

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Morfologia

***EFEITO DA DELEÇÃO GENÉTICA DO RECEPTOR DA
ANGIOTENSINA - 1-7, MAS, NA MORFOLOGIA E
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS
ADULTOS E NEONATAIS***

ELISANDRA GAVA DE CASTRO

Belo Horizonte

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Morfologia

***EFEITO DA DELEÇÃO GENÉTICA DO RECEPTOR DA
ANGIOTENSINA - 1-7, MAS, NA MORFOLOGIA E
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ
EXTRACELULAR EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS
ADULTOS E NEONATAIS***

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

ELISANDRA GAVA DE CASTRO

Orientador: Prof. Dr. Gregory Thomas Kitten

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte

2006

*Ao meu esposo Carlos Henrique e aos meus pais Luiz e Fátima
dedico este meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Gregory Thomas Kitten, pela orientação sempre com muita sabedoria.

Ao professor Dr. Robson Augusto Souza dos Santos por ter acreditado neste trabalho e colaborado para que ele fosse realizado.

Ao meu esposo e companheiro de pesquisa, Carlos Henrique de Castro, pela ajuda e companheirismo.

Aos meus pais, Luiz e Fátima e meus irmãos Eliane, Cláudio e Luiz Ângelo pela força e presença constante em todos os momentos importantes da minha vida.

A todos os colegas e alunos do Laboratório da Matriz extracelular e Desenvolvimento, especialmente Laser Oliveira que introduziu meus conhecimentos à microscopia confocal, e aos colegas da Pós-graduação em Biologia Celular pela amizade e ajuda durante essa caminhada.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Morfologia que contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e PRONEX.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Fatores que governam o *turnover* de colágeno fibrilar no miocárdio (Weber, 1999; Burlew and Weber, 2000).

TABELA 2 - Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração das vias enzimáticas para a formação de angiotensinas.

FIGURA 2 – Representação esquemática dos principais efeitos da Ang II via receptores AT₁ e AT₂ e Ang (1-7) via receptor Mas.

FIGURA 3 - Corte histológico cardíaco corado pelo tricrômico de gomori.

FIGURA 4 - Corte histológico cardíaco corado pelo tricrômico de gomori.

FIGURA 5 - Imunolocalização de núcleos em ventrículo e válvula de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 6 – Cortes histológicos cardíaco corados com picrossirius.

FIGURA 7 - Imunolocalização de colágeno I em ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 8 - Imunolocalização de colágeno I perivascular de KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 9 - Imunolocalização de colágeno I observado em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 10 - Imunolocalização de colágeno III em ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 11 - Imunolocalização de colágeno III perivascular de KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 12 - Imunolocalização de colágeno III em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 13 - Imunolocalização de colágeno III (amarelo), miosina cardíaca (verde) e núcleo (azul) em ventrículo esquerdo de Ko-Mas observado em microscopia confocal.

FIGURA 14 - Imunolocalização de fibronectina no ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 15 - Imunolocalização de fibronectina em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 16 - Imunolocalização de colágeno VI no ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 17 - Imunolocalização de colágeno VI em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

FIGURA 18 - Imunolocalização de colágeno I (Col I), III (Col III),VI (Col VI) e fibronectina (FN) em átrios de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal

FIGURA 19 - Imunolocalização de Col VI em ventrículo e válvulas atrioventriculares de animais tratados com isoproterenol observados em microscopia confocal.

FIGURA 20 - Micrografia eletrônica dentro do coração de animal KO-Mas.

FIGURA 21 – Expressão de proteínas da MEC em corações de KO-Mas e WT.

FIGURA 22 - Expressão de colágeno VI em ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) de corações de camundongos C57/BL6J tratados com Isoproterenol.
Insert: Índice de Massa Cardíaca dos camundongos C57/BL6J tratados com Isoproterenol.

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779	D-Ala-Ang-(1-7)
Amp	Aminopectidase
Amp A	Aminopectidase A
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 (3-7)	Angiotensina-(3-7)
BK	Bradicinina
Cbp	Carboxipeptidase
D-Amp	Dipeptidil-aminopectidase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
M	Válvula Mitral
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NEP	Endopeptidase Neutra
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PEP	Prolil-endopeptidase
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PKC	Proteína Cinase C
RNAm	RNA mensageiro
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
T	Válvula tricúspide

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
SUMÁRIO	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1.0 Introdução	1
1.1 Matriz Extracelular.....	2
1.2 Sistema Renina-angiotensina	4
1.2.1 Receptores do Sistema Renina Angiotensina	8
1.3 Qual seria então o link entre SRA e matriz extracelular?.....	11
1.4 Deleção genética do receptor Mas e aplicação para estudos cardiovasculares.....	13
2.0 Hipótese	14
3.0 Objetivos	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4.0 Materiais e Métodos	15
4.1 Coleta do material	15
4.1.1 Modelo de hipertrofia induzido pelo Isoproterenol.....	15
4.2 Processamento do material para histoquímica e imunofluorescência	15
4.3 Análise morfológica dos tecidos	16
4.3.1 Picrosirius	16
4.4 Análise da distribuição dos Colágenos I, III, VI e fibronectina (Imunofluorescência)	17
4.4.1 Análise quantitativa de colágenos I, III, VI e fibronectina	18
4.5 Processamento do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão(MET):.....	19
4.6 Análise estatística	20

5.0 Resultados	21
6.0 Discussão	44
7.0 Conclusões	49
8.0 Referências Bibliográficas	50

RESUMO

A expressão de vários tipos de colágenos e outras proteínas da matriz extracelular (MEC) mostram estar alteradas sob várias condições patológicas. O Sistema Renina Angiotensina (SRA) apresenta um papel importante na biossíntese da MEC dentro do coração. Foi mostrado recentemente que angiotensina-(1-7) [Ang (1-7)] é um ligante endógeno do receptor Mas, o qual está acoplado à proteína G e modula várias funções importantes no coração (Santos *et al.*, 2003). Recentemente, foi desenvolvido um camundongo com a deleção genética do protooncogênese Mas a partir do camundongo C57BL/6 (Walter *et al.*, 1998), o que permitiu estudar a importância fisiológica da proteína codificada por esse gene. Esses animais apresentam alterações cardiovasculares que leva a uma importante perda da função cardíaca (Castro *et al.*, 2004). Porém, pouco se sabe sobre o papel da Ang 1-7 e o receptor Mas na modulação da síntese dos componentes da MEC. Neste estudo, foram analisados os efeitos da deleção genética do receptor Mas na morfologia e expressão de proteínas específicas da MEC em corações de camundongos. Para isto, foram utilizados camundongos machos, adultos e neonatais knockout para o receptor Mas (KO-Mas) e seu controle (WT). Os níveis de proteínas (colágenos I, III, VI e fibronectina) foram analisados em diferentes áreas dos corações utilizando técnicas de imunohistoquímica e microscopia confocal de varredura a laser. Além disso, foram analisadas a morfologia e ultraestrutura da parede do miocárdio dos animais KO-Mas e comparados com o controle. Colorações histoquímica (ex. H&E, Tricrômico de Gomori, Picrosirius) foram usadas para o estudo da estrutura geral e organização do tecido conjuntivo cardíaco. Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para determinar possíveis alterações ultraestrutural no miocárdio. Nossos resultados mostraram que os animais KO-Mas parecem apresentar um número aumentado de células. A expressão de colágenos I e III, como também a fibronectina, uma outra proteína da MEC, está aumentada nos ventrículos desses animais adultos e neonatais. No entanto, o colágeno VI está significativamente diminuído no miocárdio desses animais KO-Mas. Além disso, observamos também que as mudanças de expressão de proteínas da MEC não estão limitadas ao miocárdio, mas também foram observadas em válvulas cardíacas. Nenhuma diferença foi observada nos átrios. Essas observações sugerem que a Ang (1-7) e seu receptor, Mas, está envolvido na expressão seletiva de proteínas específicas da MEC no coração. Este perfil encontrado pode contribuir para a função cardíaca diminuída observada nestes camundongos KO-Mas.

ABSTRACT

The expression of various types of collagen and other extracellular matrix (ECM) proteins has been shown to be altered under various physiological and pathologic conditions. The renin-angiotensin system plays a pivotal role in the biosynthesis of the ECM within the heart. It has been recently shown that angiotensin (1-7) [Ang (1-7)] is an endogenous ligand for the G protein-coupled Mas receptor. Ang (1-7) has been reported to modulate a number of important heart functions, as well as affect ECM biosynthesis. However, it has not yet been shown how Ang 1-7 or the Mas receptor modulate ECM production. In this study we investigated the effects of genetic deletion of the Mas receptor on the expression and distribution pattern of specific ECM proteins in adult and neonatal male mice hearts. Quantification of the proteins in Mas-knockout (KO-Mas) and control mice was performed using immunofluorescence-labeling techniques and confocal microscopy. Different areas of the heart from KO-Mas and WT mice were compared and the levels of collagen I, III, VI and fibronectin present were determined. General morphological changes in the ECM were evaluated using Gomori's Trichrome staining while Picrosirius red staining was used for the histological assessment of the total collagen content. We observed that while the expression of several ECM proteins, i.e., type I collagen, type III collagen and fibronectin, were significantly increased in the ventricles and valves of adult KO mice hearts compared to control mice, the expression of type VI collagen was decreased. No major differences were detected in the atria. Neonatal KO-Mas mice hearts presented similar patterns as observed in adults. These observations suggest that the Mas receptor is involved in the selective expression of specific extracellular matrix proteins within the heart. The profile observed may contribute to the decreased cardiac performance observed in KO-Mas mice.

1.0 Introdução

A diversidade dos genes que afetam o crescimento do miocárdio sugere que durante o desenvolvimento cardíaco, o miocárdio é particularmente sensível a alterações. Mutações de uma vasta variedade de genes em camundongos resultam em desenvolvimento anormal do miocárdio. Vários tipos de camundongos mutantes *null* exibem um coração fetal visivelmente maior com um aumento da trabeculação do miocárdio e reduzida compactação celular, mimetizando mudanças patológicas de uma não compactação do miocárdio ventricular. Além disso, células com maior tamanho e proliferação celular são observadas nestes camundongos *knockout*. Apesar disso, mutação *null* em vários outros genes resulta em hipoplasia do miocárdio e redução na função contrátil. Vários fatores envolvidos no controle da hipertrofia mostraram modular os genes envolvidos na deposição da matriz extracelular. A manipulação genética em camundongos tem fornecido importantes ferramentas para a avaliação funcional do papel do Sistema renina-angiotensina (SRA) na regulação da pressão arterial, desenvolvimento e homeostasia cardiovascular. Recentemente, foi desenvolvido um camundongo com deleção do protooncogene *Mas* a partir do camundongo C57Bl/6 (Walther *et al.*, 1998), o que permitiu estudar a importância fisiológica da proteína codificada por esse gene.

O Prof. Robson Augusto Souza dos Santos e colaboradores do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, estão estudando esses camundongos KO-Mas: “Angiotensina-(1-7) e seu receptor como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o estudo e tratamento de doenças cardiovasculares”. Eles têm encontrado alterações cardiovasculares que leva a uma importante perda da função cardíaca como demonstrado, *in vitro*, pela diminuição da tensão sistólica e \pm dT/dt, além da frequência cardíaca diminuída e resistência vascular coronariana aumentada (Castro *et al.*, 2004). Estes dados foram confirmados *in vivo* pela ecocardiografia (dados não publicados). No entanto, nada foi estudado em relação a importantes proteínas de matriz extracelular envolvidas no remodelamento cardíaco nesses animais KO-Mas.

Visando uma ampliação dos estudos com estes camundongos, uma colaboração foi iniciada com o Laboratório do Professor Gregory Thomas Kitten

devido sua experiência na área de MEC e técnicas morfológicas. Esta colaboração levou ao desenvolvimento deste projeto.

1.1 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) no coração consiste de colágenos intersticiais, proteoglicanas e glicoproteínas que estão arranjadas em uma rede tridimensional precisa em associação com miócitos, fibroblastos e capilares. A adesão celular a colágenos, fibronectina, laminina e outros componentes da MEC é mediado primariamente por integrinas. Interação entre células e a MEC tem papéis importantes em vários processos celulares incluindo migração, proliferação e diferenciação. Está claro que a MEC é uma estrutura dinâmica cuja organização e composições são conhecidos por modular vários processos celulares. Eventos que alteram a composição molecular ou a organização dos componentes da MEC podem levar a sérios efeitos na função celular (Brilla *et al.*, 1990; González *et al.*, 2002). Dentro do miocárdio, a MEC forma uma elaborada rede que interconecta os cardiomiócitos uns aos outros e com os capilares dentro da parede ventricular (Robinson *et al.*, 1983). Esta rede intersticial dentro do miocárdio é composta predominantemente de colágenos fibrilares (Weber *et al.*, 1989; Borg and Terracio, 1991). 85% do total de colágeno é do tipo I, que está associado principalmente às fibras grossas e conferem resistência a deformação, enquanto 11% do total de colágeno é do tipo III, e está associado à fibras finas que conferem elasticidade (Phillips & Wenstrup, 1992). Esses colágenos fibrilares fornecem um *scaffold* estrutural para cardiomiócitos e vasos coronários e dá ao tecido cardíaco propriedades físicas de rigidez e resistência a deformação (Burlew & Weber, 2000). Em adição, o colágeno fibrilar também age como um *link* entre elemento contrátil de cardiomiócitos adjacentes e como condutores de informações que é necessário para a função da célula. Isto é suportado pela observação de que a interação de fibras colágenas com os cardiomiócitos no coração ocorre em regiões próximas a banda Z, e a ligação é mediada por moléculas das famílias das integrinas (Terracio *et al.*, 1991).

Os colágenos fibrilares são produzidos por fibroblastos e miofibroblastos no coração. Miofibroblastos surgem de fibroblastos intersticial e/ou pericitos, são contráteis e tem uma maior atividade na produção de colágenos que os fibroblastos. O colágeno tipo VI é uma molécula colagenosa, porém não fibrilar,

heterotrimerica composta de três cadeias polipeptídicas - $\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ e $\alpha 3(VI)$, a qual forma uma rede extracelular microfibrilar que interage com membrana basal, colágenos fibrilares, e outras proteínas de matriz bem como com receptores da superfície celular (Brown & Timpl, 1995). Considerações estruturais predicam que a união de cadeias [$\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ e $\alpha 3(VI)$] na proporção 1:1:1 do colágeno VI é necessária para a formação de uma rede colágena microfibrilar estável (Chu *et al.*, 1988; Heckmann *et al.*, 1992). Estudos, *in vivo*, sugerem que o colágeno tipo VI, em sua forma nativa, participa da adesão e migração de células através de interações com membros da família de receptores de integrinas ou a proteoglicanas NG2 (Aumailley *et al.*, 1989; Perris *et al.*, 1993; Burg *et al.*, 1996). Sabe-se que ele forma uma rede microfibrilar extracelular que funciona como uma ponte elástica entre superfície celular e membranas basais e também com um *scaffold* estrutural da MEC. É possível também, que o colágeno tipo VI seja importante para manter apropriada relação entre as células do coração e MEC em estruturas cardíacas expostas a variáveis estágios de stress. Nas válvulas cardíacas, este colágeno também suporta a tensão em resposta a alterações no ciclo cardíaco (Klewer *et al.*, 1998). A fibronectina é a mais abundante proteína fibrosa não colagenosa sintetizada pelas células do miocárdio (Bashey *et al.*, 1992) e tem importante função no desenvolvimento cardíaco e adesão celular e apresenta-se aumentada no coração com sobrecarga mecânica (Villarreal and Dillmann, 1992).

Como em outros órgãos, a quantidade de colágeno no coração adulto normal resulta do equilíbrio entre a síntese e degradação de colágenos. Vários fatores têm sido descritos que podem alterar o balanço em favor da síntese (ex: Ang II) ou degradação (tabela 1). A predominância da síntese sobre a degradação leva ao aumento de deposição de colágeno ou fibrose que acompanha doenças cardíacas como doenças hipertensivas do coração. A fibrose altera a estrutura e função miocardial (Burlew and Weber, 2000).

TABELA.1 - Fatores que governam o *turnover* de colágeno fibrilar no miocárdio (Weber, 1999; Burlew & Weber, 2000).

Fatores que facilitam a síntese de colágeno	Fatores que facilitam a degradação de colágeno
Angiotensina II	Bradicinina
TGF β (Transforming growth factor) Outros fatores de crescimento (PDGF, bFGF, IGF-1) Aldosterona	Prostaglandina Óxido nítrico Peptídeos natriuréticos
Deoxicorticosterona	Fator de necrose tumoral-a
Endotelina –1	Interferon-G
Catecolaminas	Glicocorticóides
Interleucina –1	N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP)
Moléculas de adesão	
Osteopotin	

Vários estudos mostram mudanças na acumulação, composição ou organização de proteínas da MEC durante o desenvolvimento de doenças cardíacas. Eventos que alteram a composição molecular ou a organização dos componentes da MEC podem levar a sérios efeitos na função celular (Brilla *et al*, 1990; González *et al.*, 2002. Muitas dessas alterações estão associadas com a ativação de sistemas humorais tais como o Sistema Renina Angiotensina (González *et al.*, 2002).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O SRA é um sistema importante na regulação central e periférica da pressão arterial e no equilíbrio hidro-eletrolítico, além de estar envolvido na patogênese de várias patologias cardiovasculares. Este sistema tem sido tradicionalmente descrito, desde estudos iniciados no século XIX, como um sistema endócrino. No entanto, este tradicional conceito do SRA tem sido expandido à sua existência e produção local de angiotensinas em vários órgãos

como o miocárdio, cérebro, vasos sanguíneos, adrenais, rins e órgãos reprodutores. As ações locais desse sistema podem ocorrer ao nível da célula que produz os peptídeos (funções autócrinas), ao nível das células adjacentes às que produzem os peptídeos (funções parácrinas) ou ainda em locais distantes da região de produção (função endócrina) (Grinstead & Young, 1992; Krieger & Santos, 1998).

O SRA vem sendo amplamente estudado, incluindo as funções de seus principais componentes [Angiotensina II (Ang II) e Angiotensina-(1-7)], receptores, relações com outros sistemas e a descoberta de funções para peptídeos menores antes considerados inativos. Classicamente, este sistema é formado por uma cascata de reações enzimáticas, onde a enzima renina é liberada para a circulação sanguínea pelas células justaglomerulares do rim (Hall *et al.*, 2003). Esta enzima degrada o angiotensinogênio produzido no fígado em um decapeptídeo, Angiotensina (Ang) I, que por sua vez, sofre uma clivagem proteolítica promovida pela enzima conversora de angiotensina (ECA), altamente expressada no endotélio vascular pulmonar, formando um octapeptídeo, a Ang II (Dostal & Baker, 1999; Santos *et al.*, 2000). Assim, podemos considerar como principais componentes do SRA, o angiotensinogênio, a renina, a Ang I, a ECA, a Ang II e devido aos recentes achados, a Ang-(1-7) (FIGURA1).

A Ang II foi considerada por muito tempo como o único fragmento do SRA biologicamente ativo, sendo o principal peptídeo responsável pela homeostasia cardiovascular contribuindo para o controle da pressão arterial, volume sanguíneo e tônus vascular periférico. Cadeias menores resultantes da degradação desse peptídeo, com exceção da Ang III, eram até então considerados fragmentos inativos. Porém, recentes observações indicam que importantes ações periféricas e centrais do SRA podem ser mediadas por seqüências menores de peptídeos angiotensinérgicos (Santos & Campagnole-Santos, 1994; Ardaillou, 1999; Santos *et al.*, 2000; Campbell, 2003). Uma vez formada pela ação da renina sobre o angiotensinogênio, a Ang I pode gerar a Ang II pela ação da ECA e também pode formar outros fragmentos menores, como Ang-(1-7) pela ação de endopeptidases.

Recentemente, uma outra enzima, a ECA2, uma homóloga da ECA foi caracterizada em humanos. A ECA2 é uma carboxipeptidase que cliva um único resíduo da Ang I para gerar Ang-(1-9), e degrada Ang II em Ang-(1-7). Esta enzima parece ser essencial na regulação da função cardíaca e também está

implicada em doenças cardiovasculares (Coates, 2003; Outdit *et al.*, 2003). Pela ação de carboxipeptidases, da catepsina A e da ECA2, a Ang I também pode ser degradada em Ang-(1-9), que por sua vez, pode ser degradada em Ang-(1-7). Uma vez formada, a Ang II pode originar basicamente três peptídeos, ou seja, pela proteólise de aminopeptidases ela pode gerar Ang-(2-8) (Ang III) e a Ang-(3-8) (Ang IV) e pela ação da prolil-endopeptidase, da prolilcarboxipeptidase e da ECA2 pode gerar o heptapeptídeo Ang-(1-7) (FIGURA 1) (Chappel *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2000). Várias evidências mostram que a Ang-(1-7) apresenta características importantes que conferem a ela um papel chave na fisiologia da SRA atuando de forma contra-reguladora das ações da Ang II (Santos *et al.*, 2000). Diversos efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) mostram este papel contra-regulador. (1) A Ang-(1-7) impede a vasoconstrição produzida pela Ang II através da liberação de óxido nítrico e prostaciclina (PGI₂). (2) Este peptídeo potencializa a vasodilatação induzida pela bradicinina (BK), a qual pode ser responsável pelo efeito cardioprotetor deste peptídeo (Paula *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2000; Kucharewicz *et al.*, 2002), (3) Tallant e colaboradores, (1999), mostraram que a Ang-(1-7), ao contrário da Ang II, atua como um agente antiproliferativo. Posteriormente, em 2003, Tallant e colaboradores, confirmaram estes resultados demonstrando que a Ang-(1-7) inibe o crescimento vascular através da via prostaciclina – cAMP - proteína kinase e da ERK 1/2. Recentemente, este efeito também foi demonstrado em miócitos cardíacos de ratos neonatos, onde a Ang-(1-7) inibiu o crescimento destas células através da ativação do receptor Mas (Tallant *et al.*, 2005). Além disso, Santos e colaboradores (2004), mostraram que ratos transgênicos com níveis aumentados de Ang-(1-7), apresentam menor duração das arritmias de reperfusão e uma melhor função pós-isquêmica em corações isolados. Estes animais também foram mais resistentes à hipertrofia induzida por isoproterenol e apresentaram uma maior dP/dt avaliada por telemetria. O efeito cardioprotetor da Ang-(1-7), também foi demonstrado utilizando-se coração isolado de camundongos *knockout* para o receptor Mas. Estes animais, apresentaram tensão sistólica e dT/dt positiva e negativa diminuídas, além de diminuição da frequência cardíaca e aumento na resistência vascular coronariana (Castro *et al.*, 2004). Sumarizando, os dados da literatura mostram que a Ang II e Ang-(1-7) exercem vários efeitos biológicos importantes, porém, existem ainda diversas funções para serem esclarecidas.

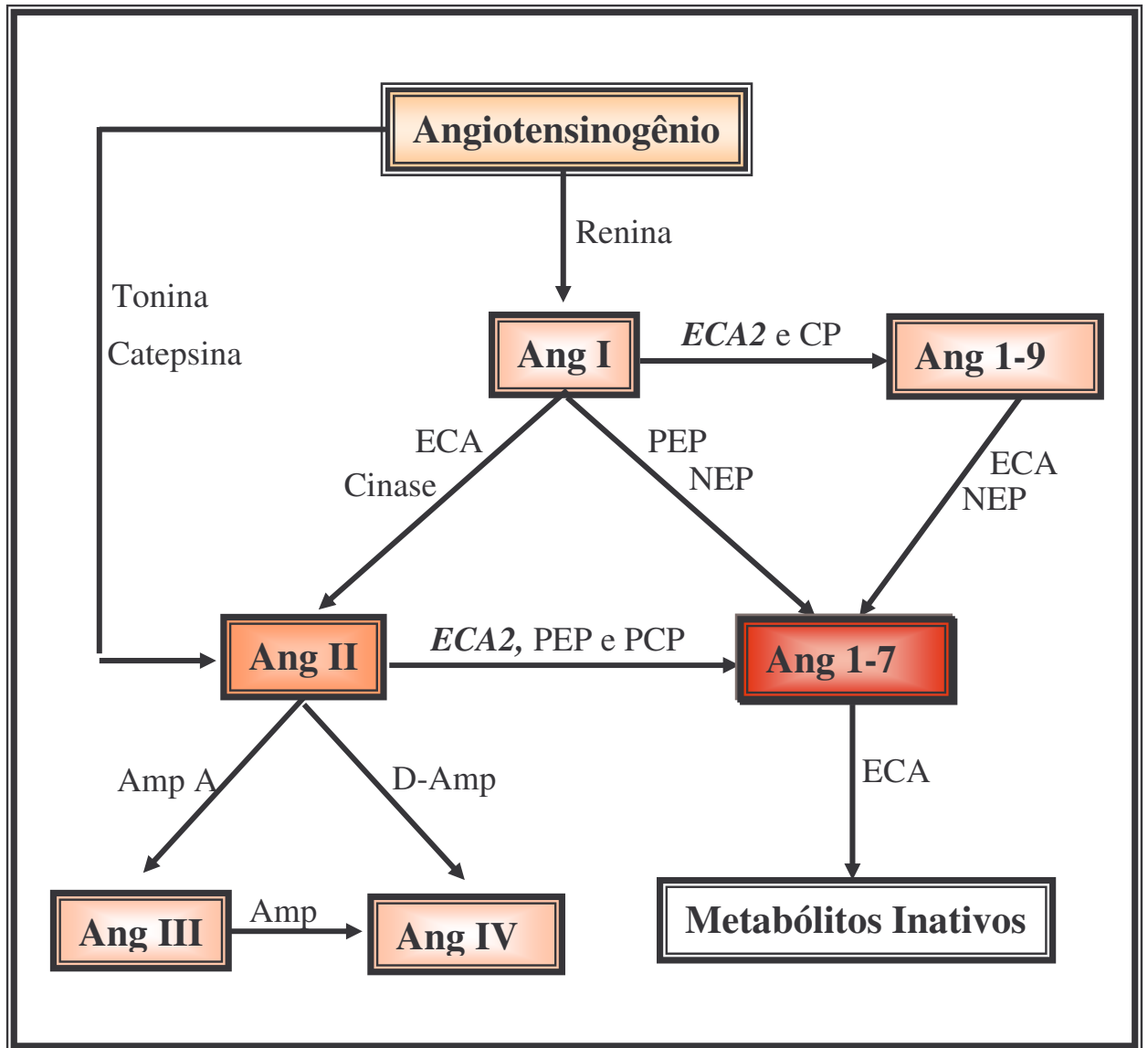


FIGURA 1 – Ilustração das vias enzimáticas para a formação de angiotensinas. Ang I, Angiotensina I; Ang II, Angiotensina II; Ang III, Angiotensina III (2-8); Ang IV, Angiotensina IV (3-8); Ang-(1-7), Angiotensina-(1-7); Ang-(1-9), Angiotensina-(1-9); CP, carboxipeptidase; Amp, Aminopeptidase; Amp A, Aminopeptidase A; D-Amp, Dipeptidil-aminopeptidase; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; NEP, Endopeptidase Neutra; PCP, Prolil-carboxipeptidase; PEP, Prolil-endopeptidase.

1.2.1 Receptores do Sistema Renina-angiotensina

Existem dois principais subtipos de receptores para a Ang II farmacologicamente definidos e clonados: receptores AT₁, com 359 aminoácidos e receptores AT₂, os quais possuem 363 aminoácidos. Ambos são receptores com sete domínios transmembranos e acoplados à proteína G no citoplasma (Touys & Berry, 2002; Campbell, 2003). Em humanos, há somente um único subtipo de receptor AT₁, ao passo que em roedores, foram identificados dois subtipos de receptores AT₁, o AT_{1A} e AT_{1B}. Esse receptor medeia importantes ações fisiológicas da Ang II e é predominante no controle de ações vasculares induzidas pela Ang II (Matsusaka & Ichikawa, 1997). O receptor AT₁ está presente e distribuído abundantemente em tecidos de adultos, incluindo vasos sanguíneos, coração, rim, glândula adrenal, fígado, cérebro e pulmão. Este receptor é responsável por mediar efeitos classicamente conhecidos da Ang II, tais como aumento da pressão arterial, vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, liberação de aldosterona pela glândula adrenal, facilitação da liberação de catecolamina da terminação nervosa e absorção renal de sódio e água (Timmermans *et al.*, 1993). Além disso, várias evidências sugerem que a Ang II, via receptor AT₁, pode participar diretamente na patogênese de várias doenças cardiovasculares, como por exemplo, a hipertensão e hipertrofia cardíaca, a qual inclui hipertrofia e reprogramação gênica de miócitos, proliferação de fibroblastos e acúmulo de proteínas da matriz extracelular (Kim & Iwao, 2000).

A segunda maior isoforma de receptor de Ang II, o AT₂, é normalmente expressa em altos níveis nos tecidos fetais, e diminui rapidamente após o nascimento. Porém, em adultos, a expressão do receptor AT₂ é detectável no pâncreas, coração, rim, adrenais, miométrio, ovário e cérebro. Nos vasos, este receptor foi localizado em células musculares lisas e endoteliais de artérias mesentéricas de rato e em arteríolas de músculo esquelético (Nora *et al.*, 1998). O receptor AT₂ é re-expressado em adultos após injúrias vascular e cardíaca e durante processos de cicatrização e obstrução renal, sugerindo um papel deste tipo de receptor no remodelamento, crescimento e desenvolvimento tecidual. Estudos sugerem que estes receptores também contribuem para processos patológicos associados com hipertrofia cardíaca e inflamação (Ichihara *et al.*, 2001).

Um outro importante receptor angiotensinérgico, o receptor Mas, foi descrito recentemente por Santos *et al.*, (2003). O protooncogene *Mas* foi primeiramente detectado em células tumorais (Young *et al.*, 1986) sendo responsável pela codificação de proteínas indispensáveis para o crescimento tumoral (Young *et al.*, 1986; Van't Veer *et al.*, 1993; Villar & Pedersen, 1994). Acoplado a proteína G, o *mas* codifica um receptor que, até então, era considerado como um receptor órfão, sabendo-se apenas que ele estava envolvido com as ações das angiotensinas (Jackson *et al.*, 1988; Von Bohlen und Halbach *et al.*, 2000). A Ang II foi considerada como um possível ligante para o Mas (Jackson *et al.*, 1988). Porém, Ambroz e colaboradores (1991) mostraram que o aumento de cálcio intracelular induzido pela Ang II em células transfectadas com *Mas* era dependente da expressão dos receptores AT₁ da Ang II, descartando, dessa forma, essa possibilidade. Porém, outros experimentos demonstraram que o receptor Mas modula a sinalização intracelular induzida pela estimulação dos receptores AT₁ (Von Bohlen und Halbach *et al.*, 2000), mantendo, dessa forma, a hipótese de que o Mas e as angiotensinas se interrelacionam.

Com o intenso interesse nos estudos da Ang-(1-7) e importantes dados apresentados na literatura, várias evidências farmacológicas e fisiológicas apontaram para a existência de um receptor para a Ang-(1-7). Santos *et al.*, 2003 demonstraram que o receptor Mas, acoplado à proteína G e codificado pelo protooncogene *Mas* (Walther *et al.*, 2000), é um receptor funcional para a Ang-(1-7). Na ausência desse receptor, vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos. Além disso, também foi demonstrado que em cultura de células CHO (ovário de hamster chinês), transfectadas com *Mas*, a ¹²⁵I-Ang-(1-7) apresenta alta afinidade de ligação. Além de suas ações específicas, vários trabalhos na literatura sugerem também, uma interação entre estes receptores angiotensinérgicos. Alguns mecanismos podem estar envolvidos nestas interações, incluindo antagonismo funcional, cross-talk ou oligomerização. O cross-talk e o antagonismo funcional entre os receptores AT₁ e AT₂ já foram descritos (Maeso *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1997; Abdala *et al.*, 2001).

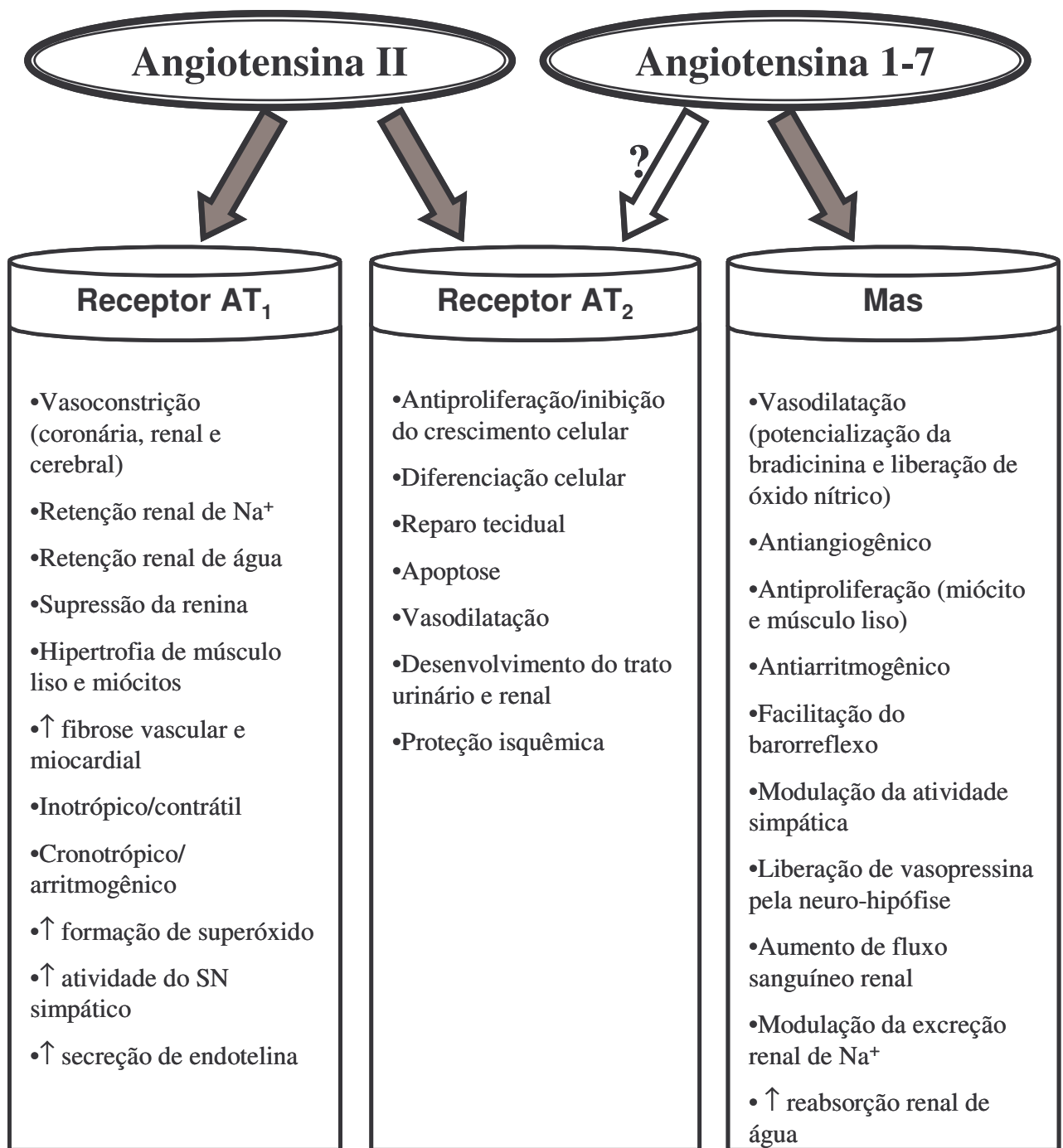


FIGURA 2 – Representação esquemática dos principais efeitos da Ang II via receptores AT₁ e AT₂ e Ang-(1-7) via receptor Mas.

1.3 Qual seria então o link entre SRA e matriz extracelular?

Evidências sugerem que componentes do SRA local ou circulante estão envolvidos no desenvolvimento de fibrose miocárdial em doenças hipertensivas e insuficiência cardíaca crônica (Ju e Dixon, 1996; Ichihara *et al.*, 2001) . Ang II, uma das principais moléculas efetoras do SRA, interage com seus receptores AT₁ e AT₂ nas células cardíacas para induzir respostas que afetam a estrutura e função do coração. Essas respostas incluem, hipertrofia de cardiomiócitos e acumulação de tecido fibroso, ambos contribuem para um progressivo comprometimento da função cardíaca (Villareal & Dillman, 1992; JU H & Dixon, 1996; Kawano *et al.*, 2000; Schnee JM. & Hsueh WA, 2000; Pathak *et al.*, 2001; González *et al.*, 2002; Lijnen P.J & Petrov V.V, 2003). Fibrose miocárdial, caracterizada por uma elevação na quantidade de colágenos, fibronectina e outras proteínas de MEC, aparece em modelos animais de hipertrofia e insuficiência cardíaca relacionados ao SRA (Weber, 1991; Boluyt 1994). Estudos *in vitro* de fibroblastos cardíacos de rato adulto e neonatal mostram que a Ang II estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágenos via receptores AT₁ (Crabos *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1996). Fielitz *et al.*, (2001) observaram um aumento na expressão de RNAm para os colágenos I, III e fibronectina em miocárdio de pacientes com doença de válvula aórtica e esta regulação estava associada com a ativação do SRA. No entanto, é importante notar que esta alteração não tem sido bem elucidada em relação ao colágeno VI. Alguns trabalhos mostram um aumento deste colágeno em modelos de infarto do miocárdio (Kitamura M, 2001; Tsuda 2003), porém, em relação ao SRA, Naugle *et al.*, (2005) observaram que fibroblastos cardíacos tratados com Ang II e colocados em substrato de colágeno VI não proliferaram, diferente do que aconteceu quando foram colocados em substrato de colágenos I e III onde houve uma proliferação destes fibroblastos. Já em modelo *in vivo* de infarto miocárdio viu-se um aumento na expressão do colágeno VI e diferenciação de miofibroblastos seguido de remodelamento pós infarto. Concluindo então que os colágenos I e III estimulam a proliferação de fibroblastos, enquanto colágeno VI tem um potencial papel no remodelamento cardíaco através da diferenciação miofibroblástica. Vários estudos de cardiomiopatia diabética tem mostrado uma acumulação de colágeno miocárdial incluindo os tipos I, III e VI, levando a uma fibrose perivascular e intersticial o qual tem sido correlacionada com disfunção cardíaca. Os

mecanismos envolvidos nessas mudanças não foram ainda completamente entendidos (Spiro and Crowley, 1993; Mizushige et al., 2000).

A Ang (1-7) é considerada um membro biologicamente ativo do SRA. As funções da Ang (1-7) em sua maioria são opostas àquelas atribuídas ao principal componente efetor do SRA, a Ang II. Loot *et al.*(2002), observaram que a infusão de Ang (1-7) em ratos, em meio a um remodelamento cardíaco pós infarto, atenuou a hipertrofia dos miócitos e preservou a função cardíaca. Confirmando esses dados, Averill *et al.*, (2003) observaram que infarto do miocárdio induzido pela oclusão da artéria coronária esquerda aumentou significamente a imunorreatividade a Ang (1-7) ao redor da área infartada, sugerindo que ela participa do SRA funcional do coração. A imunorreatividade a Ang 1-7 estava limitado a miócitos cardíacos e ausentes em células intersticiais e vasos. No entanto, Iwata *et al.*, (2005), observaram que Ang (1-7) se liga a fibroblastos cardíacos e regulam funções celulares que estão envolvidas no remodelamento cardíaco. Wang *et al.*, (2005) observaram que a administração crônica de Ang (1-7) atenuou a hipertrofia cardíaca e fibrose em ratos pós injúria, *in vivo*, sem modificar as alterações na pressão arterial e os níveis de Ang II cardíaco e plasmático. Isto mostrou que os efeitos anti-hipertrófico e anti-fibrótico da Ang (1-7) não está associada com a redução da liberação e formação da Ang II no plasma e no miocárdio, sugerindo que os efeitos benéficos da Ang (1-7) na hipertrofia e fibrose ventricular podem estar relacionados a um modo de ação intracardíaco. Para investigar os efeitos da Ang (1-7) no remodelamento da rede de colágenos miocárdial em modelos de ratos hipertensos, He *et al.*(2004), avaliaram a expressão de RNAm de colágenos I e III em ratos normais, hipertensos e hipertensos tratados com Ang (1-7). Observou-se que a expressão dos RNAm desses colágenos no miocárdio ventricular esquerdo no grupo hipertenso e no grupo hipertenso tratado com Ang (1-7) estavam aumentados comparados com o grupo controle. Mas aqueles que foram tratados com Ang (1-7) estavam significamente menores que o grupo hipertenso não tratado e com isso concluíram que a este peptídeo pode atenuar o remodelamento da rede de colágenos em ratos hipertensos. A participação da Ang II no remodelamento cardíaco frente a várias patologias cardíacas já está bem elucidada. Porém, ainda são poucos os trabalhos que mostram a ação da Ang (1-7) na matriz extracelular,

principalmente frente às conseqüências de patologias cardíacas (hipertrofia e fibrose) e nenhum mostrando esta ação via receptor Mas.

1.4 Deleção genética do receptor Mas e aplicação para estudos cardiovasculares

Recentemente foi desenvolvido um camundongo com deleção do protooncogene *Mas* a partir do camundongo C57Bl/6 (Walther *et al.*, 1998), o que permitiu estudar a importância fisiológica da proteína codificada por esse gene. Nestes camundongos *knockout*, a expressão do RNAm para o *Mas* não está presente nos principais órgãos onde esse gene é expresso em camundongos adultos, como coração, rins, testículos e cérebro (Alenina *et al.*, 2002). Devido a sua possível relação com as angiotensinas, foram realizados experimentos para avaliar a existência de alterações nos parâmetros cardiovasculares. A princípio, não foram encontradas diferenças significativas da pressão arterial ou da frequência cardíaca (Walther *et al.*, 1998). Porém, realizando-se uma análise de alta resolução dos dados obtidos, foi possível verificar uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e um aumento do tônus simpático nos camundongos *knockout* em relação aos controles, sendo essa diferença maior entre as fêmeas (Walther *et al.*, 2000). Esses resultados sugerem que o Mas também é importante no controle dos parâmetros cardiovasculares avaliados. Em camundongos *knockout* para o Mas, a ligação e a sinalização intracelular da Ang II nos rins não estão alteradas em relação aos experimentos realizados em camundongos controles (Walther *et al.*, 1998), indicando que o Mas não interfere na ligação da Ang II aos seus receptores. Experimentos realizados utilizando camundongos deficientes para o receptor Mas mostram que na ausência desse receptor, vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos, como, por exemplo, o efeito antidiurético desse peptídeo em camundongos com sobrecarga hídrica (Santos *et al.*, 2003). Assim, vários estudos mostram a participação do receptor Mas na fisiopatologia cardiovascular e de outros sistemas. O envolvimento do SRA, especialmente os peptídeos Ang II e Ang-(1-7), na modulação de proteínas da MEC no coração também tem sido intensamente descrito (Lijnen P.J & Petrov V.V, 2003; Iwata *et al.*, 2005). No entanto, a participação do receptor Mas na morfologia, estrutura e expressão de proteínas da matriz extracelular do coração ainda não foi elucidada.

2.0 Hipótese

Visto que a Ang (1-7) apresenta importante papel na fisiologia cardiovascular espera-se que os animais *knockout* para o receptor *Mas* apresentem alterações nos níveis de expressão dos componentes da matriz extracelular do coração. Este fato está relacionado com o papel importante que o SRA desempenha na biossíntese de proteínas da MEC.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Partindo das evidências de que os componentes do SRA, incluindo a Ang-(1-7), têm efeito na expressão de proteínas da MEC cardíaca e que o receptor *Mas* é um receptor específico para Ang-(1-7), temos como objetivo avaliar as alterações cardíacas, principalmente de proteínas da matriz extracelular que estão envolvidas no remodelamento cardíaco de camundongos KO-*Mas*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a estrutura geral e organização do tecido conjuntivo do miocárdio de camundongos KO-*Mas* machos adultos e neonatais comparados ao normal (WT) através de métodos histoquímicos (ex: Tricrômico de Gomori e Picrosirius).
- Analisar a ultraestrutura e morfologia do tecido conjuntivo do coração e dos cardiomiócitos através da microscopia eletrônica de transmissão de camundongos adultos KO-*Mas* comparados ao normal (WT).
- Avaliar a distribuição e quantificar a expressão de colágenos I, III, VI e fibronectina de corações de camundongos WT e KO-*Mas* machos, adultos e neonatais através de métodos imuno-histoquímicos, juntamente com microscopia confocal de varredura a laser.
- Avaliar o efeito da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol na expressão de colágeno VI em corações de camundongos C57BL/6J

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Coleta do material

Os camundongos wild-type (WT) e Mas-knockout (KO-Mas) adultos foram fornecidos pelo biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG. Os animais foram acasalados e mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia até o sacrifício dos neonatos 1 dia após o nascimento (n=12 sendo 6 KO e 6 WT) e os adultos com 2 meses de idade (n=12, sendo 6 KO e 6 WT). Para o modelo de hipertrofia foram utilizados camundongos selvagens C57BL/6J.

4.1.1 Modelo de hipertrofia induzido por Isoproterenol

Para o modelo de hipertrofia os animais foram divididos em dois grupos:

- 1- Tratamento com Isoproterenol (100mg/Kg i.p.) durante 5 dias, n=3.
- 2- Tratamento com salina (100mg/Kg i.p.) durante 5 dias, n=3.

4.2 Processamento do material para histoquímica e imunofluorescência

Os corações foram perfundidos com solução de PBS para remoção do sangue da parede ventricular, fixados em metanol 80% / DMSO 20% e criosubstituído a -70°C durante seis dias e removidas para -20°C por 1 dia.

Após a fixação e a criosubstituição, os corações foram submetidos às etapas que se seguem:

- Desidratação:** Álcool absoluto – 30 minutos a temperatura ambiente
Álcool absoluto – 30 minutos a temperatura ambiente
Álcool absoluto – 30 minutos a temperatura ambiente
- Diafanização:** Xilol – 30 minutos a temperatura ambiente
Xilol – 30 minutos a temperatura ambiente
- Infiltração:** Xilol 50% / Paraplast Plus 50% - 12 horas a 63°C
Paraplast – 30 minutos a 63°C
Paraplast – 30 minutos a 63°C
- Inclusão:** Paraplast – a 63°C

Após a inclusão em paraplast foram realizados cortes histológicos de $7\mu\text{m}$ de espessura dos tecidos. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (dados não mostrados), tricrômico de Gomori, Picosirius e submetidos à técnica de imunofluorescência para colágeno I, III, VI e fibronectina.

4.3 Análise morfológica dos tecidos

A coloração de hematoxilina e eosina é utilizada como rotina para identificação de estruturas como fibras colágenas e tecido cardíaco. O Tricrômico de Gomori permite melhor visualização de fibras e organização do tecido conjuntivo.

4.3.1 Picrosirius

A técnica histoquímica do Picrosirius é utilizada para evidenciar fibras colágenas (Junqueira *et al.*, 1979, Montes & Junqueira, 1991). Utiliza-se como corante o *sirius red* (Direct red 80 – Aldrich). O sirius red é capaz de aumentar o grau de birrefringência do colágeno durante a reação. Assim, quando o tecido contendo colágeno é observado à microscopia de polarização, as diferentes fibras de colágeno assumem cores variáveis de acordo com a intensidade de birrefringência e espessura das fibras.

O protocolo utilizado para coloração do Picrosirius segue abaixo:

Desparafinização: Xilol, temperatura ambiente (3x)

Hidratação: séries graduais de etanol passando pela água

Coloração com sirius red (Direct red 80 – Aldrich) – 60 minutos a temperatura ambiente

Gotejar HCl 0,01 N sobre as lâminas – 4 minutos

Contracoloração com Hematoxilina de Harris – 50 segundos

Lavagem em água corrente – 5 minutos

Desidratação : séries graduais de etanol

Diafanização : Xilol, temperatura ambiente (3x)

Montagem das lâminas com Entellan (Merck)

4.4 Análise da distribuição dos colágenos I, III, VI e fibronectina (Imunofluorescência)

A técnica de imunofluorescência é capaz de identificar com precisão a molécula de colágeno I, III, VI e fibronectina. Para análise dessas proteínas, foi empregada técnica de imunofluorescência indireta em 24 amostras de tecidos cardíaco, sendo seis de camundongo KO-Mas adultos, seis de WT adultos, seis KO-Mas neonatais e seis WT neonatais. Foi realizada a determinação das diluições ideais dos anticorpos primário e secundário para a imunofluorescência. No início do experimento, foi feito o controle sem o uso dos anticorpos primário e secundário para verificar se o tecido possuía autofluorescência. Este resultado foi negativo para tecido cardíaco de adulto e neonatal. Controles utilizando somente os anticorpos secundários foi feito em todos os experimentos e foram negativos em todos os casos (fig 7). A especificação dos anticorpos utilizados em suas diluições de trabalho na imunofluorescência encontra-se na TABELA. 2.

TABELA 2 - Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência indireta

Anticorpo	Especificação	Diluição	Fonte
<i>Primários</i>	Policlonal, coelho anti colágeno I humano	1:400	Research Diagnostics Inc.
	Policlonal, coelho anti colágeno III humano	1:400	Rockland.
	Policlonal, coelho anti colágeno VI humano	1:400	Research Diagnostics Inc.
	Policlonal, coelho anti fibronectina humano	1:600	Rockland
	Monoclonal, camundongo anti miosina cardíaca humano	1:200	Abcam
	Policlonal, cabra anti PECAM-1	1:400	Santa Cruz Biotechnology
<i>Secundário</i>	Policlonal, burro anti-(IgG de coelho) conjugado com Cy3	1:400	Jackson Imuno Research
	Policlonal, burro anti cabra conjugado a Cy5	1:400	Jackson Imuno Research
	Policlonal, burro anti-(IgG de coelho) conjugado a Alexa fluor	1:400	Molecular Probes

O esquema da imunofluorescência indireta segue abaixo:

Desparafinização:	Realizada com xilol - temperatura ambiente.
Hidratação:	Séries graduais de etanol passando pela água até PBS ¹ - temperatura ambiente.
Etapa de bloqueio:	PBS com BSA ² 1% e Tween 20 ³ 0,1% - 60 minutos a temperatura ambiente.
Incubação anticorpo primário:	Diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% - <i>overnight</i> a 4°C.
Lavagem das lâminas:	4 banhos em PBS - 5 minutos cada.
Incubação anticorpo secundário:	Diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% - 60 minutos a temperatura ambiente.
Lavagem das lâminas:	4 banhos em PBS - 5 minutos cada.
Montagem das lâminas	Solução de glicerina 90% / TRIS 1M 10% pH 9,0 a 25°C.

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscopia confocal Zeiss 510Meta.

4.4.1 Análise quantitativa de colágenos I, III, VI e fibronectina

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que a microscopia confocal pôde ser utilizada para quantificar a molécula colágeno VI em tecidos gengivais (Gervásio, 2000). Para a quantificação dos colágenos I, III, VI e fibronectina foi medida a intensidade de fluorescência no miocárdio e válvulas do tecido cardíaco.

As imagens foram analisadas em escala de cinza através do programa ImageTool 2.0⁴. A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade

¹ *Phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato salino

² *Bovine Serum Albumine* – Albumina de soro bovino (Boehringer Mannheim)

³ Tween 20 é um detergente também utilizado para inibir ligações inespecíficas de imunoglobulinas (Fisher Scientific)

⁴ Desenvolvido por Don Wilcox, Brent Dove, Doss McDavid e David Greer
The University of Texas Health Science Center in San Antonio
Todos os direitos reservados
<http://www.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>

“Nível de Cinza”, que varia do valor zero (preto) ao valor 255 (branco). Quanto mais próximo do valor 255, maior a intensidade fluorescência. Os parâmetros do microscópio confocal utilizados foram os mesmos para as amostras do WT e KO-Mas e controle do anticorpo secundário, tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e possível de comparação.

4.5 Processamento do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

Com o objetivo de avaliar a ultraestrutura do tecido cardíaco de animais KO-Mas comparados ao WT, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Para isso foram utilizados animais KO-Mas (n=2) e WT (n=2).

O protocolo utilizado para microscopia eletrônica de transmissão segue abaixo:

- Os corações foram perfundidos com solução de PBS para remoção do sangue e logo após perfundidos com solução fixadora de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Foi adicionado a esta solução fixadora o cloreto de cetilpiridina a 1% (CPC) para preservar melhor a MEC. Para a perfusão foi utilizado o sistema de Langendorff.
- Imersão do tecido na mesma solução fixadora “overnight” em temperatura ambiente (para não precipitar o CPC).
- Lavagem em tampão fosfato 0,1M (3x30')
- Pós fixação em OsO₄ a 2% tamponado (90')
- Desidratação gradual em acetona (50%, 70%, 95% e 100% 2x30')
- Infiltração: acetona/Epon 1:1, *overnight*; acetona/Epon 1:1, 6 horas e resina plena *overnight*.
- Inclusão a 60°C por 48 horas
- Microtomia : corte ultra-fino
- Contrastação: Citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e Acetato de uranila 2% (Watson , 1958)
- Obtenção das micrografias no microscópio eletrônico EM.10 ZEISS

4.6 Análise estatística

Para a análise da expressão das proteínas da MEC foi utilizado o teste não paramétrico de “Mann Whitney”. Para a análise da hipertrofia em camundongos tratados com Isoproterenol foi utilizado o teste t de student. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

5.0 Resultados

Após a coleta e processamento, os corações foram submetidos a técnicas de coloração e imunomarcação. Através da coloração com técnicas histoquímicas mais específicas para tecido conjuntivo e matriz extracelular (ex. Tricrômico de Gomori), pudemos classificar o tecido muscular de coração adulto, que se mostrou constituído de células alongadas com estriações transversais e núcleo centralizado (FIGURA 3). O Tricrômico de Gomori permitiu verificar alguma diferença na marcação das estruturas de tecido muscular e conjuntivo dos tecidos cardíacos: as células musculares e demais estruturas apresentam-se corados em vermelho e as fibras colágenas apresentam-se coradas em azul (FIGURA 3). Alguma diferença foi observada quanto à especificidade e qualidade de coloração dos tecidos cardíacos de KO-Mas e WT adulto. Nos animais KO-Mas observou-se uma maior quantidade de fibras colágenas, coradas pelo tricrômico de Gomori, entre os cardiomiócitos (FIGURA 3b).

Nos neonatais, a coloração com o tricrômico de Gomori mostrou um tecido cardíaco com células dispostas em um corte longitudinal com núcleo centralizado. As células musculares e outras estruturas apresentam-se coradas em vermelho e o tecido conjuntivo em azul, principalmente ao redor dos cardiomiócitos e vasos (FIGURA 4). Nesta figura pode-se observar que o tecido cardíaco de KO-Mas apresenta um maior número de células que o do WT (FIGURA 4b). Esta diferença também pode ser observada quando somente os núcleos do miocárdio e válvulas cardíacas desses animais foram imunolocalizados e observados em microscopia confocal (FIGURA 5).

Com o objetivo de evidenciar melhor a organização das fibras colágenas presente nos tecidos cardíacos foi utilizado a técnica de Picrosirius. A análise a partir dessa técnica foi realizada através da microscopia de polarização (Junqueira *et al.*, 1979, Montes & Junqueira, 1991). O sirius red é capaz de aumentar o grau de birrefringência do colágeno durante a reação. Assim, quando o tecido contendo colágeno é observado à microscopia de polarização, as diferentes fibras assumem cores variáveis de acordo com a intensidade de birrefringência e espessura das fibras. Isso nos permite analisar qualitativamente a disposição e composição das fibras colágenas que constituem a membrana basal e matriz extracelular dos tecidos. Com esta técnica pode-se observar

melhor as fibras colágenas ao redor das células e no espaço perivascular do tecido cardíaco de animais KO-Mas e WT (FIGURA 6). Espaços em preto observados entre as fibras, mostradas em vermelho, foram classificados como células cardíacas, células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. O tecido cardíaco dos animais KO-Mas adulto apresentou maior quantidade de fibras colágenas, principalmente nas válvulas atrioventriculares quando observadas em microscopia de polarização (FIGURAS 6b e 6d). Nos tecidos de neonatos, não foi permitida uma análise qualitativa quanto à composição de fibras colágenas utilizando esta técnica (dados não mostrados), pois nesta fase as fibras colágenas ainda são muito finas e em menor quantidade ao redor das células, não se dispondo, talvez, de forma paralela para assumir uma característica birrefringente e serem observadas no microscópio de polarização.

Apesar das técnicas histoquímicas utilizadas terem demonstrado qualitativamente que os componentes do tecido conjuntivo apresentam diferença quanto ao padrão de marcação entre os tecidos comparados, a técnica de imunofluorescência foi utilizada para uma melhor análise qualitativa e quantitativa da expressão de proteínas específicas da MEC (colágeno I, III, VI e fibronectina) de tecido cardíaco de animais KO-Mas comparados com WT. A intensidade de fluorescência relativa a estas proteínas foi medida através do programa Image Tool 2.0. Foram obtidas as médias e desvio padrão da expressão de colágenos I, III, VI e fibronectina de WT e KO-Mas.

A técnica de imunofluorescência indireta permitiu a observação específica das regiões marcadas pelo anticorpo contra colágeno I (FIGURAS 7,8 e 9) A marcação ocorreu na MEC do tecido ao redor dos cardiomiócitos (FIGURA 7) e também dos vasos sanguíneos onde ele irradia-se para dentro dos espaços entre as células do miocárdio (FIGURA 8). Além disso, muitas células mostraram marcação intracelular positiva sugerindo que estas células estão sintetizando ativamente colágeno I. A marcação intracelular positiva é evidente em muitas células do tecido conjuntivo das válvulas atrioventriculares (FIGURA 9). A marcação em tecidos de KO-Mas foi significamente maior do que a observada em tecidos de WT. Estas diferenças foram observadas nos animais adultos e neonatos.

Nas regiões marcadas pelo anticorpo contra colágeno III, a marcação também ocorreu na MEC do tecido ao redor dos cardiomiócitos, dos vasos sanguíneos e nas válvulas atrioventriculares (FIGURAS 10,11 e 12). No tecido de KO-Mas adulto, o colágeno III ao redor das células do miocárdio mostra-se desorganizado (FIGURA 10d). As válvulas atrioventriculares são formadas de tecido conjuntivo revestido externamente por células endoteliais (FIGURA 12c e 12d). Nesta região, a expressão de colágeno III se dá de forma difusa nos neonatos localizando-se em toda a válvula e mais localizada nos animais adultos. A marcação intracelular positiva é evidente em muitas células do tecido conjuntivo das válvulas. A marcação em tecidos de KO-Mas foi significativamente maior do que a observada em tecidos de WT. Estas diferenças foram observadas nos animais adultos e neonatos.

Na marcação de colágeno I e III foram observadas algumas áreas circulares fortemente marcadas no miocárdio dos animais KO-Mas (FIGURAS 7 e 10). Para um melhor detalhamento de onde estaria esta marcação, foi realizada uma marcação do colágeno III juntamente com a miosina cardíaca e núcleo (FIGURA 13). A marcação circular mostrou-se dentro da célula ao redor do núcleo, mostrando aumento da síntese ou deficiência na degradação destes colágenos nos animais KO-Mas.

A técnica de imunofluorescência indireta permitiu a observação específica das regiões marcadas pelo anticorpo contra fibronectina (FIGURAS 14 e 15). A marcação ocorreu na MEC do tecido ao redor das células cardíacas e nas válvulas atrioventriculares. Na região de válvulas, a expressão de fibronectina se dá de forma mais localizada principalmente nos locais de inserção com o endocárdio (FIGURA 15). A marcação em tecidos de KO-Mas foi significativamente maior do que a observada em tecidos de WT. Estas diferenças foram observadas nos animais adultos e neonatos.

Interessantemente, ao contrário do que observamos nos resultado de Colágeno I, III e fibronectina, o colágeno VI apresentou-se em menor quantidade nas regiões do coração de animais KO-Mas, marcadas pelo anticorpo contra colágeno VI, quando comparados ao controle (FIGURAS 16 e 17). A marcação ocorreu na MEC do tecido ao redor das células cardíacas e na região de válvulas onde a expressão de colágeno VI se dá de forma mais localizada principalmente nos locais de inserção com o endocárdio (FIGURA 17).

As diferenças na expressão das proteínas analisadas que foram encontradas no miocárdio e nas válvulas cardíacas dos animais KO-Mas não foram observadas nos átrios de nenhum desses animais quando comparados com o controle (FIG 18).

Como já foi relatado, poucos estudos tem sido desenvolvido em relação a mudanças na expressão do colágeno VI em modelos de hipertrofia, fibrose, hipertensão, etc. Com isso foi avaliado, neste estudo, a expressão de colágeno VI em regiões específicas do coração em um modelo de hipertrofia induzido pelo isoproterenol em camundongos C57BL/6J. O isoproterenol é um β -agonista que induz hipertrofia cardíaca (Frans *et al.*, 2001). O tratamento com o isoproterenol induziu hipertrofia ventricular (FIGURA 22A). A técnica de imunofluorescência indireta permitiu a observação específica das regiões marcadas pelo anticorpo contra colágeno VI. Nenhuma diferença quantitativa foi observada na expressão de colágeno VI no miocárdio e nas válvulas atrioventriculares de animais tratados com isoproterenol comparados ao controle (FIGURA 19).

Todas as análises e resultados relacionados com os colágenos I, III, VI e fibronectina em corações de animais KO-Mas e WT e no modelo de hipertrofia induzida pelo isoproterenol, foram observadas nos ventrículos, direito e esquerdo e nas válvulas atrioventriculares, tricúspide e mitral.

Neste estudo, também foi avaliado a morfologia e ultraestrutura da MEC e dos cardiomiócitos de animais KO-Mas através da microscopia eletrônica de transmissão. Na micrografia é possível observar várias estruturas do cardiomiócito, dentre elas o acúmulo de mitocôndrias (eletrodensas e ricas em cristas) entre as miofibrilas e os componentes dos sarcômeros que aparecem nitidamente. Não foi observada nenhuma alteração grosseira na ultraestrutura dos cardiomiócitos de KO-Mas (FIGURA 20). A MEC não ficou bem fixada e por isso suas estruturas não puderam ser analisadas com clareza.

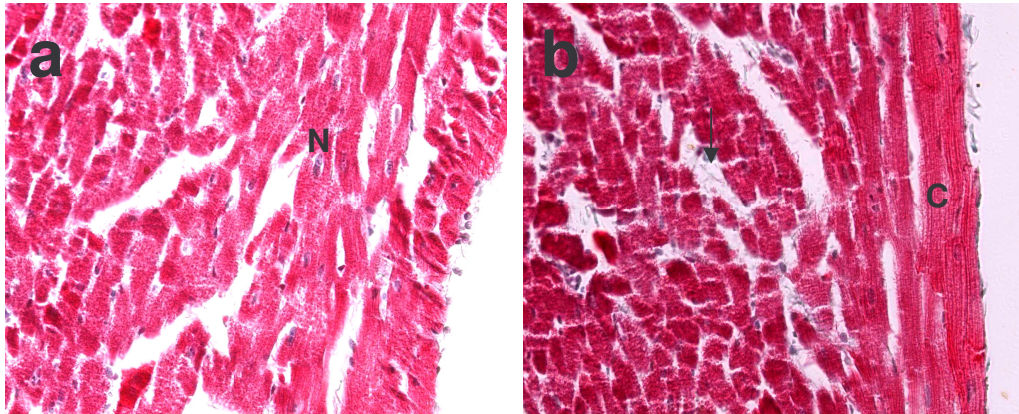


FIGURA 3 - Corte histológico cardíaco corado pelo tricrômico de gomori. Os tecidos cardíacos dos animais WT (**a**) e KO-Mas (**b**) adultos apresentaram células alongadas com estriações transversais (**C**) e núcleo centralizado (**N**). A **seta** mostra o tecido conjuntivo nos espaços entre os cardiomiócitos.

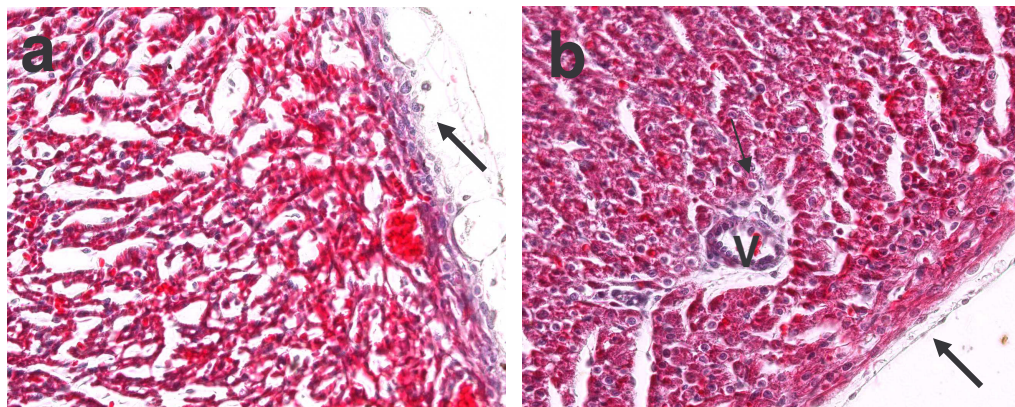


FIGURA 4 - Corte histológico cardíaco corado pelo tricrômico de gomori. Os tecidos cardíacos dos animais WT (**a**) e KO-Mas (**b**) neonatos apresentaram células em corte longitudinal e núcleo centralizado (**seta fina**). As **setas grossas** mostram o tecido conjuntivo no epicárdio . Fibras colágenas circundam o vaso (**V**). O tecido cardíaco do KO-Mas parece apresentar maior número de células.

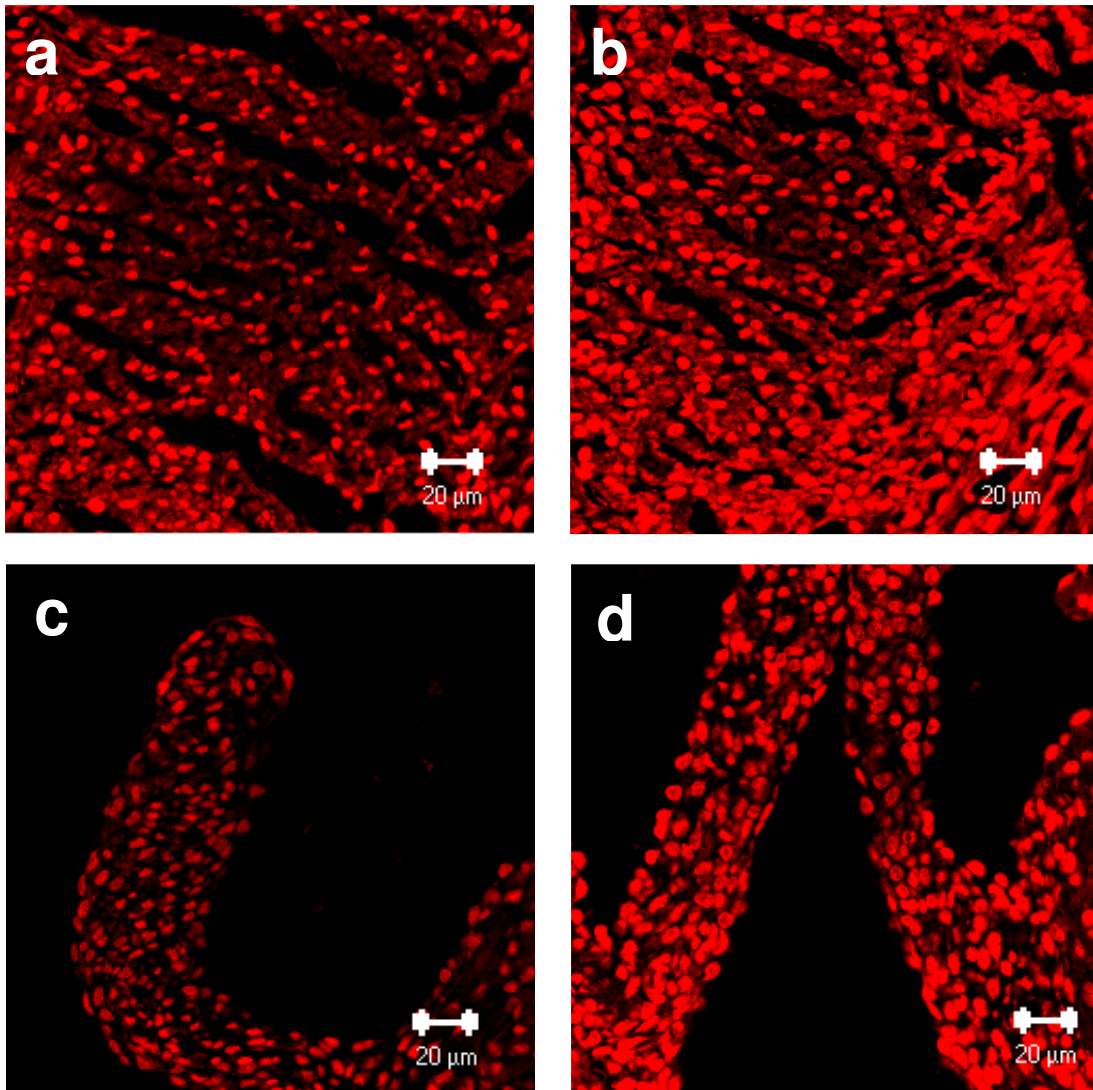


FIGURA 5 - Imunolocalização de núcleos em ventrículo e válvula de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (ventrículo esquerdo de WT neonatal); **b** (ventrículo esquerdo de KO-Mas neonatal) **c** (válvula mitral de WT neonatal); **d** (válvula mitral de KO-Mas neonatal). Observação do aumento do número de células nos KO-Mas.

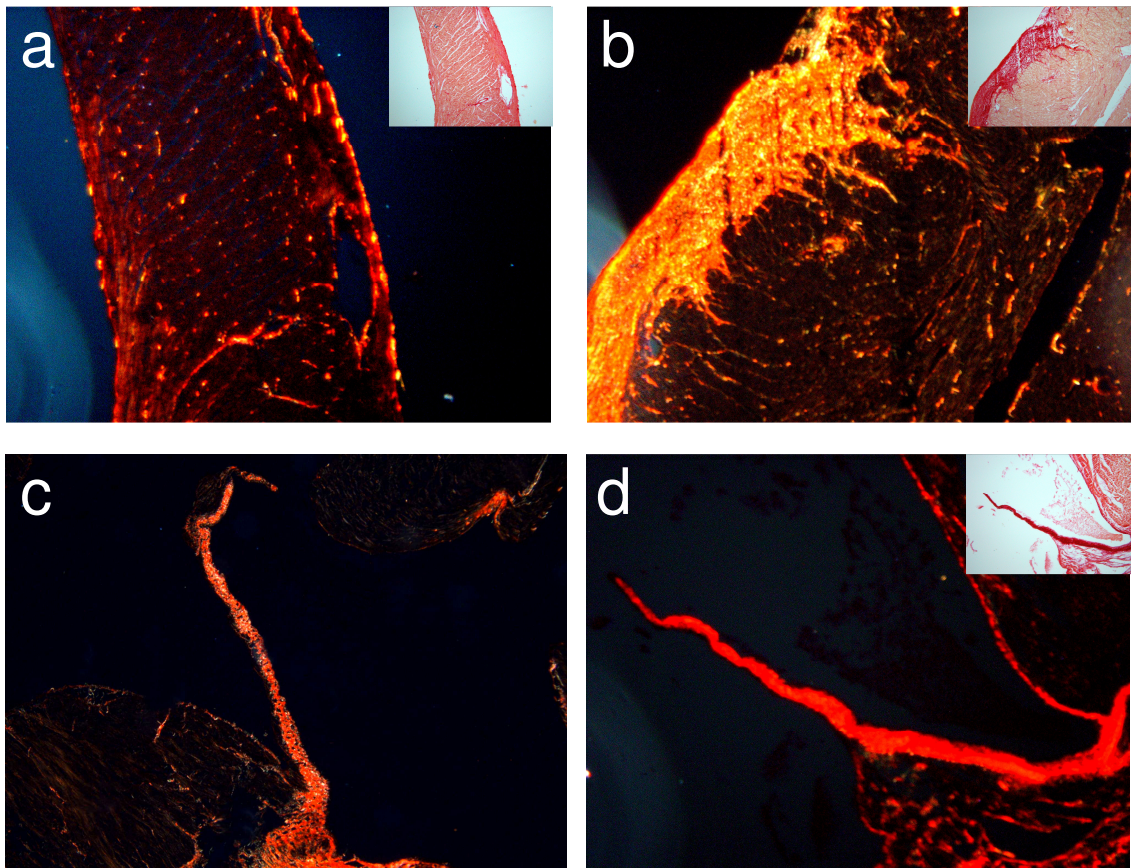


FIGURA 6 – Cortes histológicos cardíaco corados com picrosirius e observados em microscopia de polarização. **(a)** ventrículo esquerdo WT adulto; **(b)** ventrículo esquerdo KO-Mas adulto; **(c)** válvula atrioventricular WT adulto; **(d)** válvula atrioventricular KO-Mas adulto. As fibras colágenas estão coradas em vermelho e/ou amarelo de acordo com a intensidade de birrefringência e espessura das fibras. Observam-se regiões em preto ocupadas por outras estruturas que não fibras colágenas. As imagens inseridas no canto superior direito das figuras mostram o mesmo tecido observado com microscopia de luz.

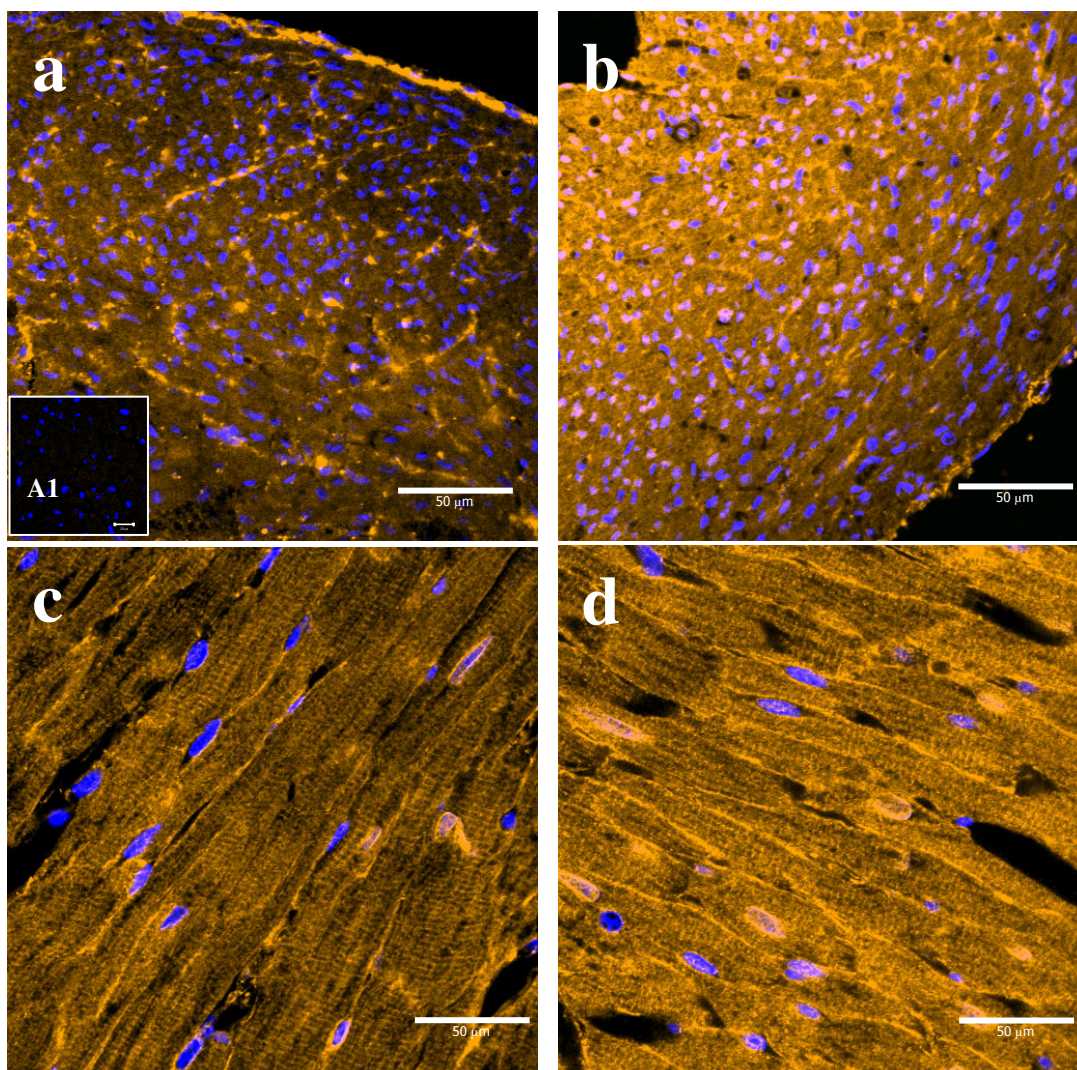


FIGURA 7 - Imunolocalização de colágeno I em ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato) **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto); **a1** (controle do anticorpo secundário). Os núcleos foram marcados com Iodeto de propídio e coloridos em azul.

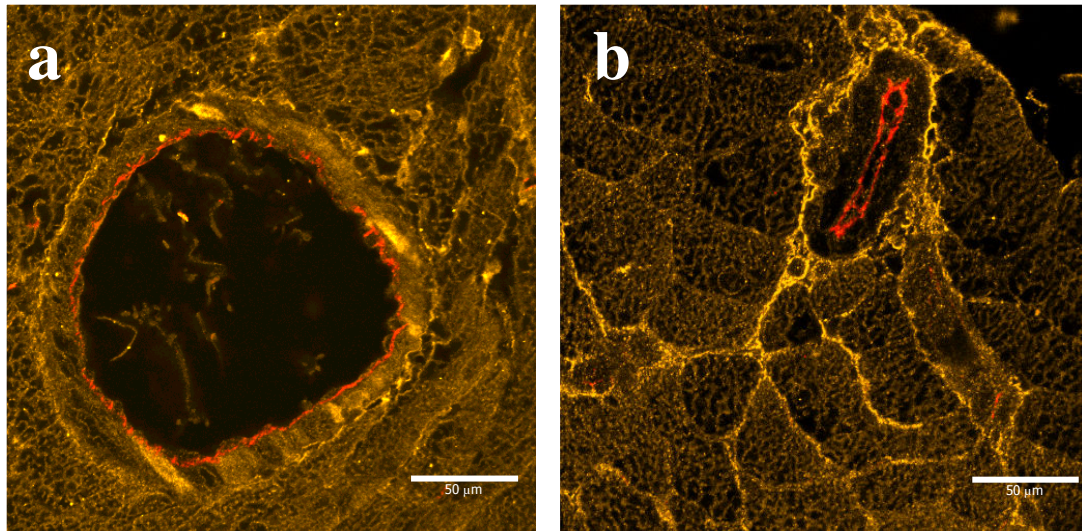


FIGURA 8 - Imunolocalização de colágeno I perivascular de KO-Mas e WT (*) observados em microscopia confocal, **a** (WT adulto) e **b** (KO-Mas adulto). As células endoteliais foram marcadas com PECAM (vermelho).

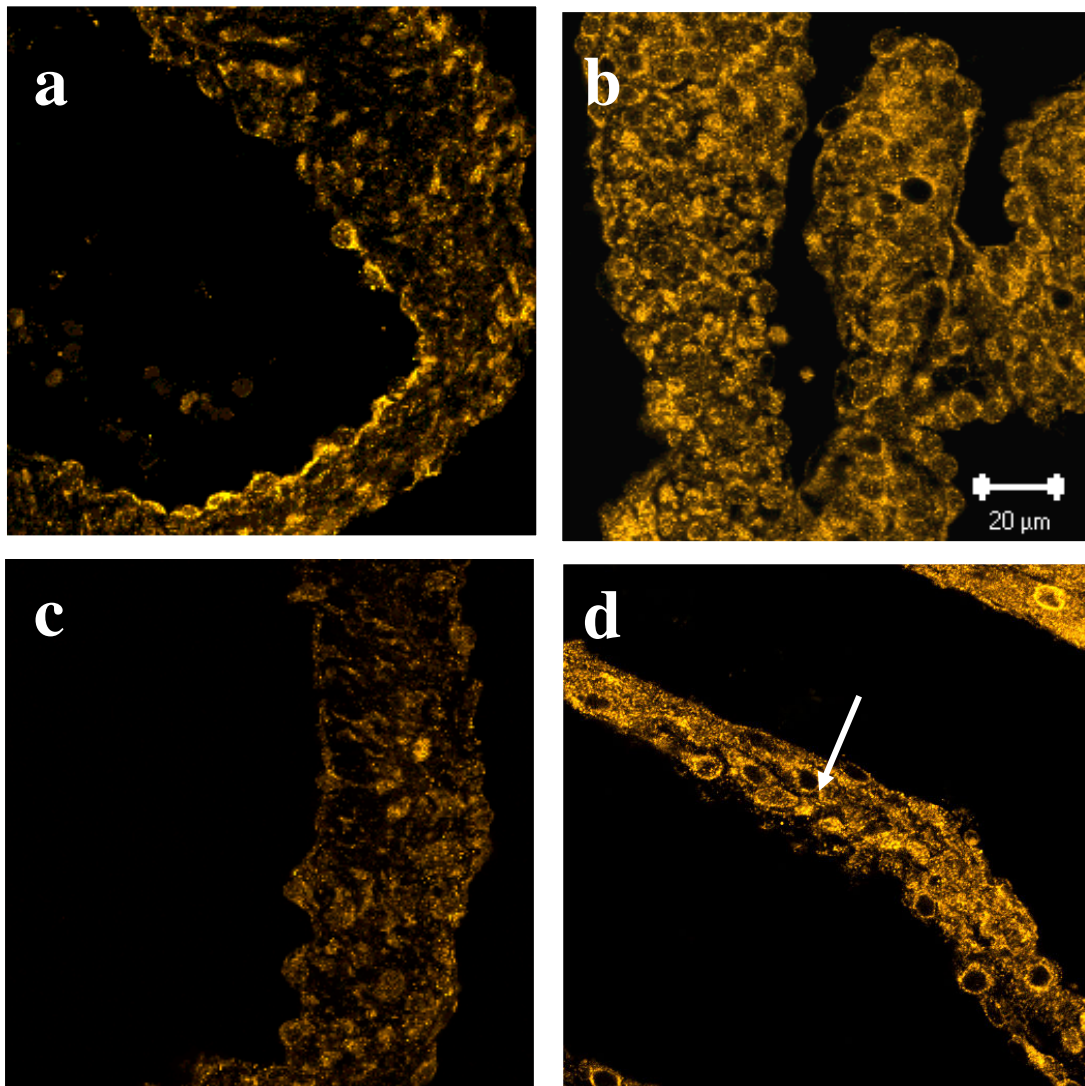


FIGURA 9 - Imunolocalização de colágeno I observado em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). A marcação intracelular positiva é evidente em muitas células do tecido conjuntivo das válvulas (**seta**).

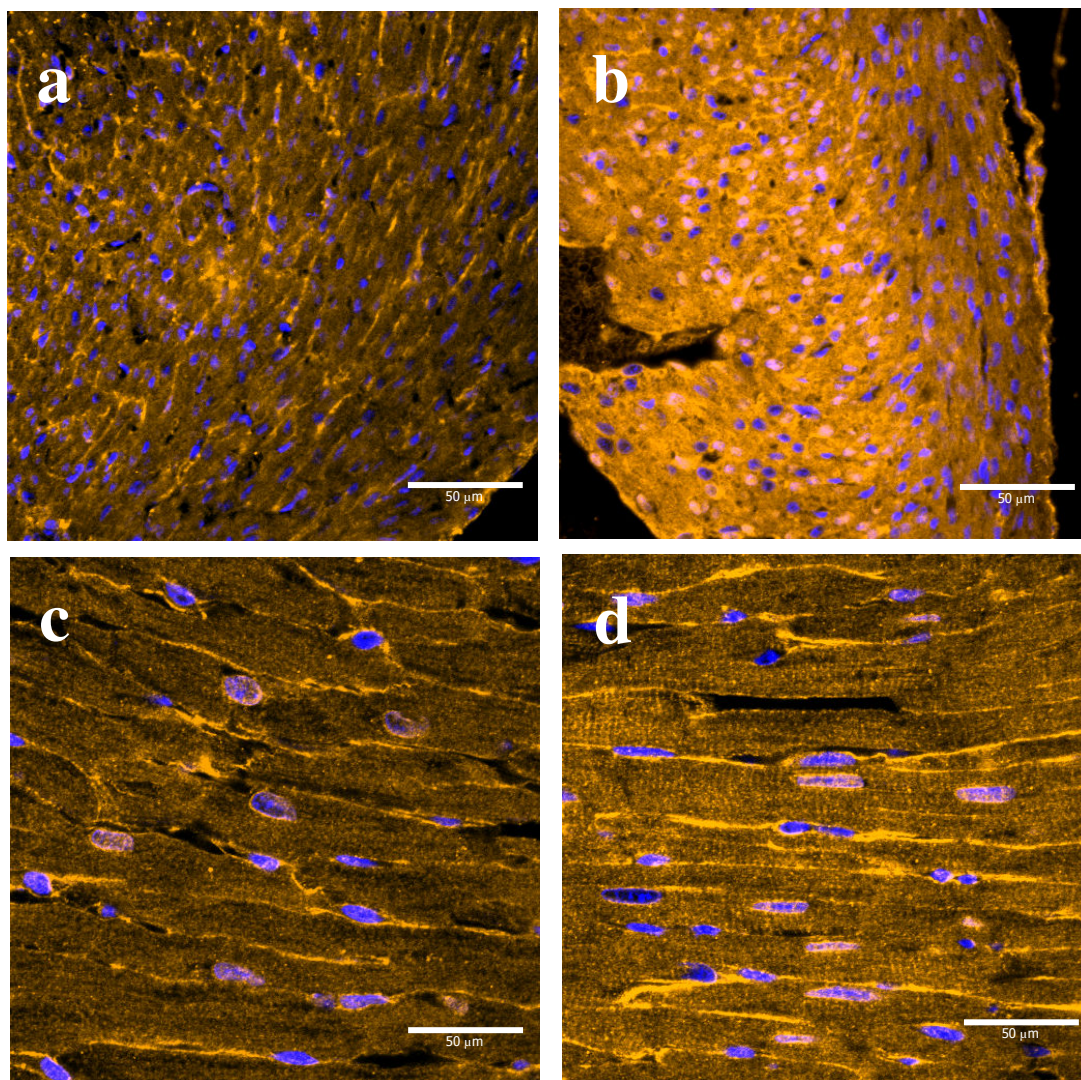


FIGURA 10 - Imunolocalização de colágeno III em ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato);**c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). Os núcleos foram marcados com iodeto de propideo e coloridos em azul.

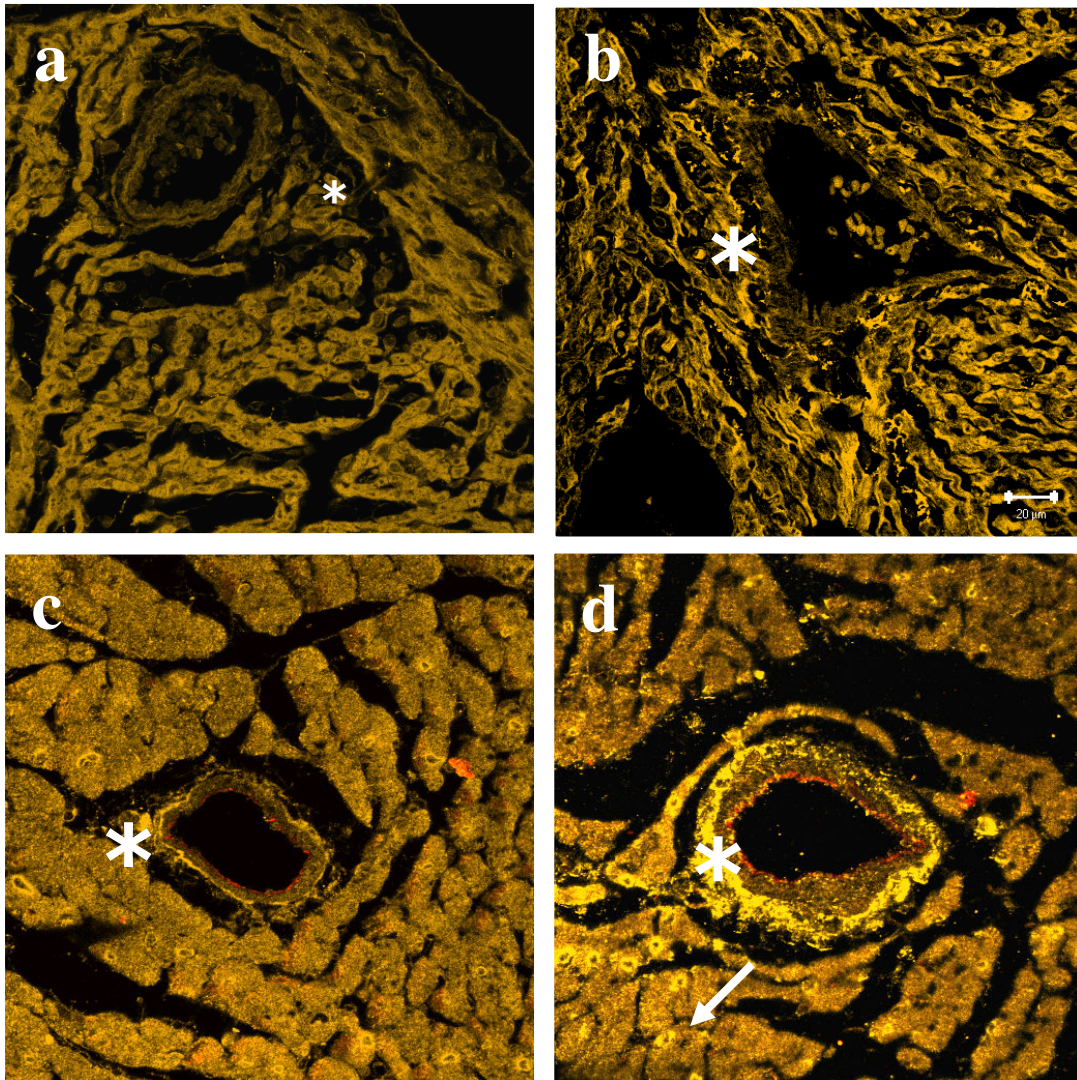


FIGURA 11 - Imunolocalização de colágeno III perivascular de KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). As células endoteliais foram marcadas com PECAM (vermelho). Nota-se uma intensa marcação do colágeno III ao redor do vaso do KO-Mas (*). Observa-se também, marcação intracelular em algumas células do miocárdio (**seta**).

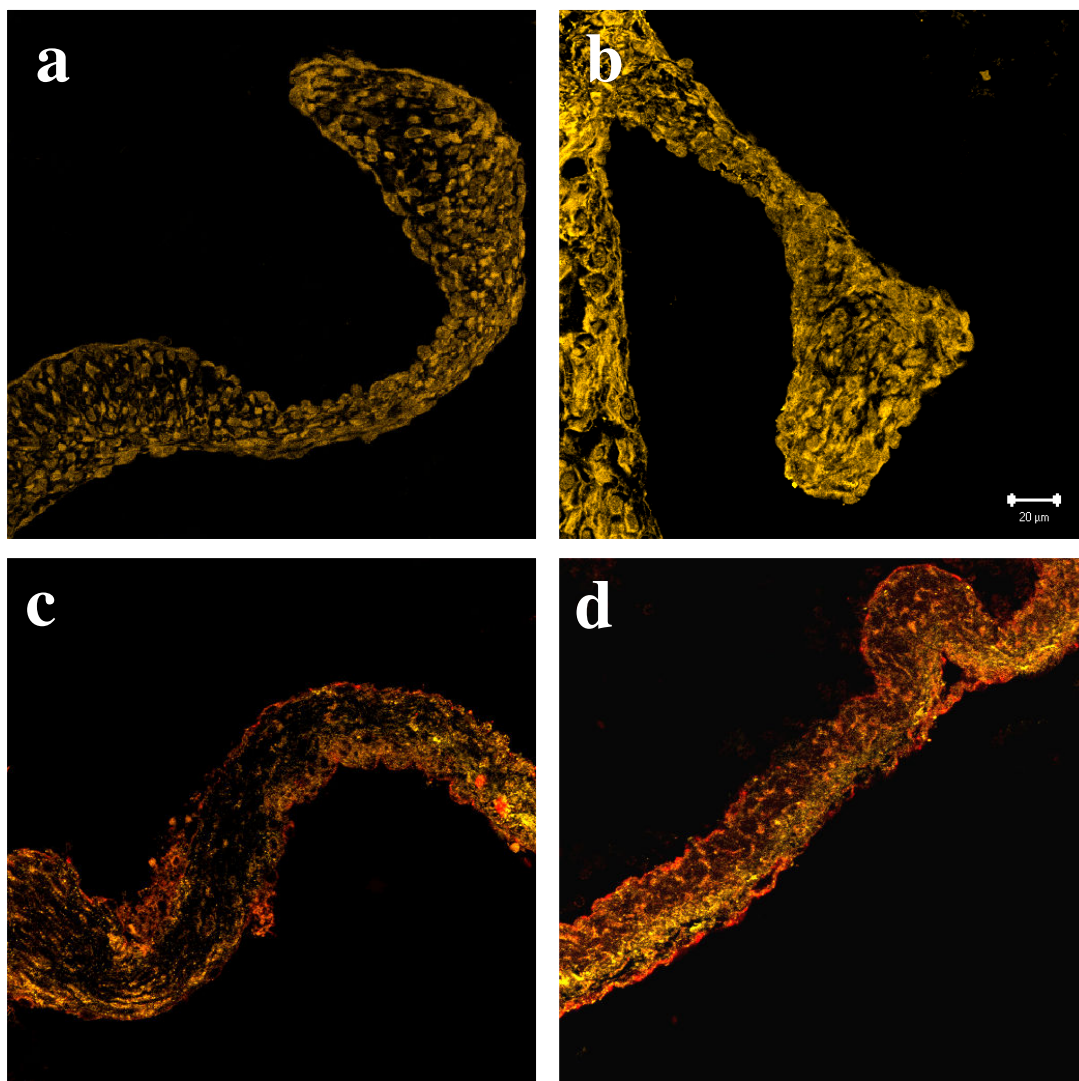


FIGURA 12 - Imunolocalização de colágeno III em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). A marcação em vermelho (**c** e **d**) indica a presença de células endoteliais circundado externamente as válvulas.

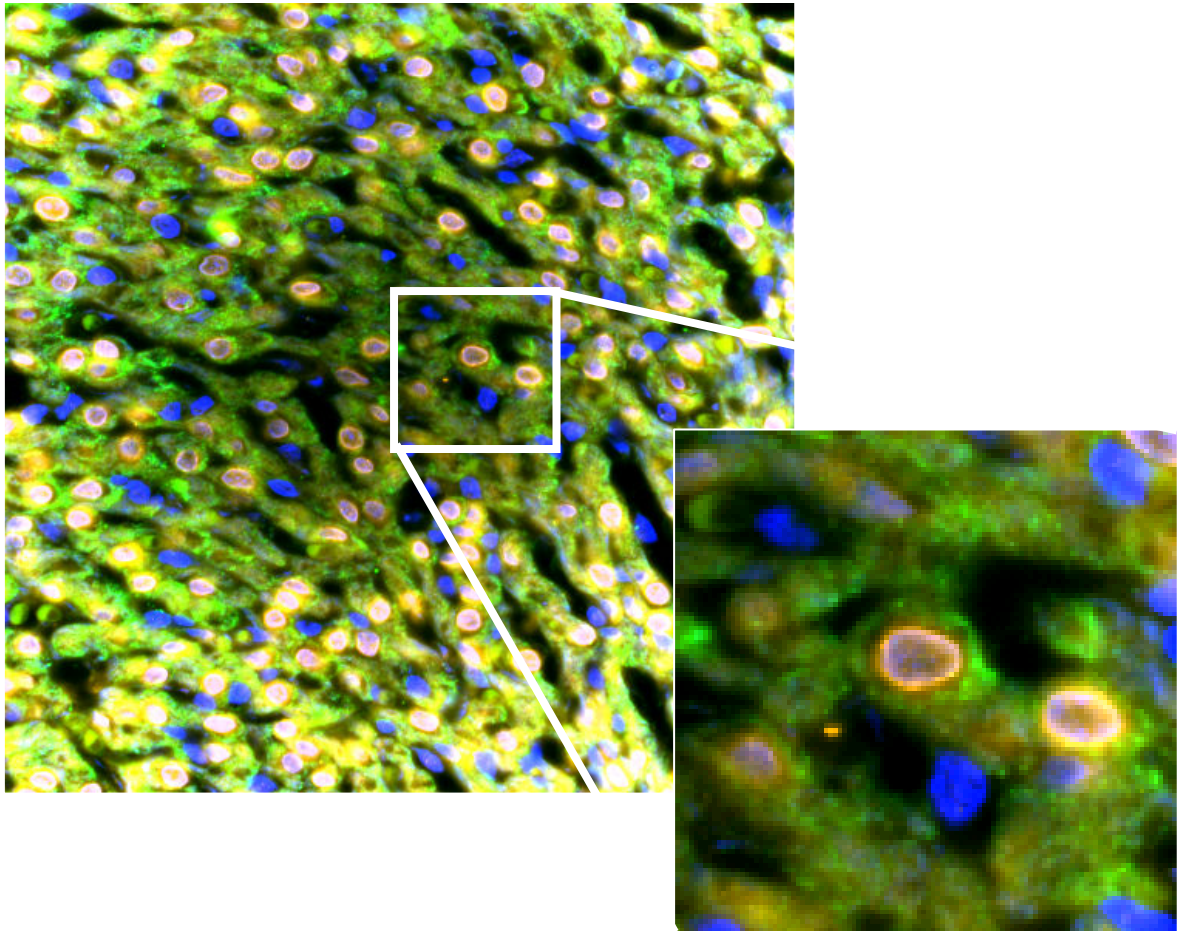


FIGURA 13 - Imunolocalização de colágeno III (amarelo), miosina cardíaca (verde) e núcleo (azul) em ventrículo esquerdo de KO-Mas observado em microscopia confocal. A seta indica a marcação intracelular de colágeno III.

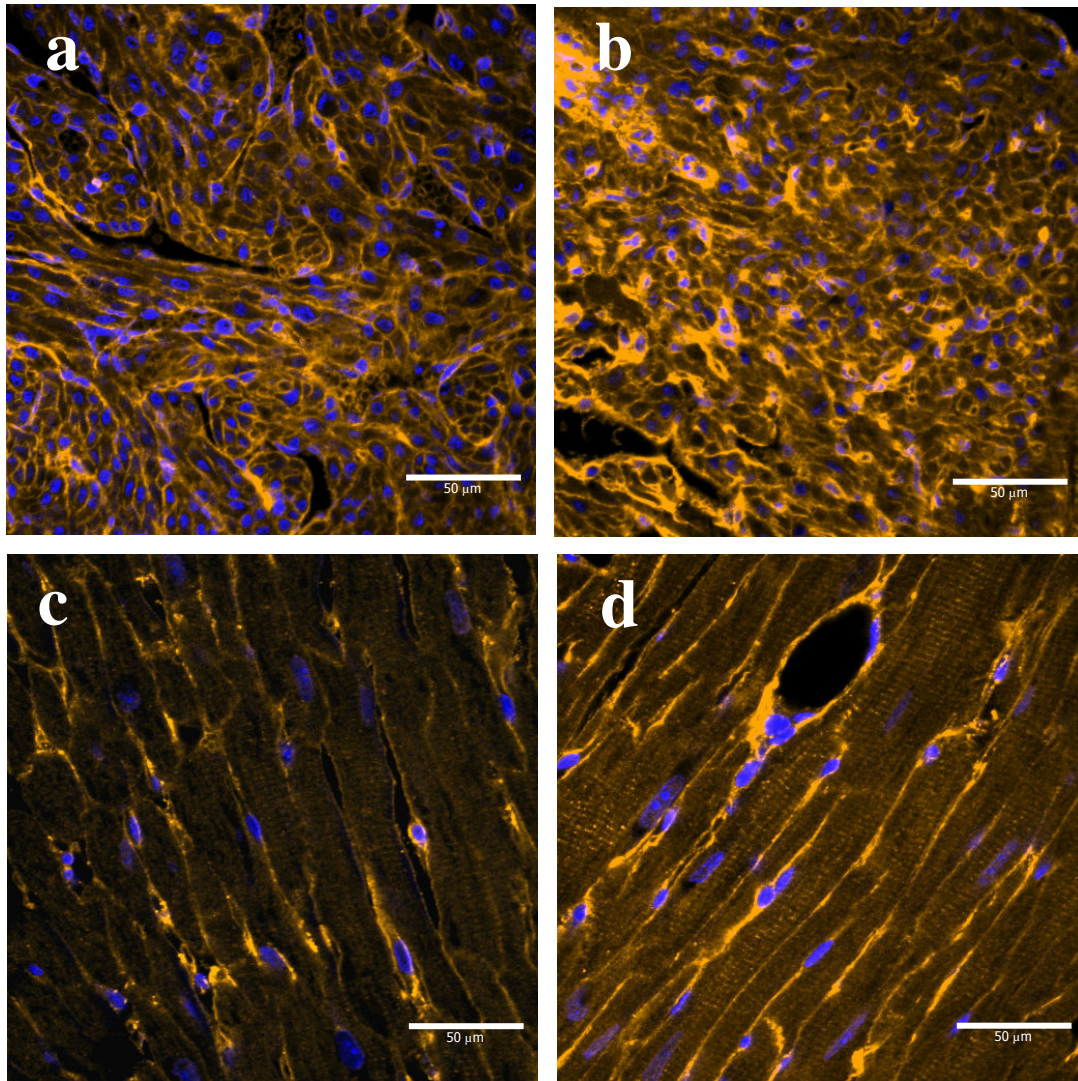


FIGURA 14 - Imunolocalização de fibronectina no ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). Os núcleos foram marcados com iodeto de propídeo e coloridos em azul.

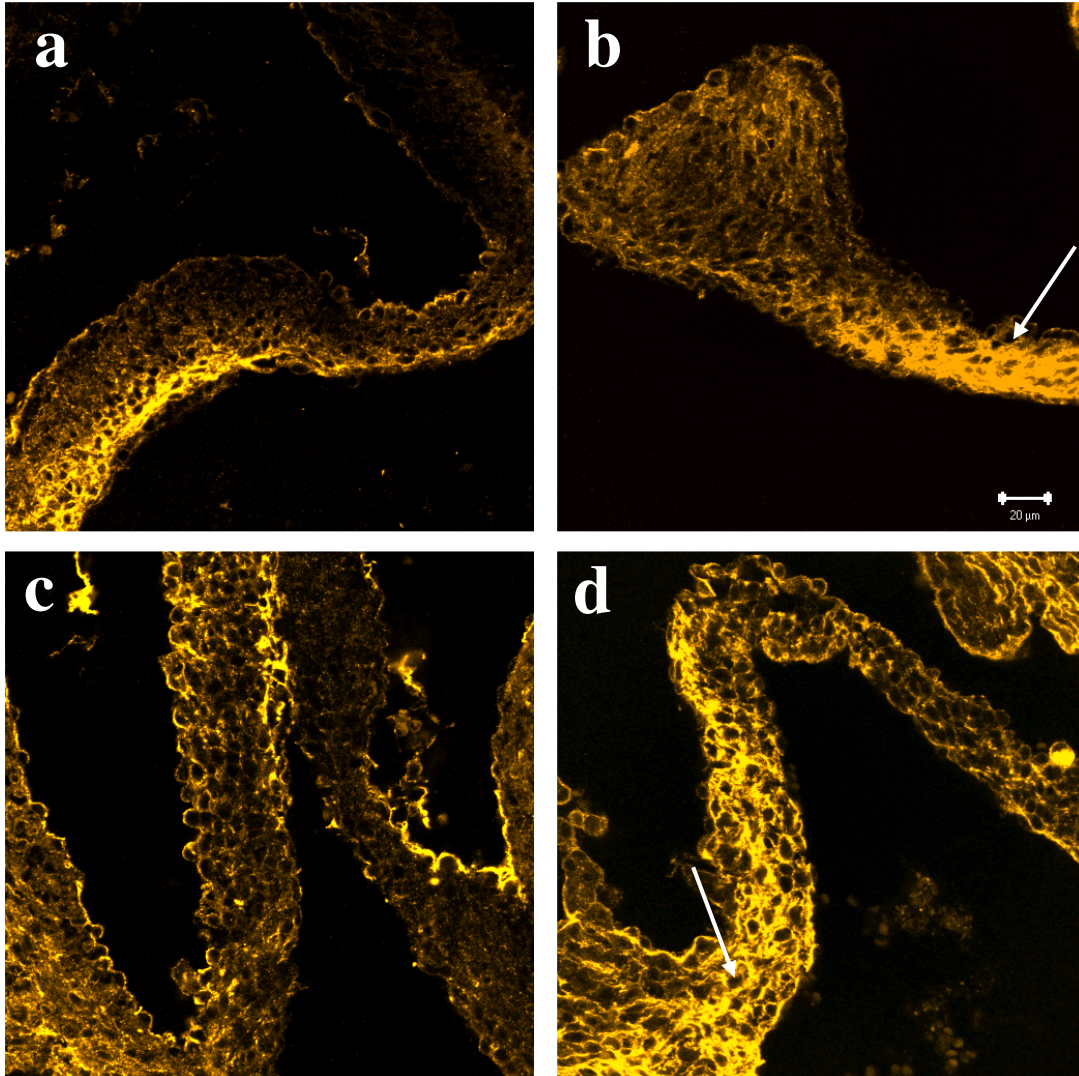


FIGURA 15 - Imunolocalização de fibronectina em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). Na região de válvulas a expressão de fibronectina se dá de forma mais localizada principalmente nos locais de inserção com o endocárdio (**setas**).

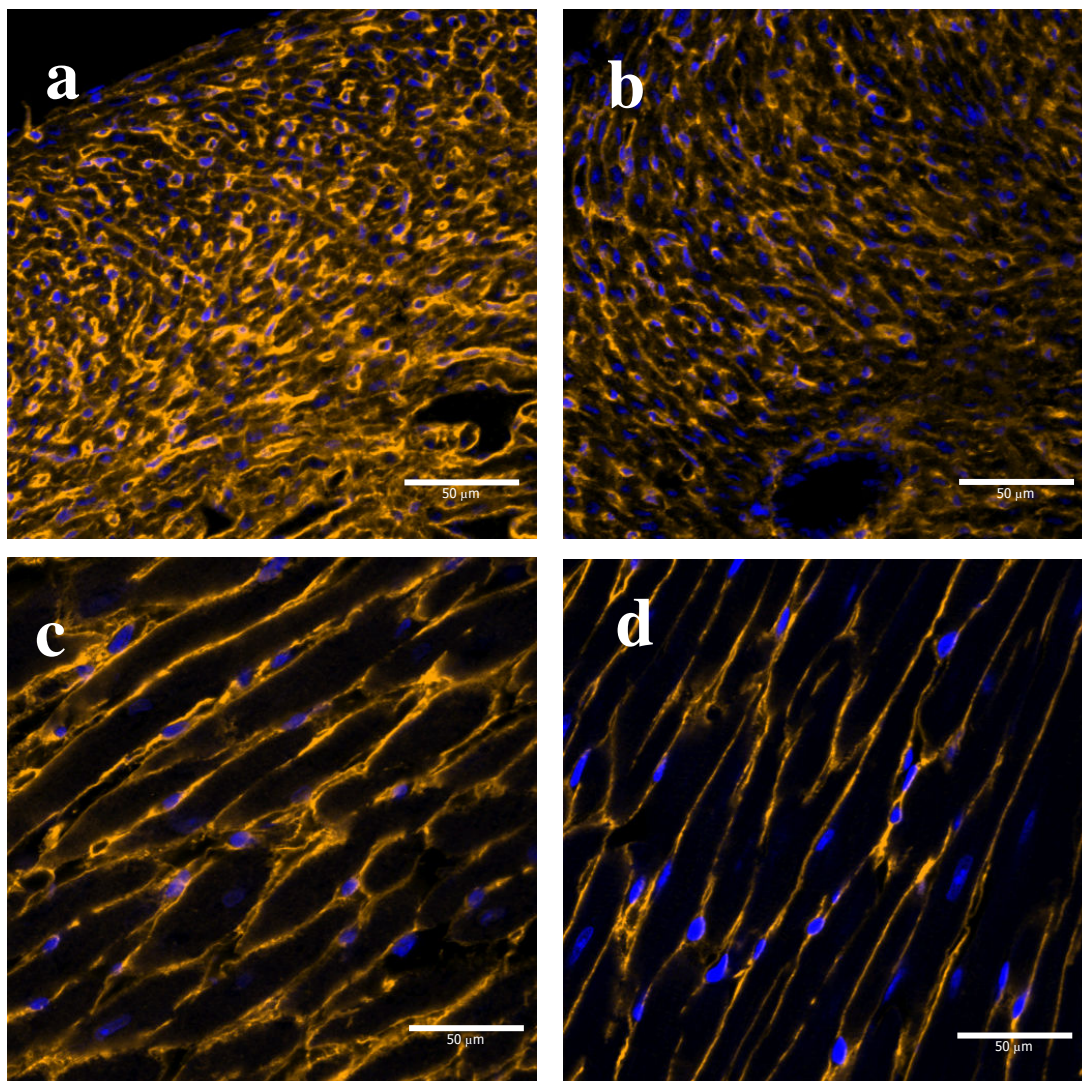


FIGURA 16 - Imunolocalização de colágeno VI no ventrículo esquerdo de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). Os núcleos foram marcados com iodeto de propídeo e coloridos em azul.

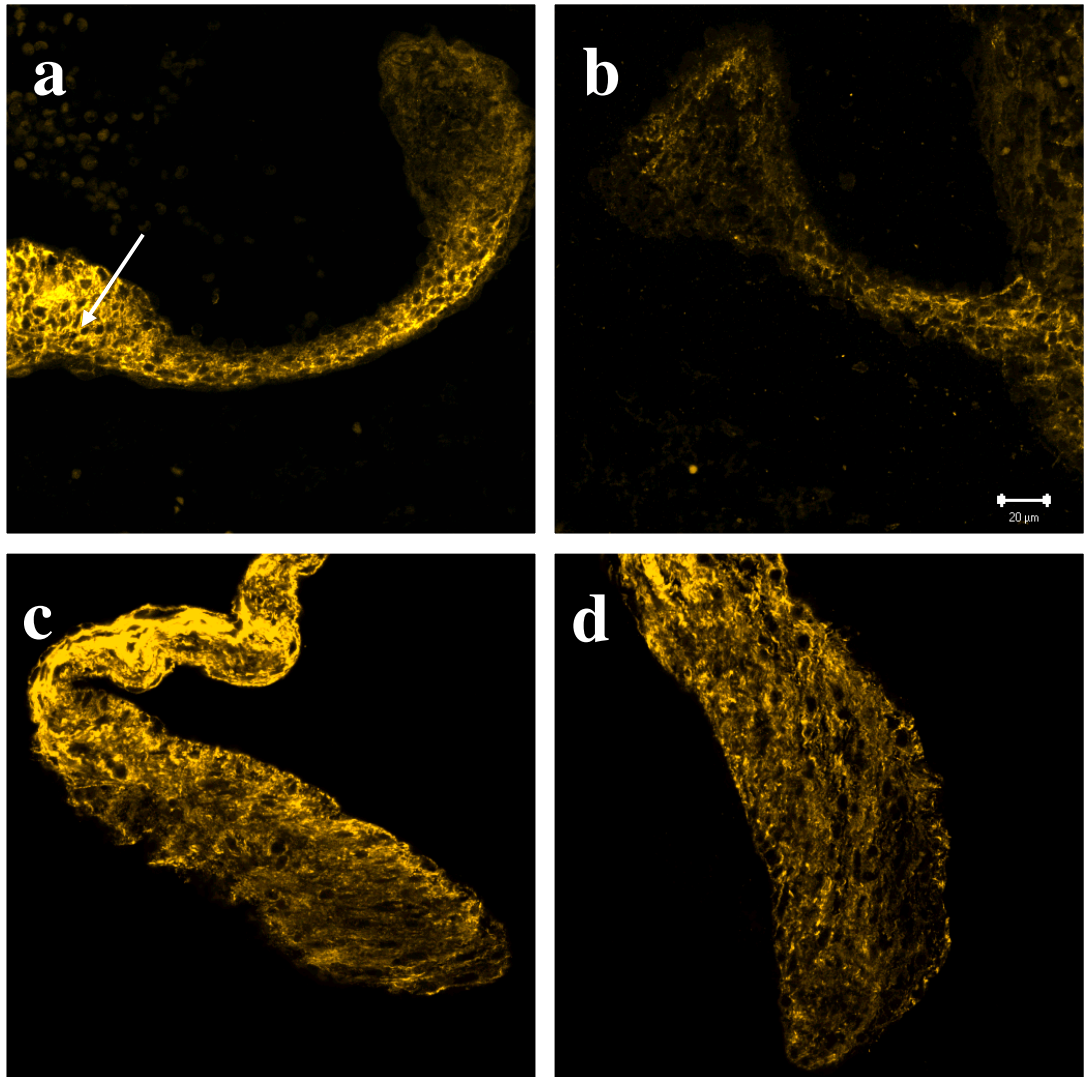


FIGURA 17 - Imunolocalização de colágeno VI em válvulas atrioventriculares de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal. **a** (WT neonato); **b** (KO-Mas neonato); **c** (WT adulto); **d** (KO-Mas adulto). Na região de válvulas a expressão de colágeno VI se dá de forma mais localizada principalmente nos locais de inserção com o endocárdio.

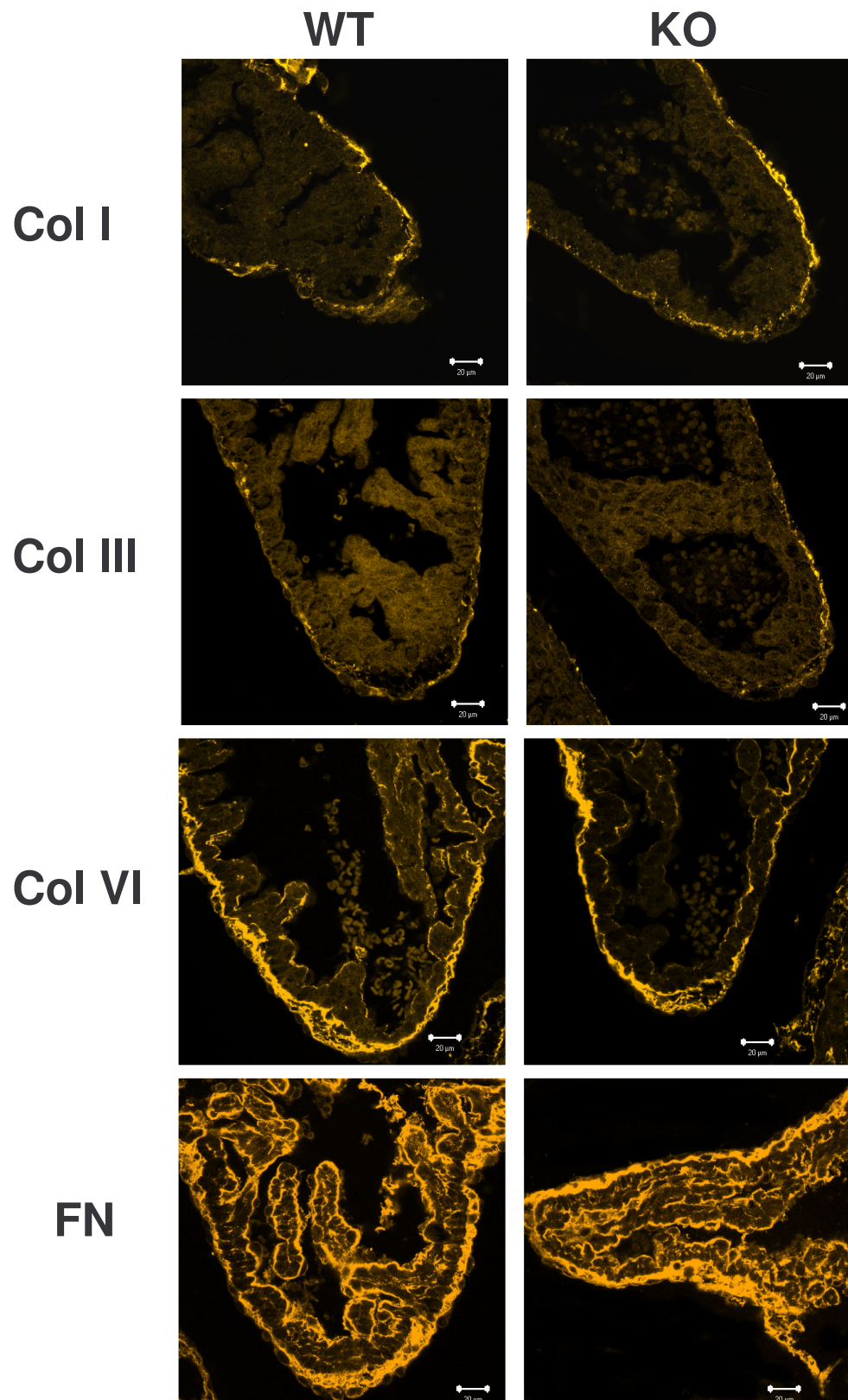


FIGURA 18 - Imunolocalização de colágeno I (Col I), III (Col III), VI (Col VI) e fibronectina (FN) em átrios de animais KO-Mas e WT observados em microscopia confocal.

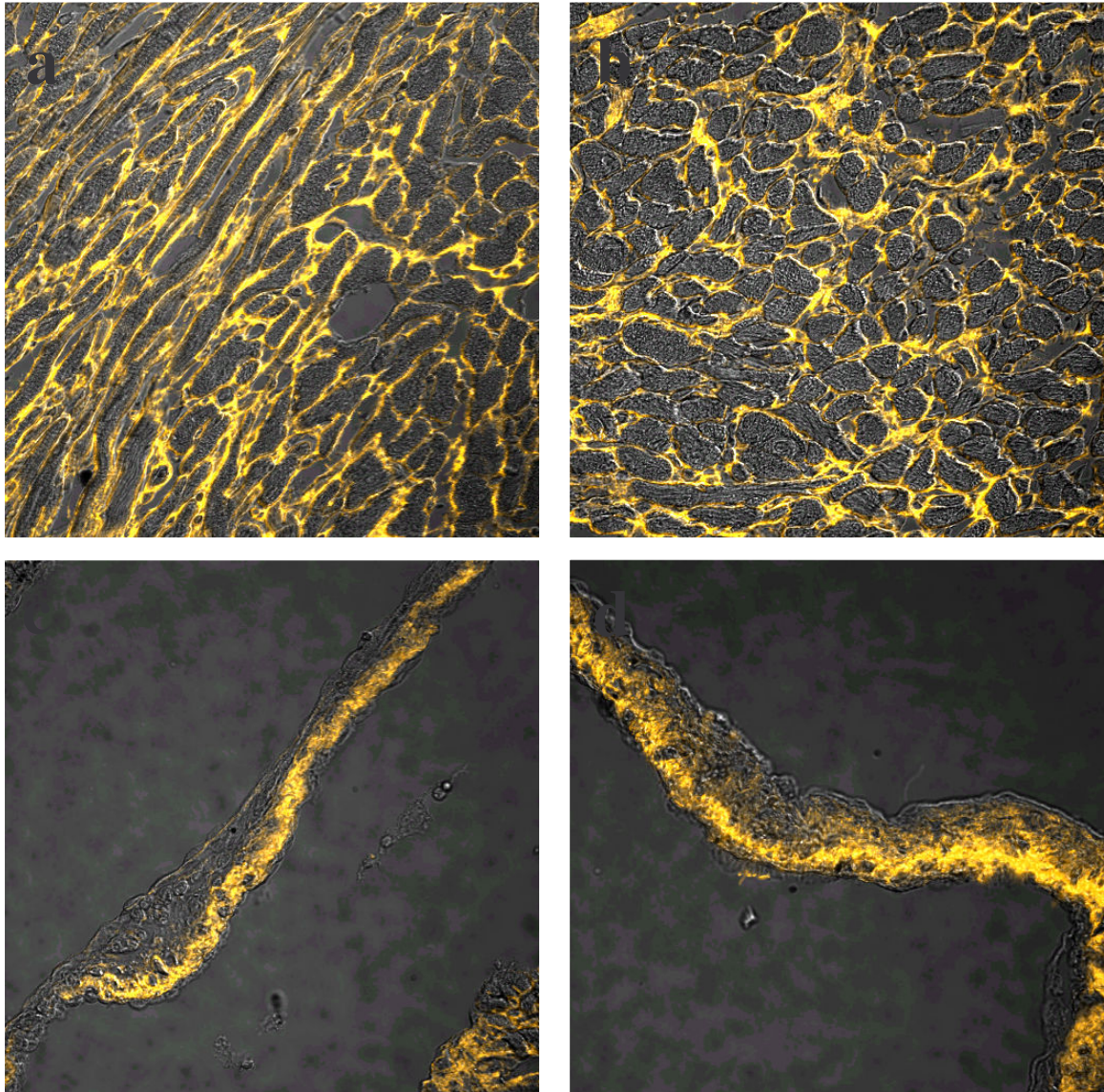


FIGURA 19 - Imunolocalização de Col VI em ventrículo e válvulas atrioventriculares de animais tratados com salina (**a** e **c**) e isoproterenol (**b** e **d**), observados em microscopia confocal.

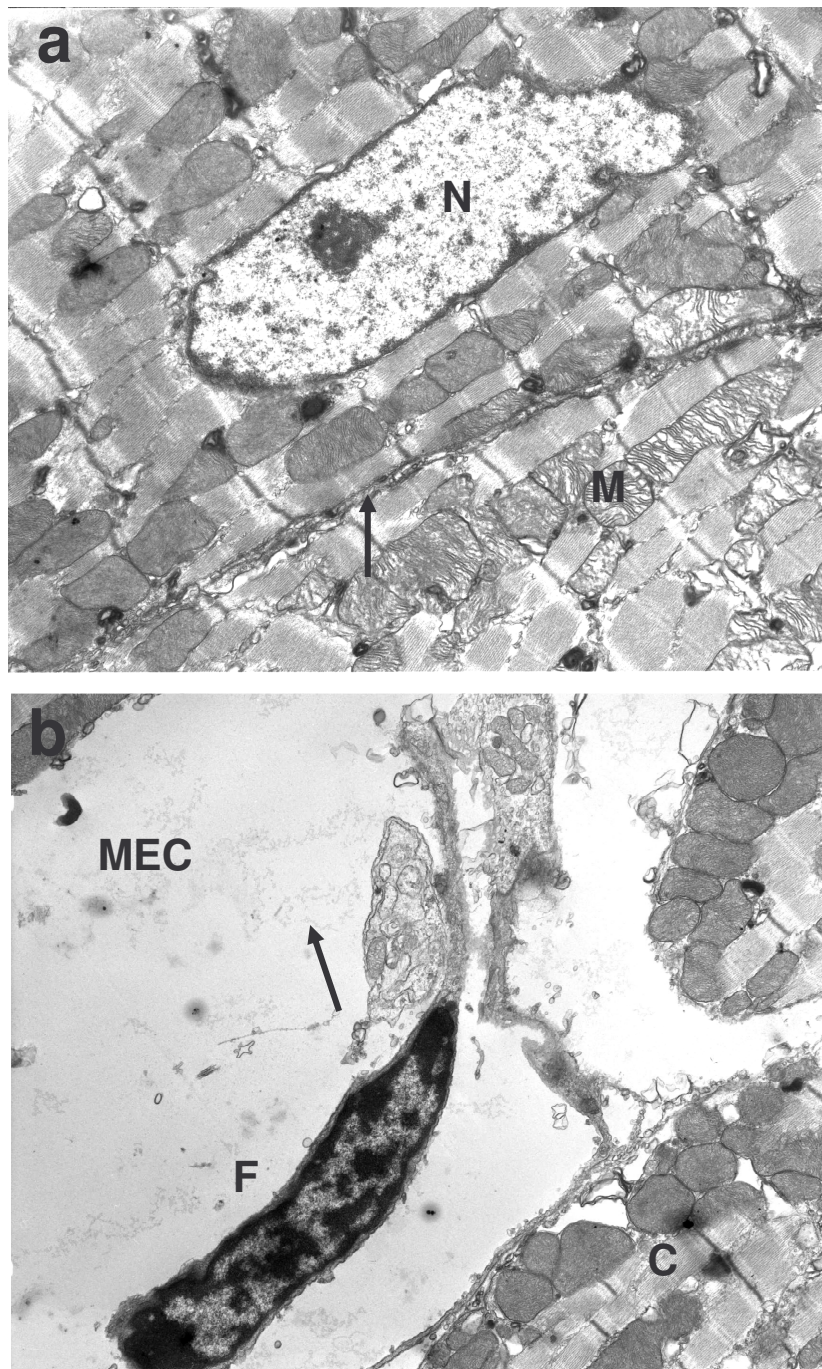


FIGURA 20 – Micrografia eletrônica dentro do coração de animal KO-Mas. **N** (núcleo), **M** (mitocôndria), **MEC** (matriz extracelular), **F** (fibroblasto). A seta da figura 18a indica a matriz extracelular entre dois cardiomiócitos. 18 a : aumento 8.050X e 18b: aumento 6.420X.

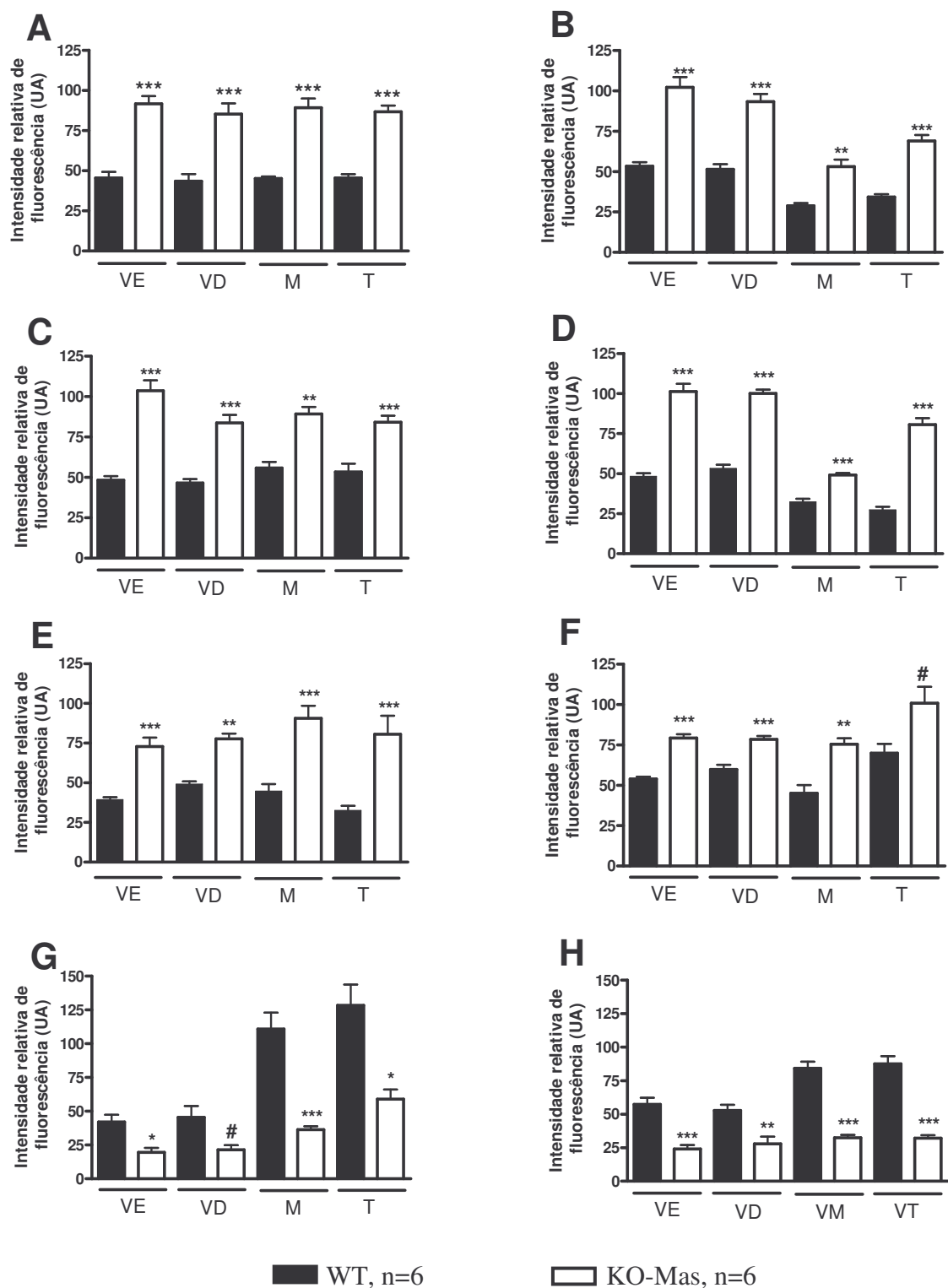


FIGURA 21 – Expressão de proteínas da MEC em corações de KO-Mas e WT. Expressão de colágeno I (A, neonato e B, adulto), colágeno III (C, neonato e D, adulto), fibronectina (E, neonato e F, adulto) e colágeno VI (G, neonato e H, adulto) em ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), válvula mitral (M) e válvula tricúspide (T). Os valores estão expressos com médias \pm EPM. # $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. U.A., Unidade Arbitrária.

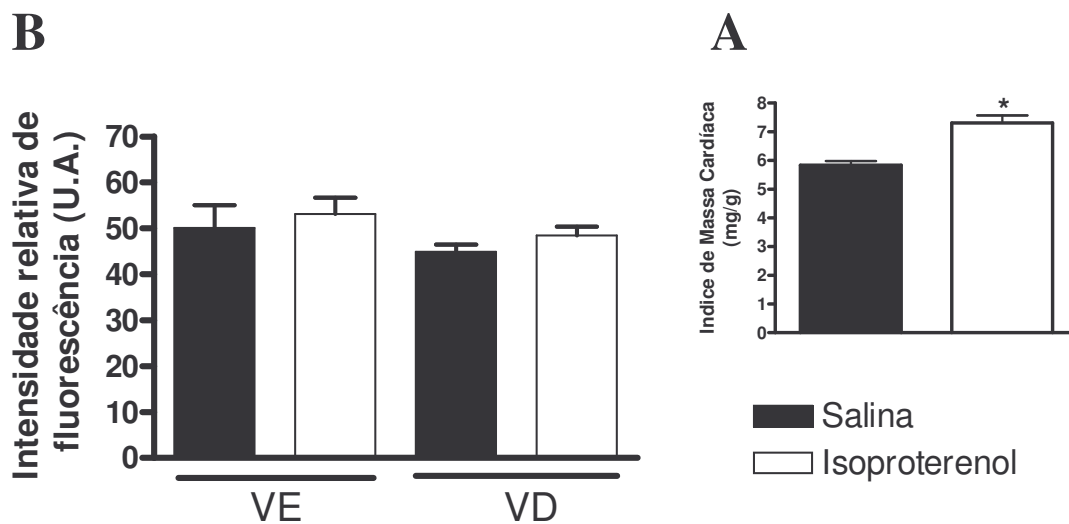


FIGURA 22 - Expressão de colágeno VI em ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) de corações de camundongos C57/BL6J tratados com Isoproterenol (B). Índice de Massa Cardíaca dos camundongos C57/BL6J tratados com Isoproterenol (A). Os dados estão expressos como médias \pm EPM. (U.A.) = unidade arbitrária. * $p < 0,01$.

6.0 Discussão

Neste trabalho, os resultados mostraram que os animais KO-Mas apresentam alterações na expressão de proteínas da matriz extracelular do coração que estão envolvidas no remodelamento cardíaco. Colágeno I, III e fibronectina estão significativamente aumentados nas válvulas atrioventriculares e ventrículos direito e esquerdo. Colágenos I e III também estão aumentados no espaço perivascular desses animais. Essas observações estão de acordo com muitos trabalhos que suportam a evidência de que a Ang II influencia na síntese de colágenos fibrilares e fibronectina (Crabos *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1996; Fielitz *et al.*, 2001), principalmente em disfunções cardíacas, e que a angiotensina 1-7 exerce função contrária, atenuando o remodelamento da rede de colágenos como mostrado por He *et al.*, (2005). Deste modo, se a Ang-(1-7) é incapaz de exercer seus efeitos via receptor Mas, um aumento de proteínas da MEC é esperado.

Este aumento de colágenos da MEC no coração, como relatado em doenças cardíacas hipertensiva, cardiomiopatia isquêmica e cardiomiopatia hipertrófica, levam ao acúmulo de tecido fibroso e contribui para um comprometimento progressivo da função cardíaca (Kawano *et al.*, 2000; Schnee & Hsueh, 2000; Pathak *et al.*, 2001; González *et al.*, 2002; Lijnen & Petrov, 2003). O colágeno fibrilar age como um link entre elemento contrátil de cardiomiócitos adjacentes e como condutores de informações que é necessário para a função da célula. Isto é suportado pela observação de que a interação de fibras colágenas com os cardiomiócitos no coração ocorre em regiões próximas à banda Z, e a ligação é mediada por moléculas das famílias das integrinas (Terracio *et al.*, 1991). No entanto quando há um acúmulo anormal de fibras colágenas, levando à fibrose, a rigidez miocárdial aumenta, comprometendo deste modo, o enchimento diastólico. A contínua acumulação aumenta ainda mais esta rigidez e prejudica o comportamento contrátil e a atividade elétrica (Diez *et al.*, 2001). Desse modo, o aumento desses colágenos fibrilares pode explicar a diminuição da contratilidade encontrada nestes animais KO-Mas.

A observação de que este aumento de colágeno fibrilar miocárdial está presente não somente no ventrículo esquerdo, mas também no ventrículo direito nos animais KO-Mas, corroboram com resultados encontrados em pacientes com hipertensão arterial, onde foi verificada a presença de fibrose miocárdial no

ventrículo esquerdo bem como no direito (Brilla *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1997; Panizo *et al.*, 1995; Varo *et al.*, 2000) sugerindo que não só a hipertensão arterial mas também algum fator humoral produzido sistêmica e/ou localmente, contribue para esta fibrose.

Embora os mecanismos precisos que governam a acumulação de colágeno fibrilar e outras proteínas de matriz em vários modelos de hipertrofia cardíaca ainda não estejam completamente elucidados, a ativação do SRA local ou circulante parece ter uma função dominante com Ang II e aldosterona como mediadores pró-fibróticos e Ang-(1-7) como contrarreguladora deste processo (Loot *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Resultados na literatura indicam que a resposta proliferativa de fibroblastos a Ang II pode ser mediada via fatores de crescimento específicos (TGF β 1), substâncias inflamatórias como PDGF (platelet-derived growth factor) e citocinas, pela osteopontin, endotelina 1, ou por uma combinação desses mecanismos (Schnee & Hsueh, 2000; Bouzeghrane & Thibault, 2002). Fibroblastos cardíacos expostos a Ang II, estimulam uma variedade de funções pro-fibróticas, como a indução de fatores de crescimento, indicando que os fibroblastos cardíacos têm uma crucial função no remodelamento cardíaco induzido pelo SRA. Em vários modelos, o aumento na expressão do mRNA de TGF β 1, precede o aumento na expressão de mRNA de colágenos e fibronectina sugerindo que o TGF β , medeia os efeitos pro-fibróticos da Ang II (Villarreal and Dillmann, 1992; Kim *et al.*, 1995). Tharaux *et al.*, 2000, mostraram que a Ang II induz a expressão do gene para Colágeno I via ativação de MAP/ER Kinase e TGF β 1. Em cultura de fibroblastos humanos observou-se que a Ang II aumentou os níveis de expressão de RNAm de TGF β 1, fibronectina e laminina e aumentou a adesão dos fibroblastos cardíacos ao colágeno (Kawano *et al.*, 2000).

Em adição ao TGF β 1, osteopontin tem sido proposta por mediar os efeitos da Ang II na produção de matriz extracelular em coração humano (Kupfahl *et al.*, 2000). Endotelina-1 também parece mediar efeitos cardíacos da Ang II. Ela é sintetizada por miócitos cardíacos e fibroblastos (Ito *et al.*, 1993) e mostram estimular a síntese de colágeno I e III em células musculares lisas (Rizvi *et al.*, 1996). Em ratos com insuficiência cardíaca crônica, bloqueadores de receptores

de endotelina-1 mostram diminuir a acumulação de colágeno ventricular (Mulder *et al.*, 2000)

Em experimentos *in vitro* usando fibroblastos cardíacos de rato adulto, a Ang II e aldosterona estimularam a síntese de colágenos de uma maneira dose dependente ao mesmo tempo em que a Ang II adicionalmente suprimiu a atividade da metaloproteinase 1, a enzima chave da degradação do colágeno, que sinergicamente leva a acumulação progressiva de colágeno dentro do interstício miocárdial (Brilla *et al.*, 1994).

Atualmente a Ang-(1-7) está sendo alvo de estudos nos seus efeitos anti-fibrotico e anti-hipertrofico. He *et al.*, (2005), observaram uma diminuição dos colágenos I e III em corações de ratos infartados tratados com Ang-(1-7). Em nosso estudo, foi observado um aumento das principais proteínas envolvidas no remodelamento cardíaco, colágenos I, III e fibronectina, em animais KO-Mas sugerindo que a interação Ang-(1-7) – Mas, pode promover importantes efeitos anti-fibróticos no coração. No entanto as vias de sinalização pelas quais este efeito ocorre, ainda não foram totalmente elucidadas. Recentes trabalhos têm apresentado dados que sugerem possíveis mecanismos pelos quais a Ang-(1-7) exerce este efeito. Em cultura de cardiomiócitos e fibroblastos a Ang-(1-7) inibiu diretamente as ações da ang II por alteração de mecanismos de sinalização, onde o pré-tratamento de fibroblastos com Ang-(1-7) inibiu a síntese de colágeno e expressão de RNAm de fatores de crescimento, tais como endotelina-1 e fator inibitório de leucemia (Iwata *et al.*, 2005). Esta ação da Ang-(1-7) em inibir a expressão de fatores de crescimento, pode explicar o número aumentado de células observado nos animais KO-Mas.

Embora os mecanismos responsáveis pelos efeitos inibitórios da Ang-(1-7) não estão completamente esclarecidos, os efeitos podem ser mediados pela liberação de fatores secundários tais como prostanoídes ou óxido nítrico como relatado em células musculares lisas vasculares (Muthalif *et al.*, 1998). Estes fatores são responsáveis por importantes efeitos da Ang-(1-7), como vasodilatação em anéis de aorta de ratos, efeitos hipotensores, antiarritmogênicos (Ferreira *et al.*, 2001) e potencialização da bradicinina (Paula *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2000). Assim, óxido nítrico e prostaglandinas podem ser os mediadores anti-fibróticos da Ang-(1-7), visto que trabalhos prévios mostraram que a bradicinina reduz a expressão RNAm de colágenos I, III e fibronectina em cultura

de fibroblastos, provavelmente por vias dependentes de prostaglandinas e óxido nítrico (Kim *et al.*, 1999; Gallagher *et al.*, 1998).

Além disso, uma outra possível via de modulação de proteínas de matriz via Ang-(1-7), pode ser através da regulação da atividade e/ou expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores. Essa hipótese se deve ao fato de que tratamentos com inibidores da ECA e/ou antagonistas do receptor AT₁ diminuem a fibrose cardíaca em modelos de hipertensão independente da diminuição da pressão arterial e estão associados com aumento nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Chappell *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998), sendo possível que este peptídeo seja responsável por seu efeito anti-fibrótico. Além disso, o tratamento com estes antagonistas ou inibidores pode aumentar também os níveis de moléculas de metaloproteinases (Laviade *et al.*, 1998), podendo assim, existir uma relação entre Ang 1-7 e atividade e/ou expressão de metaloproteinases de matriz. O aumento de colágenos fibrilares observado nos animais KO-Mas pode, no entanto, talvez esteja relacionado a um *downregulation* de metaloproteinases de matriz.

Interessantemente, vimos também que colágenos I e III estão aumentados não somente na matriz extracelular cardíaca, mas também intracelularmente. No coração mais da metade do colágeno sintetizado é degradado ainda dentro da célula pelas metaloproteinases, com o restante depositado ou degradado extracelularmente. Este processo que ocorre dentro dos lisossomas ou dentro das cisternas do retículo endoplasmático e do golgi são condições adaptativas do rápido *turnover* de colágeno (Mcanulty & Laurent., 1987). Isto pode ser um indício de que, nos animais KO-Mas, este excesso de proteínas não está sendo suficientemente degradadas intracelularmente pelas metaloproteinases na ausência da ação da Ang-(1-7) via receptor Mas.

Ao contrário dos colágenos fibrilares, nós vimos que os animais KO-Mas apresentam uma significativa diminuição na expressão do colágeno VI. Alguns trabalhos mostram um aumento deste colágeno em modelos de infarto do miocárdio (Kitamura., 2001; Tsuda., 2003). Outro estudo, de cardiomiopatia diabética, tem mostrado um acúmulo de colágeno miocárdial incluindo os tipos I, III e VI, levando a uma fibrose perivascular e intersticial o qual tem sido correlacionada com disfunção cardíaca (Spiro & Crowley, 1993; Mizushige *et al.*, 2000). Porém, nada foi relatado em relação à diminuição desse colágeno e suas

conseqüências em disfunções cardíacas relacionadas ao SRA. Em relação à diminuição do colágeno VI nos animais KO-Mas, estudos mais detalhados em relação à síntese dessa proteína ou de metaloproteinases envolvidas na degradação de colágenos, deverão ser feitos para explicar esta alteração nestes animais.

Com o objetivo de avaliar a participação do colágeno VI no remodelamento cardíaco, frente a modelos experimentais diferente dos já descritos, um modelo de hipertrofia induzido pelo isoproterenol foi utilizado para esta verificação. O isoproterenol é um β -agonista que age aumentando a força e frequência cardíaca. (Frans *et al.*, 2001). Existem algumas evidências de que a resposta trófica à estimulação simpática cardíaca depende do SRA, envolvendo principalmente a Ang II (Nagano *et al.*, 1992). No presente estudo, nenhuma alteração foi observada na expressão do colágeno VI com a administração de isoproterenol, indicando que neste modelo, o colágeno VI não participa do remodelamento pós injúria cardíaca. Isso mostra que a expressão do colágeno VI é variável a diferentes situações patológicas.

Sumarizando, nossos resultados mostram que o receptor Mas exerce importante participação na expressão seletiva de proteínas específicas da MEC no coração. Estudos futuros serão necessários para elucidar a participação deste receptor nos caminhos de sinalização e mecanismos envolvidos na síntese e/ou degradação destas proteínas.

7.0 Conclusões

Após avaliar a expressão de colágenos I, III, VI e fibronectina em corações de camundongos *knockout* para o receptor Mas através da técnica de imunofluorescência e microscopia confocal foi possível verificar:

- A expressão de colágenos I, III e fibronectina estão aumentadas nos ventrículos direito e esquerdo e nas válvulas atrioventricular dos animais KO-Mas.
- A expressão de colágeno VI está diminuída nos ventrículos direito e esquerdo e nas válvulas atrioventricular dos animais KO-Mas.

Estes dados sugerem que o receptor Mas está envolvido na expressão seletiva de proteínas específicas da matriz extracelular no coração. O perfil observado pode contribuir para a disfunção cardíaca observada nestes animais deficientes para o receptor Mas.

8.0 Referências Bibliográficas

- ABDALLA S, LOTHER H, ABDEL-TAWAB AM, QUITTERER U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, 26;276(43):39721-39726, 2001.
- ALENINA N, BADER M, WALTHER T. Imprinting of murin *Mas* Protooncogene is restricted to its antisense RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290:1072-1078, 2002.
- AUMAILLEY M, MANN K, VON DER MARK H, TIMPL R. Cell attachment of collagen type VI and arg-gly-asp dependent binding to its alpha2(VI) and alpha3(VI) chains. *Experimental. Cell Research*, 181:463–474,1989.
- ALMEIDA AP, FRÁBREGAS BC, MADUREIRA MM, SANTOS RJS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SANTOS RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effects of bradkinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 709-713, 2000.
- AMBROZ C, CLARK AJL, CATT K.J. The *Mas* oncogene enhances angiotensin-induced [Ca²⁺]_i responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1133:107-111, 1991.
- AVERILL DB; ISHIYAMA Y, CHAPPELL MC, FERRARIO CM. Cardiac Angiotensin-(1-7) in Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation*, 108:2141-2146, 2003.
- BASHEY RI, DONNELLY M, INSINGA F, JIMENEZ SA. Growth properties and biochemical characterization of collagens synthesized by adult rat heart fibroblasts in culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 24:691–700, 1992.
- BOLUYT MO, O'NEILL L, MEREDITH AL. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure: marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circulation Research*, 75:23–32, 1994.
- BORG TK, TERRACIO L. Interaction of the extracellular matrix with cardiac myocytes during development and disease. In: Robinson TF, Kinnel RK, editors. Cardiac myocyte–connective tissue interactions in health and disease. *Basel, Switzerland*: 113–129,1991.
- BOUZEGRHANE F, THIBAUT G. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovascular Research*, 53: 304-312, 2002.
- BRILLA CG, PICK R, TAN LB, JANICKI JS, WEBER KT. Remodeling of the right and left ventricle in experimental hypertension. *Circulation Research*, 67,1990.

- BRILLA CG, ZHOU G, MATSUBARA L, WEBER KT. Collagen metabolism anti in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26:809–820,1994.
- BROWN JC, TIMPL R. The collagen superfamily. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 107:484–490,1995.
- BURG MA, TILLET E, TIMPL R, STALLCUP WB. Binding of the NG2 proteoglycan and other extracellular matrix molecules. *Journal of Biology and Chemistry*, 271:26110–26116, 1996.
- BURLEW BS, WEBER KT. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiology Clinical*, 18: 435-442, 2000.
- CAMPBELL DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 784-791, 2003.
- CASTRO CH, SANTOS RAS, WALTHER T, ALENINA N, BADER M, ALMEIDA AP. Effects of Genetic Deletion of the G-Protein-Coupled Receptor *Mas* on Cardiac Function During Ischemia and Reperfusion in the Mouse Isolated Perfused Heart. *Hypertension*, 43; 1350, 2004 (Abstract).
- CHAPPELL MC, PIRRO NT, SYKES A & FERRARIO CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, 31(Part 2): 362-367, 1998.
- CHU ML, CONWAY D, PAN T, BALDWIN C, MANN K, DEUTZMANN R, TIMPL R. Amino acid sequence of the triple-helical domain of human collagen type VI. *Journal of Biology and Chemistry*, 263:18601–18606,1988.
- COATES D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 769-773, 2003.
- CRABOS M, ROTH M, HAHN AWA., ERNE P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 93:2372–2378,1994.
- DIEZ J, LOPEZ B, GONZALEZ A, QUEREJETA R. Clinical aspects of hypertensive myocardial fibrosis. *Currents Opinion of Cardiology*, 16:328-335,2001.
- DOSTAL DE & BAKER KM. The cardiac renin-angiotensin system. Conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation research*, 85: 643-650, 1999.
- FERREIRA AJ, SANTOS RAS & ALMEIDA AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 38(Part 2): 665-668, 2001.

- FIELITZ J, HEIN S, MITROVIC V, PREGLA R, ZURBRÜGG, WARNECKE C, SCHAPER J, FLECK E, REGITZ-ZAGROSEK V. Activation of the Cardiac Renin-Angiotensin System and Increased Myocardial Collagen. Expression in Human Aortic Valve Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(5), 2001.
- FRANS HH, LEENEN, ROSELYN WHITE, AND BAOXUE YUAN. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology*, 281: H2410–H2416, 2001.
- GALLAGHER A M, YU H, PRINTZ MP. Bradykinin induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin. *Hypertension*, 32: 84–88,1998.
- GERVÁSIO, O. Expressão de colágeno VI em gengiva de indivíduos com Síndrome de Down. Belo Horizonte. Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular - Instituto de ciências Biológicas – UFMG, 72p, 2000.
- GONZÁLES A; LÓPEZ B; QUEREJETA R; DÍEZ J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertensive heart disease? *Journal Molecular Cell Cardiology*, 34:1585- 1593,2002.
- GRINSTEAD WC & YOUNG JB The myocardial renin-angiotensin system: existence, importance, and clinical implications. *American Heart Journal*, 123(4): 1039-1045, 1992.
- HALL JE. Historical perspective of the renin–angiotensin system. *Molecular Biotechnology*, 24, 27–39, 2003.
- HANDA RK. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptor. *Journal of American Society Nephrology*, 11: 1377-1386, 2000.
- HE JG, HUANG YY, MA H, HE XH, LIAO XX, WANG LC, ZHOU JZ. Effects of angiotensin-(1-7) on remodeling of myocardial collagen network in pressure-overloaded rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 16(9):523-6. 2004. Abstract.
- HECKMANN M, AUMAILLEY M, CHU M-L, TIMPL R, KRIEG T. Effect of transforming growth factor-beta on collagen type VI expression in human dermal fibroblasts. *FEBS Letters*, 310:79–82,1992.
- ICHIHARA S, SENBONMATSU T, PRICE E, ICHIKI T, GAFFNEY A, INAGAMI T. Ang II type receptor is essential for left ventricular hypertrophy fibrosis in chronic Ang II-induced hypertension. *Circulation*, 104: 346-355, 2001.
- ITO H, HIRATA Y, ADACHI S, TANAKA M, TSUJINO M, KOIKE A, NOGAMI A, MURUMO F, HIROE M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 92:398 – 403,1993.

- 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. *American Journal Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 289:2356-2363, 2005.
- IYER SN, CHAPPELL MC, AVERILL DB, DIZ DI, FERRARIO CM. Vasodepressor actions of angiotensin (1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hipertension*, 31: 699-705, 1998.
- JACKSON TR, BLAIR AC, MARSHALL J, GOEDERT M, HANLEY MR. The *Mas* oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, 335:437 – 440, 1988.
- JU H, DIXON IM. Effect of angiotensin II on myocardial collagen gene expression. *Molecular Cell Biochemistry*. 163-164:231-237, 1996.
- JU H, DIXON IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Canadian of Journal of Cardiology*. 12(12):1259-1267, 1996.
- JUNQUEIRA, LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemistry. Journal*, 11(4): 447-455, 1979.
- KATWA LC, CAMPBELL SE, TYAGI SC, LEE SJ, CICILA GT, WEBER KT. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *Journal Molecular Cell Cardiology*, 29:1375-1386,1997.
- KAWANO H; DO SY; KAWANO Y; STARNES V; BARR M; LAW RE; HSUEH AW. Angiotensin II Has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation*, 101:1130-1137, 2000.
- KIM S, IWAO H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews*, 52(1):11-34, 2000.
- KIM S, OHTA K, HAMAGUCHI AI. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factorbeta1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273:509 –515 1995.
- KIM NN, VILLEGAS S, SUMMEROUR SR, VILLARREAL FJ. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*, 31:457– 466, 1999.
- KITAMURA M, SHIMIZU M, INO H, OKEIE K, YAMAGUCHI M, FUNINO N, MABUCHI H, NAKANISHI I. Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the significance of type III and VI collagens. *Clinical Cardiology*, 24(4):325-329, 2001.

- KLEWER SE, KROB SL, KOLKER SJ, KITTEN GT. Expression of Type VI Collagen in the Developing Mouse Heart. *Developmental Dynamics*, 211:248–255, 1998.
- KRIEGER EM & SANTOS RAS. Angiotensinas – aspectos fisiológicos. *Hipertensão*, 1: 7-10, 1998.
- KUCHAREWICZ I, PAWLAK R, MATYS T, CHABIELSKA E, BUCZKO W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *Journal of physiology and Pharmacology*, 53(4): 533-540, 2002.
- KUPFAHL C, PINK D, FRIEDRICH K, ZURBRUGG HR, NEUSS M, WARNECKE C, FIELITZ J, GRAF K, FLECK E, REGITZ-ZAGROSEK V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor b1 and osteopontin and indirectly effects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovascular Research*, 46:463– 475,2000.
- LIJNEN PJ, PETROV VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods and Findings Experimental and Clinical Pharmacology*. 25(7):541-564, 2003. Review.
- LOOT AE, ROKS AJM, HENNING RH, TIO RA, SUURMEIJER AJH, BOOMSMA F, GILST WH. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, 105: 1548-1550, 2002.
- MAESO R, NAVARRO-CID J, MUNOZ-GARCIA R, RODRIGO E, RUILOPE LM, LAHERA V, CACHOFEIRO V. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension*, 28(6):967-972, 1996.
- MATSUSAKA T & ICHIKAWA I. Biological Functions of Angiotensin and its receptor. *Annual Review of Physiology*, 59: 395-412, 1997.
- MCANULTY RJ, LAURENT GJ. Collagen synthesis and degradation in vivo. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of the adult rat. *Collagen and Related Research*, 7: 93-104, 1987.
- MIZUSHIGE K, YAO L, NOMA T, KIYOMOTO H, YU Y, HOSOMI N, OHMORI K, MATSUO H. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation* 101, 899–907,2000.
- MONTES G & JUNQUEIRA LC. The use of the picrosirius polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Men. Inst. Oswaldo cruz*, 86(III): 1-11, 1991.
- MULDER P, BOUJEDAINI H, RICHARD V, DERUMEAUX G, HENRY JP, RENET S, WESSALE J, OPGENORTH T, THUILLEZ C. Selective endothelin-A versus

- combined endothelin-A/endothelin-B receptor blockade in rat chronic heart failure. *Circulation*, 102:491–503, 2000.
- MULLER C, ENDLICH K, BARTHELMEBS M, HELWIG JJ. AT2-antagonist sensitive potentiation of angiotensin II-induced vasoconstrictions by blockade of nitric oxide synthesis in rat renal vasculature. *British Journal of Pharmacology*, Dec; 122(7): 1495-501, 1997.
- MUTHALIF MM, BENTER IF, UDDIN MR, HARPER JL, MALIK KU, NORA EH, MUNZENMAIER DH, HANSEN-SMITH FM, LOMBARD JH, GREENE AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 275:H1395–H1403, 1998.
- 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.
- NAUGLE JE, OLSON ER, ZHANG X, MASE SE, PILATI CF, MARON MB, FOLKESSON HG, HORNE WI, DOANE KJ, MESZAROS JG. Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *American Journal Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 290(1):323-330, 2005.
- NORA EH, MUNZENMAIER DH, HANSEN-SMITH FM, LOMBARD JH, GREENE AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 275:H1395–H1403, 1998.
- ODUIT GY, CRACKOWER MA, BACKX PH, PENNINGER JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(3):93-101, 2003.
- PANIZO A, PARDO J, HERNANDEZ M, GALINDO MF, CENARRUZABEITIA E, DIEZ J. Quinapril decreases myocardial accumulation of extracellular matrix in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 8: 815-822, 1995.
- PATHAK M; SARKAR S; VELLAICHAMY E; SEN S. Role of myocytes in myocardial collagen production. *Hypertension*, 37:833-840, 2001.
- PAULA RD, LIMA CV, KHOSLA MC, SANTOS RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, 26: 1159-1159, 1995.
- PERRIS R, HEUY-JU K, GLANVILLE RW, BRONNER-FRASER M. Collagen type VI in neural crest development: Distribution in situ and interaction with cells in vitro. *Developmental Dynamics*, 198:135–149, 1993.
- PHILLIPS C, WENSTRUP RJ. Biosynthetic and genetic disorders of collagen. *Biochemical and Clinical Aspects*:152–176, 1992.

- RIZVI MA, KATWA L, SPADONE DP, MYERS PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *Journal Molecular Cell Cardiology*, 28:243–252,1996.
- ROBINSON TF, COHEN-GOULD L, FACTOR SM. Skeletal framework of mammalian heart muscle: Arrangement of inter- and pericellular connective tissue structures. *Laboratory Investigation*, 49:482–491,1983.
- SANTOS RAS, FERREIRA AJ, NADU AP, BRAGA ANG, ALMEIDA AP, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, BALTATU O, ILIESCU R, REUDELHUBER TL, BADER M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological Genomics*, 17(3): 292-299, 2004.
- SANTOS RAS & CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(4):1033 -1047, 1994.
- SANTOS RAS, SIMÕES E SILVA AC, MARIC C, SILVA DMR, MACHADO RP, BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO SVB, LOPES MT, BADER M, MENDES EP, LEMOS VS, CAMPOGNOLE-SANTOS MJ, SCHLTHEISS HP, SPETH R, WALTHER T. Angiotensin-(1-7) is na endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS*, 100(14): 8258-8263, 2003.
- SANTOS RAS, CAMPOGNOLE-SANTOS MJ & ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory peptides*, 91: 45-62, 2000.
- SCHNEE JM, HSUEH WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovascular Research*, 46: 264-268, 2000.
- SPIRU MJ, CROWLEY TJ. Increased rat myocardial type VI collagen in diabetes mellitus and hypertension. *Diabetologia*, 36: 93–98,1993.
- SUN Y, RAMIRES FJA, WEBER KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovascular Research*, 35:138-147,1997.
- TALLANT EA, DIZ DI, FERRARIO CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 34: 950-957, 1999.
- TALLANT EA, CLARK MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 42(4):574-9, 2003.
- TALLANT EA, FERRARIO CM, GALLAGHER PE. Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the mas Receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1:1560-1566, 2005 .

- TERRACIO L, RUBIN T, GULLBERG D, BALOG ED, CARVER W, JYRING R, BORG TK. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circulation Research*; 68: 734-744,1991.
- THARAUX PL, CHATZIANTONIOU C, FAKHOURI F, DUSSAULE JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*; 36: 330-336,2000.
- TIMMERMANS PBMWM, WONG PC, CHIU AT, HERBLIN WF, BENFIELD P, CARINI DJ, LEE RJ, WEXLER R, SAYE J, SMITH R. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 45:205–251, 1993.
- TSUDA T, GAO E, EVANGELISTI L, MARKOVA D, MA X, CHU ML. Post-ischemic myocardial fibrosis occurs independent of hemodynamic changes. *Cardiovascular Research*, 59(4):926-33,2003.
- TOUYZ RM & BERRY C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 35: 1001-1015, 2002.
- VAN'T VEER LJ, VAN DER FELTZ MJM, VAN DER BERG-BAKKER CAM, CHENG RPM, VAN OORSCHOT DAJ, KIEVITS T, SCHRIER PI. Activation of the Mas protooncogene involves coupling to human aliphoid sequences. *Oncogene*, 8:2673 – 2681, 1993.
- VARO N, IRABURU M, VARELA M, LOPEZ B, ETAYO JC, DIEZ J. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 35: 1197-1202, 2000.
- VILLAR A & PEDERSEN RA. Parental imprinting of the Mas protooncogene in mouse. *Nature Genetics*, 8:373 – 379, 1994.
- VILLARREAL FJ, DILLMANN WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta1, fibronectin, and collagen. *American Journal Physiology*; 262:1861–1866, 1992.
- VON BOHLEN UND HALBACH O, WALTHER T, BADER M, ALBRECHT D. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *Journal of Neurophysiology*, 83(4):2012-2021, 2000.
- WALTHER T, WESSEL N, KANG N, SANDER A, TSCHÖPE C, MALBERF H, BADER M, VOSS A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the *Mas* protooncogene. *Brazilian Journal Of Medicine and Biological Research*, 33: 1-9, 2000.
- WALTHER T, BALSCHUN D, VOIGT JP, FINK H, ZUSCHRATTER W, BIRCHMEIER C, GANTEN D, BADER M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the *Mas* protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry*, 273:11867-11873, 1998.

- WANG LJ, HE JG, MA H, CAI YM, LIAO XX, ZENG WT, LIU J, WANG LC. Chronic administration of angiotensin-(1-7) attenuates pressure-overload left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. *J First Mil Med Univ*, 481-487, 2005.
- WEBER KT, BRILLA CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, 83:1849–65, 1991.
- WEBER KT, JALIL JE, JANICKI JS, PICK R. Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. *American Journal of Hypertension*, 2:931–940, 1989.
- WEBER KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regulatory Peptides*; 82: 1-17, 1999.
- 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*, 45:711 – 719, 1986.
- ZHOU G, KANDALA JC, TYAGI SC, KATWA LC, WEBER KT. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Molecular Cell Biochemistry*, 154:171–178, 1996.