



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RECEPTOR MAS CONTRIBUI PARA O DESENVOLVIMENTO DO
REMODELAMENTO CARDÍACO INDUZIDO PELA GESTAÇÃO**

CINTIA DO CARMO E SILVA

**GOIÂNIA-GO
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Cintia do Carmo e Silva				
E-mail:	Cintiadocarmo_fiio@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não			
Vínculo empregatício do autor	Bolsista				
Agência de fomento:	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Goiás	Sigla:	FAPEG		
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	08.156.102/0001-02
Título:	Receptor Mas Contribui Para o desenvolvimento do Remodelamento Cardíaco				
Induzido pela Gestação					
Palavras-chave:	Angiotensina- (1-7), hipertrofia cardíaca, fibrose, função cardíaca, A-779.				
Título em outra língua:	Mas Receptor Contributes To Pregnancy-Induced Cardiac				
Remodeling					
Palavras-chave em outra língua:	Angiotensin-(1-7), cardiac hypertrophy, fibrosis, heart function, A-779.				
Área de concentração:	Farmacologia e Fisiologia				
Data defesa:	(21/03/2016)				
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Biológicas				
Orientador (a):	Carlos Henrique de Castro				
E-mail:	castroufg@gmail.com				
Co-orientador (a):*	Renata Mazaro Costa				
E-mail:	Mazaro.renata@gmail.com				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 11/05/2016.

Assinatura da autora

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CINTIA DO CARMO E SILVA

**RECEPTOR MAS CONTRIBUI PARA O DESENVOLVIMENTO DO
REMODELAMENTO CARDÍACO INDUZIDO PELA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Renata Mazaro Costa

GOIÂNIA-GO

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva, Cintia do Carmo e
Receptor Mas contribui para o desenvolvimento do remodelamento
cardíaco induzido pela gestação [manuscrito] / Cintia do Carmo e Silva.
- 2016.
xvi, 57 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro; co-orientador
Renata Mazaro Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB) , Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. Angiotensina-(1-7). 2. Hipertrofia cardíaca. 3. Fibrose. 4. Função
cardíaca. 5. A-779. I. Castro, Carlos Henrique de , orient. II. Costa,
Renata Mazaro, co-orient. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Agostinho Apolinário do Carmo e Marli Maria do Carmo Silva, que abdicaram de suas inocências e assumiram o compromisso de total dedicação à nossa família. Obrigada pelos preceitos fundamentais que hoje são o pilar da minha sustentação. Estas singelas palavras jamais serão suficientes para expressar a minha enorme gratidão. Eu os amo muito!

Agradecimentos

A Deus Jeová por ser a razão do meu levantar e do meu deitar, o ar que eu respiro!

Ao meu esposo Simões de Souza Rocha pelos momentos de compreensão, cuidado e dedicação, se não fosse o seu amor, tudo teria sido mais difícil! O seu amor é meu, o meu amor é seu!

Aos meus pais Agostinho Apolinário do Carmo e Marli Maria do Carmo Silva pelos vários momentos de sacrifícios ao meu favor! Sei que este momento é nosso! Apesar das dificuldades que passamos, é chegada a boa hora!

Aos meus irmãos Kleber do Carmo e Silva e Marcelo do Carmo Silva que desde o início da minha formação torceram por mim, vibrando comigo em cada conquista! Amo vocês!

Aos meus sogros Domingos de Souza Rocha e Eneri Dias Rocha pelo incentivo. Sogra! A senhora foi inspiração para mim.

Ao meu primo Alex Silva Rocha pela paciência e boa vontade em me auxiliar, você foi peça fundamental na minha caminhada.

Às minhas cunhadas, tios, tias, primos e primas pois sei que torceram por mim, obrigada pelo amor de vocês!

Aos meus amigos Kepler Hestulano Garcia, Flaviano da Silva e Glaucio Vieira da Silva pelo apoio incondicional, não esquecerei o que fizeram por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro por ter confiado a mim tal pesquisa, estou certa que recebi excelentíssimas orientações científicas! Tenha a certeza que os meus horizontes foram vastamente ampliados graças aos seus ensinamentos.

A minha co-orientadora Prof. Dr^a. Renata Mazaro Costa, pela disposição em me auxiliar, que sem restrições agregou novas metodologias e conhecimentos a esta pesquisa. Saiba que jamais esquecerei o seu sorriso e o seu respeito ao próximo.

Aos professores parceiros Dr^a. Elizabeth Pereira Mendes, Dr^a. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, Dr. Marcos Barrouin Melo, Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, Dr. Diego Basile Colugnati, Dr. Adryano Augustto Valladão de Carvalho e Dr. Manoel Francisco Biancardi, pois sei que o *brainstorming* constante entre os senhores ampliaram as dimensões desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Franassis Barbosa de Oliveira por me fazer acreditar que esse sonho era possível.

A todos os colegas do laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica pelo prazer de compartilharmos juntos todas as inseguranças, aflições, conquistas e alegrias, sei que tudo que vivemos ficará eternizado na minha memória. Citação especial a Elizângela Custódio, Marielly da Silva, Karina Pereira Gomes, Alyne Gonçalves Bezerra, Larissa Matuda Macêdo, Pedro Henrique Alves e Allancer Divino de Carvalho Nunes, obrigada pelos auxílios constantes e trocas de conhecimentos.

A todos os colegas dos laboratórios parceiros, Monaliza Lopes dos Santos, Jordana Andrade Santos, Rodrigo Fernandes de Lima, Mônica Sousa Campos, Andres Ozorio, Luanna Fernandes Peixoto, Ayda Luz Malaver Salamanca, Agostinho Semedo Augusto e em especial ao Jônathas Fernandes Queiroz de Almeida, por contribuírem para o bom andamento dos meus experimentos.

As empresas de fomento CAPES por prover minha bolsa de estudos e ao CNPq e INTC pelos auxílios à pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por me oferecer essa oportunidade de melhorar como profissional.

*" Não há ferrolhos
Nem portas que se fechem
Diante da tua voz
Não há doenças, nem culpa
Que fiquem de pé diante de nós
E a tempestade se acalma
Na voz daquele que tudo criou
Pois sua palavra é pura
Escudo para os que nele creem".*

Voz da Verdade

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XII
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIPERTROFIA CARDÍACA	16
1.1.1 Classificação funcional da hipertrofia cardíaca.....	16
1.1.2 Classificação geométrica da hipertrofia cardíaca	17
1.2 HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA.....	18
1.2.1 Hipertrofia cardíaca fisiológica pós-natal	18
1.2.2 Hipertrofia cardíaca fisiológica induzida por exercício	19
1.2.3 Hipertrofia cardíaca fisiológica gestacional.....	20
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E HIPERTROFIA CARDÍACA.....	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 GERAL	25
2.2 ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 ANIMAIS	26
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1	27
3.2.1 Pletismografia de cauda	28
3.2.2 Coração	29
3.2.3 Cesariana	29
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2	31
3.3.1 Ecocardiografia	32
3.3.2 Coração	32
3.3.3 Cesariana	32
3.4 ANÁLISES.....	33
3.4.1 Histologia	33
3.4.2 Parâmetros Gestacionais.....	37

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1 ARTIGO	38
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXOS	72
7.1 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	72
7.2 PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-779	D-Alanine-Ang-(1-7)
PKA	Proteína Quinase A
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
Ang	Angiotensina
AST	Área de Secção Transversa
AT1	Receptor de Angiotensina II Tipo 1
AT2	Receptor de Angiotensina II Tipo 2
GMPc	Monofosfato cíclico de Guanosina
DC	Débito Cardíaco
Col I	Colágeno I
Col III	Colágeno III
E2	17 β - Estradiol
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FE	Fração de Ejeção
EPM	Erro Padrão da Média
Er α	Receptor de Estrogênio Nuclear α
ER β	Receptor de Estrogênio Nuclear β
VSF	Volume Sistólico Final
FS	Fração de Encurtamento
HC	Hipertrofia Cardíaca
HE	Hematoxilina e Eosina
IGF-1	Fator de Crescimento Ligado a Insulina
IGF-1R	Receptor do Fator de Crescimento Ligado a Insulina

IVRT	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
KO	Camundonga <i>Knockout</i> para o Receptor Mas
KO-P	Camundonga Gestante <i>knockout</i> para o Receptor Mas
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de Matriz Extracelular
NEP	Endopeptidase Neutra
NO	Óxido Nítrico
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PR-A	Receptor de progesterona tipo A
PR-B	Receptor de progesterona tipo B
PRR	Receptor de Pró-Renina
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
VS	Volume Sistólico
TF	Treinamento Físico
VE	Ventrículo Esquerdo
WT	Camundonga <i>Wild Type</i>
WT-NP	Rata <i>Wistar</i> Não Gestante
WT-P + A-779	Rata <i>Wistar</i> Gestante com D-Alanine-Ang-(1-7)
WT-P	Camundonga <i>Wild Type</i> Gestante
W-P	Rata <i>Wistar</i> Gestante

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representativo dos padrões de hipertrofia cardíaca.....	17
Figura 2. Representação esquemática do Sistema Renina- Angiotensina evidenciando as principais vias de formação das angiotensinas e seus receptores.....	23
Figura 3. Imagem ilustrativa do protocolo experimental 1.....	27
Figura 4. Representação ilustrativa da pletismografia de cauda.....	29
Figura 5. Cesariana.....	30
Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental 2.....	31
Figura 7. Imagem representativa do método de análise da hipertrofia dos cardiomiócitos.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do fixador tecidual metacarn.....	35
Tabela 2. Descrição do processamento do tecido em paraplast.....	35
Tabela 3. Reidratação para citoquímica em geral.....	35
Tabela 4. Citoquímica em hematoxilina/eosina.....	36
Tabela 5. Citoquímica em picrosirius.....	36
Tabela 6. Citoquímica em reticulina de gomori.....	36
Tabela 7. Desidratação para citoquímica em geral.....	36

RESUMO

Estudos anteriores mostraram que o eixo Ang- (1-7) / receptor Mas possui efeito protetor na hipertrofia cardíaca patológica. Além disso, o envolvimento de receptor Mas na hipertrofia cardíaca induzida por exercício tem sido sugerida. No entanto, o papel da Ang- (1-7) / receptor Mas no remodelamento cardíaco induzido pela gestação permanece desconhecido. Diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar a participação do receptor Mas no desenvolvimento da gestação e na hipertrofia, fibrose e função cardíaca durante a gestação. Ratas *Wistar* foram randomizadas aleatoriamente em 3 grupos: controle (W-NP), gestante (W-P) e gestante tratada com A-779 (W-P + A-779). Camundongos *Wild type* e *Knockout* para o receptor Mas foram randomizadas em grupos não-grávidas (WT e KO) e grávidas (WT-P e KO-P). Parâmetros gestacionais como peso materno, peso placentário, peso fetal, razão feto/placenta, fertilidade, perda pré-embriônica e perda pós-embriônica foram avaliados. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por pletismografia de cauda. A parte medial do ventrículo esquerdo (VE) foi coletado para análise morfológica do cardiomiócito e deposição de proteínas na matriz extracelular. Análise por ecocardiografia foi utilizada para avaliar a função cardíaca. O bloqueio ou a deleção genética do Mas não altera a fertilidade, o desenvolvimento embrionário ou fetal. No entanto, o bloqueio do Mas reduziu o peso placentário e aumentou a relação feto/placenta nas ratas. Já nos animais KO gestantes foi observado menor ganho de peso materno e fetal, o que acarretou em aumento da razão feto/placenta. A PAS não foi alterada pela gestação ou tratamento com A-779 nas ratas *Wistar*. O bloqueio farmacológico ou deleção genética de receptor Mas atenuou a hipertrofia dos miócitos induzida pela gravidez. O tratamento A-779 ou deleção genética do receptor Mas aumentou a deposição de colágeno III do VE das gestantes. KO apresentaram uma menor fração de ejeção, fração de encurtamento, volume sistólico e aumento do volume sistólico final em comparação com WT. Curiosamente, a gravidez restaurou esses parâmetros. Em conclusão, estes dados demonstraram que o receptor Mas pode alterar parâmetros maternos e gestacionais, bem como está envolvido na hipertrofia dos cardiomiócitos e no controle da deposição de colágeno III na gestação. Essas alterações estão associadas com a melhora da função cardíaca por meio de mecanismos independente do Mas.

Palavras-chave: Angiotensina- (1-7), hipertrofia cardíaca, fibrose, função cardíaca, A-779.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated a protective effect of the Ang-(1-7)/Mas receptor axis on pathological cardiac hypertrophy. Also, the involvement of Mas receptor in the exercise-induced cardiac hypertrophy has been suggested. However, the role of the Ang-(1-7)/Mas receptor on pregnancy-induced cardiac remodeling remains unknown. Thus, the aim of this study was to evaluate the participation of the Mas receptor in the development of pregnancy and hypertrophy, fibrosis and cardiac function during pregnancy. Female Wistar rats were randomly shared in 3 groups: control (W-NP), pregnant (W-P), and pregnant treated with A-779 (W-P + A-779). Wild type and Mas-knockout mice were distributed in non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P) groups. Gestational parameters such as, maternal weight, placental weight, fetus weight, fetus/placenta ratio, fertility, Loss pre embryonic, Loss pos embryonic were evaluated. Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff plethysmography. The medial part of the left ventricle (LV) was collected for cardiomyocytes morphometry analysis and extracellular matrix proteins deposition. Echocardiographic analysis was used to evaluate the cardiac function. Mas receptor blockade or genetic deletion of Mas did not alter the fertility or embryonic and fetal development. However, the Mas receptor antagonist decreased placental weight and increased fetus placenta ratio in rats. The pregnant KO mice presented a decreased maternal and fetal weight and increased fetus/placenta ratio. SBP was not changed by pregnancy or A-779 treatment in the Wistar rats. Pharmacological blockade or genetic deletion of Mas receptor attenuates the pregnancy-induced myocyte hypertrophy. The A-779 treatment or genetic deletion of the Mas receptor increased the collagen III deposition in LV from pregnant animals. KO mice presented a lower ejection fraction, fraction shortening, stroke volume and higher end systolic volume compared to WT. Interestingly, the pregnancy restored these parameters. In conclusion, these data show that Mas receptor can alter gestational and maternal parameters, and this is involved in the cardiomyocyte hypertrophy and in the control of the collagen III deposition in pregnancy condition. These alterations are associated with improvement of the cardiac function through Mas-independent mechanism.

Key words: Angiotensin-(1-7), cardiac hypertrophy, fibrosis, heart function, A-779.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca (HC) é o aumento da massa do coração decorrente de estímulos extrínsecos ou intrínsecos capazes de sobrecarregar a hemodinâmica cardíaca, seja por sobrecarga de volume ou pressão (1). Uma vez que a sobrecarga é gerada, vários mecanismos compensatórios são ativados para tentar minimizar a injúria. Todo esforço para a reorganização deste novo cenário, faz com que as dimensões dos cardiomiócitos e do conteúdo da matriz extracelular (MEC) sejam aumentados, para produzir uma resposta adequada à demanda, tendo como produto final aumento da contratilidade e normalização do estresse na parede cardíaca (2,3). O equilíbrio entre os miócitos cardíacos e a MEC é importante para a homeostasia e funcionamento do coração.

1.1.1 Classificação funcional da hipertrofia cardíaca

Funcionalmente, a HC pode ser classificada em patológica ou fisiológica (Figure 1) (1,3,4). A HC patológica pode ser decorrente de diversas doenças como hipertensão arterial, doenças cardíacas valvares, alterações do metabolismo cardíaco, polimorfismo genético e infarto do miocárdio (4–6). Nestes casos, ocorrem maior deposição de tecido fibrótico na MEC por diferenciação dos fibroblastos cardíacos em miofibroblastos, células capazes de sintetizar e depositar na MEC maior quantidade de fibras colágenas, principalmente colágeno do tipo I (Col I). Isto resulta em maior rigidez do miocárdio, disfunção no mecanismo de acoplamento excitação-contracção e nos movimentos de sístole e diástole (7). Além dessas alterações, as mitocôndrias sofrem alterações estruturais e funcionais, o que prejudica o metabolismo energético do coração (8).

Na HC fisiológica, as alterações encontradas são decorrentes de exercícios físicos crônicos, crescimento pós-natal e gravidez. Assim como a nomenclatura sugere, nesse tipo de hipertrofia a função cardíaca é normal ou aumentada, a fibrose cardíaca ausente e o remodelamento hipertrófico reversível (4–6).

1.1.2 Classificação geométrica da hipertrofia cardíaca

Além da classificação funcional, a HC pode ser subdividida em concêntrica e excêntrica (Figura 1), conforme a geometria das câmaras cardíacas (9). No crescimento concêntrico é observado aumento da massa e da espessura da parede cardíaca, redução do diâmetro interno das câmaras e do aporte sanguíneo. Estas observações condizem com a morfologia encontrada nesses tecidos, que demonstra organização dos sarcômeros em paralelo (10). Esta condição hipertrófica é encontrada na maioria das vezes em condições patológicas tais como hipertensão e estenose aórtica (9), que por excesso de estresse na parede cardíaca reduz a fração de ejeção e leva à disfunção ventricular sistólica (11,12). Estímulos gerados por exercícios físicos, também podem promover o crescimento concêntrico (exercícios isométricos e estáticos).

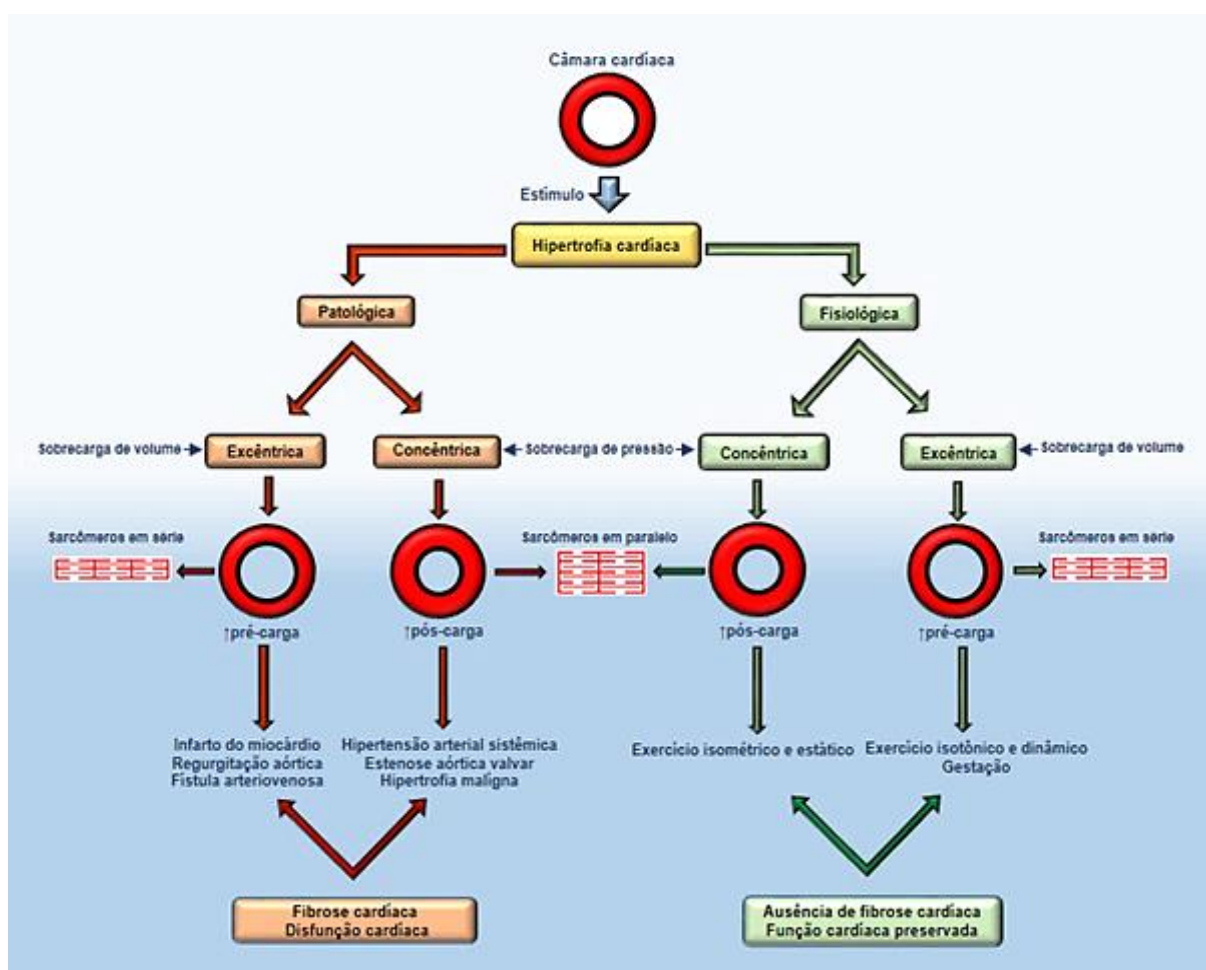


Figura 1. Esquema representativo dos padrões de hipertrofia cardíaca.

Já a HC excêntrica é decorrente da sobrecarga de volume e disposição dos cardiomiócitos em série, estímulo que aumenta o comprimento celular e a capacidade volumétrica das câmaras cardíacas (10). Mecanotransduções de sinais intracelulares provocados por sobrecarga de volume, como por exemplo, nos casos de regurgitação aórtica e fístula arteriovenosa, podem gerar hipertrofia patológica excêntrica (9). Exercícios aeróbicos que impõem a maquinaria cardíaca uma maior demanda metabólica e sobrecarga de volume, também podem promover HC excêntrica, no entanto fisiológica (3).

1.2 Hipertrofia cardíaca fisiológica

1.2.1 Hipertrofia cardíaca fisiológica pós-natal

Ao nascer o neonato tem uma rápida aceleração no crescimento, fator que modifica a hemodinâmica cardíaca por meio do aumento do fluxo sanguíneo e da demanda metabólica, essas situações fisiológicas fazem com que ocorra a proliferação dos miócitos cardíacos (13). Entretanto, essa habilidade proliferativa é rapidamente perdida, sendo substituída pela hipertrofia dos cardiomiócitos, que passa a ser o principal processo para o aumento do conteúdo cardíaco após os primeiros dias de vida do neonato (14).

Os estudos prévios mostraram que a principal via de proliferação dos cardiomiócitos na fase pós-natal, envolve o acoplamento do fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1) ao seu receptor (IGF-1R), que ao ser ativado desencadeia sequências de eventos fosforilativos, que incluem a via fosfatidilinositol 3-quinase e a proteína quinase A para ativar fatores de crescimento intracelulares (15).

Para que seja possível a síntese e o desenvolvimento celular, é necessário que as ciclinas, proteínas envolvidas na formação do ácido desoxirribonucleico, sejam devidamente ativadas para regularem cada fase do ciclo celular (16). Yoshizumi et al (1995) (17), descreveram que após o nascimento, a ciclina A, uma das moléculas responsáveis pelo crescimento e replicação do material genético celular, apresenta um declínio acentuado no 2º dia de vida pós-natal e desaparece completamente no 14º dia de vida nas células cardíacas. Um ano mais tarde, essa evidência pode ser melhor fundamentada pelo trabalho de Li et al (1996) (18) que por meio de imunomarcção dos componentes citoesqueléticos α -actina, α -tubulina e desmina,

mostraram que até o 3º dia de vida pós-natal, os cardiomiócitos são capazes de se replicarem até 68% em relação ao 1º dia de vida, mas que após o 3º dia, o número de células permanece constante com elevado ganho do volume iniciado a partir do 4º dia de vida.

1.2.2 Hipertrofia cardíaca fisiológica induzida por exercício

O treinamento físico (TF) é capaz de modular as características morfológicas e geométricas do coração potencializando o seu funcionamento em situações fisiológicas (19) e patológicas (20). Essas características renderam ao coração treinado a nomenclatura de coração de atleta (9).

As diferentes modalidades de TF gera remodelamento cardíaco, e o processo fisiológico de adaptação do sistema cardiovascular à prática de exercício físico é influenciado pelas características individuais de cada modalidade esportiva (6). Existem dois diferentes tipos de TF que atuam diretamente na hemodinâmica cardíaca: (i) exercícios isotônicos funcionalmente caracterizados por exercícios que necessitam de movimentos articulares, que submete a fibra muscular esquelética a movimentos rítmicos de contração e relaxamento; e (ii) exercícios isométricos nos quais há pouco ou nenhum movimento articular durante a prática, diferenciado pela exigência do uso da força (21).

Os exercícios dinâmicos, tais como natação, corrida e ciclismo, impõem mudanças hemodinâmicas ao coração como aumento da frequência cardíaca, do volume sistólico, do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica. Estes fatores associados aumentam o retorno venoso e gera HC fisiológica excêntrica. De forma inversa, a HC fisiológica concêntrica é característica de exercícios que requeiram aumento da força como os exercícios de musculação, pois são capazes de elevar à pressão arterial sistêmica e aumentar a pós-carga no coração (9).

O TF modula beneficemente o coração, pois apresenta capacidade de reverter da HC patológica para HC fisiológica (20,22). Outra observação bastante importante do TF pode ser constatada em ratas com pré-eclâmpsia, que por meio de corrida voluntária tiveram parâmetros como pressão arterial média e índices de proteinúria reduzidos (23).

1.2.3 Hipertrofia cardíaca fisiológica gestacional

Durante a gravidez, o sistema cardiovascular sofre profundas adaptações hemodinâmicas a fim de manter as demandas metabólicas requeridas para a manutenção da vida da mãe e do feto (24). O aumento permanente do volume é um dos fatores primordiais para o remodelamento cardíaco fisiológico excêntrico na gestação (25), pois a sobrecarga imposta aumenta o trabalho cardíaco e gera uma série de mudanças fisiológicas compensatórias a fim de manter a homeostasia do corpo gravídico (26).

A gênese da hipervolemia na gravidez é multifatorial e envolvem fatores tais como o aumento da concentração de cortisol, aldosterona (27), relaxina (28), angiotensina (Ang) II (29), retenção de sódio e água (27) e aumento da angiogênese cardíaca (30). O aumento volêmico gera respostas fisiológicas coordenadas iniciadas pelo aumento do débito cardíaco que gradualmente se eleva e alcança o pico máximo após o segundo trimestre de gestação (31). Este aumento do débito cardíaco é paralelo ao aumento gradativo da frequência cardíaca, volume sistólico e diminuição da resistência vascular periférica, sendo este último um fator importante para a perfusão fetal, por criar um leito vascular de baixa resistência (32).

Diferentemente da HC fisiológica induzida por exercício físico, que pode ter o aumento do trabalho cardíaco interrompido ao cessar o TF, na gestação, a sobrecarga do volume é contínuo e ininterrupto (33). No entanto, apesar da sobrecarga adicional imposta ao sistema cardiovascular, a função cardíaca não sofre declínio e pode ter suas funções normais ou até mesmo aumentadas (1). Isso talvez se deva a redução da rigidez e tensão passiva do músculo cardíaco (34) e ao aumento do colágeno tipo III (Col III) nesta condição (35), o que confere ao coração maior complacência e elastância.

Outros fatores que podem contribuir para as alterações cardíacas estão ligados às concentrações circulantes de hormônios esteroidais sexuais (36). A importância dos hormônios esteroides é evidente em uma gama de processos biológicos como reprodução, diferenciação, apoptose, metabolismo e homeostasia de diversos sistemas. Desse modo, o estrogênio, sintetizado principalmente pelos ovários, é necessário para a saúde da mulher em diferentes sistemas (37) e pode ser encontrado em três formas, estrona, estriol e o mais importante deles o 17 β -estradiol

(E2) (38). Atualmente, já é conhecido que as células do músculo cardíaco possuem três tipos de receptores de estrogênios: o receptor de estrogênio acoplado a proteína G α i, responsável por aumentar o NO endotelial (39) e os receptores de estrogênios (ER) nucleares α e β (ER α e ER β) (40,41), responsáveis pela regulação de fatores de transcrição nuclear ativado por ligantes (42).

Há evidências que no climatério, a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica aumenta significativamente. Isto pode estar associado, ao menos em parte, pela redução na síntese e secreção de E2 (43,44), um hormônio que apresenta ações benéficas sobre o coração devido sua ação vasodilatadora, capaz de prevenir a hipertrofia e disfunção cardíaca (45,46). Interessantemente, E2 pode reverter a HC patológica, bem como os seus marcadores, em ratas idosas ovariectomizadas (47). As formas de atuação do E2 sobre o coração podem ser por (i) difusão passiva, no qual se liga aos receptores intracelulares ER α e ER β , que no núcleo se acoplam ao elemento de resposta ao estrogênio, que desencadeia a transcrição gênica; (ii) por mecanismo rápido, por meio do acoplamento do ER ao óxido nítrico (NO) na subunidade da proteína G α i, que por sua vez aumenta a produção de NO, ativa a guanilato ciclase e aumenta concentração intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual ativa proteínas cinases dependentes de GMPc promovendo o efluxo de cálcio e conseqüentemente relaxamento do músculo cardíaco; e (iii) via dimerização de receptores, entre ER α com o receptor de IGF-1, que ativa cinase reguladora de sinal extracelular 1, 2 (ERK 1/2) que estimula atividade de ER α (48).

Assim como o estrogênio, a progesterona também é aumentada na gravidez. Os estudos prévios identificaram dois diferentes tipos de receptores de progesterona PR-A e PR-B (49) que atuam em células endoteliais e vasculares de músculo liso inibindo ações proliferativas após injúria tecidual (50,51). No coração, a progesterona pode modular a síntese proteica por duas diferentes formas, tanto por ação direta sobre receptores cardíacos quanto por ação indireta ao aumentar o volume plasmático (52).

O corpo lúteo da grávida, além da produção de progesterona, é um sítio sintetizador de relaxina, que em toda a gravidez produz altas taxas desse hormônio, responsável por aumentar o débito cardíaco e diminuir a resistência vascular periférica (53). Esses efeitos são gerados em parte, pela vasodilatação do leito coronariano via

NO (54), bem como pelo aumento da síntese de gelatinase na vasculatura, característica única à gestação (55).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina e hipertrofia cardíaca

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (Figura 2) é um sistema hormonal com características endócrinas, parácrinas e autócrinas (56,57), com regulação sobre a homeostasia da pressão arterial e balanço hidroeletrolítico (58,59). As perturbações no meio interno, tais como queda da pressão de perfusão renal, redução da concentração de sódio nos túbulos distais do néfron e excitação do nervo simpático renal estimulam a liberação da renina na circulação (60,61). Uma vez liberada, a renina atuará sobre a glicoproteína circulante, o angiotensinogênio (58), um substrato de renina responsável por originar o decapeptídeo, Ang I (62). Além da renina, existem duas endopeptidases que também são capazes de realizar essa conversão, a tonina e catepsina G (63). Após sua síntese, a Ang I pode sofrer clivagem principalmente pela enzima conversora de angiotensina (ECA), enzima significativamente expressa em leitos vasculares (61) e dar origem à Ang II, um octopeptídeo com estreita afinidade por dois diferentes subtipos de receptores da Ang II, tipo 1 e tipo 2 (AT1 e AT2) (64).

O AT1 é considerado o principal efetor da Ang II (56,65), e na maioria das vezes, essa interação resulta em efeitos deletérios, quando em constante ativação, ao organismo como, respostas proliferativas (66), hipertróficas, fibróticas (67), vasoconstritora (68) e liberação de espécies reativas de oxigênio (69). Por outro lado, quando a Ang II se acopla ao receptor AT2, promove efeitos opostos aos gerados pela ativação do AT1, desencadeando uma série de efeitos anti-hipertróficos, antiproliferativos e vasodilatadores (70). No entanto, esse receptor é menos expresso na vida adulta, sendo encontrado em grande quantidade apenas no desenvolvimento fetal e neonatal (71). Já o heptapeptídeo Ang-(1-7), pode ser principalmente formado por duas vias distintas: (i) a partir da Ang-(1-9) pela ação da endopeptidase neutra (NEP) ou ECA e; (ii) (72) pela ação catalítica da ECA II sobre a Ang II, sendo esta a principal via de formação da Ang-(1-7). A Ang-(1-7), independente da via, exerce seus efeitos por meio da ativação do receptor Mas, um receptor acoplado a proteína G (59). O eixo ECA II/ANG-(1-7)/Mas exerce efeitos contra regulatórios ao eixo ECA/Ang II/AT1, por contrapor ao eixo vasoconstritor, mitogênico, arritmogênico e trombolítico da

Ang II (73) por meio da liberação de prostaciclina, NO e fatores de transcrição anti-hipertroficantes (74). Todos esses efeitos benéficos ao organismo colocaram esse eixo em evidência nos estudos voltados para a gênese e tratamento das diferentes formas de HC.

O SRA é importante na manutenção da saúde da mãe e do feto e, para o desenvolvimento de uma gravidez normal, colaborando na homeostasia do sistema renal, uteroplacentário (75) e cardíaco (76). Uma característica interessante e exclusiva da gravidez é que o aumento progressivo de E2 pela placenta (77) é capaz de estimular a síntese hepática do angiotensinogênio (78). Outro componente do SRA que também se eleva entre a quarta e sexta semana de gestação é a renina plasmática (79).

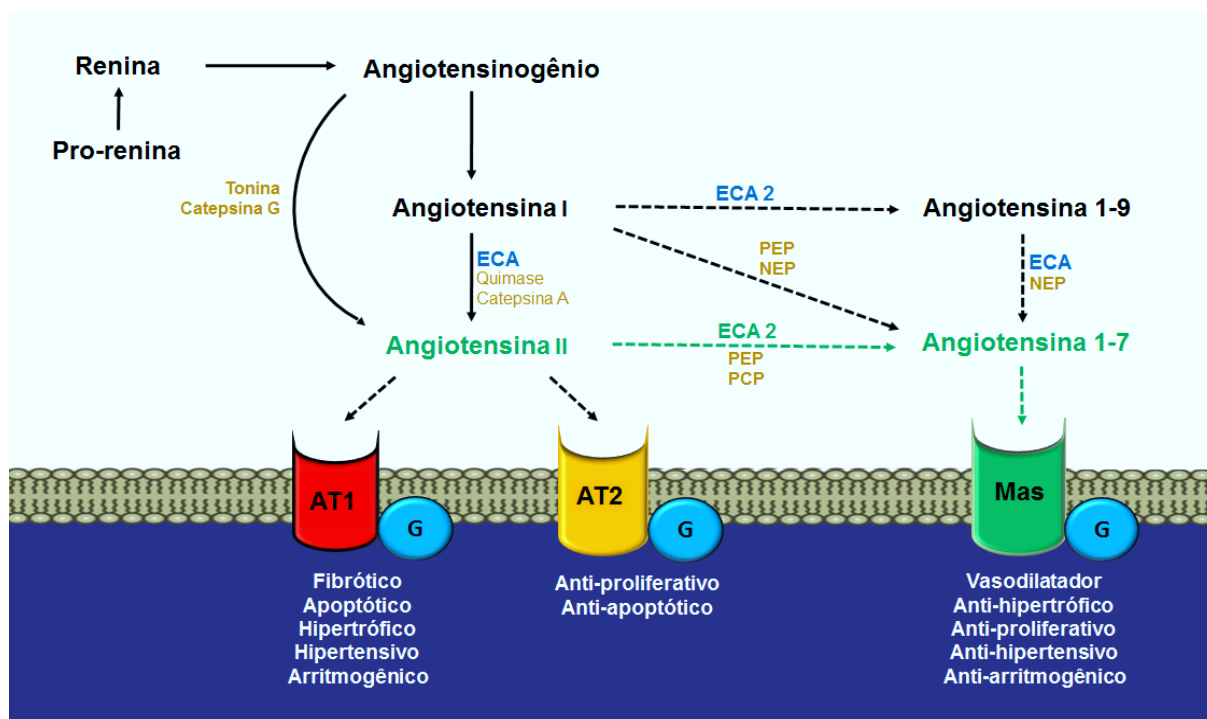


Figura 2. Representação esquemática do Sistema Renina-Angiotensina evidenciando as principais vias de formação das angiotensinas e seus receptores. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA 2, enzima conversora de angiotensina 2; AT1, receptor de angiotensina II tipo 1; AT2, receptor de angiotensina II tipo 2; G, proteína G.

O aumento do angiotensinogênio e da renina plasmática, são eventos que desencadeiam as reações enzimáticas do SRA. Interessantemente, a Ang II também

está elevada na gravidez em concentrações similares às condições patológicas, porém sem gerar efeitos deletérios (80,81). Isso pode ser devido a capacidade da progesterona materna de suprimir o efeito pressor da Ang II sobre tecido vascular por meio do aumento da síntese de prostaciclina vasculares (82). Outro fator interessante é que o aumento da Ang II é um fator contribuinte para o aumento da síntese de colágeno na MEC, todavia a infusão de Ang II na gravidez não aumenta a fibrose intersticial (83).

Algumas descrições na literatura têm mostrado o envolvimento patológico do AT1 na gravidez com complicação. Em mulheres com pré-eclâmpsia pode ocorrer heterodimerização do AT1 com o receptor de bradicinina, fator que pode estar relacionado com o aumento da sensibilidade à Ang II, causa primordial da complicação dessa patologia (81). Outra evidência relacionada ao AT1 na pré-eclâmpsia é a síntese de auto anticorpo agonista do AT1 (84), um agente causador de isquemia placentária e hipertensão (85). Já na gravidez normal, há evidências do aumento da Ang-(1-7) plasmática (86), renal (87,88), placentária (89) e uterina (90).

Diante do exposto, pode-se afirmar que a via Ang II/AT1 está implicada em algumas condições patológicas presentes na gravidez e que o eixo Ang-(1-7)/Mas está associado ao remodelamento cardíaco fisiológico induzido por exercício físico e possui efeitos contra regulatórios aos efeitos gerados pela via Ang II/AT1. No entanto, ainda não se sabe se o receptor Mas está envolvido no desenvolvimento do remodelamento cardíaco fisiológico e nas alterações da função cardíaca observadas na gestação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a participação do receptor Mas no remodelamento cardíaco induzido pela gravidez, bem como suas implicações na função cardíaca na gestação.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio do receptor Mas sobre a fertilidade das fêmeas
- Avaliar se o bloqueio do receptor Mas gera efeito fetotóxico e/ou embriotóxico nas fêmeas.
- Avaliar a PAS das ratas gestantes submetidas ao antagonista do receptor Mas, A-779.
- Avaliar a resposta hipertrófica e fibrótica em ratas tratadas com o antagonista do receptor Mas.
- Avaliar a resposta hipertrófica e fibrótica em camundongas com deleção genética para o receptor Mas.
- Avaliar a função cardíaca por ecocardiografia das camundongas gestantes com deleção genética para o receptor Mas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os animais utilizados nesta pesquisa, foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos relativos ao uso de animais de laboratório, assim como os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), sob nº. 039/14.

Ratas *Wistar* - Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 80 dias de idade e peso corporal variando entre 180 e 210 g (no início dos experimentos), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG, Goiânia).

A alocação das ratas foram em caixas plásticas de polipropileno medindo 41x34x16 cm, com no máximo 5 animais por caixa anterior ao cruzamento, com temperatura e umidade do ambiente controlados, sob iluminação artificial com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, iniciando-se a fase clara às 7:00 horas, no biotério setorial do Instituto de Ciências Biológicas 2. Os animais receberam água filtrada e ração padrão *ad libitum*.

Camundongas C57Bl/6 *Wild-type* and *Knockout* - Também foram inseridas nessa pesquisa camundongas com deleção genética (*Knockout* [KO]) para o receptor Mas e o seu respectivo controle *Wild type* (WT), com aproximadamente 80 dias de idade e peso corporal variando entre 18 e 20 g (no início dos experimentos), fornecidos pelo Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte).

As camundongas foram alocadas em mini-isoladores de polipropileno medindo 37,9x19,7x12,6cm, com no máximo 5 animais por caixa anterior ao cruzamento, com temperatura e umidade do ambiente controlados, sob iluminação artificial com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, iniciando-se a fase clara às 7:00h. Todos os animais receberam água filtrada e ração padrão *ad libitum*.

3.2 Protocolo Experimental 1

As Ratas *Wistar* foram randomizadas entre os grupos e mantidas por um período de adaptação mínimo de sete dias antes do início dos experimentos. Na semana seguinte, por meio do lavado vaginal, foi acompanhado o ciclo estral por 1 semana. As fêmeas com o ciclo estral regular foram consideradas aptas para os experimentos. A fase estral escolhida para a administração do fármaco por meio do implante de uma mini bomba osmótica foi diestro II, por possibilitar um período de recuperação do animal e aceitabilidade do macho para a cópula. Para a cirurgia, as ratas foram anestesiadas na região peritoneal com tribromoetanol a 2,5% (Sigma®) na dose de 1 ml/100g de animal. Após a administração do anestésico, foi realizada a tricotomia do pelo na região posterior da coluna vertebral, anatomicamente entre as escápulas, uma incisão de aproximadamente 2 cm foi realizada, a pele divulgionada, o implante fixado e em seguida suturada com fio agulhado estéril. A temperatura corporal do animal foi mantida por meio de luz infravermelho. Dois dias após a cirurgia de implante da bomba de perfusão, as ratas foram submetidas ao cruzamento. No entanto, um dia antes do cruzamento, as ratas foram estimuladas por meio da colocação da caixa do rato macho ao lado das suas respectivas alocações.

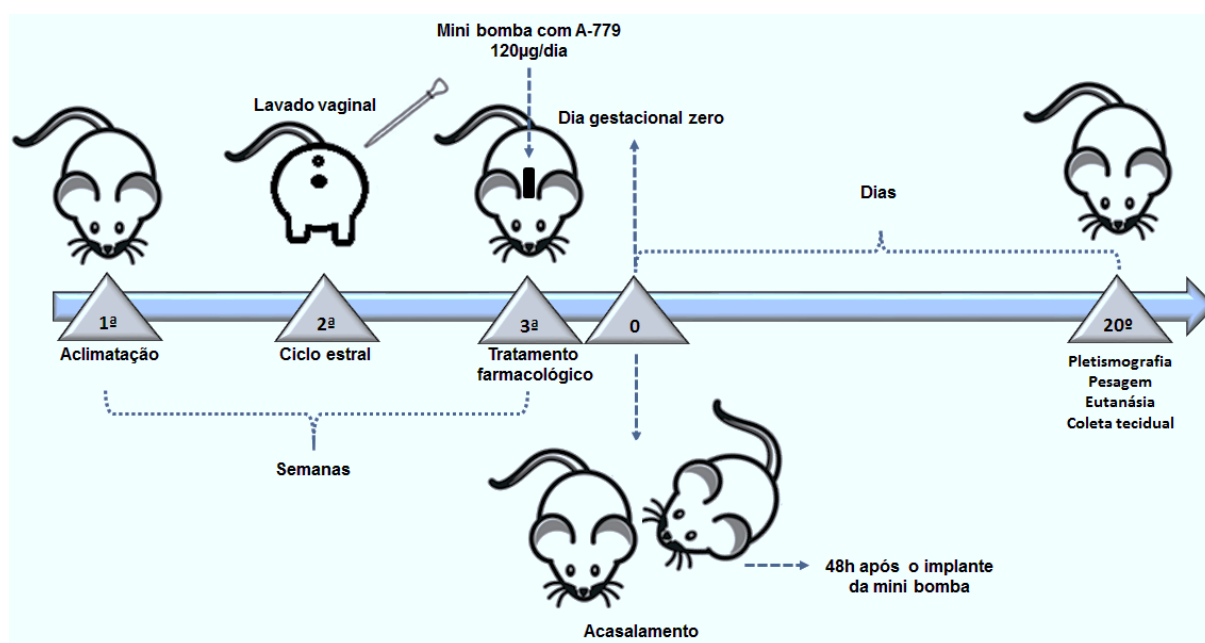


Figura 3. Imagem ilustrativa do protocolo experimental 1.

Para inibir a ação da Ang-(1-7), foi usado o D-Alanine-Ang-(1-7) (A-779), antagonista seletivo para o receptor Mas, receptor específico da Ang-(1-7), diluído em água deionizada Milli-Q, administrado por via subcutânea, por meio de um implante de minibomba osmótica (Alzet®) com dosagem contínua de 120µg/dia, com durabilidade para 28 dias ininterruptos. A dosagem foi estabelecida após revisão na literatura (91–93).

Os grupos de acasalamento foram randomizados aleatoriamente em pares de fêmeas, sendo realizada a introdução do rato macho à caixa apenas no final do dia. No início da manhã seguinte, a confirmação da cópula foi realizada por meio do lavado vaginal, a presença do espermatozoide foi confirmada por meio da microscopia de luz, que foi contado como dia gestacional zero. Posteriormente, as fêmeas grávidas foram pesadas e alocadas em caixas individuais até o dia da eutanásia (Figura 3).

Os animais foram randomizados em 3 grupos: grupo 1= não gestante (W-NP), grupo 2= gestante sem A-779 (W-P), grupo 3= Gestante com A-779 (W-P + A-779).

3.2.1 Pletismografia de cauda

Uma semana anterior a eutanásia, as ratas foram aclimatizadas para a pletismografia de cauda. No último dia de gestação, as ratas foram colocadas em uma caixa aquecida por 10 min para dilatação da artéria caudal, posteriormente transferida para um contensor com exposição total da cauda, na qual foi introduzido um manguito com conexão comum com uma pera de insuflação, um transdutor de pressão e uma torre de mercúrio. Próximo ao manguito foi acoplado um sensor de pulso em contato com a cauda, na região anatômica correspondente a artéria caudal, que foi capaz de captar os sinais produzidos pela PAS. A captação dos sinais mecânicos produzidos a partir da insuflação do manguito e da pressão arterial pulsátil caudal, foi realizada por transdutores conectados a um amplificador de sinais BP-100 (ADInstruments), que por sua vez foi conectado a um conversor analógico/digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália) e em sequência a um computador, com o software LabChart7 (ADInstruments) que permitiu obter registros dos sinais em tempo real em imagens gráficas (Figura 4). Para obter os valores da PAS, foram realizadas 3 aferições por animal, das quais foi obtida a média aritmética dos valores de cada animal. O

exame foi realizado no vigésimo dia de gestação e posteriormente eutanasiados por decaptação.

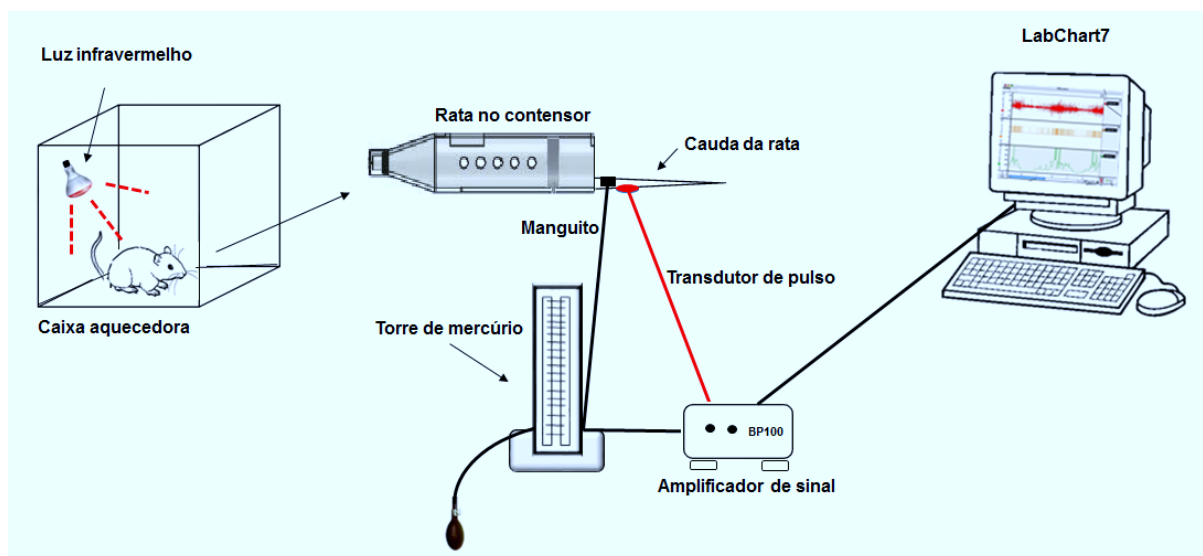


Figura 4. Representação ilustrativa da pletismografia de cauda.

3.2.2 Coração

Após a eutanásia dos animais, a cavidade torácica foi aberta para a excisão do coração, que foi submerso em um béquer com 20 ml de cloreto de potássio (4mM) para o total relaxamento das fibras cardíacas. Em seguida, o tecido foi colocado em uma placa de petri sobre o gelo, forrada com papel filtro para retirada do excesso de líquido, o ventrículo direito e esquerdo (VE) foram dissecados, o ápice e a base removidos e armazenados a -80°C , o tecido cardíaco transversal medial esquerdo foi mensurado (5 mm), separado e fixado para processamentos histológicos e análises posteriores.

3.2.3 Cesariana

Após a remoção do coração, os animais foram submetidos à cesariana (Figura 5). Com o auxílio de uma tesoura, foi realizada a laparotomia abdominal no eixo crânio caudal do animal (A), o útero gravídico foi removido na altura do cérvix com seus conteúdos e posicionado de acordo com a anatomia da excisão (B). Em seguida os úteros foram abertos, os fetos com sua respectiva placenta foram removidos, posicionados em sentido horário respeitando os lados direito e esquerdo para

experimentos futuros (C). Os neonatos, as placentas e a anatomia materna foram submetidos a avaliação macroscópica quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas. Seguidamente os neonatos foram quantificados, sexados por meio da distância anogenital e pesados. Os corpos lúteos ovarianos (D), as reabsorções fetais e sítios de implantações (e) também foram quantificados. Ao final das análises, todos os neonatos foram eutanasiados por decapitação.

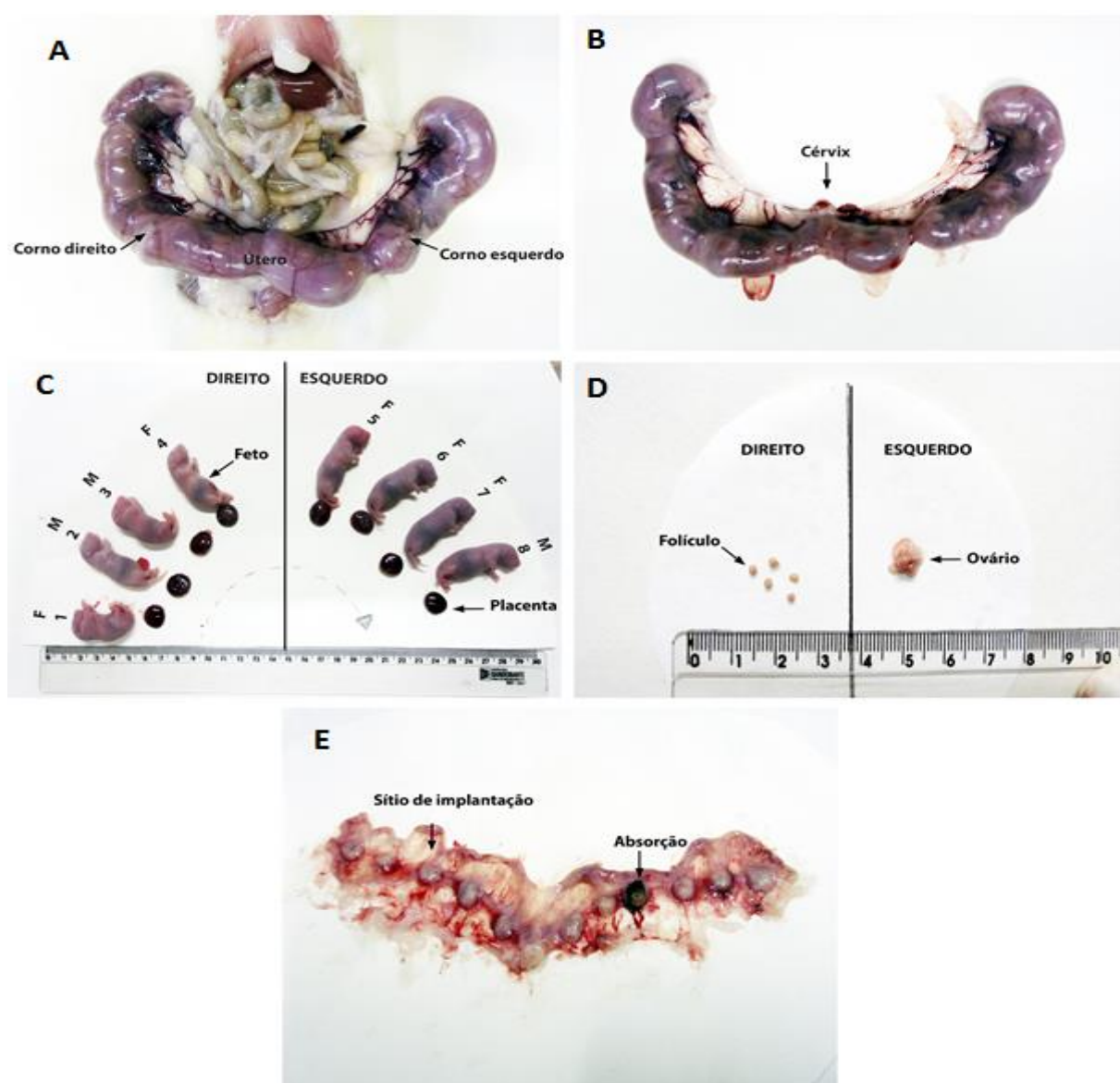


Figura 5. Cesariana. (A) Laparotomia com exposição uterina. (B) útero removido na altura do cérvix com seus devidos conteúdos. (C) contagem, sexagem e pesagem dos neonatos com suas respectivas placentas. (D) quantificação dos corpos lúteos ovarianos direito e esquerdo. (E) quantificação dos sítios de implantação e absorções fetais. M, macho; F, Fêmea.

3.3 Protocolo Experimental 2

As camundongas foram randomizadas aleatoriamente entre os grupos e mantidas por um período de adaptação mínimo de sete dias antes do início dos experimentos. Na semana subsequente, o ciclo estral foi acompanhado, em dentro II as camundongas foram submetidas ao acasalamento, sendo realizada a introdução do camundongo à caixa apenas no final do dia. No início da manhã do dia seguinte, a confirmação da cópula foi realizada por meio lavado vaginal, a presença do espermatozoide foi considerado dia gestacional zero e o macho foi retirado da caixa. As camundongas permaneceram alocadas em grupo de 3 animais por caixa até o dia da eutanásia (Figura 6).

Após a formação dos grupos de acasalamento, não houve variações entre os animais dos grupos, bem como foram realizadas no máximo três tentativas consecutivas para o acasalamento. O peso de todos os animais foi obtido no dia da eutanásia.

Foram criados 4 grupos experimentais: grupo 1= WT controle (WT), grupo 2= WT gestante (WT-P), grupo 3= KO controle (KO) e grupo 4= KO gestante (KO-P).

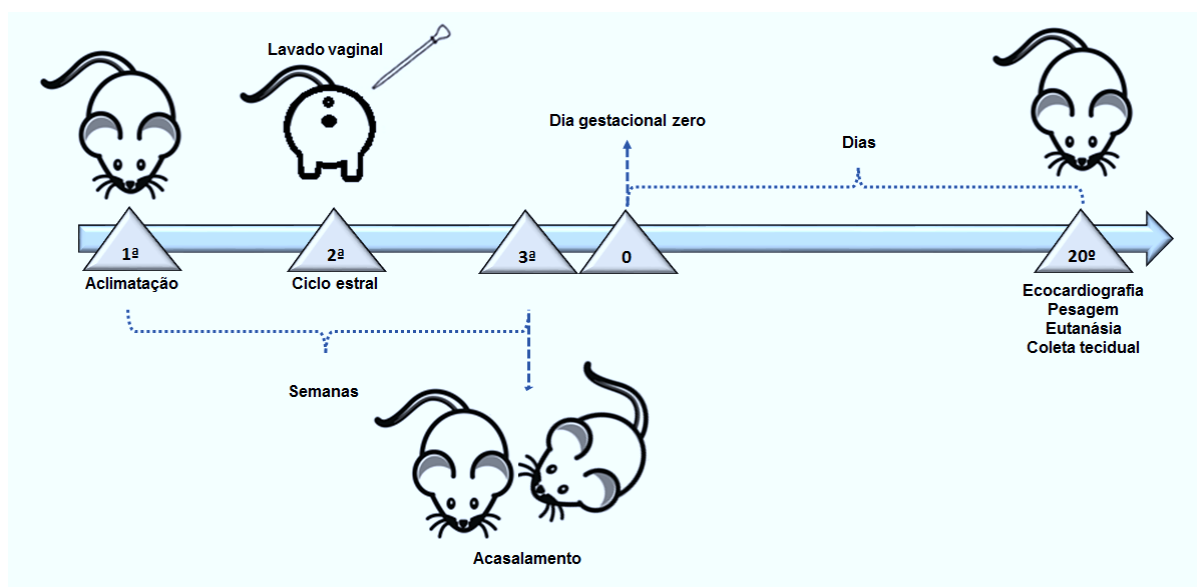


Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental 2.

3.3.1 Ecocardiografia

Avaliação da função cardíaca das camundongas foram realizadas *in vivo* de forma não invasiva, utilizando um sistema de ecocardiografia transtorácica de alta resolução equipado com transdutor bifrequencial de 30/40 MHz (VEVO 2100 VisualSonics, Toronto, Canadá). No vigésimo dia gestacional os animais foram anestesiados por inalação com isoflurano a 5%. Na posição supina, o tórax e abdômen foram tricotomizados, aplicado gel condutor para ecocardiografia a fim de permitir maior impedância das ondas ultrassônicas. Imagens de alta resolução foram obtidas a partir das janelas ultrassonográficas paraesternal direita eixos curto e longo no modo bidimensional (Modo B). As dimensões do VE foram mensuradas em modo M (Motion) no nível dos músculos papilares tanto para o eixo curto como para o eixo longo. Os parâmetros da função cardíaca avaliados foram: fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (FS), volume sistólico (VS), volume sistólico final (VSF), débito cardíaco (DC) e tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT). Todas as medidas e cálculos foram realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

3.3.2 Coração

Após a eutanásia dos animais, a cavidade torácica foi aberta para a excisão do coração, que foi submerso em um béquer com 20 ml de cloreto de potássio (4mM) para o total relaxamento das fibras cardíacas. Em seguida, o tecido foi colocado em uma placa de petri sobre o gelo, forrada com papel filtro para retirada do excesso de líquido, o ventrículo direito e esquerdo foram dissecados, o ápice e a base removidos e armazenados a -80°C, o tecido cardíaco transversal medial esquerdo foi mensurado (4 mm), separado e fixado para processamentos histológicos e análises posteriores.

3.3.3 Cesariana

Após a remoção do coração, os animais foram submetidos à cesariana. Com o auxílio de uma tesoura, foi realizada a laparotomia abdominal no eixo crânio caudal do animal, o útero gravídico foi removido na altura do cérvix com seus conteúdos e posicionado de acordo com a anatomia da excisão. Em seguida os úteros foram abertos, os fetos com sua respectiva placenta foram removidos, posicionados em

sentido horário respeitando os lados direito e esquerdo para experimentos futuros. Os neonatos, as placentas e a anatomia materna foram submetidos a avaliação macroscópica quanto à presença de anomalias e/ou malformações congênitas. Seguidamente os neonatos foram quantificados, sexados por meio da distância anogenital e pesados. Os corpos lúteos ovarianos, as reabsorções fetais e sítios de implantações também foram quantificados (Figura 5). Ao final das coletas teciduais, todos os neonatos foram eutanasiados por decapitação.

3.4 Análises

3.4.1 Histologia

O segmento do VE coletado para histologia foi fixado em metacarn (Tabela 1) por 4 horas, posteriormente desidratados em séries de soluções crescentes de etanol (Neon®), xilol (Synth®) e incluídos em paraplast (Sigma® (Tabela 2). As amostras foram seccionadas em micrótomo (Leica RM2155, Nussloch, Germany, 4 µm de espessura, 3 cortes por animal com intervalo de 150µm. Após secção, o material foi fixado em lâminas (Exacta, 26x76x1x1.2mm), reidratados (Tabela 3) e submetidos à três diferentes colorações: citoquímica em hematoxilina/eosina (HE) (Tabela 4), picrosirius (Tabela 5) e reticulina de gomori (Tabela 6). Após a coloração de interesse, os cortes foram desidratados (Tabela 7) e montados.

Morfometria do cardiomiócito - Os cardiomiócitos corados em HE foram mensurados a fim de determinar a porcentagem de hipertrofia celular. Os cortes transversais do VE foram microfotografados, em cada segmento tecidual 5 imagens foram capturadas, de cada imagem capturada 5 cardiomiócitos foram mensurados na área de secção transversa (AST), totalizando 75 cardiomiócitos por animal (Figura 7). Somente as células cardíacas dispostas longitudinalmente, com núcleo e limites celulares visíveis foram consideradas. A AST de cada cardiomiócito foi mensurado na região correspondente ao núcleo. Esta análise foi realizada nos diferentes grupos dos animais experimentais em estudo.

Estereologia da matriz extracelular - Para quantificar a deposição das fibras colágenas na matriz extracelular intersticiais totais foi realizada a coloração em picrosirius. Para especificar o tipo de fibra colágena (tipo I ou III), também foi realizada a técnica em reticulina de gomori, realizada apenas nos corações das camundongas.

Em ambas as técnicas citadas anteriormente, o método de análise quantitativo utilizado foi a estereologia, por ser capaz de fornecer ferramentas eficientes e confiáveis para determinar parâmetros quantitativos da estrutura do tecido em seções. A estereologia consiste em um teste de multipontos, com 130 pontos (94). Para isso, foram capturadas 5 regiões aleatórias (ausentes de vasculaturas) de cada lâmina do grupo experimental. Os valores relativos foram determinados pela contagem dos pontos coincidentes sobre o vértice de cada compartimento em estudo, seguido da divisão destes pelo número total de pontos do sistema teste

Todas as imagens histológicas foram obtidas no microscópio Zeiss Scope A1, sendo que as imagens em picrosirius foram microfotografadas em magnitude de 20x com um filtro polarizador acoplado. Já as imagens em HE e reticulina foram capturadas sob luz convencional em magnitude de 40x. Posteriormente foram digitalizadas no software Zen Lite 2012 e analisadas no software Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

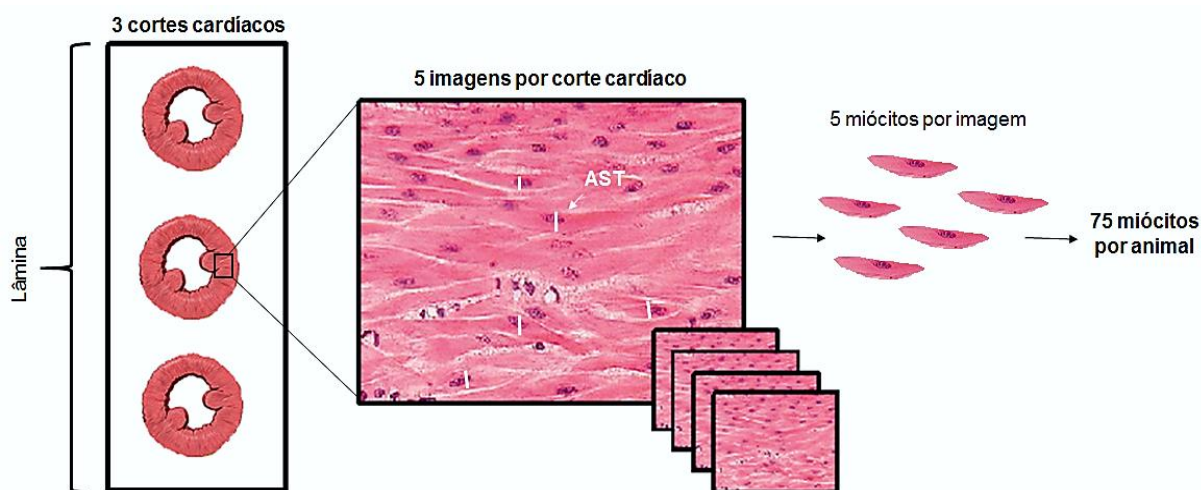


Figura 7. Imagem representativa do método de análise da hipertrofia dos cardiomiócitos. AST, área de secção transversa do cardiomiócito.

Tabela 1. Descrição do fixador tecidual metacarn

Reagente	Volume (ml)	Temperatura (°C)
Metanol PA	60	Ambiente
Clorofórmio PA	30	Ambiente
Ácido acético PA	10	Ambiente

Tabela 2. Descrição do processamento do tecido em paraplast

Desidratação			
Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Etanol PA 70%	60	Imersão	Ambiente
Etanol PA 80%	60	Imersão	Ambiente
Etanol PA 95%	60	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	60	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	60	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	60	Imersão	Ambiente
Diafinização			
Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Xilol PA	60	Imersão	Ambiente
Xilol PA	60	Imersão	Ambiente
Xilol PA	60	Imersão	Ambiente
Infiltração			
Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Paraplast I	60	Imersão	58°- 60°C
Paraplast II	60	Imersão	58°- 60°C
Paraplast de inclusão	Até a secção	Emblocamento	58°- 60°C

Tabela 3. Reidratação para citoquímica em geral

Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Xilol PA	20	Imersão	Ambiente
Xilol PA	20	Imersão	Ambiente
Xilol PA	20	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	1	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	2	Imersão	Ambiente
Etanol PA 70%	1	Imersão	Ambiente
Etanol PA 50%	1	Imersão	Ambiente
Água corrente	2	Imersão	Ambiente

Tabela 4. Citoquímica em hematoxilina/eosina

Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Hematoxilina	05	Imersão	Ambiente
Água corrente	10	Imersão	Ambiente
Etanol 80%	1	Imersão	Ambiente
Eosina	5	Imersão	Ambiente
Desidratação e montagem			

Tabela 5. Citoquímica em picrossírius

Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Picrossírius	60	Imersão	Ambiente
Água corrente	1	Lavagem	Ambiente
Hematoxilina	8	Imersão	Ambiente
Água corrente	10	Imersão	Ambiente
Etanol 95%	0,2	Imersão	Ambiente
Desidratação e montagem			

Tabela 6. Citoquímica em reticulina de gomori

Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Permanganato de Potássio	2	Gotejamento	Ambiente
Ácido oxálico	1	Gotejamento	Ambiente
Alúmen férrico	2	Gotejamento	Ambiente
Prata amoniacal	2	Gotejamento	Ambiente
Formol 10%	3	Gotejamento	Ambiente
Cloreto de ouro	0,2	Imersão	Ambiente
Hipossulfito de sódio	2	Gotejamento	Ambiente
Ácido pícrico	2	Gotejamento	Ambiente
Desidratação e montagem			

Tabela 7. Desidratação para citoquímica em geral

Reagente	Tempo (min)	Procedimento	Temperatura (°C)
Etanol PA 95%	1	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	1	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	1	Imersão	Ambiente
Etanol PA 100%	1	Imersão	Ambiente
Xilol PA	1	Imersão	Ambiente
Xilol PA	1	Imersão	Ambiente
Xilol PA	1	Imersão	Ambiente
Montagem			

A montagem consiste na adesão de uma lamínula (Precision®) com Entellan® sobre o material processado.

3.4.2 Parâmetros Gestacionais

Para analisar a fertilidade, embriotoxicidade (perda pré-embriônica), fetotoxicidade (perda pós-embriônica), entrega nutricional da mãe para o feto (razão feto/placenta) e a razão sexual de machos e fêmeas entre os neonatos dos diferentes grupos, foi realizada as seguintes fórmulas matemáticas:

Fórmula 1:

$$\text{Perda pré-embriônica} = \frac{\text{número total de corpos lúteos}}{\text{número total de implantações}}$$

Fórmula 2:

$$\text{Perda pós-embriônica} = \frac{\text{número total de reabsorções}}{\text{número total de implantações}}$$

Fórmula 3:

$$\text{Razão feto placenta} = \frac{\text{peso dos neonatos machos ou fêmeas}}{\text{peso placentário correspondente}}$$

Fórmula 4:

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{número total de neonatos machos ou fêmeas}}{\text{número total de neonatos}}$$

3.5 Análise Estatística

O software utilizado para a análise dos dados obtidos foi o GraphPad Prism 5.0 e 6.0®. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os Parâmetros de fertilidade, embriotoxicidade, fetotoxicidade e peso corporal materno foram analisados por meio do teste t-student. Análise de variância seguida do pós-teste de Newman-Keuls foi utilizado para analisar a pressão arterial, parâmetros histológicos e dados ecocardiográficos. Todas as análises estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo

MAS RECEPTOR CONTRIBUTES TO PREGNANCY-INDUCED CARDIAC REMODELING

^aCintia do Carmo e Silva; ^dJônathas Fernandes Queiroz de Almeida; ^aLarissa Matuda Macedo; ^dMarcos Barrouin Melo; ^aGustavo Rodrigues Pedrino, ^bFernanda Cristina Alcantara dos Santos, ^bManoel Francisco Biancardi, ^{c,d}Robson Augusto Souza dos Santos, ^bAdryano Augustto Valladão de Carvalho; ^aElizabeth Pereira Mendes; ^aDiego Basile Colugnati, ^bRenata Mazaro Costa; ^aCarlos Henrique de Castro.

Departments of ^aPhysiological Sciences, ^bPharmacology and ^cHistology, Embryology and Cell Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, 74001-970; Departments of ^dPhysiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, 31270-901; ^eNational Institute of Science and Technology in Nanobiopharmaceutics, Brazil, 31270-901.

Short Title: Mas Receptor and Pregnancy-Induced Cardiac Remodeling

Corresponding author: Carlos Henrique de Castro, PhD
Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB II,
Universidade Federal de Goiás, Campus II,
Avenida Esperança, s/n
74690-900, Goiânia, GO, Brasil,
FAX: (55-62) 3521-1204 - Phone: (55-62) 3521-1775.
e-mail: castro@ufg.br

Abstract

Previous studies have demonstrated a protective effect of the Ang-(1-7)/Mas receptor axis on pathological cardiac hypertrophy. Also, the involvement of Mas receptor in the exercise-induced cardiac hypertrophy has been suggested. However, the role of the Ang-(1-7)/Mas receptor on pregnancy-induced cardiac remodeling remains unknown. The objective of this study was to evaluate the participation of the Mas receptor in the development of the cardiac hypertrophy and fibrosis induced by gestation. Female Wistar rats were randomly divided in 3 groups: control (W-NP), pregnant (W-P), and pregnant treated with A-779 (W-P + A-779). Wild type and Mas-knockout mice were distributed in non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P) groups. Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff plethysmography. The medial part of the left ventricle (LV) was collected for histological analysis. Echocardiographic analysis was used to evaluate the cardiac function. SBP was not changed by pregnancy or A-779 treatment in the Wistar rats. Pharmacological blockade or genetic deletion of Mas receptor attenuated the pregnancy-induced myocyte hypertrophy. The treatment with A-779 or genetic deletion of the Mas receptor increased the collagen III deposition in LV from pregnant animals. When compared to WT, KO mice presented a lower ejection fraction, fraction shortening, stroke volume and higher end systolic volume. Interestingly, the pregnancy restored these parameters. We conclude that Mas receptor is involved in the cardiomyocyte hypertrophy and in the control of the collagen III deposition during pregnancy. These alterations are associated with improvement of the cardiac function through Mas-independent mechanism.

Key words: Angiotensin-(1-7), cardiac hypertrophy, fibrosis, heart function, A-779.

SUMMARY STATEMENT

In this study we have showed that the Ang-(1-7)/receptor Mas axis contributes to cardiac remodeling development induced by pregnancy.

INTRODUCTION

Cardiac hypertrophy can be defined as a quantitative increase in the myocyte size (1) in response to pressure or volume overload, leading to an increase in contractility and normalization of the cardiac wall stress (2-5).

The left ventricular hypertrophy, based on the type and duration of stimulus (6), results in two classes of functional cardiac phenotypes: pathological and physiological (7). In prolonged pathological diseases, such as hypertension, aortic valve stenosis (8), myocardial infarction and genetic mutations (9), the hypertrophied heart displays functional impairments, mainly due to an increase in the fibrosis and stiffness (10). On the other hand, physiological hypertrophy is present during postnatal growth, chronic physical exercise and in the maternal heart during pregnancy (1).

Throughout the pregnancy, the heart develops eccentric ventricular hypertrophy in response to volume overload caused by increased blood volume. This hypertrophy is characterized by reversible growth with normal or enhanced cardiac function (11). The changes in the circulating sexual hormones levels in pregnancy can be related to ventricular hypertrophy development (12). One example is the increase of the protein synthesis in the cardiac muscle in response to progesterone (13,14).

A growing body of research has reported on the important relation between cardiac hypertrophy development and the Renin-angiotensin system (RAS). Angiotensin (Ang) II and Ang-(1-7) are the main effectors of the RAS and have counter-regulatory actions. Ang II binding to AT1 receptor increases blood pressure and causes cardiac hypertrophy and fibrosis (15,16). In opposition, activation of the Mas receptor by Ang-(1-7) or AVE0991, a non-peptide Mas receptor agonist, was able to prevent *isoproterenol* or hypertension-induced cardiac remodeling (17). Recently, it was demonstrated that exercise training increases the Ang-(1-7) levels and upregulates Mas receptor in the hypertrophied rat hearts (18), suggesting that ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis plays a role in the development of the physiological cardiac hypertrophy.

Interestingly, a crosslink between RAS and ovarian hormones has been observed during pregnancy. In the gestational period, estrogens cause an increase in the RAS activity, which augments the levels of angiotensinogen and renin (19). In addition, increased Angiotensin II levels seem to contribute to the pathophysiology of

preeclampsia (20) and the blockade of AT1 receptor prevents cardiac remodeling associated hypertension in pregnancy (21).

Nevertheless, whether or not Ang-(1-7)/Mas receptor axis is involved in the genesis and development of the gestational cardiac hypertrophy remains to be unraveled. In this regard, this study aimed to evaluate the role of the Mas receptor activation in the development of cardiac remodeling induced by gestation.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male (280 - 350 g) and Female (180 - 210 g) Wistar rats were provided by the animal facilities of the Federal University of Goiás, Brazil. Male and female C57Bl/6 Wild-type (WT) and Mas-knockout (KO) mice weighing 18-20g were obtained from the transgenic animal facilities of the Laboratory of Hypertension, Federal University of Minas Gerais, Brazil. All animals were kept in temperature-controlled rooms with 12 hour light/dark cycles and the animals had free access to water and food. All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines approved by local authorities (ethical committee number 039/14).

Study design

Female Wistar rats were randomly shared in 3 groups: control (W-NP), pregnant (W-P), and pregnant treated with A-779 (W-P + A-779). Wild type and KO mice were divided in non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P) groups. Two days before mating (diestrus II), the rats were anesthetized with tribromoethanol (0.1 ml/10g body weight of 2.5% solution) and received a subcutaneous implant of osmotic minipump (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino CA) containing Mas receptor antagonist A-779 (120 µg/day/Kg). The infusion was kept over the gestational period. The presence of a vaginal plug and sperm in the vagina confirmed successful mating and indicated the first day of gestation. On day 20 of gestation the animals were weighed and euthanized for decapitation and tissues were collected.

General parameters of pregnancy

In order to assess possible changes in the fetuses and fertility, we performed a midline laparotomy. The ovaries were removed and the number of corpora lutea, implantations sites and reabsorptions were determined (22). An implantation site with a shrunken placenta and a dissolved or discolored brown embryo was defined as reabsorption. Pre-embryonic loss was assessed by calculating the difference between the number of corpora lutea (representing the number of eggs ovulated) and implantations sites for each female; pre-embryonic loss was set as the lack of fertilization or death of the embryo prior to implantation sites, which is defined as embryotoxic effect. The post-embryonic loss was calculated by the number of reabsorptions by total number of implantations sites, which indicates fetotoxicity. At the end of pregnancy, fetuses were sexed, weighed and decapitated.

Systolic blood pressure

Systolic blood pressure (SBP) was measured in the rats by noninvasive tail-cuff plethysmography (PowerLab/400 ADInstruments, Australia) at the twentieth day of pregnancy.

Morphometrical and stereological analyses

The hearts were collected and imerged in potassium chloride solution (4 mmol/L). The left hearts (LV) were dissected and the medial part of the LV was separated for histological analysis. LV samples were fixed in methacarn, dehydrated in ethanol, clarified in xylene and embedded in paraffin. The tissue fragments were sectioned with 4 μ m of thickness. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to evaluate the cross-sectional area of myocytes (MCSA) and general morphological studies. The measures of MCSA were performed in the region corresponding to the nucleus and with visible cell limit. Picrosirius red (direct red 80) staining was used for histological analysis of total collagen (Col) deposition. The images were obtained in a system coupled with a polarizing filter, facilitating the identification of the collagen fibers. Gomori's reticulin cytochemistry was also performed to specify collagens fibers type I and III.

Stereological analyzes were performed on a multipoint test system with 130 points (23) to quantify the relative frequency of total Col and type I and III Col. All

histological images were obtained under a microscope Zeiss Axio Scope A1, coupled with Zen Lite software 2012. The morphometrical and stereological analyzes were performed using the software Image Pro-Plus v6.1 for Windows (Media Cybernetics Inc., Sprong Silver, MD, USA).

Echocardiographic analysis

Cardiac morphology and function in adult mice (10–12 weeks old) were assessed noninvasively using a high-frequency, high-resolution echocardiographic system consisting of a VEVO 2100 ultrasound machine equipped with a 30–40 MHz bifrequencial transducer (Visual Sonics, Toronto, Canada). The mice were anesthetized with 5% isoflurane during 1 min for induction. Anesthesia was maintained via a nose cone with 1.0 to 1.25% isoflurane. The mice were placed in supine position on an imaging stage equipped with built-in electrocardiographic electrodes for continuous heart rate monitoring and a heater to maintain the body temperature at 37°C. Then the anterior chest was shaved and it was applied gel for ultrasound conduction. The anterior chest was shaved and the mice were placed in supine position on an imaging stage equipped with built-in electrocardiographic electrodes for continuous heart rate monitoring and a heater to maintain the body temperature at 37 °C. Images of short and long axis views of the heart were acquired using bidimensional and M-modes. Left ventricle chamber dimensions and wall thicknesses were measured. The parameters of cardiac function were: ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), stroke volume (SV), end systolic volume (ESV), cardiac output (CO) and isovolumetric volume time (IVRT). All measurements and calculations were made according to the guidelines of the American Society of Echocardiography.

Data analysis

The results are presented as the mean \pm standard error of mean. General parameters of pregnancy were compared by Student's t test. One-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls post-test was used to analyze blood pressure, morphometrical and stereological analysis and echocardiografic data. All statistical analyses were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of the Mas receptor blockade on pregnancy-induced cardiac changes

The pregnancy did not alter the SBP in the rats at the late phase of the gestation period (110 ± 7.2 vs. 105 ± 6.6 mmHg in pregnant rats). Indeed, the treatment with A-779 did not change the SBP in pregnant rats (105 ± 6.6 vs 105 ± 5.9 mmHg in W-P + A-779 animals).

As expected, pregnancy induced an increase in the MCSA from Wistar rats. However, the Mas receptor blockade attenuates the myocyte hypertrophy (Figure 1A and B). Thereafter, the Col deposition in the left ventricle was evaluated. Pregnancy did not change the total Col deposition in Wistar rats. However, the A-779 treatment induced an increase in the Col deposition in the LV from Wistar rats (Figure 2 A and B).

Effects of the genetic deletion of the Mas receptor on pregnancy-induced cardiac changes

In order to confirm the changes observed by pharmacological blockade of the Mas receptor, we investigated the pregnancy-induced cardiac changes in Mas KO mice. The cardiomyocyte hypertrophy promoted by pregnancy was also observed in WT mice hearts. Similar to found during pharmacological blockade, the deletion of the Mas receptor attenuated the hypertrophy induced by pregnancy (Figure 3 A and B).

Previous studies have demonstrated that male KO mice present a fibrotic profile in the heart (24). Here, no difference was found in the total Col deposition in non-pregnant female KO mice hearts. However, the pregnancy increased the total Col deposition in KO-P, but not in WT mice hearts (Figure 4 A and B). The deposition of the Col I (Figure 5 A) and Col III (Figure 5 B) did not differ between hearts of non-pregnant KO mice and WT. However, we observed an increased Col III deposition in KO-P mice hearts. The expression of the Col I was not changed by pregnancy (Figure 5 A-C).

The deletion of Mas receptor induced a significant reduction in systolic cardiac function in female mice. As observed in the figure 6, KO mice presented a lower ejection fraction (Figure 6 A), shortening fraction (Figure 6 B), stroke volume (Figure 6 C) and higher end systolic volume (Figure 6 D) compared to WT. Interestingly, the

pregnancy restored these parameters. Cardiac output was significantly higher in animals KO-P compared to KO (Figure 6 E). Diastolic function was not different among the groups as observed by the IVRT (Figure 6 F).

General parameters of pregnancy

Treatment with Mas receptor antagonist or genetic deletion of Mas receptor did not affect the fertility of the animals (Supplementary table 1 and 2). The pregnant Wistar rats did not show difference in gestational body weight gain (Supplementary figure 1 A). In contrast, body weight gain was lower in KO mice when compared to WT mice (Supplementary figure 1 B). Mas receptor blockade decreased the placenta weight without changing fetal weight. This resulted in increase of the fetal/placenta ratio (Supplementary figure 2 A-C). Differently, while placenta weight was unchanged in KO mice, fetal weight was lower in these animals, thus resulting in a decreased fetal/placenta ratio (Supplementary figure 2 D-F).

DISCUSSION

The major findings of this paper were: (i) blockade of Mas receptor in Wistar rats or its deletion in mice attenuated the myocyte hypertrophy development in pregnant animals; (ii) hearts from pregnant KO displayed an exacerbated Col deposition in LV; (iii) female KO mice presented systolic dysfunction (lower ejection fraction, shortening fraction, stroke volume and higher end systolic volume compared to WT), but these parameters were restored by pregnancy in KO mice.

Ang-(1-7)/Mas receptor axis is involved in the development of the cardiac hypertrophy in physiological and pathological conditions. Increases in circulating Ang-(1-7) levels in transgenic rats reduced the cardiac hypertrophy induced by either isoproterenol (26) or Ang II (27). Similarly, treatment with Ang-(1-7) prevented the Ang II- and hypertension-induced cardiac hypertrophy (28,29). Furthermore, the involvement of the Ang-(1-7) and Mas receptor in the development of the exercise-induced cardiac hypertrophy has been suggested (30). Swimming training increases Mas receptor expression (30), ACE2 activity and protein expression and Ang-(1-7) levels in the heart (18). Pregnancy is another physiological stimulus that results in cardiac hypertrophy (31). In our study, we observed that myocyte hypertrophy was attenuated in both KO mice and A-779 treated Wistar rats. In line with this result, it was

observed that the Ang-(1-7) is increased during gestation (32-43). These data strongly suggest that the Ang-(1-7)/Mas receptor plays a role in the development of gestational left ventricular hypertrophy.

Previous studies have described that Ang-(1-7) prevents cardiac fibrosis induced by chronic infusion of Ang II, (29), isoproterenol (17) or in DOCA-salt model of hypertension (35). Also, genetic deletion of Mas receptor leads to a higher levels of extracellular matrix proteins in both right and left ventricles (24) from male mice. In our study, we did not observe difference in total Col deposition between non-pregnant KO and WT mice hearts; however pregnancy induced Col III deposition only in KO hearts. This suggests that the cardiac fibrosis may be a gender driven feature, probably governed by ovarian hormones. In this regard, females mice submitted to transverse aortic constriction presented lower fibrosis than male mice (37). Interestingly, pregnancy increased the Col III deposition in KO mice hearts, but not in WT hearts. Despite the mechanisms underlying Col deposition in heart during pregnancy remain unknown, the increased in the Col III expression observed in KO hearts might be related to the matrix metalloproteinases activity, since it was previously demonstrated that the active form of the matrix metalloproteinases-2, which cleaves Col III, is downregulated in hearts of neonatal and adult KO mice (24).

In order to evaluate whether the changes in morphology, specially the Col deposition, would influence the cardiac function, the echocardiography analyses were performed in the female pregnant and non-pregnant KO mice. We observed a significant impairment in the systolic function (ejection fraction, shortening fraction, stroke volume and end systolic volume) in non-pregnant KO mice. Interestingly, these parameters were restored in the late phase of the gestational period. Previous studies have described that genetic deletion of Mas, in male mice, leads to a marked impairment of cardiac function (25,37). These alterations appear to be caused, at least in part, by severe alterations in Col protein expression in left ventricles (25). Here, we did not observe differences in the Col deposition between WT and KO mice hearts, which is a robust evidence of dysfunction in the contractile machinery of the cardiomyocytes from KO hearts. Even so, pregnant KO mice presented an improvement in the cardiac function. This data can be in part due to the higher steroid sex hormones levels in the gestational period, since previous studies have indicated that estradiol can improve cardiac muscle contractility (39). In addition, the increase in

the Col III can also participate in the improvement of the cardiac function, since this Col form a reticular network with compliant profile. So, further studies are necessary to better clarify the mechanism(s) involved in the improvement of the cardiac function observed in pregnant KO mice.

Taken together, these data show that Mas receptor is involved in the cardiomyocyte hypertrophy development and in the control of the Col III deposition in pregnancy condition. These alterations are associated with improvement of the cardiac function through Mas-independent mechanism.

CLINICAL PERSPECTIVES

In the present study, we evaluated the participation of the Mas receptor activation in the development of cardiac remodeling induced by gestation. We observed that pharmacological blockade or genetic deletion of Mas receptor attenuated the pregnancy-induced myocyte hypertrophy and increased the collagen III deposition in LV from pregnant animals. Interestingly, the pregnancy restored systolic dysfunction observed in KO mice. Many studies have suggested the involvement of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis in the development of the physiological cardiac hypertrophy induced by exercise. In the present study, we have demonstrated that Ang-(1-7)/Mas receptor participates in the development of pregnant-induced cardiac remodeling. These data can be useful to improve understanding of the mechanism involved in the physiological hypertrophy development. Indeed, alterations in the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis can be related to cardiac complications observed during pregnancy. Pharmacological interventions in this axis may become part of the therapeutic strategies in pregnant subjects with cardiovascular complications.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Cintia do Carmo e Silva carried out the pregnancy model in Wistar rats, treatment with A-779 and histological analyses. Jônathas Almeida carried out the pregnancy model in WT and KO mice, Larissa Macedo and Gustavo Pedrino carried out the plethysmography. Diego Colugnati, Fernanda Santos and Manoel Biancardi developed and interpreted the histochemical analyses. Marcos Melo performed and interpreted the Echocardiography, Robson Santos and ^bRenata Costa and Adryano

Carvalho help in the pregnancy model, designed and revised the paper. Elizabeth Mendes designed the experiments, interpreted the data and revised the paper. Carlos Castro designed the study, interpreted the data and wrote the paper.

FUNDING

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

REFERENCES

1. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):191–227F.
2. Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card ail.* 2002;8:S258–63.
3. Maillet M, van Berlo JH, Molkenin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:38–48.
4. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975;56(1):56–64.
5. Frey N, Katus H a., Olson EN, Hill J a. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation.* 2004;109(13):1580–9.
6. Heineke J, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. 2006;7(8):589–600.
7. Cantor E J F, Babick AP, VasANJI Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. 2005;38:777–86.
8. Debosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth. *Circ Res.* 2006;113(2): 2097-2104.
9. Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically Detected Left Ventricular Hypertrophy : Prevalence and Risk Factors. *American college of physicians.* 1998;108(7):7–13.
10. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. regulatory factors. 1993;(27):341–8.
11. McMullen J. , L JG I. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:255–62.
12. Li J, Umar S, Amjedi M, Iorga A, Sharma S, Nadadur RD, et al. New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy. *Am J Cardiovasc Dis.* 2012;2(3):192–207.
13. Chung E, Yeung F, Leinwand LA. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *Journal of Applied Physiology.* 2012. 112(9):1564–75.

14. Chung E, Yeung F, Leinwand L a. Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy. *Cardiovasc Res.* 2013;100(3):402–10.
15. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian J Med Biol Res.* 2002;35(9):1001–15.
16. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2 / ANG- (1 – 7)/ Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;70112:804–17.
17. Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PWM, Gomes ERM, Dias-Peixoto MF, et al. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010;4(2):83–96.
18. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension.* 2011;58(2):182–9.
19. Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P, Ferrario CM. Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Brazilian J Med Biol Res.* 1999;32(4):373–81.
20. Doering TP, Haller N a, Montgomery M a, Freeman EJ, Hopkins MP. The role of AT1 angiotensin receptor activation in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(6):1307–12.
21. Sakairi A, Ishida J, Honjo K, Inaba S, Nakamura S, Sugiyama F, et al. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens Res.* 2008;31(12):2165–75.
22. Hales F. Effect of Spermatogenesis by Testosterone in Adult Male Rats : Pregnancy Outcome and Progeny. *Biol Reprod.* 1984;31:221–30.
23. Weibel ER, Kistler SG, Scherle WF. Pratical stereological methods for morfhometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30:23-37.
24. Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, et al. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regul Pept.* 2012;175(1-3):30–42.
25. Santos R a S, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, De Paula RD, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor mas knockout mice. *Hypertension.* 2006;47(5):996–1002.

26. Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP De, Campagnole-santos MJ, et al. Expression of an angiotensin- (1-7) - producing fusion protein. protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 2004;17:292-299.
27. Gomes ERM, Lara A a., Almeida PWM, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension*. 2010;55(1):153–60.
28. Pei Z, Meng R, Li G, Yan G, Xu C, Zhuang Z, et al. Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs. *Toxicol Lett*. 2010;199(2):173–81.
29. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton T a, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin- (1 – 7). *AJP-Heart Circ Physiol*. 2007;292:736–42.
30. Filho AG, Ferreira AJ, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008;93:589–98.
31. Chung E, Leinwand L a. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovasc Res*. 2014;101(4):561–70.
32. Brosnihan KB, Neves L a a, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(8):1255–62.
33. Brosnihan KB, Neves L a a, Joyner J, Averill DB, Chappell MC, Sarao R, et al. Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy. *Hypertension*. 2003;42(4 II):749–53.
34. Neves L a a, Williams AF, Averill DB, Ferrario CM, Walkup MP, Brosnihan KB. Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7). *Endocrinology*. 2003;144(8):3338–43.
35. Grobe JL, Mecca AP, Mao H, Katovich MJ. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):2417–23.
36. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(6):1597–606.

37. Castro CH, Santos R a S, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci.* 2006;80(3):264–8.
38. Ren J, Hintz KK, Roughead ZKF, Duan J, Colligan PB, Ren BH, et al. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1800–7.
39. Paigel AS, Ribeiro RF, Fernandes A a, Targueta GP, Vassallo D V, Stefanon I. Myocardial contractility is preserved early but reduced late after ovariectomy in young female rats. *Reprod Biol Endocrinol. BioMed Central Ltd;* 2011;9(1):54.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A) Myocytes Cross-sectional area (MCSA) from non-pregnant (W-NP), pregnant (W-P) and pregnant treated with Mas receptor antagonist A-779 (W-P+A-779) Wistar rats. (B) Representative micrographs from the same groups. Original magnification, 40x. Approximately 75 cardiomyocytes were analyzed for each animal. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Figure 2: (A) Analysis of total collagen (Col) content (red) in left ventricles from non pregnant (W-NP), pregnant (W-P) pregnant treated with Mas receptor antagonist A-779 (W-P+A-779) Wistar rats. (B) Representative micrographs stained with picosirius red and analyzed at 20x magnification using polarizing filters. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Figure 3: (A) Myocytes Cross-sectional area (MCSA) from Wild type and Mas-knockout mice non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P). (B) Representative micrographs from the same groups. Original magnification, 40x. 75 cardiomyocytes were analyzed for each animal. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Figure 4: (A) Analysis of total collagen (Col) content (red) in left ventricles from Wild type and Mas-knockout mice non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P). (B) Representative micrographs stained with picosirius red and analyzed at 20x magnification using polarizing filters. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Figure 5: Quantitative analysis of collagen (Col) I (A) and III (B) content in left ventricles from Wild type and Mas-knockout mice non-pregnant (WT and KO) and pregnant (WT-P and KO-P). (C) Representative micrographs stained with Gomori's Reticulin. 40x magnification. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Figure 6: Echocardiographic analysis in Wild type and Mas knockout mice. * $P < 0.05$. Values are means \pm SEM. EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; SV, stroke volume; ESV, end systolic volume, CO, cardiac output; IVRT, isovolumetric volume time.

Figure 1

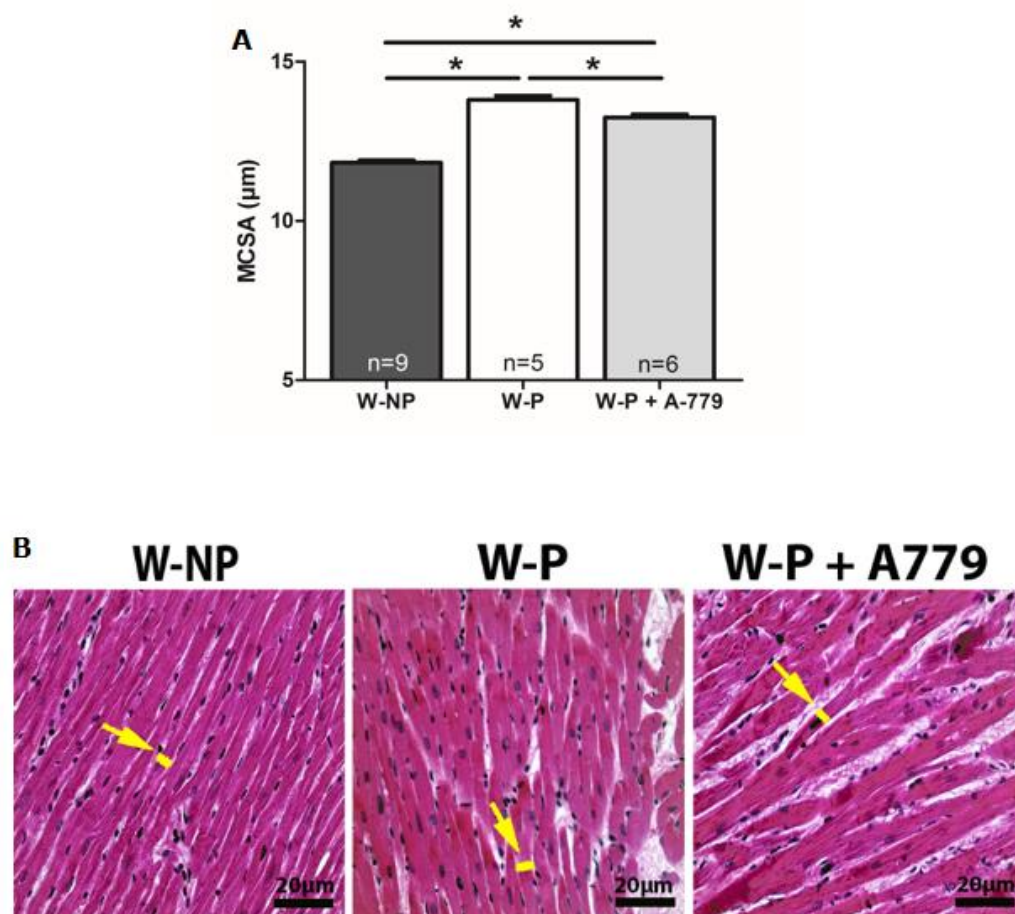


Figure 2

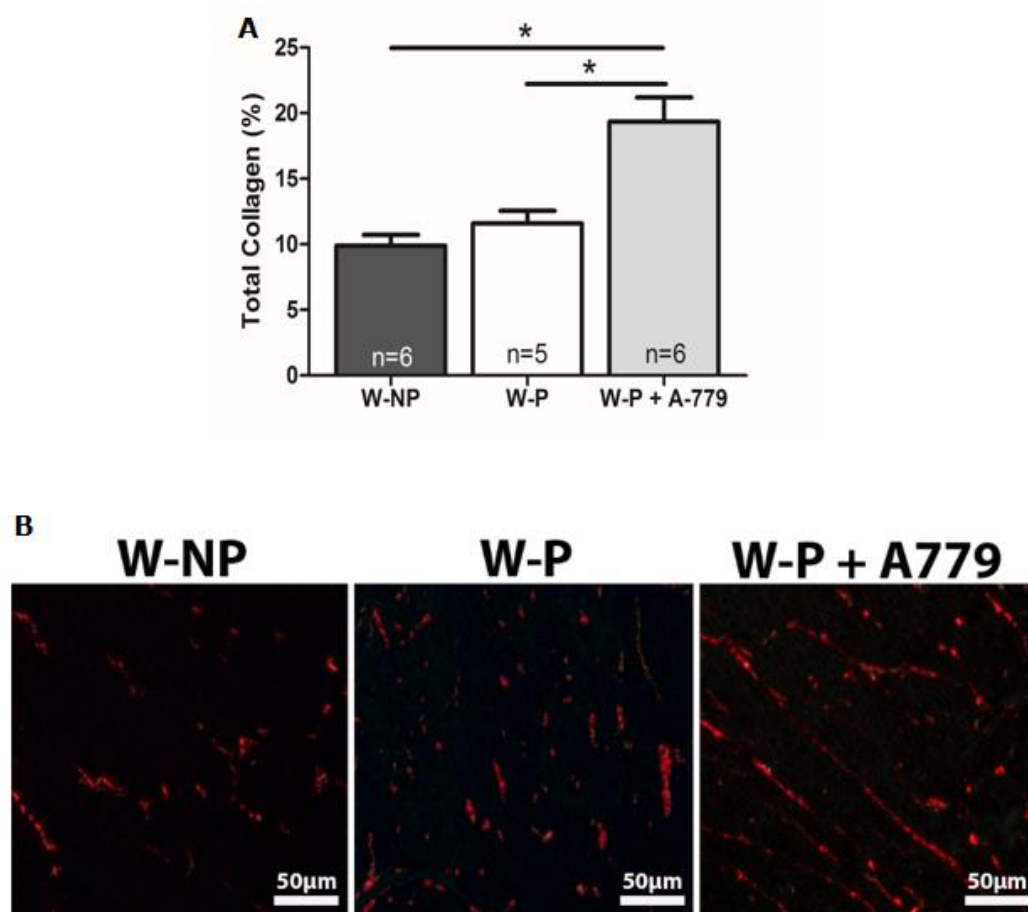


Figure 3

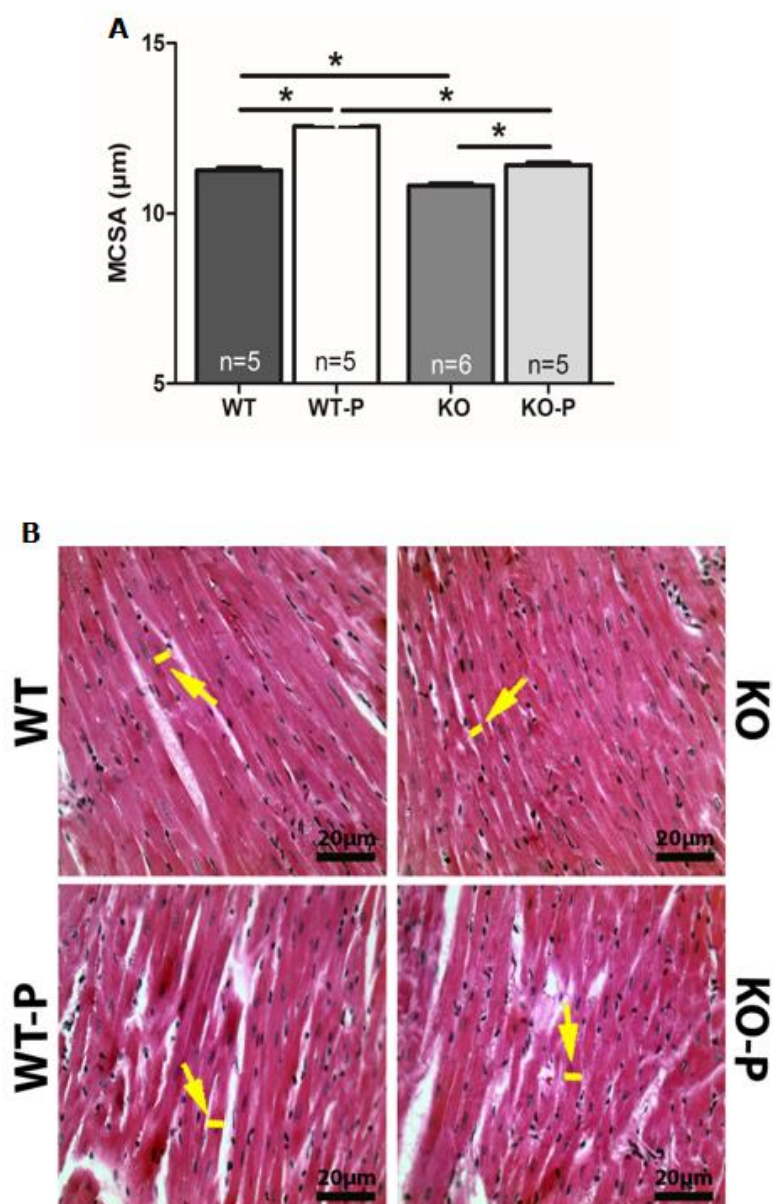


Figure 4

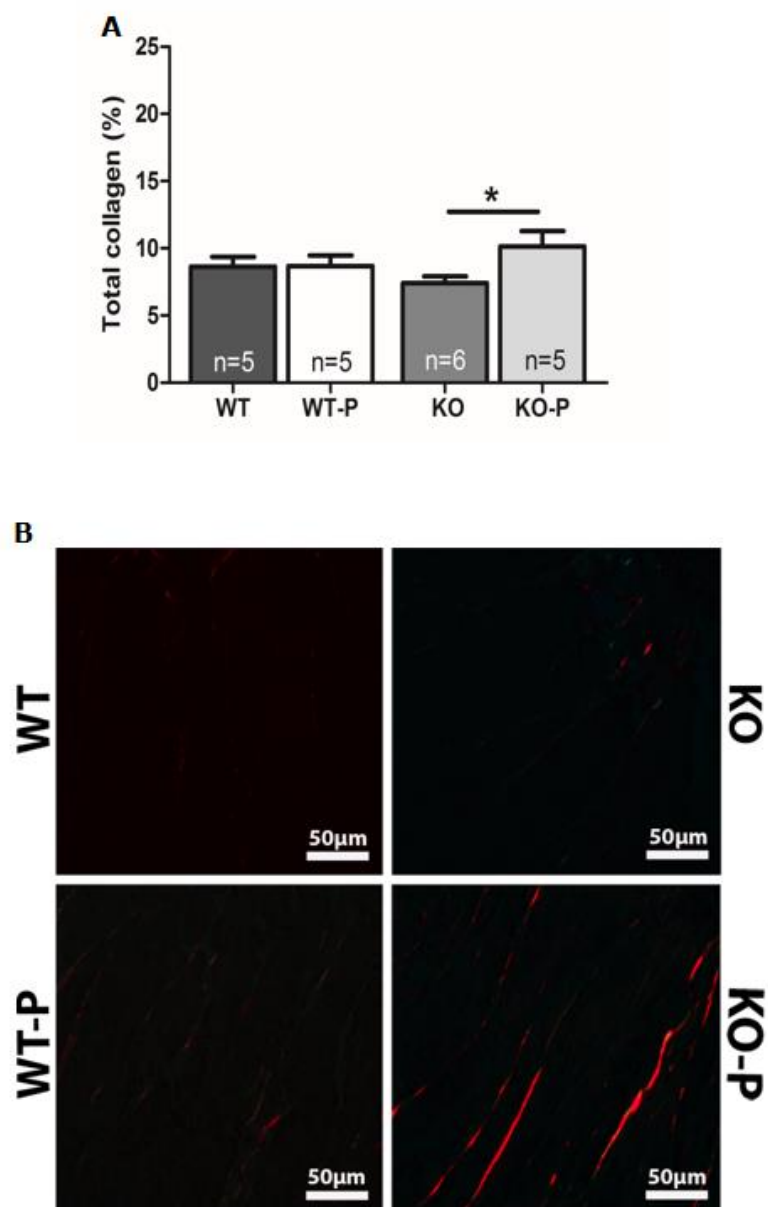
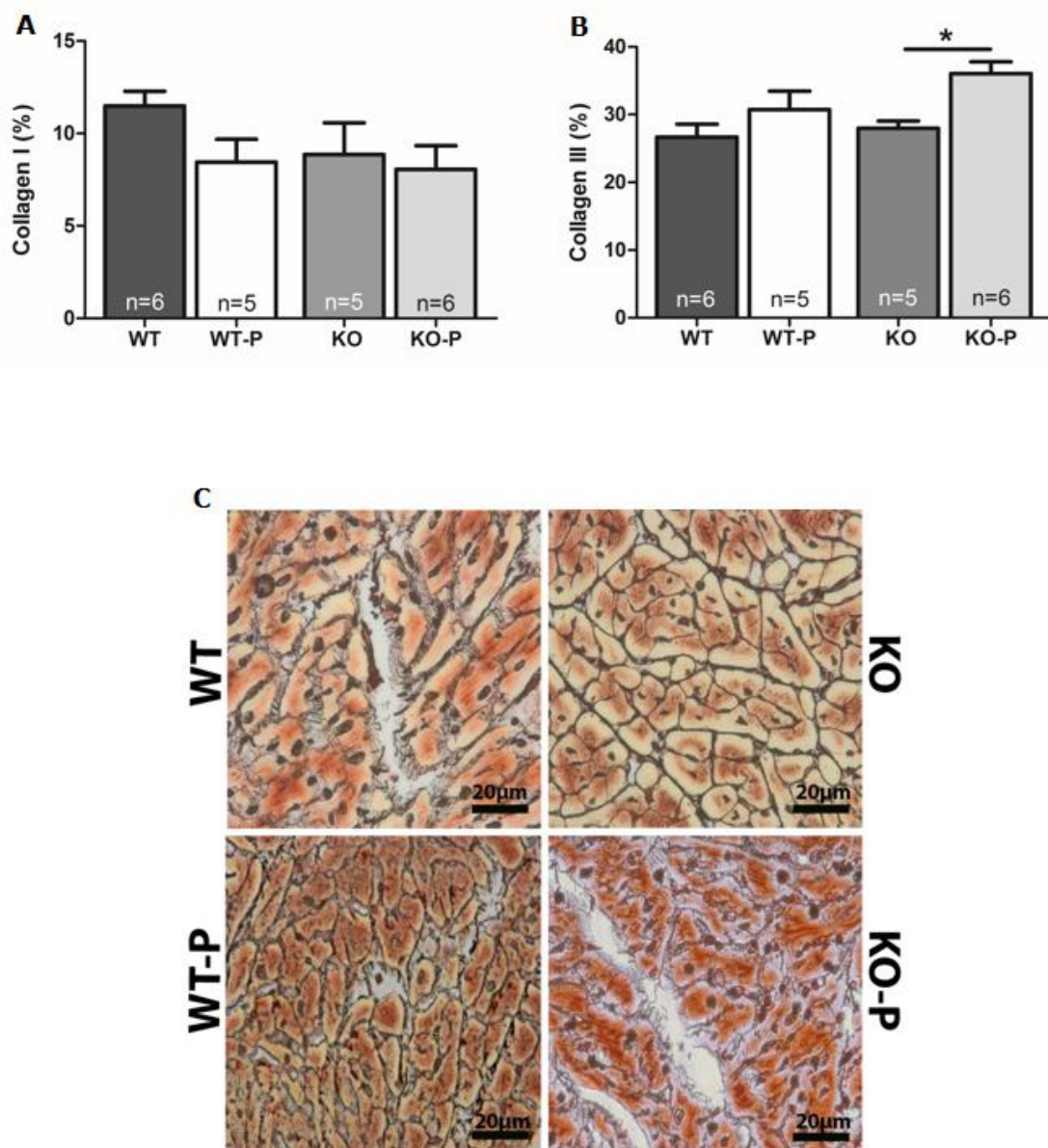


Figure 5



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

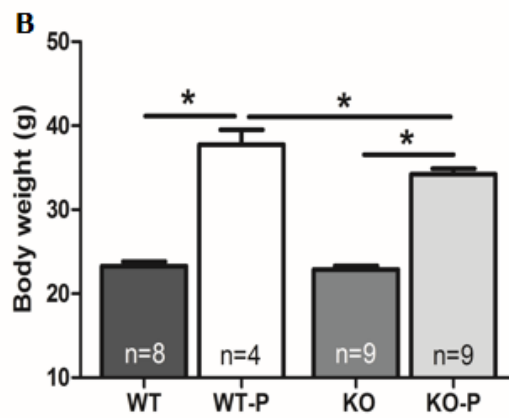
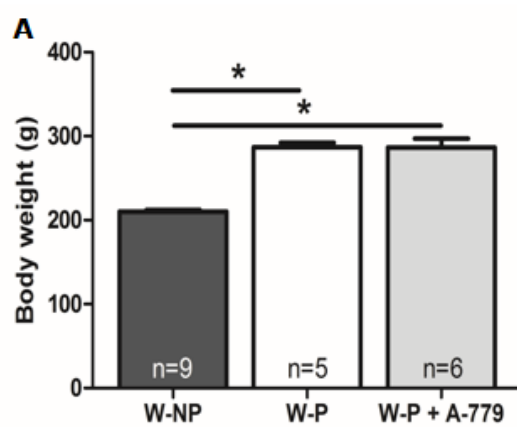
Supplemental Figure 1: Body weight of non pregnant and pregnant animals at the 20 day of gestation. (A) Wistar rats and (B) Wild type and Mas-knockout mice.

* $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

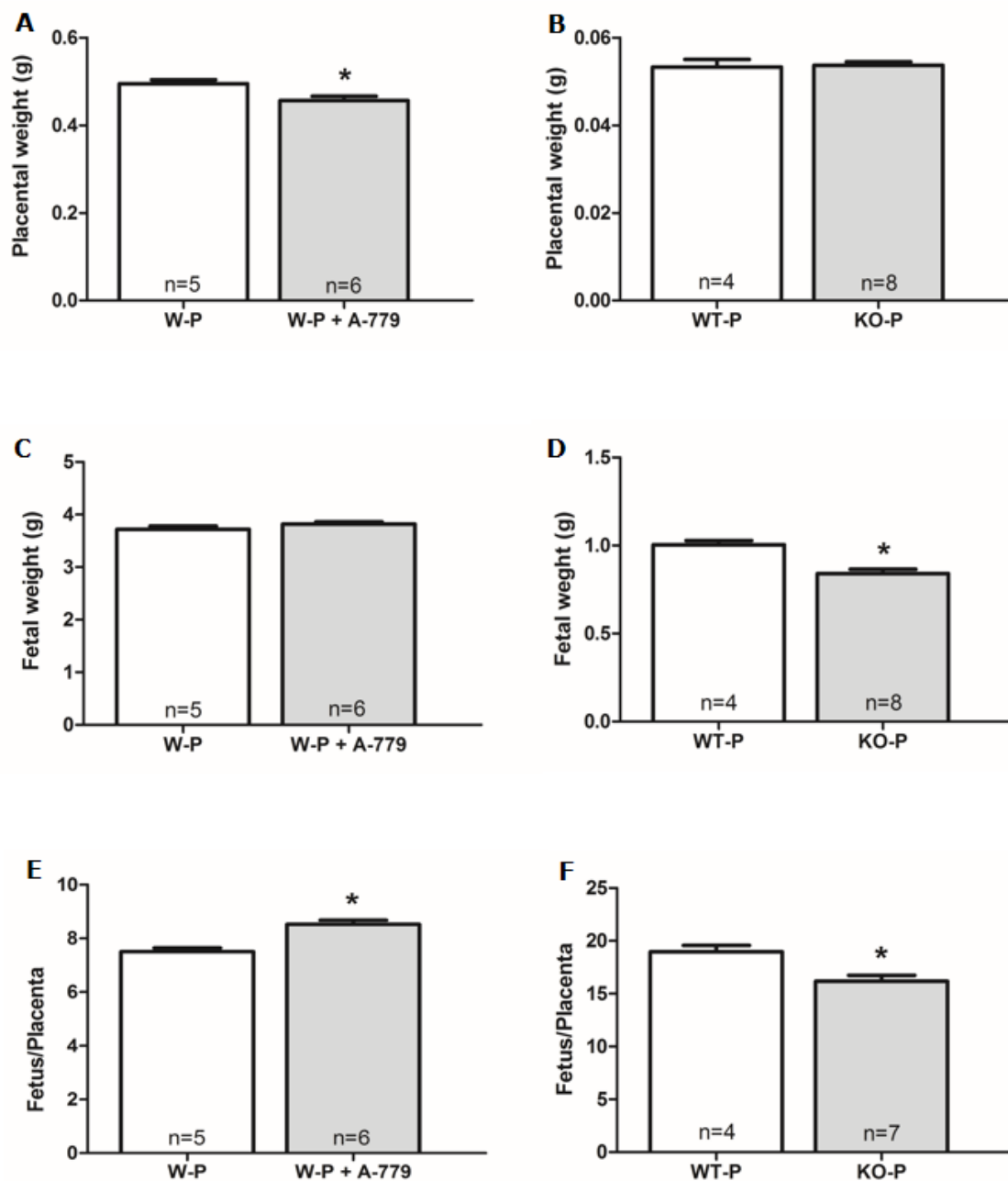
Supplemental Figure 2: Fetal parameters. Placental weight, fetal weight and fetus to placenta ratio in (A, C and E) Wistar rats or in (B, D and F) Wild type and KO mice.

* $P < 0.05$. Values are means \pm SEM.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary table 1. General parameters of pregnancy in rats

Parameters	W-P	W-P + A-779
Loss pre embryonic	1.02 ± 0.67	1.06 ± 0.91
Loss pos embryonic	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.04
Number of Fetus	9.40 ± 0.04	9.33 ± 0.02
Sex ratio of female	0.56 ± 0.07	0.53 ± 0.04
Sex ratio of male	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.04

Data are reported as mean ± SEM.

Supplementary table 2. General parameters of pregnancy in mice

Parameters	WT-P	KO-P
Loss pre embryonic	1.15 ± 0.05	1.14 ± 0.06
Loss pos embryonic	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.02
Number of Fetus	9.50 ± 1.04	9.00 ± 0.33
Sex ratio of female	0.52 ± 0.10	0.65 ± 0.10
Sex ratio of male	0.45 ± 0.12	0.32 ± 0.09

Data are reported as mean ± SEM.

5. CONCLUSÃO

Diante desses resultados podemos concluir que:

- O receptor Mas participa do desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda na gestação.
- O bloqueio ou a deleção genética do receptor Mas promoveu um aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular no coração das ratas e camundongas gestantes, respectivamente. Este aumento, possivelmente, foi devido ao aumento da expressão de Col III nessa condição.
- A ausência do receptor Mas nas camundongas resultou em prejuízo da função ventricular sistólica. No entanto, as disfunções cardíacas observadas foram revertidas pela gestação.
- O bloqueio ou a deleção genética do receptor Mas não altera a fertilidade e progressão da gravidez das fêmeas. Entretanto, pode influenciar parâmetros placentários e fetais.

Sendo assim, nossos dados demonstraram que o receptor Mas está envolvido no desenvolvimento da hipertrofia de cardiomiócitos e no controle da deposição de Col III na gestação. Essas alterações são associadas com a melhora da função cardíaca por mecanismos independentes do receptor Mas. Já sobre a gestação, o receptor Mas não tem influencia sobre a fertilidade e evolução da gravidez, mas sua ausência ou antagonismo pode modular o peso placentário e fetal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):191–227.
2. Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail.* 2002;8(6):S258–63.
3. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.* 2005;96(11):1208–16.
4. Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:38–48.
5. Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, Colucci WS, Frazier OH, Leinwand LA, et al. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation.* 1997;95:766–70.
6. Fagard RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin.* 1997;15(3):397–412.
7. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. Review series ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 2007;117(3):568–75.
8. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):234–42.
9. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000;101:336–44.
10. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975;56(1):56–64.
11. Gunther S, Grossman W. Determinants of ventricular function in pressure-overload hypertrophy in man. *Circulation.* 1979;59(4):679–88.
12. Huber D, Grimm J, Koch R, Krayenbuehl HP. Determinants of ejection performance in aortic stenosis. *Circulation.* 1981;64(1):126–34.
13. Klopfenstein HS, Rudolph M. Postnatal changes in the circulation and responses to volume loading in sheep. *Circ Res.* 1978;42(6):839–45.

14. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.* 1998;83(1):15–26.
15. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(7):1050–93.
16. Aleem E, Kaldis P. Mouse Models of Cell Cycle Regulators : New Paradigms. *Results Probl Cell Differ.* 2006;42(5):271–328.
17. Yoshizumi M, Lee WS, Hsieh CM, Tsai JC, Li J, Perrella M a., et al. Disappearance of cyclin A correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2275–80.
18. Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes a M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(8):1737–46.
19. Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation.* 2010;122(12):1221–38.
20. Garcarena CD, Pinilla O a., Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2009;53(4):708–14.
21. Barbier J, Ville N, Kervio G, Walther G, Carré F. Sports-Specific Features of Athlete’s Heart and their Relation to Echocardiographic Parameters. *Herz Kardiovaskuläre Erkrankungen.* 2006;31(6):531–43.
22. Konhilas JP. Exercise Can Prevent and Reverse the Severity of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2006;98(4):540–8.
23. Genest DS, Falcao S, Michel C, Kajla S, Germano MF, Lacasse AA, et al. Novel role of the renin-angiotensin system in preeclampsia superimposed on chronic hypertension and the effects of exercise in a mouse model. *Hypertension.* 2013;62(6):1055–61.
24. Abbas AE, Lester SJ, Connolly H. Pregnancy and the cardiovascular system. *Int J Cardiol.* 2005;98(2):179–89.
25. Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. 1983. p. R720–9.
26. Bassien-capsa V, Fournon J, Comte B, Chorvatova A. Structural , functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. 2006;0008:423–31.

27. Jensen E, Wood C, Keller-Wood M. The normal increase in adrenal secretion during pregnancy contributes to maternal volume expansion and fetal homeostasis. *J Soc Gynecol Investig.* 2002;9(6):362–71.
28. Conrad KP. Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301:R267–75.
29. Zheng J, Bird IM, Chen D-B, Magness RR. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: interactions with nitric oxide. *J Physiol.* 2005;565(Pt 1):59–69.
30. Umar S, Nadadur R, Iorga a., Amjedi M, Matori H, Eghbali M. Cardiac structural and hemodynamic changes associated with physiological heart hypertrophy of pregnancy are reversed postpartum. *J Appl Physiol.* 2012;113(8):1253–9.
31. Clapp JF, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol.* 1997 Dec;80(11):1469–73.
32. Katz R, Karliner JS, Resnik R. Effects of a natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation.* 1978;58(3 Pt 1):434–41.
33. Chung E, Leinwand L a. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovasc Res.* 2014;101(4):561–70.
34. Virgen-Ortiz A, Marin JL, Elizalde a., Castro E, Stefani E, Toro L, et al. Passive mechanical properties of cardiac tissues in heart hypertrophy during pregnancy. *J Physiol Sci.* 2009;59(5):391–6.
35. Limon-miranda S, Salazar-enriquez DG, Muñoz J, Ramirez-archila M V, Sanchez-pastor EA, Andrade F, et al. Pregnancy Differentially Regulates the Collagens Types I and III in Left Ventricle from Rat Heart. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–5.
36. Pedram A, Razandi M, Narayanan R, Dalton JT, McKinsey T a, Levin ER. Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2013;24(24):3805–18.
37. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89(3-4):89–97.
38. Gruber C, Tschugguel W, Shneeberger C, Hunber J. Production and actions of estrogens. *English J.* 2002;346(5):340–52.

39. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, et al. Plasma Membrane Estrogen Receptors Are Coupled to Endothelial Nitric-oxide Synthase through G_i*. 2001;276(29):27071–6.
40. Kuiper GGJM, Enmark EV a, Peltö-huikkot M, Nilsson S, Li JG. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Biochemistry*. 1996;93(6):5925–30.
41. Jensen E V, Desombre ER. Estrogen-Receptor Interaction. *Science*. 1973;182:126–34.
42. Carroll JS, Brown M. Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*. 2006;20(8):1707–14.
43. Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson E. Sex Hormones and Hypertension. *Cardiovasc Res*. 2002;53:688–708.
44. Barton M, Meyer MR. Postmenopausal hypertension: Mechanisms and therapy. *Hypertension*. 2009;54(1):11–8.
45. Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-zagrosek V. 17 β -Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. 2010;719–28.
46. Cantor E J F, Babick AP, Vasanthi Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. 2005;38:777–86.
47. Xu Y, Arenas I a., Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res*. 2003;57(2):388–94.
48. Babiker F a., De Windt LJ, Van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans P a. Estrogenic hormone action in the heart: Regulatory network and function. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):709–19.
49. Kastner P, Krust a, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*. 1990;9(5):1603–14.
50. Morey AK, Pedram A, Razandi M, Prins B a., Hu RM, Biesiada E, et al. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology*. 1997;138(8):3330–9.
51. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids*. 2003;68(10-13):831–6.

52. Goldstein J, Sites CK, Toth MJ. Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. *Fertil Steril*. 2004;82(2):430–6.
53. Conrad KP. Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(2):R267–75.
54. Bani-Sacchi T, Bigazzi M, Bani D, Mannaioni PF, Masini E. Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br J Pharmacol*. 1995;116(1):1589–94.
55. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(5):275–82.
56. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2002;89(2A):3A – 9A; discussion 10A.
57. Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*. 2012;437–45.
58. Griendling K, Murphy T, Alexander R. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. *Res Adv Ser*. 1993;1816–29.
59. Santos RAS, Simoes AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I De, et al. G protein-coupled receptor Mas. 2003;100(14):8258–63.
60. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol*. 2003;552(3):667–71.
61. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1977;57(2):313–70.
62. Elliott DF, Peart WS. The amino acid sequence in a hypertensin. *Biochem J*. 1957;65(2):246–54.
63. Ferreira a. J, Santos R a S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J Med Biol Res*. 2005;38(4):499–507.
64. Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol*. 1993;14(2):123–71.
65. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(2):R381–7.
66. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling : physiological and pathological effects in the cardiovascular system. 2007;292:82–97.

67. Sakairi A, Ishida J, Honjo K, Inaba S, Nakamura S, Sugiyama F, et al. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens Res.* 2008;31(12):2165–75.
68. Santos RAS, Ferreira AJ, Verano-braga T, Bader M. angiotensin- (1 – 7) and Mas : new players of the renin – angiotensin system. *J Endocrinol.* 2013;216(2):1–17.
69. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(9-10):1302–14.
70. Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari T a. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol.* 2003;140(5):809–24.
71. Matsubara H. Pathophysiological Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Cardiovascular and Renal Diseases. *Circ Res.* 1998;83(12):1182–91.
72. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. UltraRapid Communication A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:e1–9.
73. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Chabielska E, Buczek W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(4):533–40.
74. Bader M, Alenina N, Andrade-navarro MA, Santos RA. Mas and Its Related G Protein – Coupled. 2014;66:1080–105.
75. Roxanna A, Xia Y. The functional role of the Renin-Angiotensin System in pregnancy and preeclampsia. *Placenta.* 2008;29(9):763–71.
76. Wong a Y, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Adamson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2002;282(3):H918–25.
77. Siiteri PK, MacDonald PC. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1966;26(7):751–61.
78. Olkers W. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids.* 1996;61(1996):166–71.
79. Hsueh W, Luetscher J, Carlson E, Grislis G, Frazee E, Mchargue A. Changes in active and inactive renin throughout normal pregnancy. *Clin Exp Hypertens A.* 1982;54(5):1010–6.
80. Weir RJ. Vasopressor substances in normal and abnormal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1975;5(1-2):75–85.

81. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery a, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.* 2001;7(9):1003–9.
82. Gant NF, Worley RJ, Everett RB, Macdonald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int.* 1980;18:253–8.
83. Aljabri MB, Songstad NT, Lund T, Serrano MC, Andreasen T V., Al-Saad S, et al. Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts. *Acta Physiol.* 2011;201(4):445–56.
84. Jin Z, Zhang W, Yang H, Wang X, Zheng Y, Zhang Q, et al. Maternal Treatment with Agonistic Autoantibodies against Type-1 Angiotensin II Receptor in Late Pregnancy Increases Apoptosis of Myocardial Cells and Myocardial Susceptibility to Ischemia-Reperfusion Injury in Offspring Rats. *PLoS One.* 2013;8(11):e80709.
85. LaMarca B, Wallace K, Granger J. Role of angiotensin II type I receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) in preeclampsia. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(2):175–9.
86. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine.* 2002;18(3):239–45.
87. Costa APR, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MAR, Santos R a. S, et al. Angiotensin-(1–7): A Novel Peptide in the Ovary. *Endocrinology.* 2003;144(5):1942–8.
88. Valdés G, Corthorn J, Bharadwaj MS, Joyner J, Schneider D, Brosnihan K. Utero-placental expression of angiotensin-(1–7) and ACE2 in the pregnant guinea-pig. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11(1):5.
89. Neves LAA, Stovall K, Joyner J, Valdés G, Gallagher PE, Ferrario CM, et al. ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(1):R151–61. 90. Brosnihan KB, Neves L a a, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004;37(8):1255–62.
91. Filho AG, Ferreira AJ, Santos SHS, Neves SRS, Silva Camargos ER, Becker LK, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol.* 2008;93:589–98.
92. Joyner J, Neves L a a, Stovall K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) serves as an aquaretic by increasing water intake and diuresis in association with downregulation of aquaporin-1 during pregnancy in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(3):R1073–80.

93. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, Gonzalez-Pacheco, F R. Target the degradation of angiotensin II with recombinant ACE2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. 2010;55(1):90–8.
94. Weibel ER, Kistler SG, Scherle WF. Pratical stereological methods for morfometric cytology. J Cell Biol. 1966;30:23–37.

7. ANEXOS

7.1 Comprovante de submissão do artigo

Your manuscript entitled "MAS RECEPTOR CONTRIBUTES TO PREGNANCY-INDUCED CARDIAC REMODELING" by Cintia Carmo-Silva, Jônathas Almeida, Larissa Macedo, Marcos Melo, Gustavo Pedrino, Fernanda Santos, Manoel Biancardi, Robson Santos, Adryano Carvalho, Elizabeth Mendes, Diego Colugnati, Renata Mazaro-Costa, and Carlos Castro has passed initial quality control and your paper will now be sent for peer review. Please expect to receive reviewer comments and the Journal's initial decision within 4 weeks.

You may check on the status of this manuscript at any time by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://clinsci.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2KF3Ht4A6DmO7F3A9ftdt2kpwBfatPpt9DpbUfAUNgZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page)

Alternatively, please do contact editorial@portlandpress.com if you have any specific questions.

Thank you for submitting your work to Clinical Science.

Best wishes

Jennifer Turner

Clinical Science

Submission Date 10th Feb 16 05:25:45

7.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/Ceua



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL
DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 20 de agosto de 2014

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO, PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O Nº 039/14.

Finalidade do projeto:

() Pesquisa () Ensino

Identificação:

Título do projeto: PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR MAS NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA CARDÍACA GESTACIONAL

Pesquisador Responsável/ Unidade: Professor Carlos Henrique de Castro/Departamento de Ciências Fisiológicas/ ICB

Pesquisadores Participantes: Cintia do Carmo e Silva – Pesquisadora, Adryano Augustto Valladão de Carvalho – Pesquisador, Renata Mazaro e Costa - Pesquisadora.

Unidade onde será realizado: Instituto de Ciências Biológicas

Data de apresentação à CEUA: 16/06/2014

Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada a esta Comissão consideramos o projeto **APROVADO**, salvo melhor juízo desta Comissão.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/09/2019.

Data da reunião: 20/08/2014



Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI