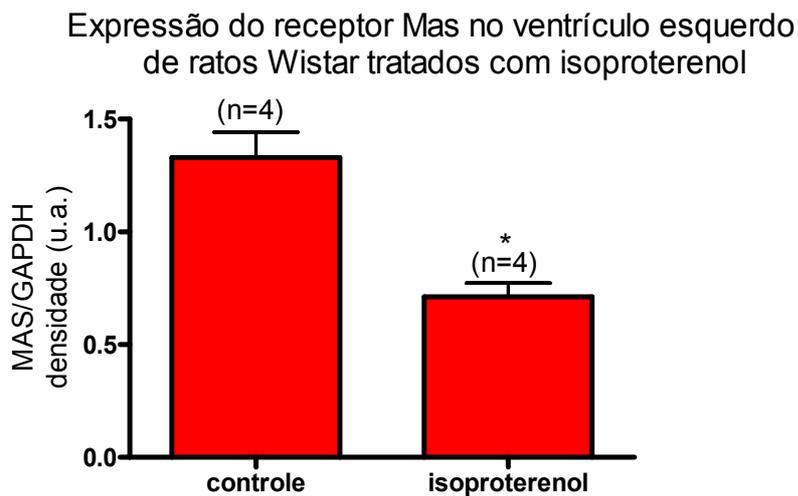


Figura 16- Expressão do receptor Mas no coração de ratos Wistar tratados com salina e tratados com isoproterenol. **A.** Western blot representativo. (Mas e GAPDH). **B.** O gráfico de barras mostra a expressão proteica do receptor Mas após a normalização com GAPDH (u.a. = unidades arbitrárias). n = número de amostras. \* P < 0,05.

## 5-Discussão

### *5.1-Receptor Mas no miócito e no tecido cardíaco de ratos em diferentes idades*

O presente trabalho mostra a presença e localização do receptor Mas no cardiomiócito de ratos em diferentes idades. Como mostrado anteriormente, a maior reatividade da Ang-(1-7) em cardiomiócitos após o infarto do miocárdio, torna essas células alvo de estudos da expressão do receptor Mas. Os estudos de Tallant e cols, (2005) identificaram, através da técnica de western blot, a presença do receptor Mas no miócito ventricular de ratos neonatos e mostraram que o efeito anti-hipertrófico da Ang-(1-7) é mediado pelo receptor Mas. Em adição, os estudos de Tallant e cols, (2005) mostraram pela técnica de imunofluorescência a presença do receptor Mas principalmente na membrana celular de ratos neonatos. O presente estudo, portanto, confirma e amplia esses dados, mostrando que o receptor Mas está localizado preferencialmente na superfície do sarcolema, com nenhuma ou muito pouca expressão no túbulo-T de cardiomiócitos em ratos de idades variadas de 21 dias, 3 meses e 12 meses

Um importante achado deste estudo foi a identificação de um aumento da expressão do receptor Mas no coração com o envelhecimento. De modo semelhante, estudos de Alenina e cols, (2002) mostraram que no testículo a expressão do receptor MAS foi detectada em camundongo de 18 dias e apresentou um aumento contínuo até os 6 meses e, a partir desta idade, a expressão do receptor Mas não se alterou. Esse padrão de comportamento da expressão do receptor Mas com o envelhecimento parece ser semelhante para o tecido cardíaco. Além disso, nossos resultados mostram que, em diferentes idades, a expressão do receptor Mas é semelhante entre as câmaras cardíacas (átrios, ventrículo direito e esquerdo). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que em todas as idades estudadas foi observada uma tendência do ventrículo esquerdo em apresentar uma maior expressão do receptor Mas, no entanto, esta não foi significativa. Paralelamente, os estudos de Heymes e cols, (1998) mostraram que o envelhecimento é marcado por um aumento da expressão do receptor AT1 no coração, particularmente no ventrículo esquerdo.

Uma das principais hipóteses sugeridas para explicar o aumento da expressão do receptor AT1 no coração de animais senis é o aumento do estresse mecânico que ocorre normalmente com o envelhecimento no coração (Heymes e cols, 1998). De modo semelhante, a maior expressão do receptor Mas no coração de animais adultos e senis também pode ser uma resposta adaptativa a este stress.

O aumento da expressão do receptor Mas no coração com o avanço da idade pode representar uma resposta compensatória aos danos teciduais cardíacos que ocorrem com a senescência. Estas alterações podem fazer parte de um mecanismo molecular contrarregulatório de proteção ao aumento da expressão do receptor AT1 no coração durante o remodelamento cardíaco que ocorre com a senilidade. Entretanto, é necessário ressaltar que a alteração da expressão desses receptores no miocárdio pode ser um reflexo da alteração dos constituintes celulares no coração. No coração senil ocorre uma preponderância do número de fibroblastos em relação ao número de cardiomiócitos e um aumento da vascularização para o miocárdio (Lakatta, 1993). Desta forma, uma maior densidade do receptor Mas no fibroblasto e nas coronárias pode refletir a maior expressão deste receptor no coração com o envelhecimento. Experimentos futuros serão necessários para analisar o comportamento da expressão do receptor Mas durante o envelhecimento nos principais tipos celulares cardíacos (os cardiomiócitos, os fibroblastos e as coronárias).

Outro ponto que deve ser investigado é a interação dos peptídeos e receptores do sistema renina-angiotensina com outros sistemas fisiológicos como o sistema calicreína-cininas. Estudos recentes de Kintsurashvili, (2005) mostraram que, com o envelhecimento, ocorre uma inversão da expressão do receptor B2 (que diminui) e B1 (que aumenta) no coração e sugerem que, com a senilidade, o receptor B1 assumiria as funções do receptor B2 no coração. Dessa forma, um aumento da expressão do receptor Mas e B1 no coração com o envelhecimento podem, em conjunto, representar um mecanismo de proteção do miocárdio em resposta ao aumento da expressão do receptor AT1 e redução da expressão do receptor B2. Desta forma, o entendimento do balanço entre a expressão dos receptores dos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas pode ser uma ferramenta útil no estudo do remodelamento cardíaco que ocorre com a senilidade.

## *5.2-Alteração do Receptor Mas na hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica*

Os resultados do presente estudo mostraram que tanto o treinamento físico aeróbio como a administração crônica de isoproterenol em ratos Wistar promoveram um aumento significativo da relação entre o peso do coração e peso corporal. Entretanto, quando a expressão do receptor Mas foi analisada nestes dois modelos de hipertrofia cardíaca, apenas no modelo de hipertrofia cardíaca patológica (animais tratados com isoproterenol) ocorreu alteração na expressão do receptor Mas no coração. Nossos resultados com treinamento físico corroboram com os achados de Gomes-Filho e cols, (2004) que mostraram que animais Wistar submetidos ao treinamento físico desenvolveram uma hipertrofia cardíaca significativa sem apresentar alteração na expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo. O fato mais importante a ser considerado neste ponto é a necessidade da realização de outros experimentos para verificar se a expressão do receptor Mas pode estar alterada com o treinamento físico em diferentes intensidades e duração.

Outro ponto importante a ser discutido é o fato de que nos estudos de Gomes-Filho e cols (2004), apesar dos ratos Wistar não terem apresentado alteração da expressão do receptor Mas no coração, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentaram um aumento significativo da expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo. Isto torna os estudos da expressão do receptor Mas no coração de extrema relevância, pois sugere que em condições patológicas alterações na expressão do receptor Mas no coração podem ser mais evidentes.

Baseado nestas evidências o presente estudo utilizou um modelo de hipertrofia cardíaca patológica com administração crônica de isoproterenol e os resultados mostraram que a expressão do receptor Mas está reduzida com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica.

A redução da expressão do receptor Mas na hipertrofia cardíaca desenvolvida pela administração de isoproterenol pode fazer parte de um complexo mecanismo que contribui para as alterações cardio-deletérias que ocorrem na

hipertrofia patológica, como redução na perfusão tecidual cardíaca, proliferação da matriz intersticial, fibrose, dentre outras.

Recentemente estudos de Santos e cols (2004) mostraram que a hipertrofia cardíaca desenvolvida durante o tratamento crônico com isoproterenol é atenuada em animais transgênicos que apresentam aumento de 2,5 vezes nas concentrações plasmáticas de Ang-(1-7), sugerindo um efeito anti-hipertrófico deste peptídeo nestas condições.

Em conjunto, estes dados sugerem que, diferente da hipertrofia cardíaca fisiológica desenvolvida pelo treinamento físico, a expressão do receptor Mas diminui em resposta a um modelo de hipertrofia cardíaca patológica. Desta forma, o comportamento da expressão do receptor Mas durante o remodelamento cardíaco parece dependente do tipo de estímulo responsável pelas alterações da estrutura cardíaca.

Enquanto o treinamento físico é marcado pelo aumento da vascularização do miocárdio e crescimento uniforme dos miócitos cardíacos (Schaible e cols, 1986), a administração crônica com isoproterenol é marcada pela necrose cardíaca e apoptose dos cardiomiócitos (Bristow e cols, 1982). Desta forma, é possível que o cardiomiócito represente um tipo celular importante, onde ocorre uma alta expressão do receptor Mas, tornando estas células alvo importante dos estudos da expressão deste receptor e suas vias de sinalização. Em adição enquanto o treinamento físico é marcado por uma redução do tônus simpático, especialmente na hipertensão (Negrão e cols, 1993), o remodelamento cardíaco promovido pelo tratamento com isoproterenol mimetiza uma condição de hiperatividade simpática (Kudej e cols, 1997). Portanto, também pode-se especular uma possível interação entre a atividade simpática e expressão do receptor Mas no coração, sendo que a hiperatividade simpática levaria a uma *down-regulation* do receptor Mas, enquanto a redução do tônus simpático observado com a atividade física contribuiria para uma *up-regulation* do receptor Mas.

## 6-Conclusão

Este estudo mostrou, em ratos Wistar de diferentes idades, que o receptor Mas, em ratos Wistar de diferentes idades, está presente no cardiomiócito de animais adultos localizando-se principalmente na membrana celular do cardiomiócito. Além disso, a expressão do receptor Mas no coração aumenta até a idade adulta (3 meses), mantendo-se inalterada com o envelhecimento (até 18 meses). Não foi observada diferença significativa na distribuição do Mas entre as diferentes câmaras cardíacas, independente da idade do animal. Interessantemente, a expressão do receptor Mas não foi alterada pelo treinamento físico, no entanto, diminuiu após o tratamento com isoproterenol. Esses resultados sugerem que a expressão do receptor Mas varia dependendo do estímulo (idade, exercício físico, isoproterenol) e tipo de hipertrofia cardíaca desenvolvida. Experimentos funcionais serão importantes no futuro, para determinar as consequências fisiológicas da alteração na expressão do receptor Mas em cada um dos modelos experimentais estudados. Além disso, a caracterização do(s) tipos celulares onde a alteração na expressão do receptor Mas está ocorrendo será muito importante. Três hipóteses são sugeridas para explicar a alteração da expressão do receptor Mas no coração: 1) alteração dos níveis teciduais das angiotensinas, especialmente a Ang-(1-7); 2) alterações morfológicas promovidas especificamente em um tipo celular específico e 3) a influência das alterações de outros sistemas que participam do controle da atividade cardíaca e que interagem com o sistema renina-angiotensina (ex: calicreína-cininas e sistema nervoso autônomo).

## 7-Referências

1. Abbas A, Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension*. 30(2 Pt 1):217-21, 1997.
2. Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, Walther T. Cell Type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem* 50:691–695, 2002.
3. Allard M, Devenny M, Doss L, Grizzle W, Bishop S. Alterations in dietary sodium affect iso-proterenol-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 22: 1135–1145, 1990.
4. Andreatta SH, Averill DB, Santos RA, Ferrario CM. The ventrolateral medulla. A new site of action of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1988 Feb;11(2 Pt 2):1163-6.
5. Assayag P, Charlemagne D, de Leiris J, Boucher F, Vale`re PE, Lortet S, Swynghedaw B, Besse S. Senescent heart compared with pressure overload- induced hypertrophy. *Hypertension* 29:15–21, 1997.
6. Averill DB, Ishiyama Y, Chappell MC, Ferrario CM. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 28;108(17):2141-6, 2003.
7. Azevedo L, Brum P, Mattos K, Junqueira C, Rondon M, Barreto A, Negrão C. Effects of losartan combined with exercise training in spontaneously hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (36): 1595-1603, 2003.
8. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue reninangiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 79: 76-102, 2001.

9. Basso N, Kurnjek ML, Ottaviano G, Ruiz P, Taquini CM, and Gallo AJ. Seven days infusion of norepinephrine. Effect of enalapril and losartan. *Hypertension* 25: 1374, 1995.
10. Benjamin I, Jalil J, Tan L, Cho K, Weber K Clark W. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 65: 657–670, 1989.
11. Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensin(1-7). *Peptides*. 14(4):679-84, 1993.
12. Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 269(1 Pt 2):H313-9, 1995.
13. Becker LK, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Cardiovascular effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the RVLM of trained normotensive rats. *Brain Res*. 8;1040(1-2):121-8, 2005.
14. Bono F, Mapelli A, Stoppani L. The action of synthetic hypertensin on the guinea pig heart under fluothane anesthesia. Experimental study. *Minerva Anesthesiol*. 28:105-10, 1962.
15. Braith RW, Welsch MA, Feigenbaum MS, Kluess HA, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J Am Coll Cardiol*.34:1170-1175, 1999.
16. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:809–820, 1994.

17. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, and Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307:205–211.
18. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 27(3 Pt 2):523– 8, 1996.
19. Busatto VC, Cunha V, Cicilini MA, Mill JG. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Mar;32(3):355-60.
20. Carre´ F, Lessard Y, Coumel P, Ollivier L, Besse S, Lecarpentier Y, Swynghedauw B. Spontaneous arrhythmias in various models of cardiac hypertrophy and senescence of rats: a Holter monitoring study. *Cardiovasc Res* 26:698–705, 1992.
21. Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 263(1 Pt 2):R89-94, 1992.
22. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79:1–6, 1987.
23. Campbell DJ. Renin-angiotensin system inhibition: how much is too much of a good thing? *Intern Med J*. 32(12):616-20, 2002.
24. Campbell DJ. The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(6):784– 91, 2003.
25. Cox RH, Hubbard JW, Lawler JE, Sanders BJ, Mitchell VP. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. *J Appl Physiol*. 58:1207-1214, 1985.

26. Crabos M, Roth M, Hahn AWA, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* 93:2372–2378, 1994.
27. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 417(6891):822–8, 2002.
28. Chappell MC, Iyer SN, Diz DI, Ferrario CM. Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 31(9):1205-12, 1998.
29. Chen JH, Nakayama M, Nevo E, et al. Coupled systolic ventricular and ventricular stiffening with age: Implications for pressure regulation and cardiac reserve in the elderly. *J Am Coll Cardiol*. 32: 1221-7, 1998.
30. Clark MA, Tallant EA, Diz DI. Downregulation of the AT1A receptor by pharmacologic concentrations of Angiotensin-(1–7). *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;37(4):437– 48.
31. Clausmeyer S, Reinecke A, Farrenkopf R, Unger T, Petres J. Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. *Endocrinology*. 141: 2963-2970, 1998.
32. Crabos M, Roth M, Hahn A, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* 93:2372–2378, 1994.
33. De Mello WC. Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. *Hypertension*. 27:1267–1272, 1996.

34. De Mello WC. Is an intracellular renin-angiotensin system involved in the control of cell communication in heart? *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:640–646, 1994.
35. De Mello WC. Intracellular Angiotensin II Regulates the Inward Calcium Current in Cardiac Myocytes. *Hypertension.* 32:976-982, 1998.
36. De Mello WC & Danser AH. Angiotensin II and the Heart On the Intracrine Renin-Angiotensin System. *Hypertension.* 2000;35:1183-1188.
37. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *87(5):E1–9*, 2000.
38. Dostal David E., Kenneth M. Baker. The Cardiac Renin-Angiotensin System Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? *Circulation Research.* 85:643-650, 1999.
39. Dzau, V.J. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch. Intern. Med.* 153: 937-942, 1993.
40. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol.* 12:R745–52, 2002.
41. Fagard R, Cattaert A, Lijnen P, Staessen J, Vanhees L, Moerman E, Amery A. Responses of the systemic circulation and of the renin-angiotensin-aldosterone system to ketanserin at rest and exercise in normal man. *Clin Sci (Lond).* 66(1):17-25, 1984.
42. Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. Role of PGI<sub>2</sub> and effects of ACE inhibition on the bradykinin

potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. Regul Pept. 15;127(1-3):183-9, 2005.

43. Ferrario CM, Santos RA, Brosnihan KB, Block CH, Schiavone MT, Khosla MC, Greene LJ. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. Clin Exp Hypertens A. 10 Suppl 1:107-21, 1988.

44. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). Hypertension. 30(3 Pt 2):535-41, 1997.

45. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. J Am Soc Nephrol. 9(9):1716-22, 1998.

46. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. Kidney Int. 68(5): 2189-2196. , 2005.

47. Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertension 38(Part 2):665- 8, 2001.

48. Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. Braz J Med Biol Res 2002;35:1083-90.

49. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild T, McCabe T. Nitric Oxide Synthase and NO Release Molecular Scaffold to Regulate Akt-Dependent Phosphorylation of Endothelial Domain Mapping Studies Reveal That the M Domain of hsp90 Serves as Nitric Oxide Synthase and NO Release Molecular Scaffold to Regulate Akt-Dependent Phosphorylation of Endothelial. Circ. Res. 90;866-873, 2002.

50. Gardin JM, Arnold AM, Bild DE, et al. Left ventricular diastolic filling in the elderly. The cardiovascular health study. *Am J Cardiol.* 82: 345-51, 1998.
51. Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R, Diez J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertensive heart disease? *J Mol CellCardiol.* 34(12): 1585-1593, 2002.
52. Gorelik G, Carhini L, Scicli A. Angiotensin 1–7 Induces Bradykinin-Mediated Relaxation in Porcine Coronary Artery. *JPET* 286:403–410, 1998.
53. Grady E, Sechi L, Griffin C, Schambelan M, Kalinyak J. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921–933 93:1592–1601, 1991.
54. Grimm D, Elsner D, Schunkert H, Pfeifer M, Griesse D, Bruckschlegel G, Muders F, Riegger GA, Kromer EP. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* Jan;37(1):91-100, 1998.
55. Grobe JL, Mecca AP, Mao H, Katovich MJ. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in the DOCA-salt model of hypertension. *Am J Physiol.* 2006; in press.
56. Hachamovitch R, Wicker P, Capasso JM, Anversa P. Alterations of coronary blood flow and reserve with aging in Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 256:H66–H73, 1989.
57. Hayashi A, Kobayashi A, Takahashi R, Suzuki F, Nakagawa T, Kimoto K. Effects of voluntary running exercise on blood pressure and renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).*46:165-170, 2000.

58. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. Jan;37(1):72-76, 2001.
59. Heymes C, Swynghedauw B, Chevalier B 1994 Activation of angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme gene expression in the left ventricle of senescent rats. *Circulation* 90:1328–1333.
60. Heymes C, Silvestre JS, Llorens-Cortes C, Chevalier B, Marotte F, Levy BI, Swynghedauw B, Samuel JL. Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology*. 139(5):2579-87, 1998.
61. Hoffmann S, Krause T, Pinto Y, Buikema H, Bohlender J, Inagami T, Ganten D, Urata H. Cardiac-specific expression of the human AT1 receptor in transgenic rats. *Hypertension*. 28:p76, 1996.
62. Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(6):H2356-63, 2005.
63. Kang N, Walther T, Tian X-L, Lippoldt A, Ganten D, Bader M. Local angiotensin synthesis is crucial in hypertension-induced end-organ damage. *Hypertension*. 34: 344, 1999.
64. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Sarota T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth cells. *J Hypertens*. 9:17–22, 1991.
65. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*. 101(10): 1130-1137, 2000.

66. Kintsurashvili E, Duka A, Ignjacev I, Pattakos G, Gavras I, and Gavras H. Age-related changes of bradykinin B1 and B2 receptors in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H202–H205, 2005.
67. Kim, S & Iwao, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(1):11-34.
68. Koitabashi N, Arai M, Tomaru K, Takizawa T, Watanabe A, Niwano K. Carvedilol effectively blocks oxidative stress-mediated downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 gene transcription through modification of Sp1 binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 116 – 124, 2005.
69. Kudej R, Iwase M, Uechi M, Vatner D, Oka N, Ishikawa Y, Shannon R, Bishop M, Vatner S. Effects of Chronic  $\beta$ -Adrenergic Receptor Stimulation in Mice. *J Mol Cell Cardiol* 29, 2735–2746, 1997.
70. Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev* 73:413–467, 1993.
71. Lindpainter K, Jin M, Niederlaier N, Wilhelm M, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res.* 67:564–573, 1990.
72. Loot AE, Roks AJ, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation.* 2;105(13):1548-50, 2002.
73. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci.* 66(1):67-76, 2000.

74. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(4):R994-R1000, 2001.
75. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert J, Brunner D, Gabbiani G, Brunner H, Pedrazzini T. Blood pressure independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 31:1324-1330e, 1998.
76. McMurray JJ and Stewart S. Epidemiology, etiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 83: 596–602, 2000.
77. Mendes AC, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Santos RA. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regul Pept.* 15;125(1-3):29-34, 2005.
78. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, Corman. B, Levy BI. Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition of the aging processes: II-large arteries. *Am J Physiol* 267:R124–R135, 1994.
79. Mori T, Hayashi T, Sohmiya K, Okuda N, Shimomura H, Ohkita M. Mechanisms of combined treatment with celiprolol and candesartan for ventricular remodeling in experimental heart failure. *Circ J* 2005; 69: 596 – 602.
80. Morris J, Heady J, Raffle P, Roberts C, Parks J. Coronary heart disease and physical activity of work. *Lancet*, 265, 1053-1057, 1953.
81. Muller D, Fischli W, Clozel J, Hilgers K, Bohlender J, Menard J, Busjahn A, Ganten D, Luft F. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res* 82:13-20, 1998.

82. Nagano M, Higaki J, Nakamura F, Higashimori K, Nagano N, Mikami H, and Ogihara T. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 19: 708–712, 1992.
83. Negrão CE, Irigoyen MC, Moreira ED, Brum PC, Freire PM, Krieger EM. Effect of exercise training on the renal sympathetic nerve activity, baroreflex control and blood pressure responsiveness. *American Journal Of Physiology Regulatory Integrative And Comparative Physiology*. 265: 365-370, 1993.
84. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Indana M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95:46–54, 1995.
85. Nutter P, Priest R, Fuller E. Endurance training in the rat. Myocardial mechanics and biochemistry. *J. Appl. Physiol.* (4):934-40,1981.
86. Oliveira E & Krieger J. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico. Aspectos moleculares. *Hipertensão*. 2(5): 73-78. 2002.
87. Oparil S, Chen YF, Meng QC, Yang RH, Jin HK, Wyss JM. The neural basis of salt sensitivity in the rat: altered hypothalamic function. *Am J Med Sci*. 1988 Apr;295(4):360-9.
88. O'Rourke RA, Chatterjee K, Wei JY. Atherosclerotic coronary heart disease in the elderly. *J Am Coll Cardiol*. 10: 52-6A, 1987.
89. Peach M. Renin–angiotensin system: biochemistry and mechanism involved. of action. *Physiol Rev*. 57:313–70, 1977.
90. Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M. Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive

oxygen species and p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(1):H96-106, 2006.

91. Parmley WW. Evolution of angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension, heart failure, and vascular protection. *Am J Med* 105: 27s-31s, 1998.
92. Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension.* Dec;26(6 Pt 2):1154-9, 1995.
93. Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol.* 111(3):652-4, 1994.
94. Rodeheffer RJ, Gerstenblith G, Becker LC, Fleg JL, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Exercise cardiac output is maintained with advancing age in healthy human subjects: cardiac dilatation and increased stroke volume compensate for a diminished heart rate. *Circulation* 69:203–213, 1984.
95. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases. *Hypertension* 38: 1382-1387, 2001.
96. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterisation of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 73:413–423, 1993.
97. Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, Ido R, Mano T, Kuzuya T, Miwa T, Takeda H, Hori M. Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from system-independent hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37,293-9, 2001.

98. Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RAS. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol.* 284:H1985-H1994, 2003.
99. Sampaio WO, Santos RAS, Faria-Silva R, Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via AKT-dependent pathways. *Hypertension.* 49 (1): 185-92, 2007.
100. Santos RAS, Brum JM, Brosnihan KB, Ferrario CM: The renin angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension.* 15(Suppl. 2):I121-I127, 1990.
101. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues ARV, Gropen C Jr, Carvalho WS, Simoes E, Silva AC, and Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin- (1–7): evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull.* 35: 293–298, 1994.
102. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 28;91(1-3):45-62, 2000.
103. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 100(14):8258– 63, 2003.
104. Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL and Bader M. Expression of an angiotensin-(1–7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics.* 17(3):292– 9, 2004.

105. Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz J, Ramos AS, Rosa K, Irigoyen M, Bader M, Alenina N, Kitten G, Ferreira A. Impairment of In Vitro and In Vivo Heart Function in Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Knockout Mice. *Hypertension*. 47:996-1002, 2006.
106. Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-Bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca<sup>2+</sup> in intact cardiac myocytes. *Circ Res*. 74:970–978, 1994.
107. Schaible TF, Malhorda A, Ciambone GJ, Scheuer J. Chronic swimming reverses cardiac dysfunction in hypertensive rats. *J Appl. Physiol*. 60:1445-1441, 1986.
108. Schaper J. Effect of multiple ischemic events on human myocardium: an ultrastructural study. *Eur Heart J* 9: 141-149, 1998.
109. Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price Jr E, Roberts RL. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 22(24):6471– 82, 2003.
110. Simões-e-Silva AC, Baracho NC, Passaglio KT, Santos RA. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 30(4):503-13, 1997.
111. Simões-e-Silva AC, Diniz JS, Regueira Filho A, Santos RA. The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Pediatr*. 145(1):93-8, 2004.
112. Schelling P, Ganten D, Speck G, Fischer H. Effects of angiotensin II and renin in 3t3 and SV3T3 cells. *J Cell Physiol*, 98: 503-14, 1979.
113. Shivakumar K, Dostal DE, Boheler K, Baker KM, Lakatta EG. Differential response of cardiac fibroblasts from young adult and senescent rats to ANG II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284(4):H1454-9, 2003.

114. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin-converting enzyme activity and mRNA levels in pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 86:1913–1920, 1990.
115. Stoll, M; Steckelings, UM; Paul, M; Bottari, SP; Metzger, R; Unger, T. The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 95:651–657, 1995.
116. Sun Y, Ramires FJ, Zhou G, Ganjam VK, Weber KT. Fibrous tissue and angiotensin II. *J Mol Cell Cardiol.* 29(8) : 2001- 2012, 1997.
117. Takahiro T, Masafumi Y, Masakazu O, Toshiyuki N, Mamoru M, Tetsuro O, Shinichi O, Masahiro D, Jinyao L, Yasuhiro I, Takeshi Y, Tomoko O, Masunori M. AT1 Receptor Antagonist Restores Cardiac Ryanodine Receptor Function, Rendering Isoproterenol-Induced Failing Heart Less Susceptible to Ca<sup>2+</sup>-Leak Induced by Oxidative Stress. *Circ J*, 70:777-86, 2006.
118. Tallant EA, Diz DI, and Ferrario CM. State-of-the-art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1–7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 34: 950–957, 1999.
119. Tanaka, M; Ohnishi, J. Ozawa,Y; . Sugimoto, M; Usuki, S; Naruse, M; Murakami, K; Miyazaki, H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 207:593–598, 1995.
120. Teerlink JR, Pfeffer JM, and Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res* 75: 105–113, 1994.

121. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie, G. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 275:; 33238-33243, 2000.
122. Tsutsumi, Y; Matsubara, H; Masaki, H; Kurihara, T; Murasawa, S; Takai, S; Miyazuki, M; Nozawa, Y; Ozono, R; Nakagawa, K; Miwa, T; Kawada, N; Mori, Y; Shibasaki, Y; Tanaka, Y; Fujiyama, S; Koyama, Y; Fujiyama, A; Takahasi, H; Iwasaka, T. Vascular smooth muscle-targeted over expression of angiotensin II type 2 receptor causes endothelium-dependent depressor and vasodilative effects via activation of the vascular kinin system. *J Clin Invest.* 104:855–864, 1999.
123. Urata H, Strobel F, Ganten D. Widespread tissue distribution of human chymase. *J Hypertension. Suppl 12:* S17-S22, 1994.
124. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 277(17): 14838– 43, 2002.
125. Wei JY. Mechanisms of disease: Age and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 327: 1735-9, 1992.
126. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 32(3):496-502, 1998.
127. Yonemochi H, Yasunaga S, Teshima Y, Iwao T, Nakagawa M, Saikawa T, Ito M. Mechanism of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Upregulation Induced by ACE Inhibition in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes Roles of Bradykinin and Protein Kinase C. *Circulation.* 97:2268-2273, 1998.

128. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 6;45(5):711-9, 1986.
129. Zamo FS, Oliveira EM, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training reduced hypertension and RAS activity but not the cardiac hypertrophy. *J Hypertens*. 22:72-72, 2004.
130. ZhouYY, Lakatta EG, Xiao RP. Age-associated alterations in calcium current and its modulation in cardiac myocytes. *Drugs Aging*. 13(2):159-71, 1998.
131. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for up regulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2. *Circulation*. 108(14):1707-12, 2003.