

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

Avaliação dos efeitos vasculares da Angiotensina-(1-9)

GABRIEL SANGLARD SANTOS RESENDE

BELOHORIZONTE

2020

GABRIEL SANGLARD SANTOS RESENDE

Avaliação dos efeitos vasculares da Angiotensina-(1-9)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza Santos.

BELOHORIZONTE

2020

043 Resende, Gabriel Sanglard Santos.
Avaliação dos efeitos vasculares da Angiotensina-(1-9) [manuscrito] / Gabriel Sanglard Santos Resende. – 2020.
86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Sousa Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Angiotensina – Receptores. I. Santos, Robson Augusto Sousa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASCULARES DA ANGIOTENSINA-(1-9)"

GABRIEL SANGLARD SANTOS RESENDE

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 22 de janeiro de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. DANIEL CAMPOS VILLELA
FACULDADE DE MEDICINA/UFVJM


PROFA. DRA. MARIA CLAUDIA COSTA IRIGOYEN
INCoR/USP


PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 22 de janeiro de 2020

**DEDICO ESTE TRABALHO A MINHA MÃE, A TIA SARAH E A VOVÓ TUCA
POR TANTOS ANOS DE APOIO, CARINHO E EXEMPLO.**

NÃO HÁ FATOS ETERNOS, COMO NÃO HÁ VERDADES ABSOLUTAS.
(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, pelas oportunidades, pela paciência, apoio, confiança por todos esses anos.

A todos os amigos do laboratório de Hipertensão!

Aos professores, que sempre contribuíram enriquecendo nosso conhecimento

Ao **Jose Roberto da Silva**, por toda ajuda, ensinamentos e principalmente por pela alegria que contagia a todos.

Ao **Augusto** pela recepção e ensinamentos e todo apoio durante o período na Suíça

E a todos que contribuíram com este trabalho de forma direta ou indireta para que essa tese se tornasse possível.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMO

A Angiotensina-(1-9) é um nonapeptido formado pela hidrólise da Ang I via ECA 2, que parece ter ações contra-regulatórias do eixo clássico do SRA. Estudos recentes sugerem que a Ang-(1-9) exerce seus efeitos via receptor AT₂, contudo, a ferramenta farmacológica que vem sendo utilizada para avaliar a interação Ang-(1-9) com o receptor AT₂, o PD123319, recentemente foi descrito como antagonista não específico do receptor AT₂, interagindo também com o receptor MrgD. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos receptores AT₂, Mas e MrgD nos efeitos cardiovasculares da Ang-(1-9). Foram realizadas técnicas de reatividade vascular. A Ang-(1-9) produziu um relaxamento vascular dose-dependente em anéis de aorta de ratos SD, que não foi modificado pelo antagonista seletivo do Mas, resultados similares foram observados com o antagonismo farmacológico dos receptores AT₂ e MrgD. Houve uma atenuação da vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) nos camundongos Mas nocaute quando comparado com os animais WT, mas a resposta não foi abolida. Não houve diferença na resposta relaxante entre os camundongos AT₂ nocaute e WT, Também foi avaliado a interação da Ang-(1-9) com a Alamandina, e Ang-(1-7), na qual de forma surpreendente os resultados demonstraram inibição cruzada do efeito vasorrelaxante induzido pela Ang-(1-9). Os resultados obtidos neste estudo sugerem Ang-(1-9) não induz seus efeitos biológicos por interagir com o receptor AT₂. Além disso, os efeitos induzidos pela Ang-(1-9) não são mediados pelos receptores angiotensinérgicos Mas e MrgD. Sendo assim podemos sugerir que a Ang-(1-9) realiza suas ações através de outro receptor, ainda não identificado, que em algumas situações pode ser sensível a PD123319. Com relação a interação entre Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7), observamos que Ang-(1-9), atenua o efeito tanto da Ang-(1-7) quanto da Alamandina. E essa interação parece envolver COX-1, COX-2 e direta ou indiretamente o receptores AT₁.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-9), Alamandina, Angiotensina-(1-7), Receptores, Mas, AT₂, AT₁, MrgD.

ABSTRACT

Angiotensin- (1-9) is a nonapeptide formed by the hydrolysis of Ang I via ECA 2, which appears to have counter-regulatory actions on the classical axis of the SARS. Recent studies suggest that Ang- (1-9) exerts its effects via the AT2 receptor, however, the pharmacological tool that has been used to evaluate the Ang- (1-9) interaction with the AT2 receptor, PD123319, has recently been described as a non-specific antagonist of the AT2 receptor, also interacting with the MrgD receptor. Therefore, the aim of this study was to evaluate the participation of AT2, Mas and MrgD receptors in the cardiovascular effects of Ang- (1-9). Vascular reactivity techniques were performed. Ang- (1-9) produced a dose-dependent vascular relaxation in aorta rings of SD rats, which was not modified by the selective Mas antagonist, similar results were observed with the pharmacological antagonism of the AT2 and MrgD receptors. There was an attenuation of vasodilation induced by Ang- (1-9) in the Mas knockout mice when compared to the WT animals, but the response was not abolished. There was no difference in the relaxing response between AT2 knockout and WT mice. The interaction of Ang- (1-9) with Alamandin, and Ang- (1-7) was also evaluated, in which surprisingly the results showed cross-inhibition. of the vasorelaxant effect induced by Ang- (1-9). The results obtained in this study suggest that Ang- (1-9) does not induce its biological effects by interacting with the AT2 receptor. In addition, the effects induced by Ang- (1-9) are not mediated by the angiotensinergic receptors Mas and MrgD. Therefore, we can suggest that Ang- (1-9) performs its actions through another receptor, not yet identified, which in some situations may be sensitive to PD123319. Regarding the interaction between Ang- (1-9), Alamandina and Ang-(1-7), we observed that Ang- (1-9), attenuates the effect of both Ang-(1-7) and Alamandina. And this interaction seems to involve COX-1, COX-2 and directly or indirectly the AT1 receptors

Keywords: Angiotensin-(1-9), Alamandine, Angiotnsin-(1-7), Receptors, Mas, AT2,

AT1, MrgD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via clássica do sistema renina angiotensina	28
Figura 2 - Ilustração mais atualizada do sistema renina-angiotensina	31
Figura 3 - Esquema representativo do experimento de reatividade vascular	39
Figura 4 - Efeito da Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD	55
Figura 5 a) - Efeito da remoção mecânica do endotélio vascular no efeito vaso relaxante da Ang-(1-9) em anéis de aorta torácica de ratos	56
Figura 5 b) - Efeito da Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD quando pré-incubada com L-Name.....	56
Figura 6: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de A-779.....	57
Figura 7 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de D-Pro7	58
Figura 8 - Efeito induzido pelo peptídeo Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de PD123 319.....	59
Figura 9 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de Dpro⁷ e PD 123 139	60

Figura 10 - Efeito induzido pela Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N WT.....	61
Figura 11 - Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas Knockout (Mas ^{-/-}) e FVB/N wildtype (Mas ^{+/+}).....	62
Figura 12 - : Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas <i>Knockout</i> (AT ₂ ^{-/-}) e FVB/N <i>wildtype</i> (AT ₂ ^{+/+}).....	63
Figura 13 a) - Efeito da pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD)	64
Figura 13 b) - Efeito da Alamandina em anéis de ratos SD	64
Figura 14 a) - Efeito da Ang-(1-9) pré-incubada, sobre as curvas concentração resposta para: Ang-(1-9)	66
Figura 14 b) - <i>Efeito da Ang-(1-9) pré-incubada, sobre as curvas concentração resposta para Alamandina</i>	66
Figura 14 c) - <i>Efeito da Ang-(1-9) pré-incubada, sobre as curvas concentração resposta para Ang-(1-7)</i>	66
Figura 15 a) - Efeito da Alamandina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD).....	67
Figura 15 b) - <i>Efeito da Ang-(1-7) pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD</i>	68

Figura 16 a) - Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD).....	69
Figura 16 b) - Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD)	69
Figura 17 - Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD).....	70
Figura 18 a) - Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD)	71
Figura 18 b) - Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD)	71
Figura 19 - Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD).....	72
Figura 20 a) - Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD).....	73
Figura 20 b) - Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD).....	73
Figura 21 - Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD).....	74

Figura 22 a) - A Indometacina no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD.75

Figura 22 b) - O Ibuprofeno no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-9). em anéis de aorta de ratos SD.....75

Figura 23 a) - A Indometacina no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de aorta de ratos SD76

Figura 23 b) – O ibuprofeno no o efeito promovido pela Alamandina pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD.....77

Figura 24 a) - A Indometacina no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos SD77

Figura 24 b) - O ibuprofeno no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos SD.....78

Figura 25 a) - O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-9), em anéis de aorta de ratos SD.....79

Figura 25 b) - O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de aorta de ratos SD.79

Figura 25 c) - O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7). em anéis de aorta de ratos.....80

Figura 26 a) - A Indometacina no o efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD..... **81**

Figura 26 b) - O Ibuprofeno no o efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD..... **81**

Figura 26 c) - O SC650 no efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD..... **82**

Figura 27 - Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD)..... **83**

Figura 28 - Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD)..... **83**

Figura 29 - Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD).)..... **84**

Figura 30 a) - O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para **a)** Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD, **85**

Figura 30 b) - O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para Alamandina em anéis de aorta de ratos SD..... **85**

Figura 30 c) - O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos SD **86**

Figura 31 - *Losartan no efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD87*

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
I. INTRODUÇÃO	23
1.1 Sistema Rinina-Angiotensina Clássico.....	24
1.2 Enzima Conversora de Angiotensina 2 e visão Moderna do SRA.....	29
1.3 ANGIOTENSINA-(1-9).....	32
II. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais.....	37
3.2 Montagem e preparação dos vasos	37
3.3 Protocolos experimentais	39
3.7 Análise Estatística	53
IV. RESULTADOS	54
4.1. Efeito da Ang-(1-9), em anéis de aorta de ratos.....	55
4.2. Efeito induzido pelo antagonismo farmacológico dos receptores Mas, AT ₂ e MrgD, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aortas de ratos Sprague-dawley	57
4.3. Efeito do peptídeo Ang-(1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N.....	60
4.4 Efeito da Ang-(1-7) e Alamandina, em anéis de aorta de ratos.....	63

4.5 Efeito da Interação da Ang-(1-9) com outras angiotensinas.....	65
4.6 Avaliação do mecanismo dos efeitos da Ang-(1-9) em anéis de aorta.....	68
V. DISCUSSÃO.....	88
VI. CONCLUSÃO.....	96
VII. REFERÊNCIAS.....	89

I. INTRODUÇÃO

1.1 SRA Clássico

A pressão arterial (PA) envolve complexos mecanismos, uma rede integrada de órgãos e sistemas que trabalham de forma associada para manutenção da homeostase. O controle da PA ocorre de forma pleonástica por sistemas de controle de *feedback* e *feedforward*, que atuam a curto, médio e a longo prazo. Nesse complexo sistema, participam o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, hormônios circulantes e mecanismos de autorregulação locais (fatores metabólicos e endoteliais), que interagem para controlar o débito cardíaco e a resistência vascular, mantendo a PA estável (Dampney et al., 2002).

As doenças cardiovasculares (DCV) atualmente são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas representando 31% das mortes em 2015 no mundo foram em decorrência de DCV, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 2017). O principal fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças é a hipertensão arterial, sendo a mesma uma das patologias com maior prevalência no mundo, levando a óbito cerca de 7,5 milhões de pessoas a cada ano (Roger et al., 2012).

No período de estabelecimento da hipertensão arterial, a faixa de variação da PA (*set point*) é deslocada de forma sustentada para um nível superior. Esta mudança decorre de alterações periféricas mantidas constantes, como aumento da resistência vascular periférica total e/ou aumento do débito cardíaco. Estas alterações periféricas são desencadeadas por alterações centrais, como alterações na sensibilidade barorreflexa (Veerasingham and Raizada, 2003), aumento na atividade do sistema nervoso simpático (Esler, 2000) e alterações na atividade do sistema renina

angiotensina (SRA), que desempenham um papel chave na patogênese da hipertensão arterial (Britto et al., 1997; Ferrario, 1990; Santos et al., 1989).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal vastamente estudado, o qual cumpre um papel importante na regulação central e periférica da pressão arterial e no equilíbrio hidro-eletrolítico, além de estar envolvido na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Peach, 1977; Santos *et al.*, 2000).

Em 1898 Tiegerstedt e Bergman desenvolveram os primeiros estudos relacionados ao SRA. Esses autores descreveram que extratos não purificados do córtex renal originavam um aumento prolongado da pressão arterial de coelhos anestesiados, e denominaram a substância responsável por esse aumento da pressão arterial de renina (Tiegerstedt e Bergman, 1898; Basso and Terragno, 2001; Inagami, 1998).

Pouco interesse foi atribuído a essas descobertas até a década de 30. Em 1934 Goldblatt e cols. demonstraram pela primeira vez ser possível produzir uma elevação mantida da pressão arterial restringindo o fluxo sanguíneo para os rins. Embora fosse reconhecido que o aumento da pressão arterial poderia ser causado por uma substância presente no sangue. Goldblatt e cols. não associaram este efeito à renina, já que nem citaram o trabalho de Tiegerstedt e Bergman (1898) (Goldblatt *et al.*, 1934).

Já em 1940, trabalhando de forma independente Braun-Menendez e cols., na Argentina e Page e Helmer, nos Estados Unidos, descreveram que o peptídeo pressórico não era a renina, e sim um produto da ação enzimática dessa substância sobre uma proteína plasmática (Braun-Menendez *et al.*, 1940; Page and Helmer, 1940). O primeiro grupo denominou esse produto de hipertensina e o segundo de angiotonina. Posteriormente o termo angiotensina, resultado da agregação entre os

termos “hipertensina”, originado na Argentina e “angiotonina”, nos Estados Unidos, passou a ser usado com o intuito de unificar essa terminologia (Braun-Menendez and Page, 1958).

Aproximadamente dez anos após os trabalhos desses dois grupos de pesquisadores, foram identificadas duas formas de angiotensina, a angiotensina I (Ang I) e a angiotensina II (Ang II), sendo a primeira resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda resultado da quebra enzimática da Angiotensina I (Skeggs *et al.*, 1954). Skeggs e cols. em 1956 elucidaram a cascata de formação da angiotensina II, demonstrando tratar-se de um octapeptídeo formado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Skeggs *et al.*, 1956).

Na visão clássica do SRA, seus principais componentes são angiotensinogênio, renina, Angiotensina I (Ang I), enzima conversora de angiotensina (ECA) e Angiotensina II (Ang II). A renina é uma aspartil protease secretada por células justaglomerulares da arteríola aferente. A secreção da renina é estimulada por queda da pressão de perfusão renal, diminuição da concentração de sódio nos túbulos distais do néfron e por excitação do nervo simpático renal via estimulação β 1-adrenérgica das células justaglomerulares e retroalimentação negativa por uma ação direta da Ang II nas células justaglomerulares (Atlas, 1998).

O octapeptídeo Ang II é o principal componente do SRA e sua formação consiste em dois estágios. Inicialmente, ocorre clivagem da alfa-glicoproteína angiotensinogênio, liberada pelo fígado, através da ação da enzima renina, formando o decapeptídeo Ang I. A Ang I é biologicamente inativa e, sob a ação da ECA, forma a Ang II (Atlas, 2007; Lentz *et al.*, 1956). Atualmente, é aceito que Ang II também pode ser formada a partir de vias independentes de renina/ECA, e que Ang I e Ang II podem

ser convertidas em peptídeos angiotensinérgicos menores, biologicamente ativos, como a Ang III, Ang IV e Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2005).

A Ang II medeia seus efeitos atuando principalmente através de dois subtipos de receptores: AT1 e AT2. Estes são receptores metabotrópicos que podem ser distinguidos através do uso de antagonistas seletivos. Receptores AT1 são antagonizados seletivamente por bimefilimidazoles, como losatana, enquanto tetra-hidroimidazopiridinas como o PD123319, antagonizam os receptores AT2. Ang II também pode exercer seus efeitos biológicos atuando de forma indireta através da liberação de outros fatores ou através de *cross-talk* com cascatas de sinalização intracelulares de outros agentes vasoativos, fatores de crescimento e/ou citocinas (Berry *et al.*, 2001).

Os receptores AT1 medeiam à maioria das ações clássicas da Ang II nos tecidos dos sistemas cardiovascular e neuroendócrino, onde se encontram amplamente distribuídos. Dentre as principais ações da Ang II, via AT₁, destacam-se: vasoconstrição, aumento na retenção de sódio e água (por ação direta ou via liberação de aldosterona e vasopressina), aumento da síntese de renina, diminuição da sensibilidade do reflexo pressórico, proliferação celular (angiogênese, remodelamento da matriz extracelular, liberação de noradrenalina pelas terminações simpática e adrenal, aumento da atividade simpática no sistema nervoso central, hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos, estimulação de fibrose no miocárdio e vasos sanguíneos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cheng *et al.*, 2005; Keidar *et al.*, 2007).

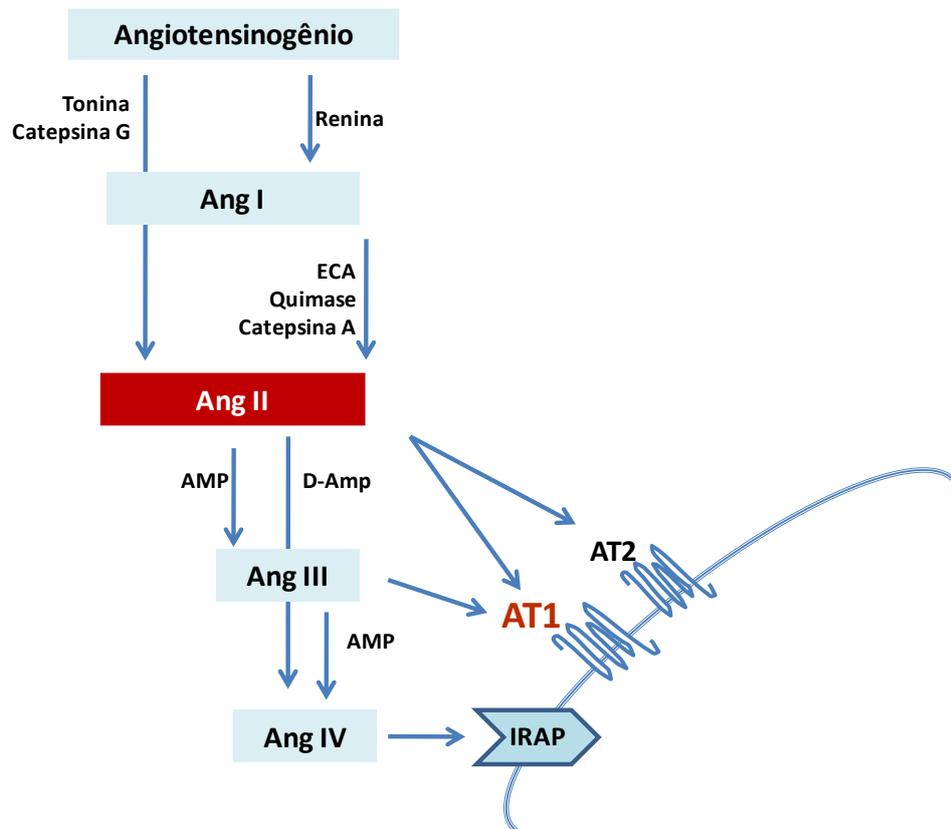


Figura 1: Ilustração esquemática do sistema renina-angiotensina mostrando a via “clássica” de formação da angiotensina II e seu receptor. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; AT1, Receptor de Angiotensina II.

Enquanto os receptores AT1 são amplamente distribuídos, a expressão dos receptores AT₂ é mais limitada. Sabe-se que esses receptores estão presentes principalmente em tecidos fetais em desenvolvimento, o que sugere uma possível participação na morfogênese dos órgãos (Kim and Iwao, 2000). Em adultos, o AT₂ é encontrado no útero, em células granulosas do ovário, na medula adrenal, em diferentes núcleos cerebrais, cardiomiócitos, células da musculatura lisa vascular e células endoteliais (Kim and Iwao, 2000; Matrougui *et al.*, 1999). Estudos sugerem que a interação da Ang II com o receptor AT₂ desencadeia, na maior parte das vezes, efeitos contrários aos observados pela interação da Ang II com o receptor AT₁ (Berry *et al.*, 2001; Carey *et al.*, 2001). Neste sentido, Tsutsumi e cols. em 1999 sugerem que

a ativação dos receptores AT₂, nos vasos sanguíneos, pode desencadear uma resposta vasodilatadora dependente da síntese de cininas e óxido nítrico (NO) (Tsutsumi *et al.*, 1999). Estudos *in vivo*, baseando-se na superexpressão ou deleção genética do receptor AT₂, demonstraram que este receptor é capaz de inibir várias ações mediadas pelo receptor AT₁ (Hein, 1998). Abdalla e colaboradores em 2001, demonstraram que o receptor AT₂ pode formar heterodímeros com o receptor AT₁ independentemente da ligação da Ang II, sugerindo que a interação entre esses dois receptores possa promover uma alteração conformacional em AT₁ impossibilitando a ativação de suas vias de sinalização. Apesar destes achados literários, a importância funcional dos receptores AT₂ em humanos e os mecanismos envolvidos na transdução de sinal não estão ainda claramente elucidados (AbdAlla *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2001).

1.2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

Em 2000, uma nova carboxipeptidase foi descoberta, a ECA2 (Donoghue *et al.*; Tipnis *et al.* 2000). A ECA 2 possui uma estrutura similar à ECA endotelial humana, apresentando aproximadamente 40% da sua homologia com essa enzima. A expressão da ECA2 foi mostrada no endotélio das coronárias e vasos intra-renais, coração, rim, testículos e em células musculares lisas (Turner *et al.*, 2002).

Estruturalmente o gene que codifica a ECA2 possui 18 éxons e as várias similaridades entre a sequência genômica da ECA2 e a sequência da ECA, sugere uma relação evolutiva entre esses dois tipos de genes (Turner *et al.*, 2002). Porém, a especificidade da ECA2 é diferente da ECA. A ECA2 hidrolisa a Ang I, a Ang II e o

metabolito da bradicinina [des-Arg9], mas não hidrolisa a bradicinina. Sugerindo que a especificidade da ECA2 possa estar relacionada a sua função como carboxipeptidase com uma preferência por um resíduo hidrofóbico C-terminal, ou seja, uma ação com carboxipeptidase A(CP-A) o que justifica a ausência de hidrólise da bradicinina, que apresenta um resíduo básico na porção C-terminal (Vickers *et al.*, 2002). Estruturalmente, entretanto a ECA2 é diferente da CP-A e da ECA e tal distinção é comprovada pelo fato da ECA2 não ser inibida por inibidores clássicos da ECA (captopril, lisinopril, enalapril) e nem por inibidores da CP-A. Mais importante nesse contexto é que ao hidrolisar a Ang II e a Ang I, a ECA2 apresenta uma via metabólica para a formação de Ang-(1-9) e Ang-(1-7) (Vickers *et al.*, 2002), dessa forma a caracterização da ECA2 possibilitou a divisão dos dois eixos distintos de formação de peptídeo no sistema, cujas as ações são aparentemente modulatórias.

Em 2003, Santos e cols. identificaram o receptor Mas como um receptor funcional, específico, seletivo para a Ang-(1-7). O receptor Mas possui sete domínios transmembrana e é acoplado à proteína G (GPCR) (Santos *et al.*, 2003). Este receptor é altamente expresso nos testículos e cérebro (Metzger *et al.*, 1995; Walther *et al.*, 2000). Santos e cols. em 2003 fizeram uma ampla caracterização do receptor Mas e demonstraram que: (1) há um único sítio específico de ligação para Ang (1-7) e estudos com o antagonista seletivo deste heptapeptídeo, A-779, indicaram a existência de um receptor específico da Ang- (1-7), (2) a deleção genética deste receptor aboliu a ligação da Ang-(1-7) em rins de camundongos, (3) camundongos deficientes para o receptor Mas perderam completamente a ação antidiurética induzida pela Ang-(1-7) após uma sobrecarga aguda de água, (4) a Ang-(1-7) interage com o receptor Mas em células transfectadas promovendo liberação de ácido araquidônico e (5) animais deficientes para receptor Mas tem o relaxamento vascular

na aorta induzida pela Ang-(1-7) abolido. Estudos indicam que vários efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) podem ser completamente abolidos pelo antagonista seletivo do receptor Mas, A-779, sugerindo um papel importante do eixo Ang-(1-7)-Mas no sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2000, 2003, 2005, 2018).

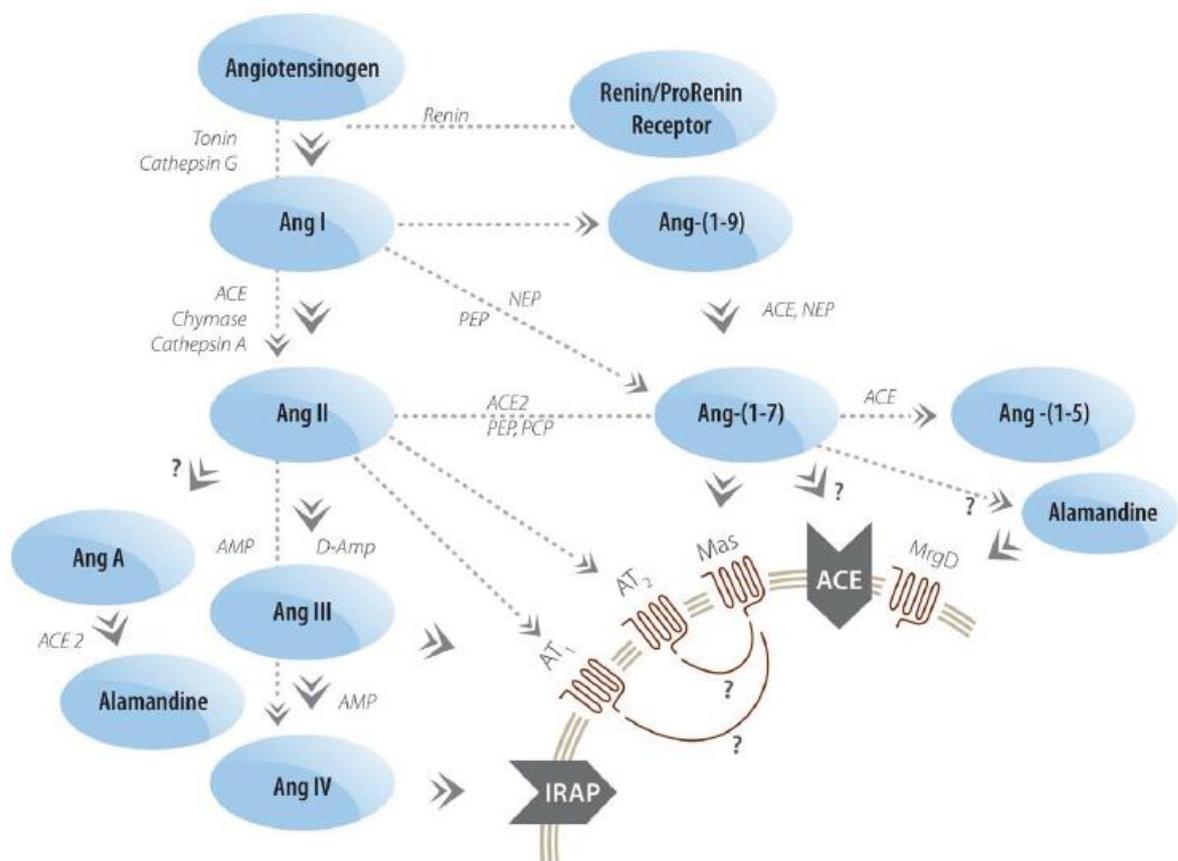


Figura 2: Ilustração mais atualizada do sistema renina-angiotensina. (Santos, 2014)

1.3 Angiotensina-(1-9)

Antes mesmo da descoberta da ECA2, em 1985 Snyder & Wintroub descreveram a angiotensina-(1-9) como angiotensina I Des-leu¹⁰, um peptídeo formado nas plaquetas via carboxipeptidase, oriunda da ação des-leu de um tipo específico de plaqueta que ainda não havia sido identificada (Snyder *et al.*, 1985). Já em 1986 Snyder & Wintroub propuseram a Angiotensina I Des-leu¹⁰ como um componente contra regulatório da Angiotensina II, agindo como antagonista da ECA, e compara a magnitude de seus efeitos vasoativos aos da bradicinina (Snyder and Wintroub, 1986). Já em 1989 John H. buscando uma forma de quantificar concentrações da Ang-(1-9), registra pela primeira vez através de radioimunoensaio a presença de angiotensina-(1-9) no plasma de ratos, atribuindo sua formação a uma ação de carboxipeptidase (Johnson *et al.*, 1989).

A Angiotensina-(1-9) é um nonapeptídeo formado a partir da conversão da angiotensina I através de peptidases, incluindo a carboxipeptidase A (CxA), catepsina A (CpA) e ECA2 (Ocaranza *et al.*, 2014a) Fig. 2. Além desta bioconversão, a ECA 2 degrada Ang II em Ang- (1-7), prevenindo desta forma, o acúmulo de Ang II enquanto favorece a formação de Ang-(1-7) (Donoghue *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2004). Apesar da Ang (1-9) ter uma afinidade, aproximadamente, 100 vezes menor do que Ang II para o receptor AT₂, esta atividade mostrou-se importante com os atuais modelos de sinalização farmacológica de receptores acoplados à proteína G (Ocaranza and Jalil, 2012).

Estudos recentes sugerem que a Ang-(1-9) atua via receptores AT₂, desempenhando importante papel no sistema cardiovascular, como: vasodilatação, ação anti-hipertrofica em cardiomiócitos, ação anti-hipertensiva e anti-proliferativa

(Flores-Muñoz et al., 2011, 2012; Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza and Jalil, 2012; Ocaranza et al., 2014a, 2014b). Contudo a ferramenta farmacológica que vem sendo utilizada para avaliar a interação Ang-(1-9)/AT₂, é o antagonista do receptor AT₂, PD123319, recentemente foi demonstrado que esse antagonista apresenta importante promiscuidade, inibindo por exemplo o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Levando-nos a hipótese de que a Ang-(1-9), pode desencadear suas ações por meio de um receptor diferente do que vem sendo descrito na literatura.

Tanto o receptor AT₂, quanto o receptor Mas, e o mais recentemente descrito o MrgD, parecem ter efeitos similares contra-regulando e/ou modulando os efeitos induzidos pela interação da Ang II com receptor AT₁ no sistema cardiovascular (Lautner *et al.*, 2013). Sendo assim, possíveis candidatos a receptores do peptídeo Ang-(1-9).

Além disso, observando a similaridade dos efeitos vasoativos da Ang-(1-7), Alamandina e Ang-(1-9), levantamos a hipótese que os mesmos poderiam ativar receptores e exercer efeito sinérgico e/ou cumulativo em anéis de aorta de ratos. Em virtude dessas possíveis consequências, funcionais ou terapêuticas torna-se importante compreender os mecanismos envolvidos.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos vasculares induzidos pela Angiotensina-(1-9), em aortas de ratos e camundongos

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos da Angiotensina-(1-9) em anéis de aórticos de camundongos e ratos.

2.2.2 Avaliar a participação dos receptores Mas, AT₂ e MrgD nos efeitos vasculares do peptídeo Ang-(1-9).

2.2.3 Avaliar o possível efeito sinérgico e cumulativo do peptídeo Ang-(1-9) com outras angiotensinas e os possíveis mecanismo envolvidos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para realização do presente estudo foram utilizados camundongos machos FVBN wild type (WT), FVBN com deleção genética do receptor Mas ($Mas^{-/-}$) ou com deleção genética do receptor AT_2 ($AT_2^{-/-}$); com idade entre 10 a 12 semanas. Ratos sprague-dawley (SD) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR-SP), machos com peso entre 250-300 gramas.

Os animais foram provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

3.2 Montagem e preparação dos vasos

Os camundongos foram eutanasiados por decapitação, subsequente retirada de um seguimento da artéria aorta descendente torácica de 2 a 3 cm isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e retirados anéis de 3 mm de comprimento. Os anéis foram montados entre duas hastes de metal inseridas no lúmen da artéria para produzir tensão. Uma das hastes conecta-se a um suporte fixo ajustável e a outra a um transdutor para registro de força. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a um sistema computadorizado. O sistema foi montado em cuba para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs, com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH_2PO_4 1,17; $CaCl_2$ 2,5; $MgSO_4$ 1,4; $NaHCO_3$ 20; glicose 11,0; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), e temperatura controlada a 37°C. As

preparações permaneceram em repouso por 60 minutos, sob tensão basal constante de 0,5 g em

camundongos e 1g pra ratos, durante este período foram lavadas com a solução de Krebs em intervalos de 15 minutos.

Após o período de estabilização, a viabilidade da preparação foi testada utilizando fenilefrina (Phe) (100 nmol/L) e a integridade do endotélio foi verificada com a administração de acetilcolina (ACh - 1 μ mol/L). De acordo com o protocolo experimental, o endotélio foi preservado. A verificação da presença do endotélio foi demonstrada pelo relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. As preparações com endotélio vascular só foram utilizadas quando apresentaram no mínimo 80% de relaxamento para acetilcolina.

As repostas foram registradas usando-se transdutores de tensão isométrica (ADInstruments, PtyLtd. Bela Vista, Australia) conectados a um amplificador (QUAD Bridge, PtyLtd. Bela Vista, Australia). O programa Power Lab versão 7.1 foi utilizado para aquisição dos dados.

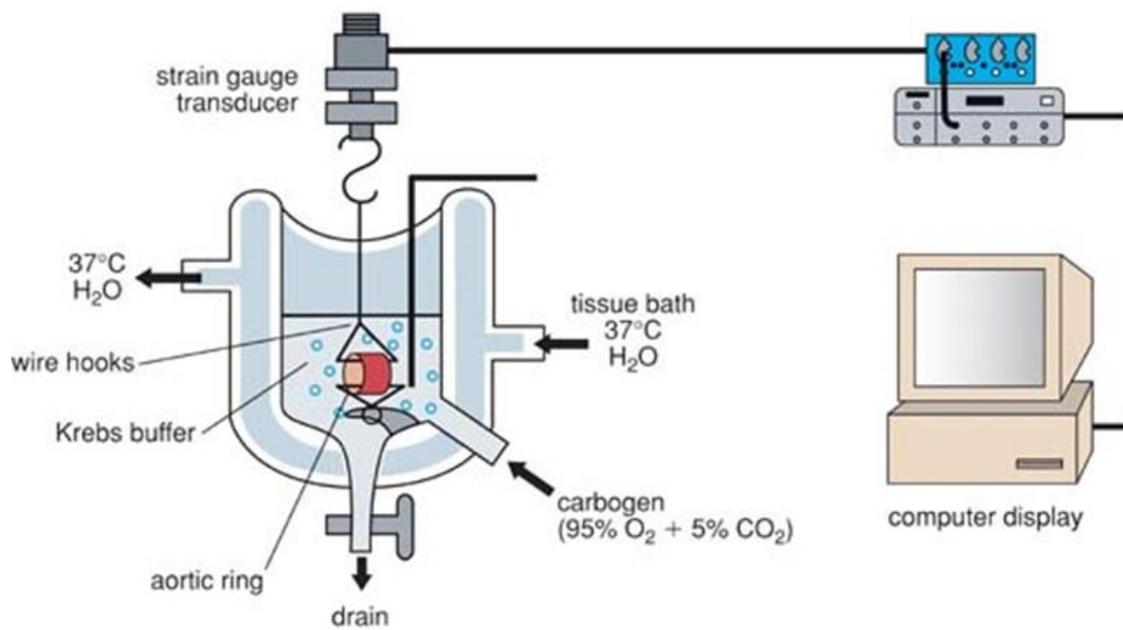


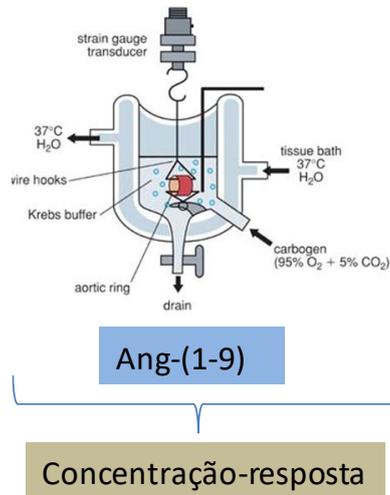
Figura 3: Esquema representativo da conexão dos vasos às hastes metálicas e sistema de aquisição de dados da reatividade vascular de vasos isolados.

3.3 Protocolos experimentais:

Determinação do efeito da Ang-(1-9) em anéis de aorta torácica de ratos e camundongos.

Objetivo: Verificar se a Ang-(1-9) induz vasorrelaxamento em anéis de aortas de camundongos wild type e ratos SD.

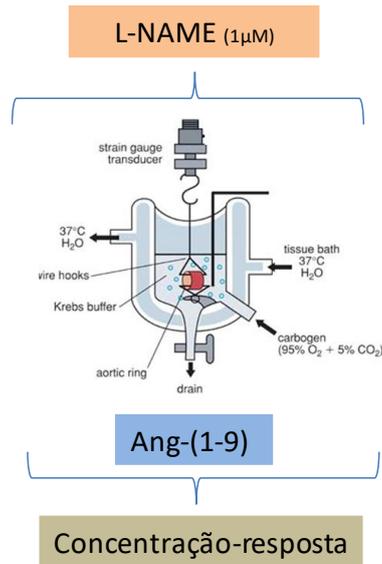
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9) em preparações com endotélio vascular, previamente pré-contraídas com Phe.



Avaliação da participação do endotélio vascular na resposta relaxante da Ang-(1-9) em anéis de aorta.

Objetivo: Verificar a participação do endotélio na resposta relaxante da Ang-(1-9) na artéria aorta.

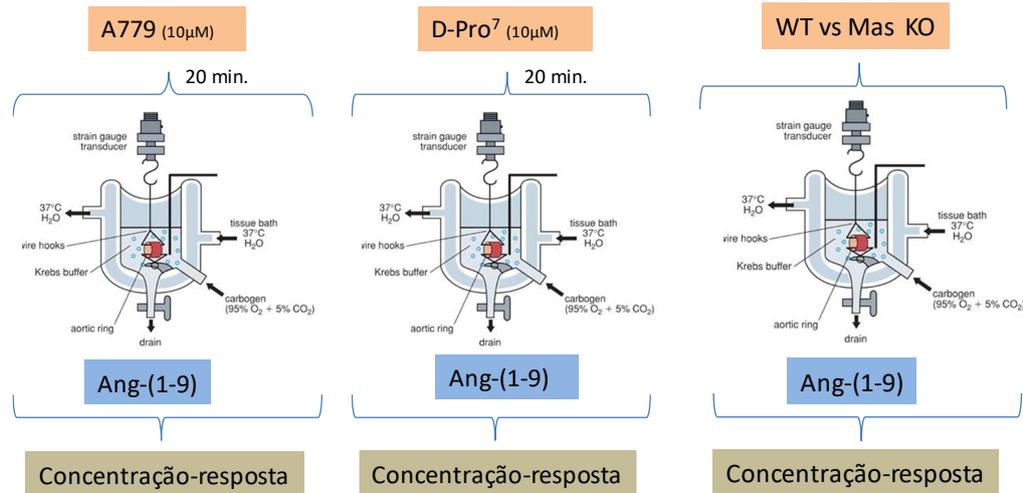
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9) em preparações com endotélio vascular na presença de L-Name e sem o endotélio vascular, previamente pré-contraídas com Phe.



Avaliação da participação dos receptores Mas e MrgD na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) na artéria aorta.

Objetivo: Verificar se o relaxamento vascular induzido pela Ang-(1-9) é dependente do receptor Mas e ou MrgD.

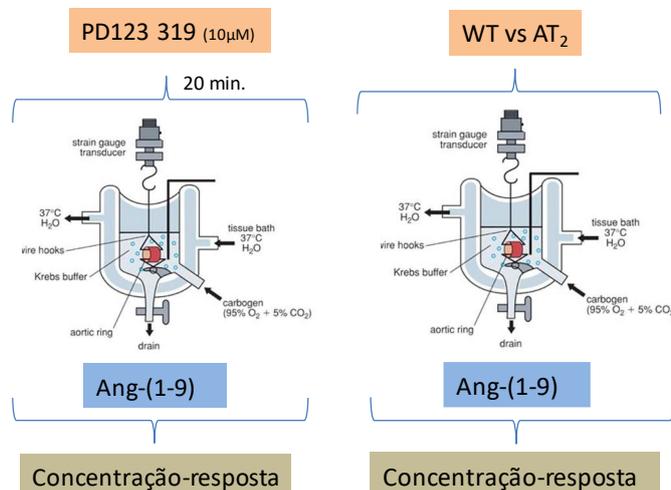
Foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos nocautes para receptor Mas, e de ratos SD utilizando os inibidores do receptor Mas, A-779 e D-Pro7 (10 μ mol/L) que age também inibindo MrgD.



Avaliação da participação do receptor AT₂ no efeito vaso relaxante induzido pela Ang-(1-9) em anéis de artéria aorta.

Objetivo: Verificar se o relaxamento vascular induzido pela Ang-(1-9) é dependente do receptor AT₂.

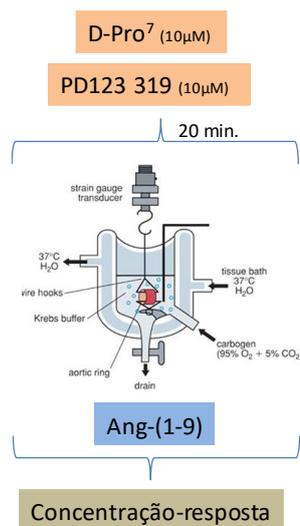
Foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos nocautes para receptor AT₂, e de ratos SD, utilizando o inibidor do receptor AT₂, PD123319 (10µmol/L).



Avaliação da participação dos receptores Mas, AT₂, MrgD no efeito vaso relaxante da Ang-(1-9) em anéis de aorta torácica.

Objetivo: verificar se a resposta vascular desencadeada pela Ang-(1-9) depende dos receptores Mas, AT₂ e MrgD.

Foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD com endotélio vascular preservado, utilizando em conjunto os inibidores D-Pro⁷ (10μmol/L) para os receptores Mas e MrgD, e PD123319 (10μmol/L) como inibidor de AT₂ e MrgD.

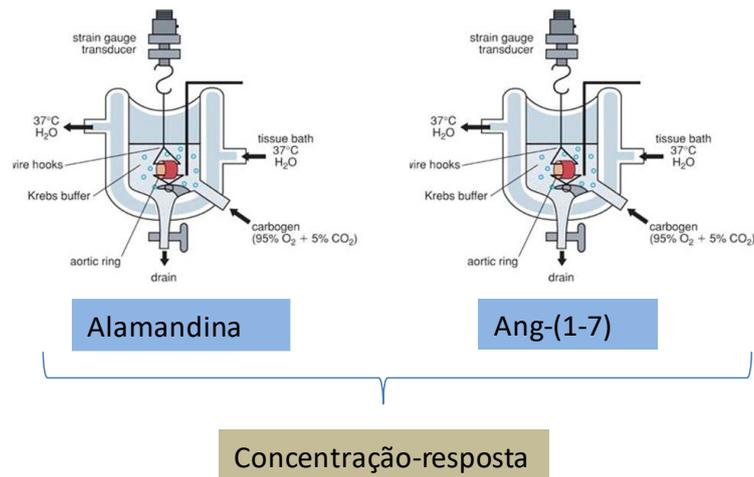


Avaliação da interação entre a Ang-(1-9) com Ang-(1-7) e Alamandina

Avaliação do efeito da Alamandina e Ang-(1-7) na resposta relaxante na artéria aorta.

Objetivo: Verificar o efeito vaso relaxante da Alamandina e Ang-(1-7) em anéis de aortas de ratos SD.

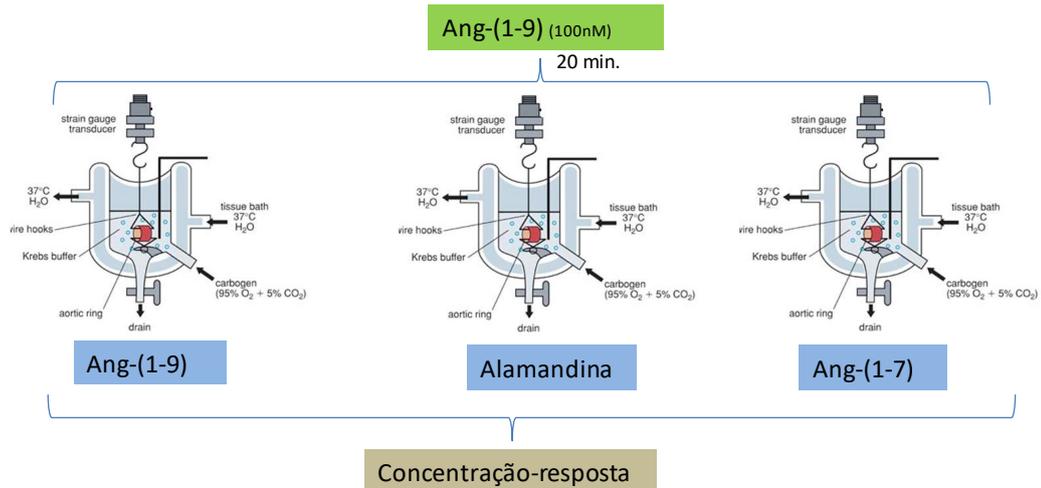
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para Alamandina e Ang-(1-7) em preparações com endotélio vascular preservado, previamente pré-contraídas com Phe.



Avaliação da pré-incubação com Ang-(1-9) nas curvas concentração-resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7).

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7), sofrem alterações quando os vasos são pré-incubados com Ang-(1-9).

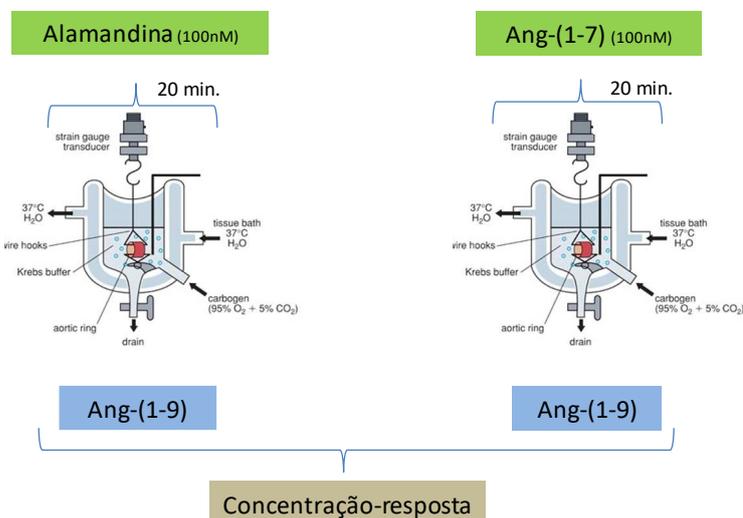
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7) em anéis de aorta pré-incubados (20 min) com Ang-(1-9) (100µmol/l).



Efeito da pré-incubação com Alamandina ou Ang(1-7), na curva concentração-resposta pra ang(1-9).

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Alamandina ou Ang(1-7), sofrem alterações quando pré-incubadas com Ang(1-9).

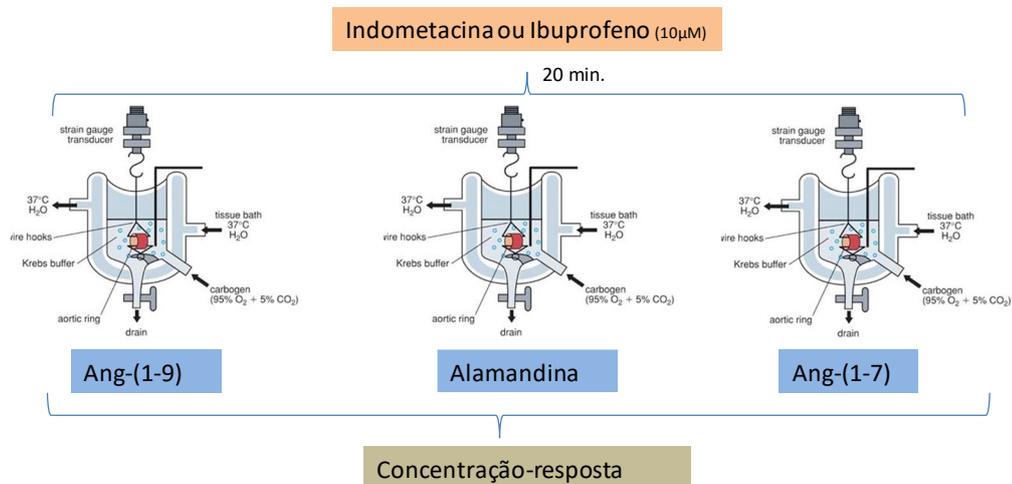
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para, Alamandina e Ang(1-7) pré-incubadas com Ang(1-9) (100μmol/l) em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da participação de prostaglandinas no efeito vaso-relaxante promovidos pela Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7).

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7), sofrem alterações quando pré-incubadas com inibidor não específicos para COX.

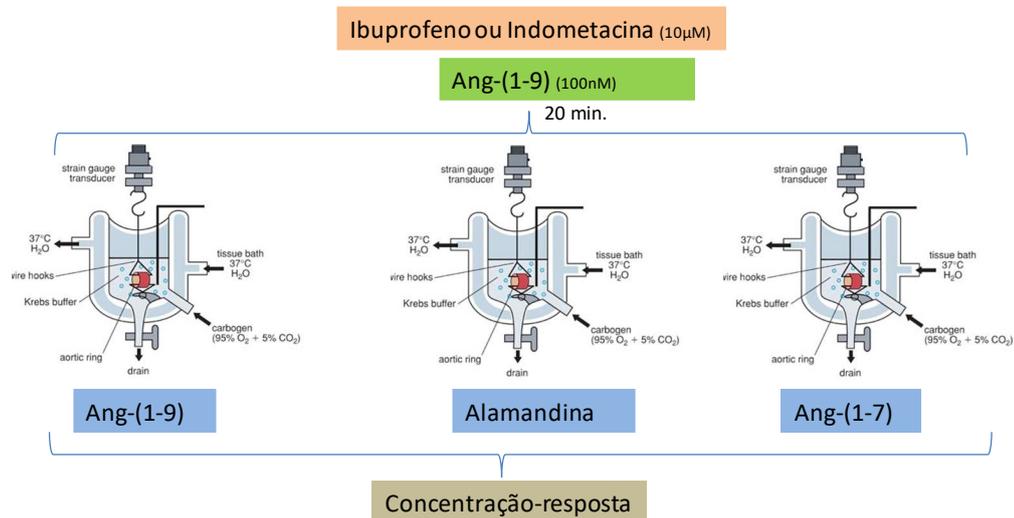
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com indometacina ou Ibuprofeno em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da participação das prostaglandinas na interação entre a Ang-(1-9) com outras angiotensinas.

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7) pré incubadas com Ang-(1-9), sofrem alterações na presença dos inibidores não específicos para COX indometacina ou ibuprofeno.

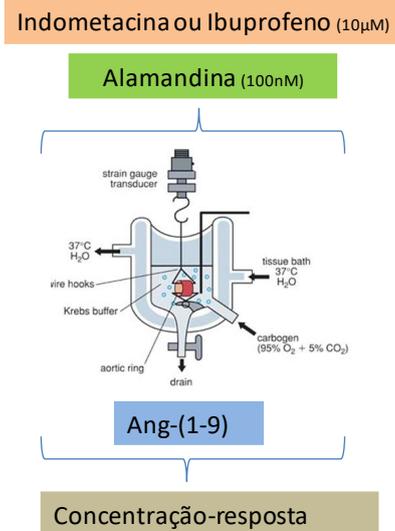
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com Ang-(1-9) e indometacina ou Ibuprofeno em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação das prostaglandinas no efeito promovidos pela pré-Incubação da Alamandina na curva concentração resposta para Ang-(1-9)

Objetivo: Verificar se a curva concentração resposta para Ang-(1-9) sofre alterações quando pré incubada com Alamandina, na presença de inibidores não específicos para COX.

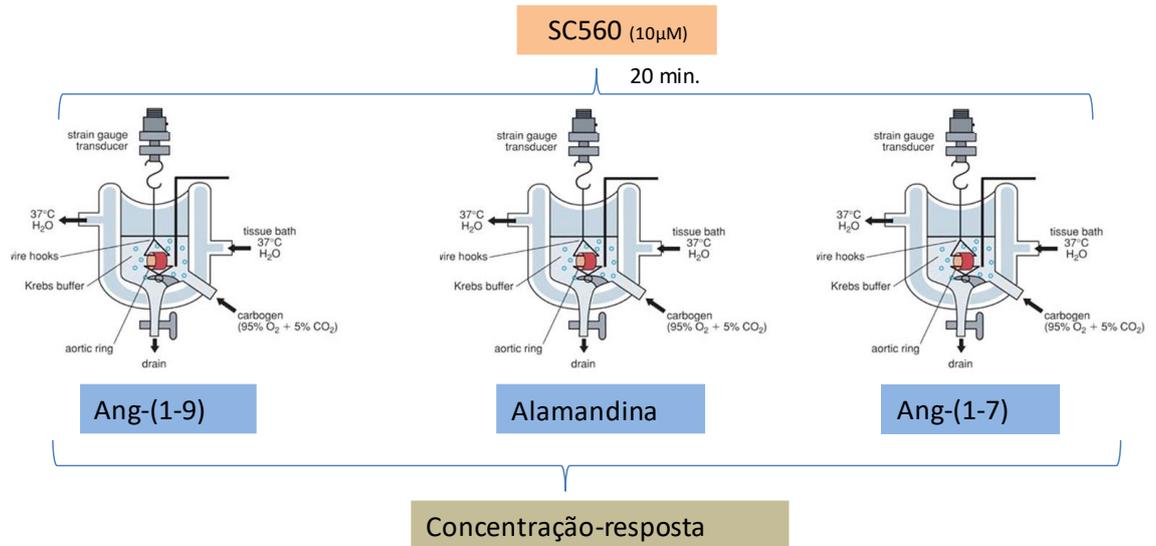
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) pré-incubada com Alamandina na presença de inibidores não específicos para COX (indometacina ou Ibuprofeno) em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da COX-1 no efeito vaso-relaxante promovidos pela Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7).

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7), sofrem alterações quando pré-incubadas com inibidor específico para COX-1.

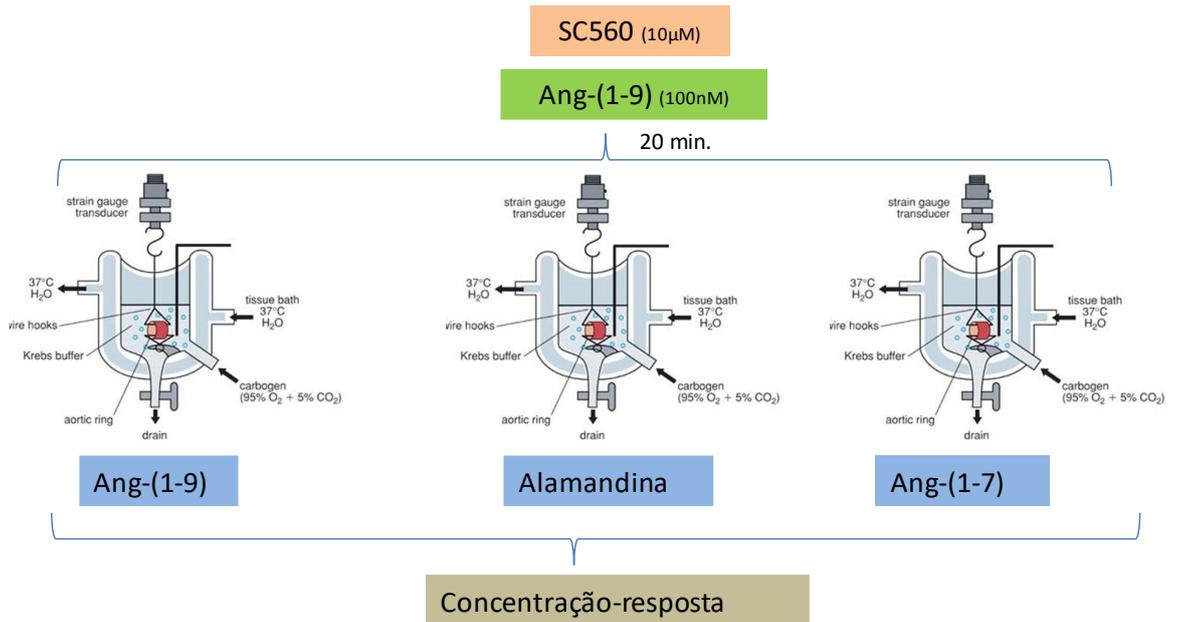
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com inibidor específico para COX-1 SC560 em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da COX-1 nos efeitos promovidos pela pré-Incubação com Ang-(1-9)

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7) pré incubadas com Ang-(1-9), sofrem alterações na presença do inibidor específico para COX-1 SC560.

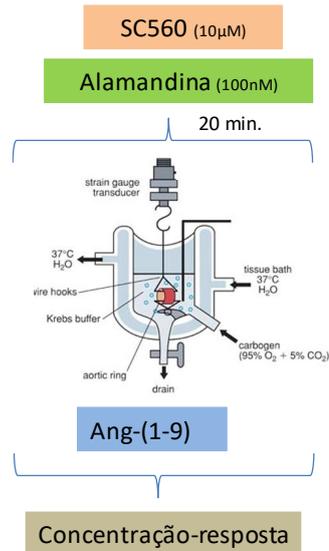
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com Ang-(1-9) e SC560 em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da COX-1 no efeito promovidos pela pré-Incubação da Alamandina na curva concentração resposta para Ang-(1-9)

Objetivo: Verificar se a curva concentração resposta para Ang-(1-9) sofre alterações quando pré incubada com Alamandina, na presença de um inibidor específico para COX.

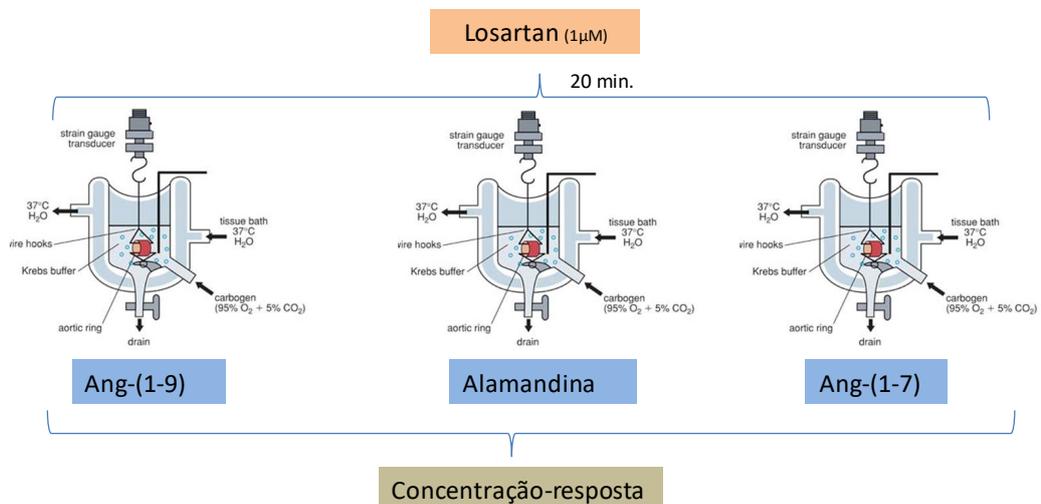
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) pré-incubadas com Alamandina e o inibidor específico para COX-1 (SC560) em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da participação do receptor AT₁ no efeito vaso-relaxante promovidos pela Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7).

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7), sofrem alterações quando pré-incubadas com o inibidor específicos para AT₁.

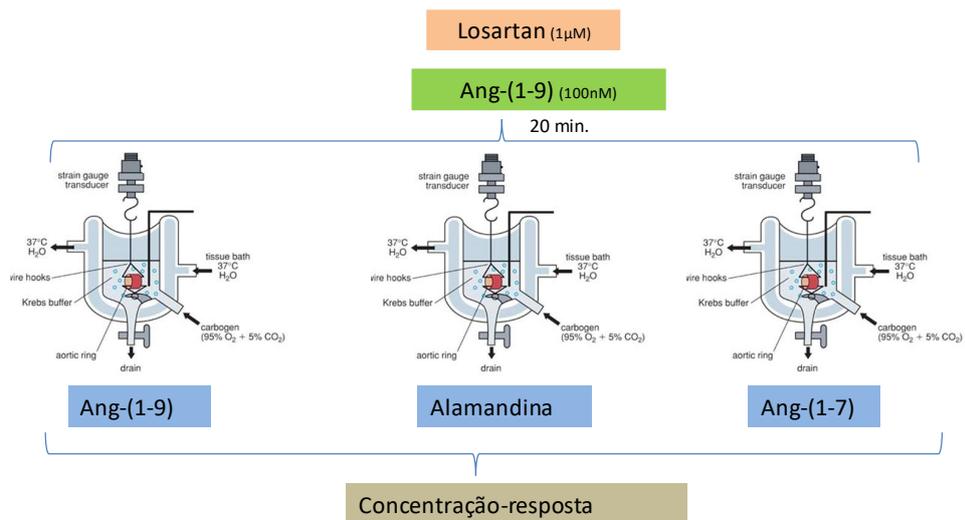
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com Losartan em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da participação do receptor AT_1 nos efeitos promovidos pela pré-Incubação com Ang-(1-9)

Objetivo: Verificar se as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina ou Ang-(1-7) pré incubadas com Ang-(1-9), sofrem alterações na presença do antagonista específicos para o receptor AT_1 .

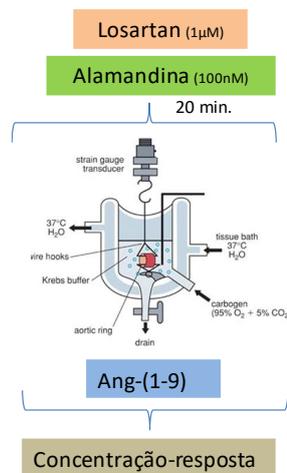
Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) Alamandina e Ang-(1-7) pré-incubadas com Ang-(1-9) e Losartan em preparações com endotélio vascular preservado.



Avaliação da participação do AT_1 no efeito promovido pela pré-Incubação da Alamandina na curva concentração resposta para Ang-(1-9)

Objetivo: Verificar se a curva concentração resposta para Ang-(1-9) sofre alterações quando pré incubada com Alamandina, na presença do antagonista específico para AT₁.

Foram construídas curvas cumulativas concentração-resposta para: Ang-(1-9) pré-incubadas com Alamandina e Losartan em preparações com endotélio vascular preservado.



3.7 Análise estatística

As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPadPrism (GraphPad Software Corporation, versão 5.00,2007). Os resultados são considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0.05$

IV. RESULTADOS

4.1. Efeito da Ang-(1-9), em anéis de aorta de ratos

Como esperado, a adição de quantidades crescentes de Ang-(1-9), em anéis de aorta de ratos SD pré-contraídos com fenilefrina produziu efeito vasorelaxante dose-dependente ($E_{max} = 15 \pm 2,6\%$) (**Fig. 4**).

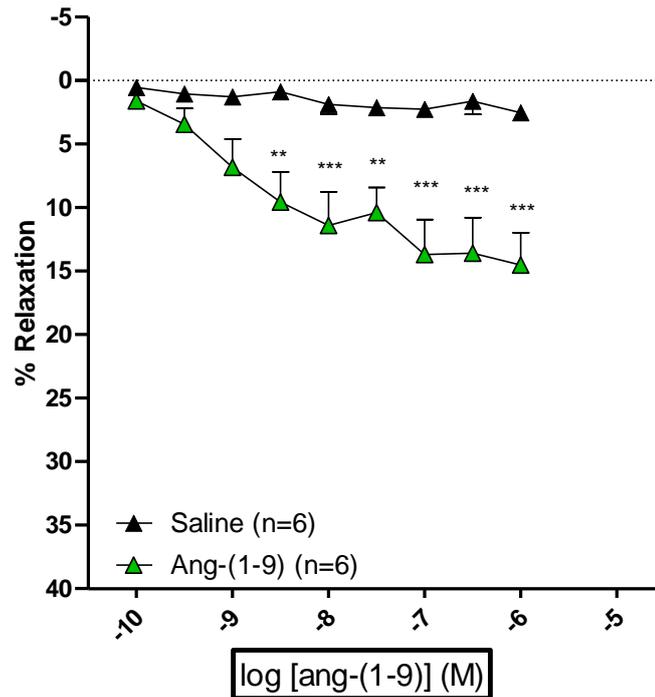


Figura 4: Resposta da Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.1.2 Avaliação da dependência da integridade do endotélio e da NOs no efeito vaso relaxante da Ang-(1-9).

Observamos que a Ang-(1-9) em anéis de aorta com endotélio removido mecanicamente não apresenta efeito vasorelaxante ($E_{max} = 0,3 \pm 2,1\%$) (**Fig. 5a**). O mesmo foi observado quando pré-incubamos os anéis (com endotélio) com L-Name $1\mu\text{M}$ ($E_{max} = -0,4 \pm 1,5\%$) (**Fig. 5b**).

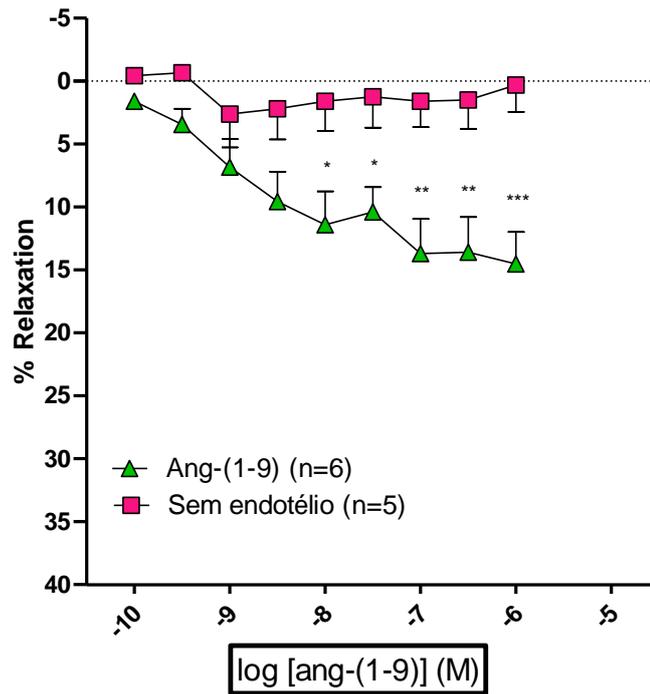
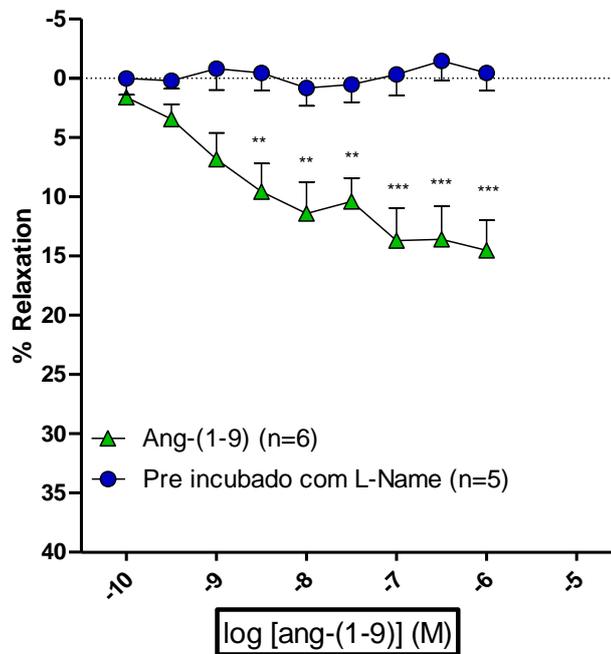


Figura 5 a) Efeito da remoção mecânica do endotélio vascular no efeito vaso relaxante da Ang-(1-9) em anéis de aorta torácica de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni)



b) Efeito da Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD quando pré-incubada com L-Name. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni)

4.2 Efeito induzido pelo antagonismo farmacológico dos receptores Mas, AT2 e MrgD, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aortas de ratos Sprague-dawley

4.2.1 Efeito induzido pelo antagonismo farmacológico do receptor Mas através do antagonista A-779, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aortas de ratos Sprague-dawley.

A figura 6 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O antagonismo farmacológico do receptor Mas, pelo A-779, não altera estatisticamente a resposta induzida pela Ang-(1-9).

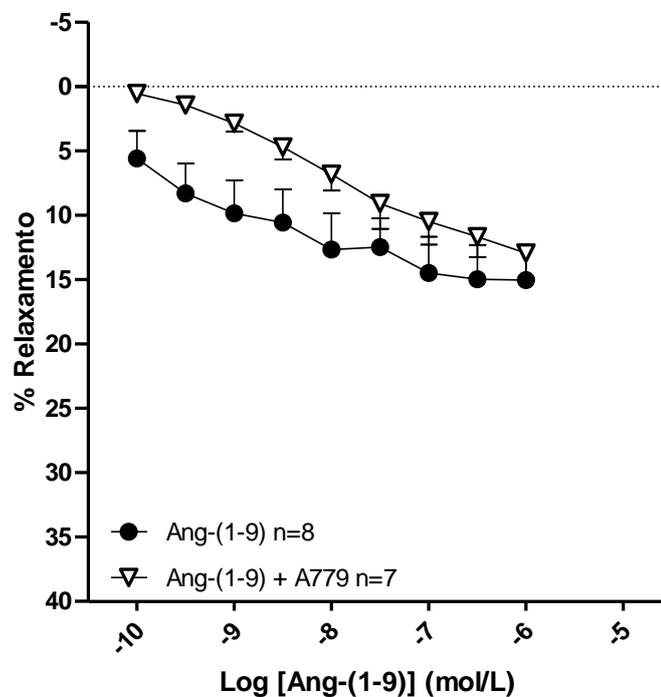


Figura 6: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de A-779. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.2.1 Efeito do antagonismo dos receptores Mas e MrgD pelo D-Pro⁷-Ang-(1-7), sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-dawley.

A figura 7 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O antagonismo farmacológico com dos receptores Mas e MrgD, o D-Pro⁷, não alteraram o efeito vascular induzido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 15,6 \pm 1,7$).

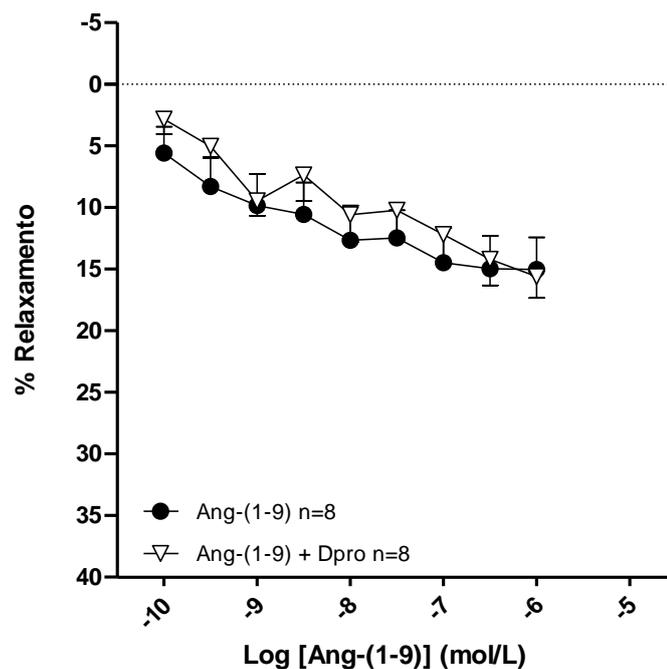


Figura 7: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de D-Pro⁷. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.2.3 Efeito do antagonismo do receptor AT₂ pelo PD123 319, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-dawley.

A figura 8 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O Bloqueio farmacológico com o antagonista do receptor AT₂, PD123 319, não alterou de forma significativa o efeito vascular induzido pela Ang-(1-9) (E_{max} = 22,7 ± 5,4).

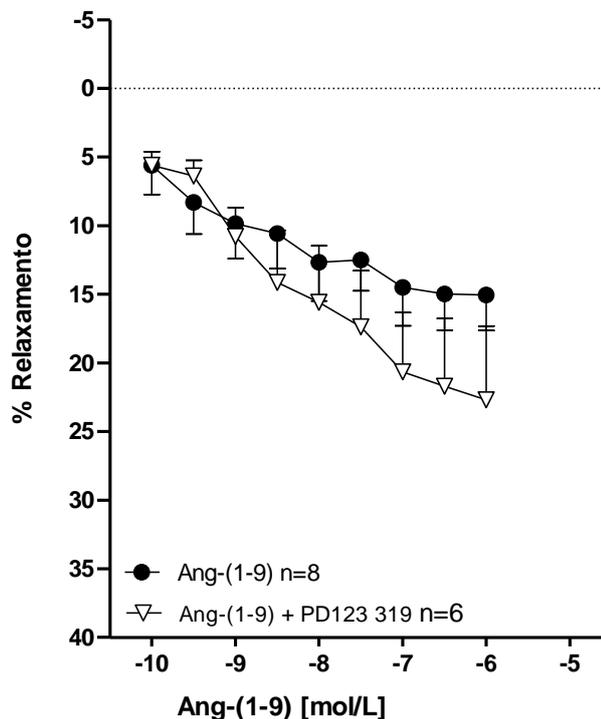


Figura 8: Efeito induzido pelo peptídeo Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de PD123 319. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.2.4 Efeito do antagonismo simultâneo dos receptores MAS, AT₂ e MrgD, pelo D-Pro⁷-Ang-(1-7) e PD123 319, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-dawley.

A figura 9 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O antagonismo farmacológico dos receptores Mas, AT2 e MrgD, não alterou de forma significativa a resposta induzida pela Ang-(1-9)

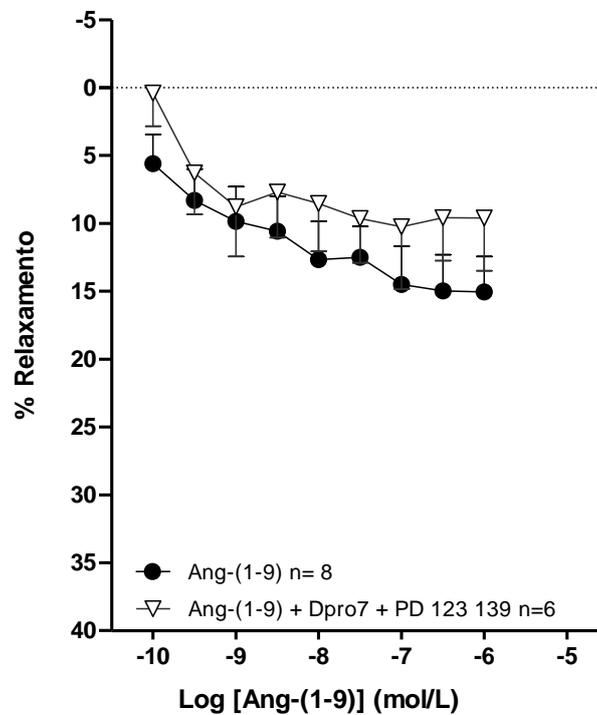


Figura 9: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos sprague-dawley na presença de Dpro⁷ e PD 123 139. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.3. Efeito do peptídeo Ang-(1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N

A Figura 10 mostra o efeito relaxante concentração-dependente induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N WT contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe).

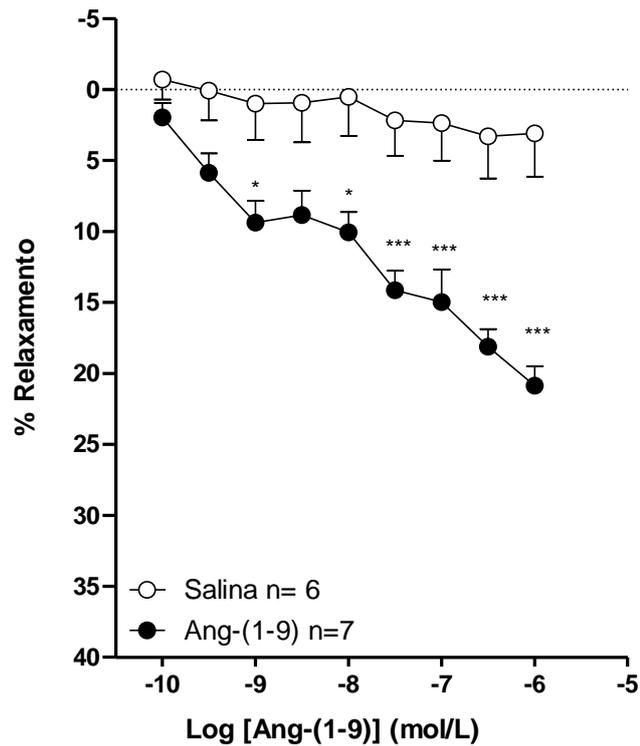


Figura 10: Efeito induzido pela Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N WT. .
 $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.3.2 Avaliação do receptor Mas na resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N mas knockout.

A Figura 11 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe). Comparamos a ação da Ang-(1-9) em camundongos com e sem a deleção genética do receptor Mas, sendo que os animais *Knockout* apresentaram um relaxamento mais tênue em doses de maior concentração. O relaxamento, no entanto, não foi abolido.

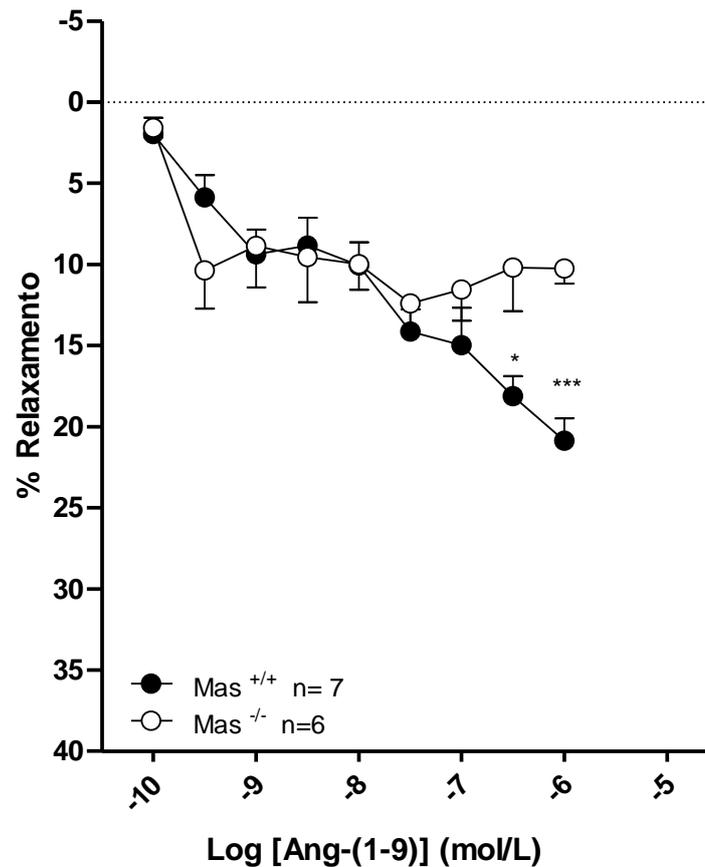


Figura 11: Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas Knockout (Mas^{-/-}) e FVB/N wildtype (Mas^{+/+}). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.3.3 Avaliação da participação do receptor AT₂ na resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N AT₂ knockout.

A Figura 12 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe)

Na Figura comparamos a ação da Ang-(1-9) em camundongos com e sem a deleção genética do receptor AT₂, sendo que não houve diferença entre os grupos, sugerindo que a ação do peptídeo pode ocorrer independente da presença do receptor AT₂.

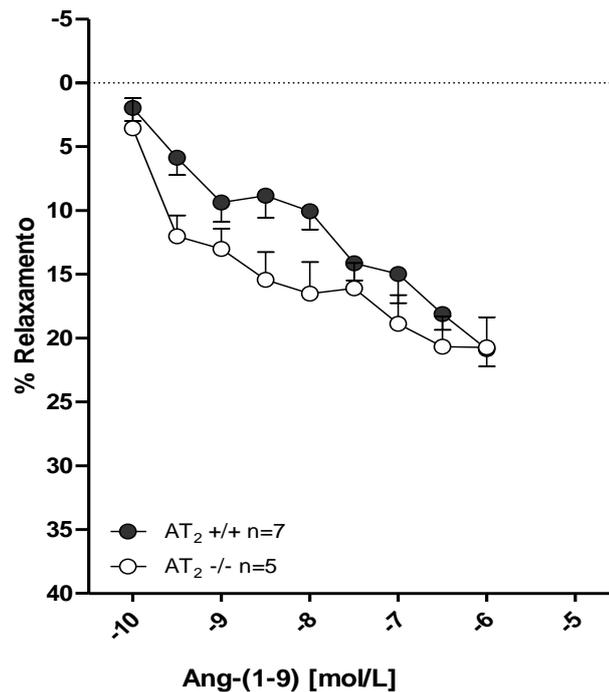


Figura 12: Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas *Knockout* (AT₂ -/-) e FVB/N *wildtype* (AT₂ +/+) (B * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni)).

4.4. Efeito da Ang-(1-7) e Alamandina, em anéis de aorta de ratos.

Como já é bem definido na literatura, a adição de concentrações crescentes de Ang-(1-7) e Alamandina, em anéis de aorta de ratos SD pré-contraídos com fenilefrina, produziu efeito vasorelaxante dose-dependente ($E_{max} = 22 \pm 1,2\%$) e ($E_{max} = 23 \pm 1,5\%$) respectivamente.

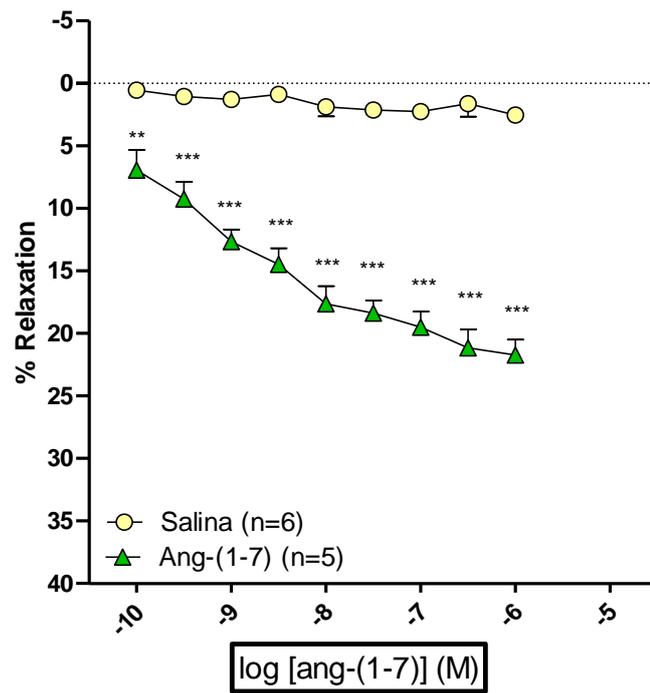
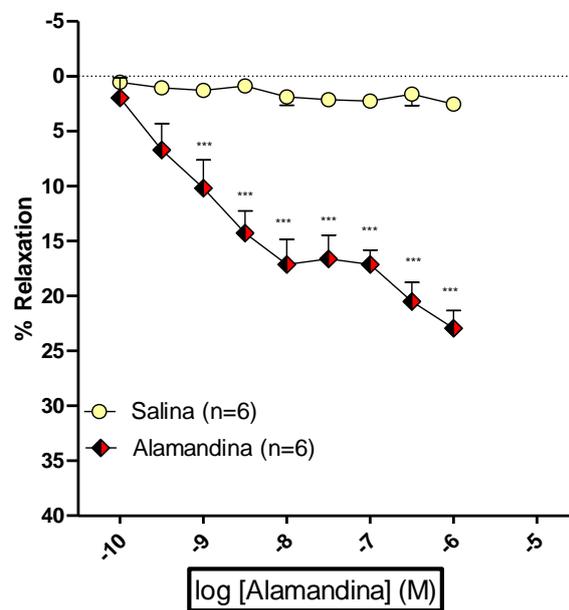


Figura 13: a) Efeito da pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) Efeito da Alamandina em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.5. Efeito da Interação da Ang-(1-9) com outras angiotensinas

4.5.1 Efeito da pré-incubação com Ang-(1-9) sobre as curvas concentração-resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7).

Ao pré-incubar os anéis de aorta com Ang-(1-9) 100nM, observamos que o efeito vasodilatador promovido pela Ang-(1-9) e Alamandina foram atenuados ($E_{max} = 6 \pm 2,4$ e $9 \pm 1,9\%$ respectivamente) (**Fig. 14a e 3b**). Além disso, a Ang-(1-9) inibiu completamente o efeito vaso relaxante induzido pela Ang-(1-7) ($E_{max} = -33 \pm 1,3\%$) (**Fig. 14c**).

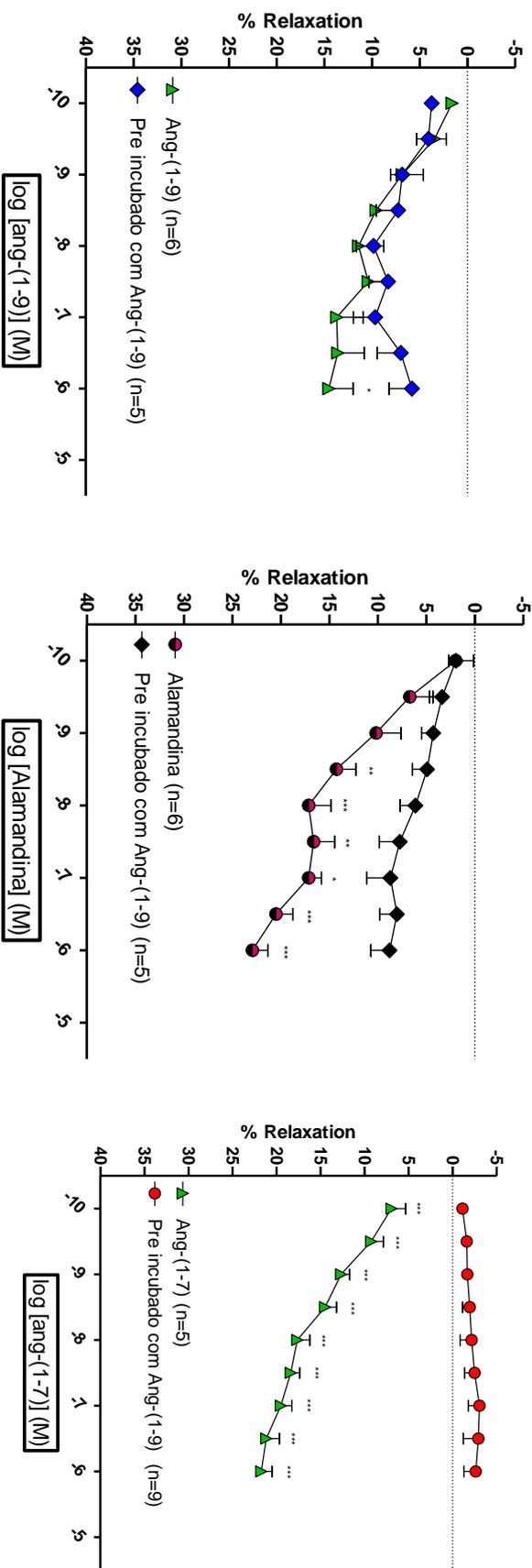


Figura 14: Efeito da Ang-(1-9) pré-incubada, sobre as curvas concentração resposta para: a) Ang-(1-9), b) Alamandina e c) Ang-(1-7), em anéis de aorta de rato. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni)

4.5.2 Efeito da pré-incubação com Alamandina ou Ang-(1-7), na curva concentração-resposta para Ang-(1-9).

Ao pré-incubar com Alamandina (20min), observamos que o efeito vasorelaxante promovido pela Ang-(1-9) foi atenuado ($E_{max} = 6 \pm 2,4$) (**Fig. 15a**).

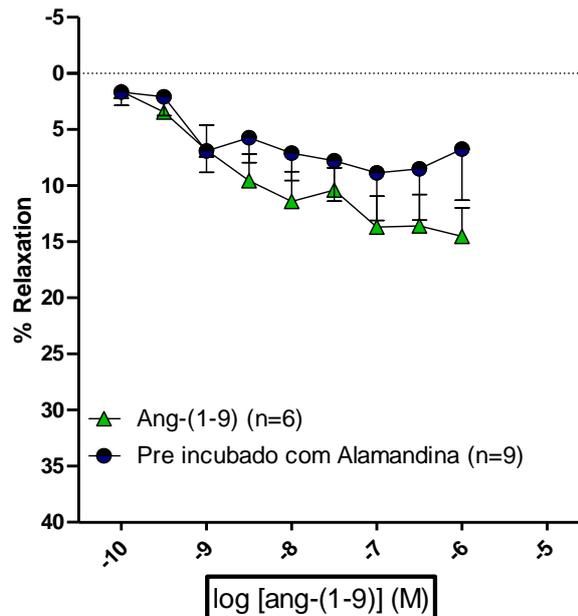
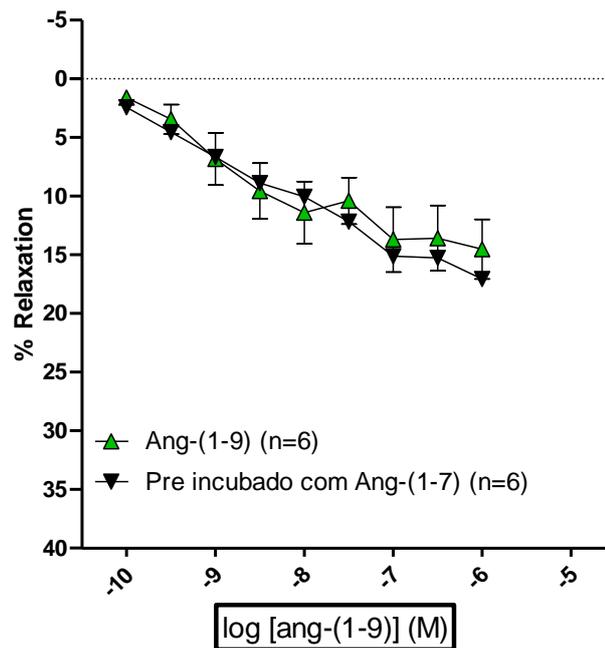


Figura 15: a) Efeito da Alamandina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

A pré-incubação com Ang-(1-7), não alterou o efeito vasorelaxante promovido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 17 \pm 2,6$) (**Fig. 15b**)



b) Efeito da Ang-(1-7) pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6. Avaliação do mecanismo dos efeitos da Ang-(1-9) em anéis de aorta.

Em etapa subsequente de nosso estudo passamos a avaliar o mecanismo de ação direta da Ang-(1-79) em anéis de aorta bem como de sua interação com outras angiotensinas.

4.6.1 Participação das prostaglandinas nos efeitos promovidos pela Ang-(1-9).

Ao tratar previamente os anéis com inibidores não específicos de COX, (indometacina ou ibuprofeno), observamos que o efeito da Ang-(1-9) foi sutilmente potencializado pela ação da indometacina ($E_{max} = 23 \pm 2\%$) (Fig. 16a).

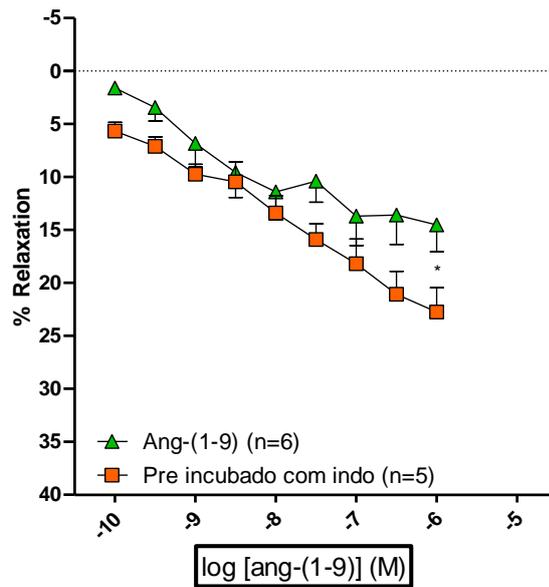
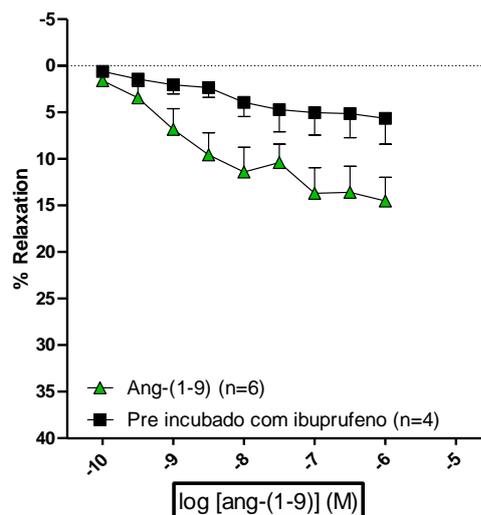


Figura 16: a) Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Contudo, ao tratar previamente os anéis de aorta com o inibidor não específico de COX, ibuprofeno, observamos que o efeito da Ang-(1-9) não foi alterado de forma estatisticamente significativa ($E_{max} = 15 \pm 3\%$) (**Fig. 16b**).



b) Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Bem como observado no resultado anterior, ao tratar previamente os anéis com o inibidor para COX-1, SC560, notamos que o efeito da Ang-(1-9) não foi alterado ($E_{max} = 15 \pm 3\%$). (**Fig. 17**).

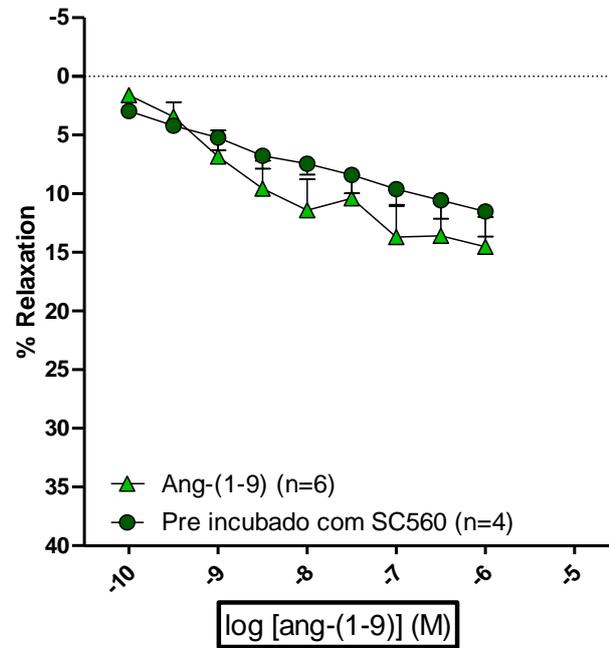


Figura 17: Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.2 Participação das prostaglandinas nos efeitos promovidos pela Alamandina.

Após tratar previamente os anéis de aorta com o inibidor não específico de COX, indometacina, observamos que o efeito vaso relaxante da Alamandina foi atenuado ($E_{max} = 23 \pm 1\%$) (**Fig. 18a**).

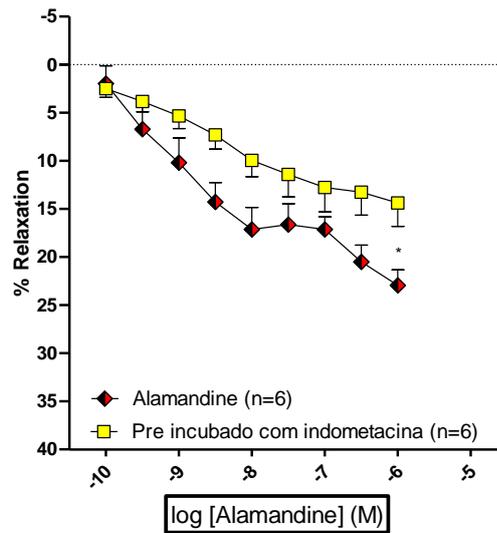
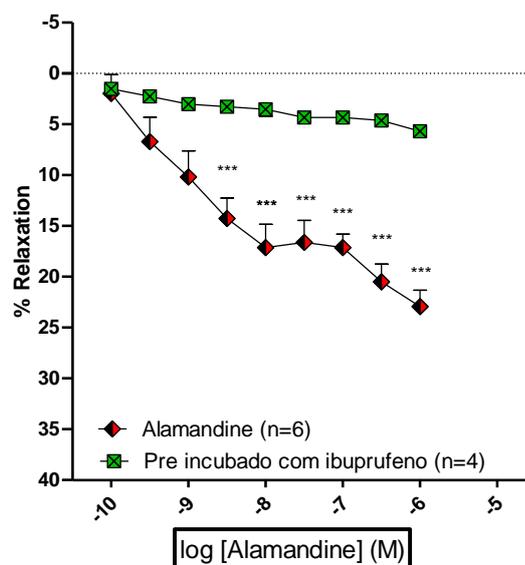


Figura 18: a) Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Almandina em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Já, ao tratar previamente os anéis de aorta com o inibidor não específico de COX, ibuprofeno, observamos que o efeito da Almandina foi fortemente suprimido ($E_{max} = 6 \pm 0,5\%$) (**Fig. 18b**).



b) Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Almandina em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Ao tratar previamente os anéis com o inibidor para COX-1, SC560, foi observado atenuação do efeito vasodilatador promovidos pela Alamandina ($E_{max} = 11 \pm 3\%$). (Fig. 19).

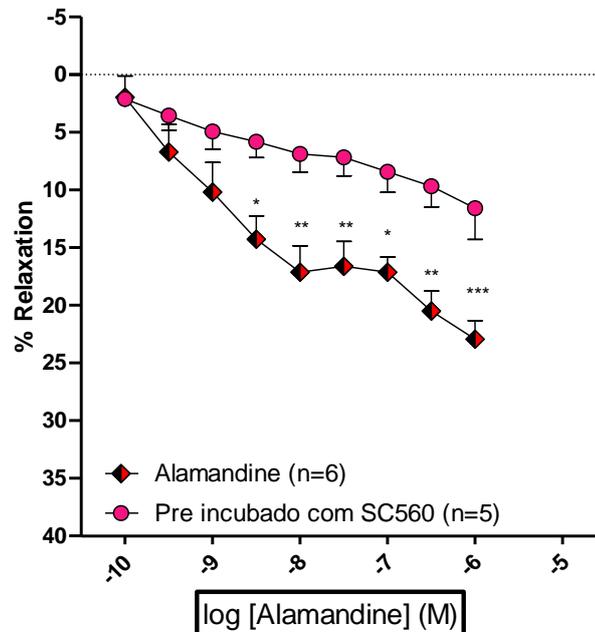


Figura 19: Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.3 Participação das prostaglandinas nos efeitos promovidos pela Ang-(1-7).

Após tratar previamente os anéis de aorta com o inibidor não específico de COX, indometacina, não observamos diferença estatística quando comparado ao grupo não tratado ($E_{max} = 19 \pm 2,5\%$) (Fig. 20a).

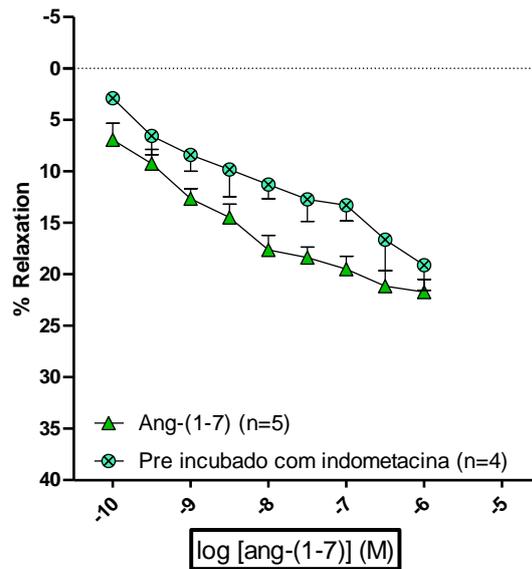
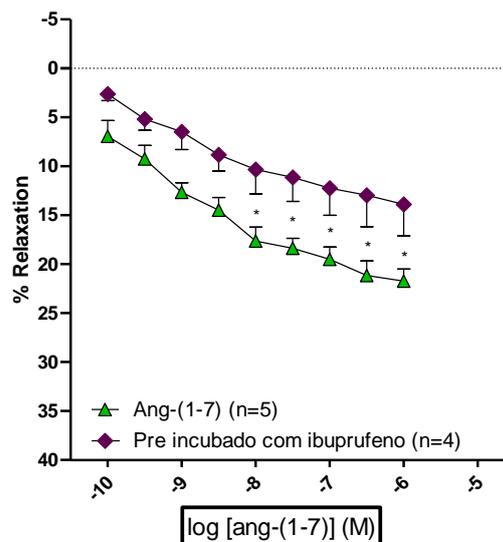


Figura 20:

a) Efeito da indometacina pré-incubada, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

No entanto, o tratamento previo dos anéis de aorta com o inibidor não específico de COX, ibuprofeno, atenuou o efeito da Ang-(1-7) ($E_{max} = 14 \pm 3\%$) (**Fig. 20b**).



b) Efeito do ibuprofeno pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Após tratar previamente os anéis com o inibidor específico para COX-1, SC560, foi observado uma atenuação importante do efeito vaso relaxante promovido pela Ang-(1-7) ($E_{max} = 8 \pm 2\%$). (**Fig. 21**).

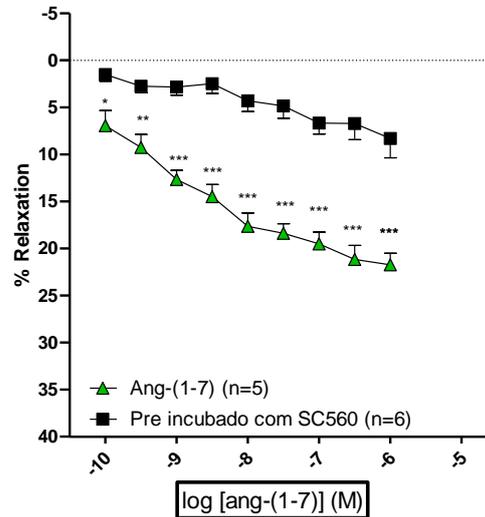


Figura 21: Efeito do SC560 pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.4 Participação das prostaglandinas nos efeitos promovidos pela pré-incubação com Ang-(1-9)

Ao tratar previamente os anéis com inibidores não específicos de COX, (indometacina ou ibuprofeno), observamos que o efeito da Ang-(1-9) pré-incubada com ela mesma não se alterou com o tratamento na presença da Indometacina ($E_{max} = 13 \pm 2,3\%$) (**Fig. 22a**).

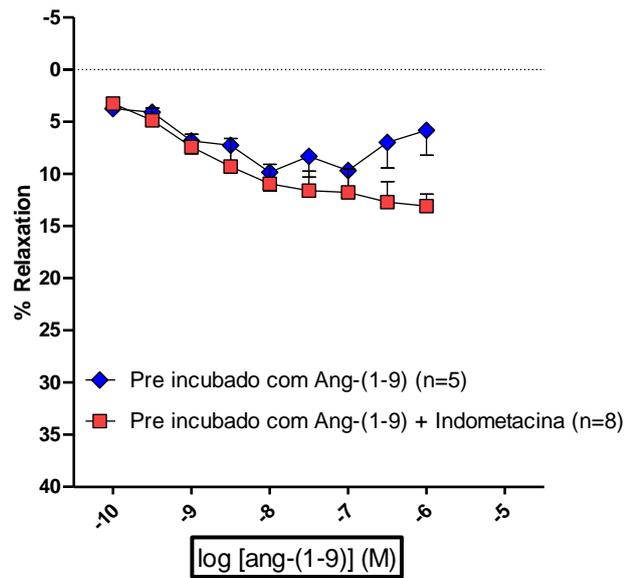
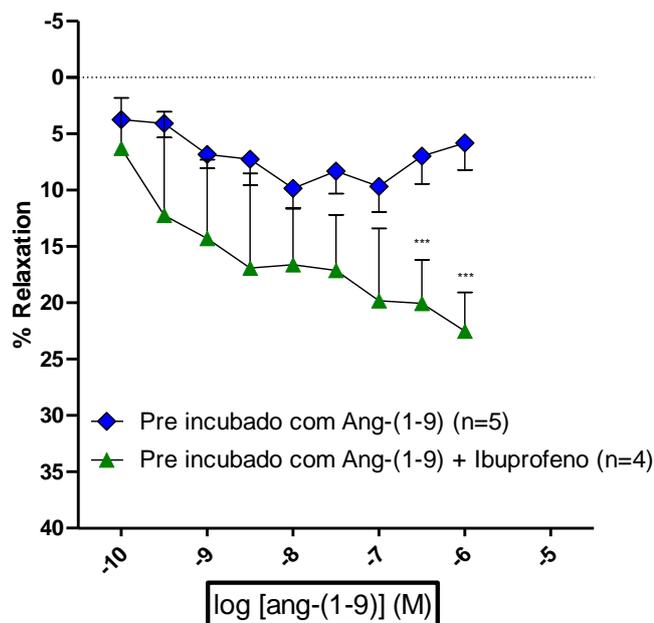


Figura 22: a) A Indometacina no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Por outro lado, o Ibuprofeno foi capaz de promover atenuação significativa desse efeito ($E_{max} = 23 \pm 2,6\%$) (**Fig. 22b**).



b) O Ibuprofeno no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-9). em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

No grupo Alamandina, pré-tratado com Ang-(1-9), tanto a indometacina quanto ibuprofeno não influenciaram a atenuação do efeito vaso relaxante produzida pela Ang-(1-9) sobre a Alamandina ($E_{max} = 6 \pm 1,7\%$) (**Fig. 23a**) e ($E_{max} = 7 \pm 1,7\%$) (**Fig. 23b**) respectivamente.

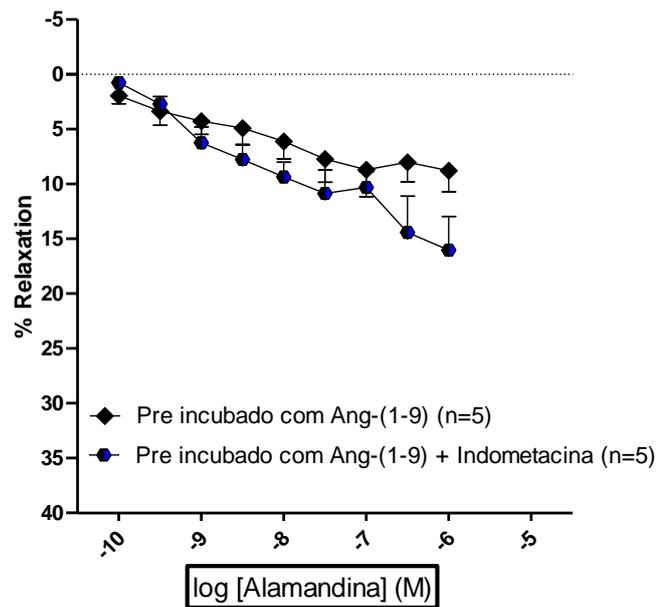
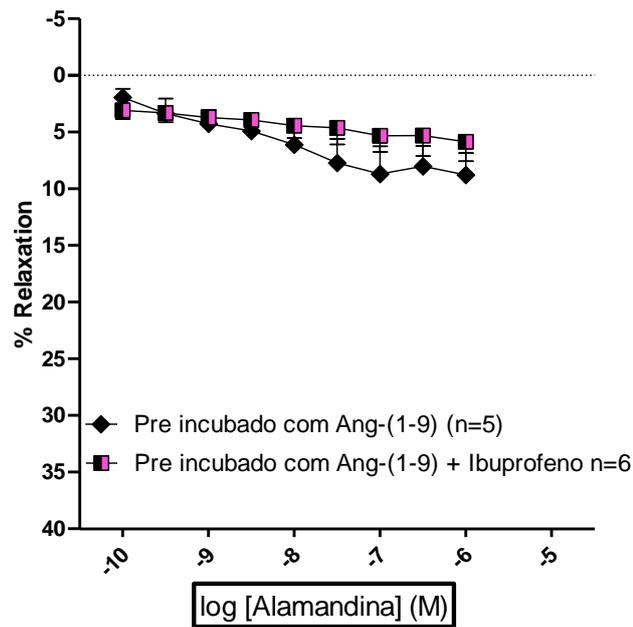


Figura 23: a) A Indometacina não o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de aorta de ratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) O Ibuprofeno no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta pra Alamandina. em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Já o grupo Ang-(1-7), no qual no qual os anéis foram pré-incubados com a Ang-(1-9), a presença de indometacina foi capaz de reverter o efeito inibitório provocado pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 21 \pm 3,7\%$) (Fig. 24a). Por outro lado o Ibuprofeno, apenas atenuou o efeito inibitório promovido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 7 \pm 1,7\%$) (Fig. 24b).

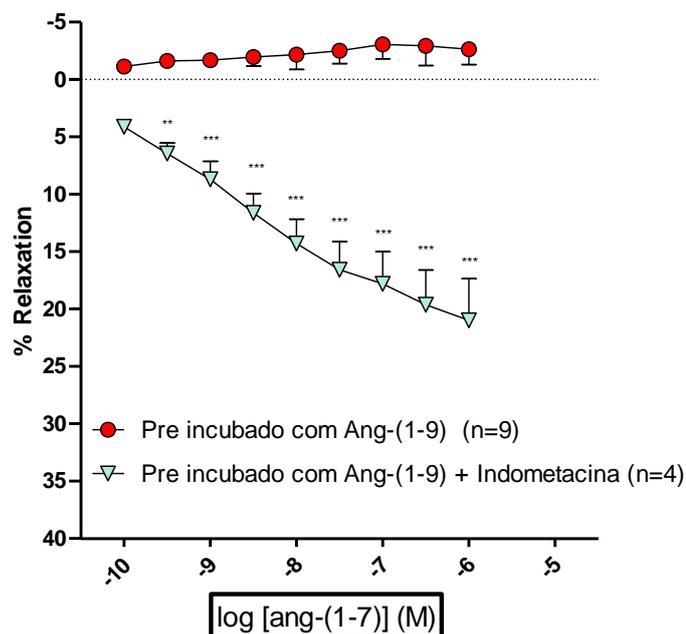
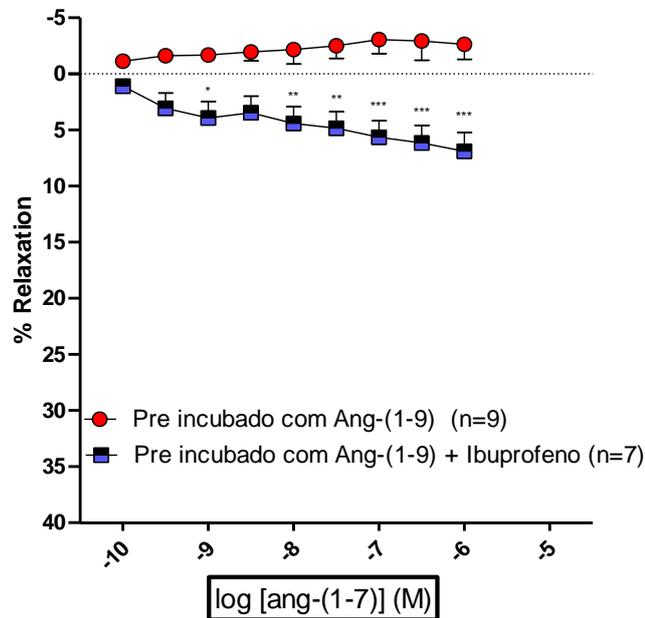


Figura 24: a) A Indometacina no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) O ibuprofeno no o efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubada sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Ao tratar previamente com o inibidor específico pra COX-1 o SC560, observamos que o efeito da Ang-(1-9) quando pré-incubada com ela mesma, não se altera ($E_{max} = 11 \pm 1,3\%$) (**Fig. 25a**), bem como no grupo Alamandina, pré-incubada com Ang-(1-9) ($E_{max} = 7 \pm 2,2\%$) (**Fig. 25b**). Contudo na curva pra Ang-(1-7), o SC560 atenuou o efeito inibitório promovido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 10 \pm 3,1\%$) (**Fig. 25c**).

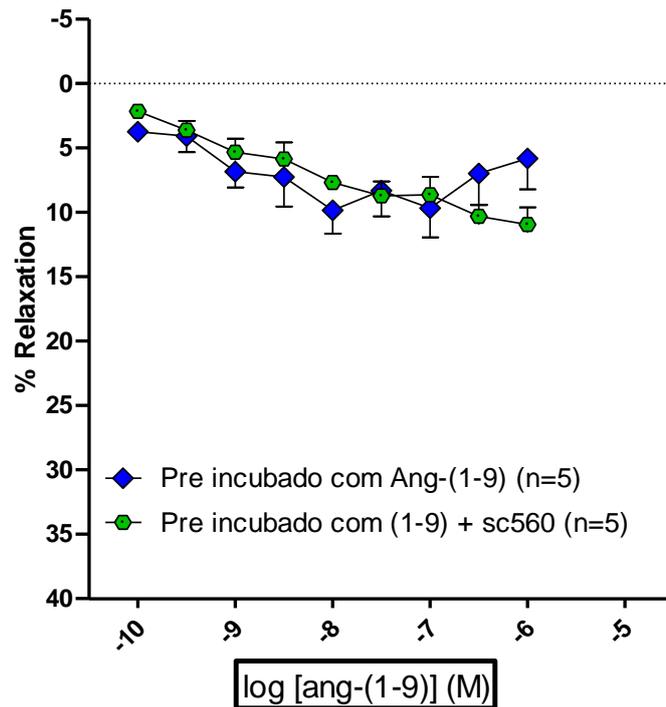
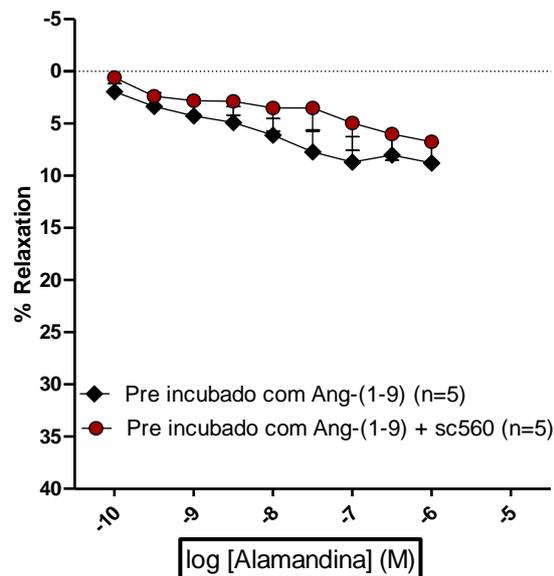
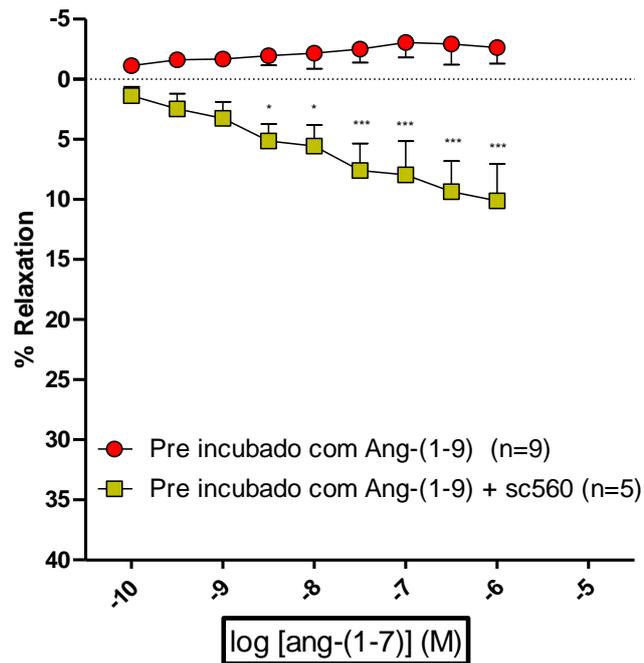


Figura 25: a) O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-9), em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



c) O SC560 no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7). em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.5 Participação das Ciclo-oxigenases no o efeito promovido pela pré-incubação com Alamandina.

Observamos que na presença da indometacina, ocorreu atenuação do efeito inibitório promovido pela pré-incubação com Alamandina sobre a atividade vasorelaxante da Ang-(1-9) ($E_{max} = 20 \pm 2,7\%$) (**Fig. 26a**), já o Ibruprofeno mostrou uma tendência em atenuar esse efeito inibitório, porém, os resultados não foram estatisticamente significativos ($E_{max} = 18 \pm 1,5\%$) (**Fig. 26b**). Com relação à participação da COX-1, O SC560, não se mostrou efetivo no grupo tratado com Ang-(1-9) e pré-incubado com Alamandina ($E_{max} = 5 \pm 2,3\%$) (**Fig. 26c**).

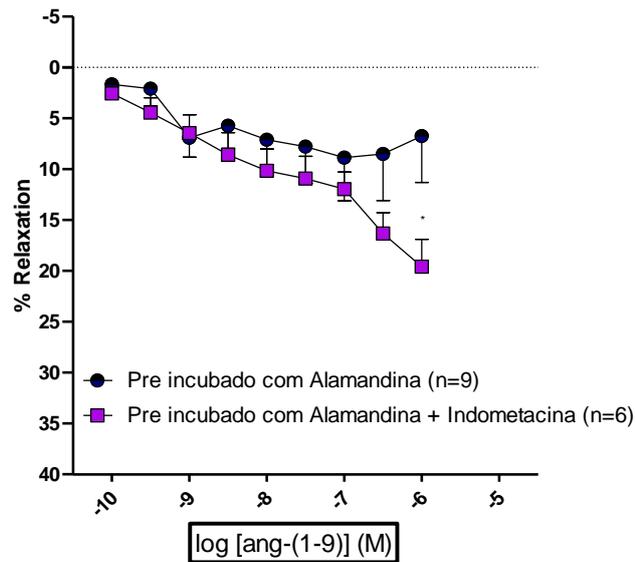
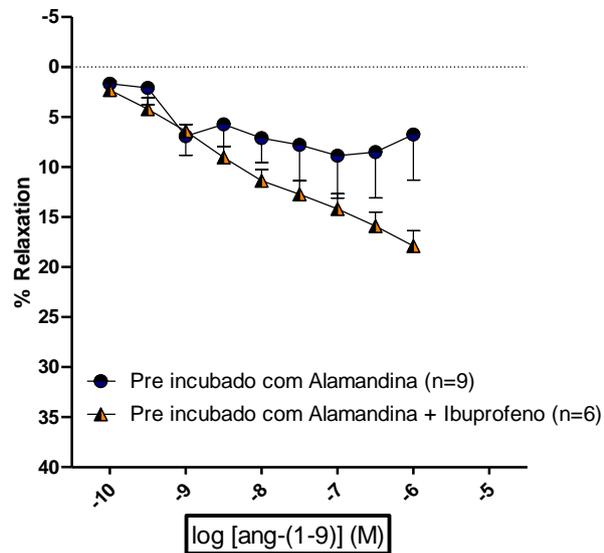
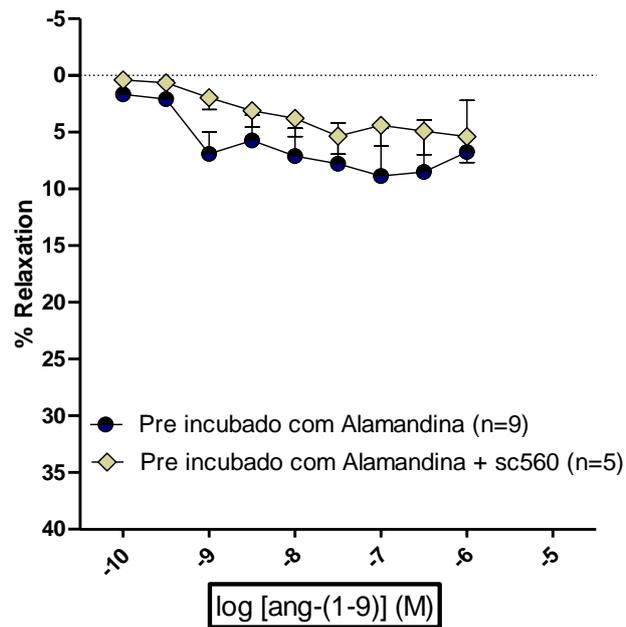


Figura 26: a) A Indometacina no o efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) O Ibuprofeno no o efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni)



c) O SC650 no efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.6 Papel do receptor AT_1 no efeito vasodilatador promovido pela Ang-(1-9).

Alamandina e Ang-(1-7).

Na presença do Losartan, foi observado uma atenuação leve do efeito vasorelaxante produzido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 9 \pm 1\%$)

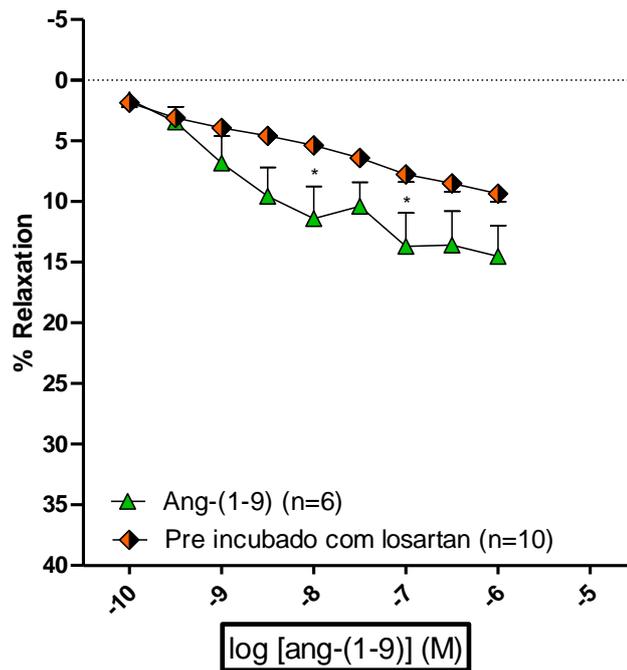


Figura 27: Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

O losartan, bem como observado no para Ang-(1-9), atenuou o efeito vaso relaxante na presença da Alamandina ($E_{max} = 16 \pm 1,5\%$)

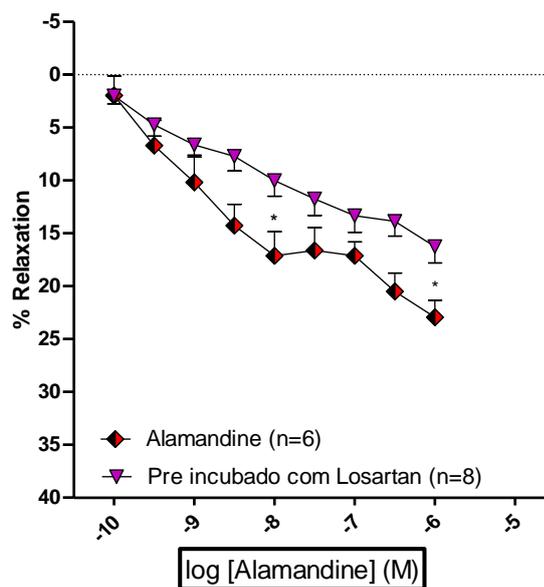


Figura 28: Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Alamandina em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

Em contrapartida, na presença do Losartan, foi observado a potencialização do efeito vaso relaxante promovido pela Ang-(1-7) ($E_{max} = 29 \pm 3\%$)

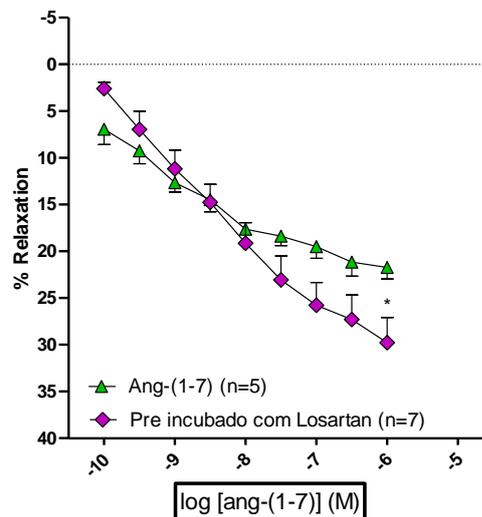


Figura 29: Efeito do Losartan pré-incubado, sobre a curva concentração resposta pra Ang-(1-7) em anéis de ratos SD). * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.6 Papel do receptor AT_1 no efeito promovido pela pré-incubação com Ang-(1-9).

Na presença do Losartan, a ação inibitória provocada pela pré-incubação com Ang-(1-9) no efeito vasorelaxante produzido por ela mesma foi revertido e o efeito vasorelaxante potencializado ($E_{max} = 27 \pm 6,3\%$) (**Fig. 30a**). Contudo, na curva para Alamandina o Losartan não alterou o efeito inibitório promovido pela pré-incubação com Ang-(1-9) ($E_{max} = 11 \pm 1,6\%$) (**Fig. 30b**), diferentemente da curva pra Ang-(1-7), na qual observamos que o Losartan, foi capaz de reverter o efeito inibitório promovido pela Ang-(1-9) ($E_{max} = 17 \pm 1,6\%$) (**Fig. 30c**).

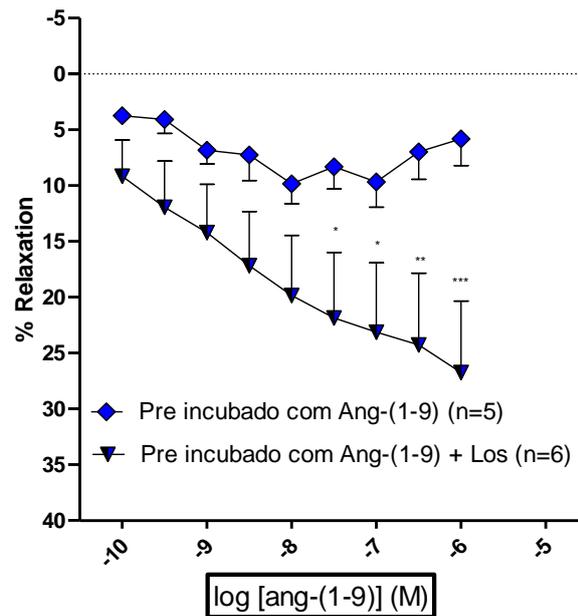
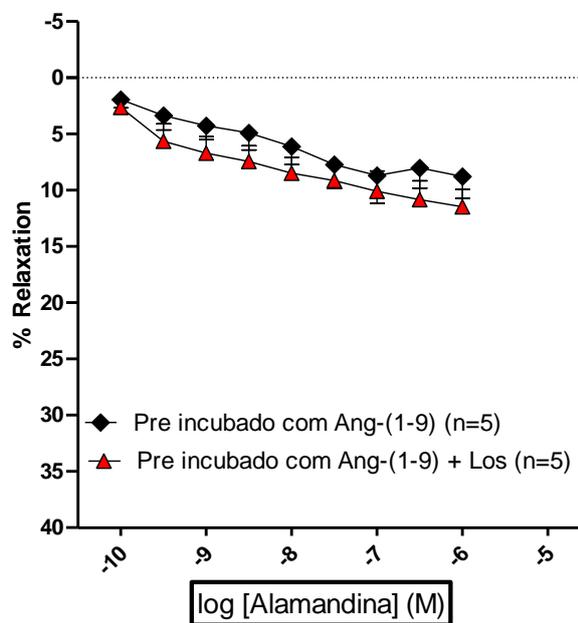
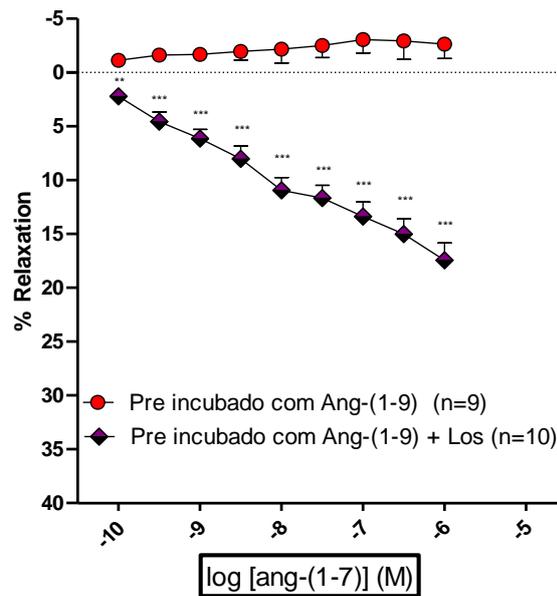


Figura 30 a) O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para **a)** Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



b) O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para Alamandina em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).



c) O Losartan no efeito promovido pela Ang-(1-9) pré-incubado na curva concentração resposta para Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

4.6.7. Papel do AT₁ no efeito promovido pela pré-incubação com Alamandina.

O Losartan, não foi capaz de reverter ou atenuar o efeito inibitório promovido pela pré-incubação com Alamandina no efeito vasorelaxante da Ang-(1-9) ($E_{max} = 13 \pm 2,6\%$) (Fig. 31).

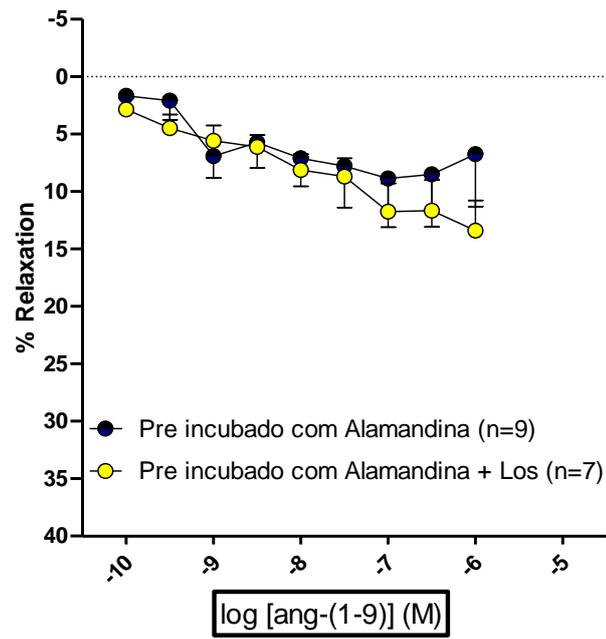


Figura 31

Losartan no efeito promovido pela Alamandina pré-incubada na curva concentração resposta pra Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Two-way ANOVA seguido do pós teste Bonferroni).

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos ações vasculares da angiotensina-(1-9), um peptídeo biologicamente ativo do SRA, formado a partir do decapeptídeo Ang I, através de peptidases, incluindo a carboxipeptidase A (CxA), catepsina A (CpA) e ECA2, (Ocaranza *et al.*, 2014a). Esse peptídeo possui nove resíduos de aminoácidos e tem como importante característica sua atividade vasodilatadora e anti-hipertrofica. (Ocaranza *et al.*, 2014a). Seu efeito vasorrelaxante foi mais uma vez evidenciado em nossos estudos, bem como a dependência endotelial e sua possível ação via liberação de NO.

Interessantemente, diferente do que até então vem sendo descrito na literatura, os resultados deste estudo sugerem que parte dos efeitos vasculares induzidos pela Ang-(1-9) podem ocorrer independente do receptor AT₂.(Ocaranza *at al* 2019). Além disso obtivemos evidências de que sua ação em anéis aorta também pode ocorrer independente dos receptores Mas e MrgD.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão do mecanismo de ação da Ang-(1-9). Nosso estudo demonstra resultados conflitantes com alguns trabalhos que atribuem suas ações exclusivamente via receptor AT₂. (Flores-Muñoz *et al.*, 2011, 2012; Ocaranza and Jalil, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b; 2019).

Em 2013 nosso grupo descreveu a formação e ações da Alamandina mostrando que o PD123 319, extensamente utilizado como antagonista seletivo do receptor AT₂, não é totalmente seletivo para esse receptor, podendo, por exemplo, interagir com o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Esses resultados nos levaram a investigar a participação de outros receptores na possível modulação dos efeitos

biológicos induzidos pela Ang-(1-9). Sendo assim, foi investigado a participação dos receptores angiotensinérgicos Mas e MrgD que, similarmente ao receptor AT₂, quando ativados apresentam efeitos antagonicos sobre a ativação da via clássica do SRA através do receptor AT₁, como vasodilatação, efeitos anti-hipertroóficos, anti-fibróticos, e anti-aritmogênicos, sendo portanto possíveis candidatos a receptor da Ang-(1-9) (Carey *et al.*, 2001; Ferreira and Santos, 2005; Lautner *et al.*, 2013); Ocaranza *et al.*; 2019).

Em 2012, Flores-Muñoz *et al.*, através de experimentos utilizando a técnica de reatividade vascular em anéis de aorta de ratos SHR-SP, demonstrou o efeito da Ang-(1-9) sobre a biodisponibilidade de NO. Foram realizadas curvas cumulativas concentração resposta com fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) e, interessantemente, o grupo de animais previamente tratados com Ang-(1-9) apresentou atenuação da vasoconstricção (Flores-Munoz *et al.*, 2012).

Mais recentemente, Ocaranza *et al.* (2014), observaram resposta vasodilatadora em outro experimento de reatividade vascular, através de curvas cumulativas concentração resposta com Ang-(1-9), em anéis de ratos SD pré contraídos com epinefrina (Ocaranza *et al.*, 2014b).

Esses resultados vêm de encontro com nosso trabalho, que também utilizando a metodologia de reatividade vascular, mostrou que a Ang-(1-9) promove efeito vasodilatador de forma concentração dependente em anéis de aorta de camundongos e ratos.

A vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) é endotélio dependente. No protocolo experimental em que os anéis de aorta foram previamente tratados com o L-NAME ou tiveram seu endotélio mecanicamente removido, a Ang-(1-9) teve seu efeito abolido,

sugerindo importante participação do NO como resposta ao estímulo do peptídeo (Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b). Esses resultados também foram observados em nossos experimentos.

Com o intuito de verificar a participação do receptor Mas no relaxamento vascular induzido pela Ang-(1-9), realizamos o antagonismo farmacológico desse receptor utilizando o D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A-779) (Santos *et al.*, 1994). Observamos atenuação parcial do relaxamento vascular induzido pela Ang-(1-9) quando os anéis de aorta foram pré-incubados com o A-779, a princípio sugerindo a participação do receptor Mas no efeito vascular da Ang-(1-9). Em contrapartida, em experimento semelhante feito por Ocaranza *et al.* (2014), o A-779 não alterou a resposta induzida pelo peptídeo. Deve-se ressaltar que esses autores, utilizaram concentrações mais baixas de A-779, o que pode explicar essas observações.

Em seguida, foi testado o protocolo experimental com D-Pro⁷-Ang-(1-7), antagonista dos receptores Mas e MrgD (Lautner *et al.*, 2013). De forma interessante, não foi observada nenhuma alteração no efeito da Ang-(1-9), o mesmo também foi observado com antagonismo específico do receptor Mas, o qual não apresentou resultados significativamente diferente do controle.

Ao avaliar a participação do receptor AT₂ na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) utilizando o PD123 319 que é comumente utilizado como antagonista seletivo desse receptor (Flores-Muñoz *et al.*, 2011; McKinney *et al.*, 2014; Ocaranza *et al.*, 2014b) foi observado que esse composto não foi capaz de bloquear o efeito vasodilatador da Ang-(1-9). Sendo assim, esse resultado, é contrário a outros dois trabalhos, nos quais o PD123319 reverteu a resposta induzida pela Ang-(1-9) em

experimento de reatividade vascular (Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b).

Com o intuito de confirmar os resultados anteriores foi realizado um protocolo experimental para avaliar a participação dos receptores AT₂, Mas e MrgD nos efeitos da Ang-(1-9), e surpreendentemente, considerando os dados existentes na literatura atual, observamos que a associação dos antagonistas D-Pro⁷-Ang-(1-7) e PD123319 não alterou o efeito da vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos.

Com objetivo de ratificar os resultados anteriores de antagonismo farmacológico, foram realizados experimentos utilizando animais geneticamente modificados, com deleção genética de receptores angiotensinérgicos. Interessantemente, o efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-9) foi significativamente reduzido nos anéis de aorta provenientes dos animais com deleção genética do receptor Mas, sugerindo dessa vez a possível participação do receptor Mas nos efeitos vasculares induzidos pela Ang-(1-9). Em contrapartida, em anéis de aorta de animais com deleção genética do receptor AT₂ não houve inibição do efeito da Ang-(1-9), o que confirmou nossos dados relacionados ao PD123319 e nos leva a sugerir que o receptor AT₂ não participa de forma direta da vasodilatação promovida pela Ang-(1-9).

Tendo em vista a similaridade dos efeitos vasoativos da Ang-(1-7), Alamandina e Ang-(1-9) e nossos dados sugerirem que o efeito vasorrelaxante da Ang-(1-9) pode ocorrer de forma independente dos receptores testados, levantamos a hipótese que os mesmos poderiam exercer efeito sinérgico e/ou cumulativo em anéis de aorta de ratos. Com esse intuito, construímos curvas concentração respostas para Ang-(1-9),

Alamandina e Ang-(1-7). Todas pré tratadas com Ang-(1-9) e surpreendente, observamos que a Ang-(1-9) atenuou os efeitos promovidos por ela mesma e pela Alamandina, além de reverter completamente o efeito vasorrelaxante induzido pela Ang-(1-7). Já quando a Alamandina ou Ang-(1-7) foi pré incubada na curva para Ang-(1-9) não observamos diferenças estatisticamente significativas.

Diante desses resultados surpreendentes, foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos pela inibição cruzada induzida pela Ang-(1-9). Para isso, inicialmente foi testado o possível envolvimento das prostaglandinas nesse efeito. Primeiramente analisamos o efeito da indometacina sobre as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7). E obtivemos resultados bem interessantes, no qual a presença da indometacina potencializou o efeito vasorrelaxante da Ang-(1-9) e atenuou o mesmo efeito para Alamandina, já para Ang-(1-7) não foi observado diferenças significativas, contudo quando pré incubamos a indometacina juntamente com a Ang-(1-9), não observamos diferenças entre as curvas concentração resposta para Ang-(1-9) e Alamandina. Contudo ela foi capaz de reverter completamente o efeito inibitório induzido pela Ang-(1-9) sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-7), além disso a indometacina também reverteu o efeito atenuante da Alamandina sobre a curva concentração resposta para Ang-(1-9).

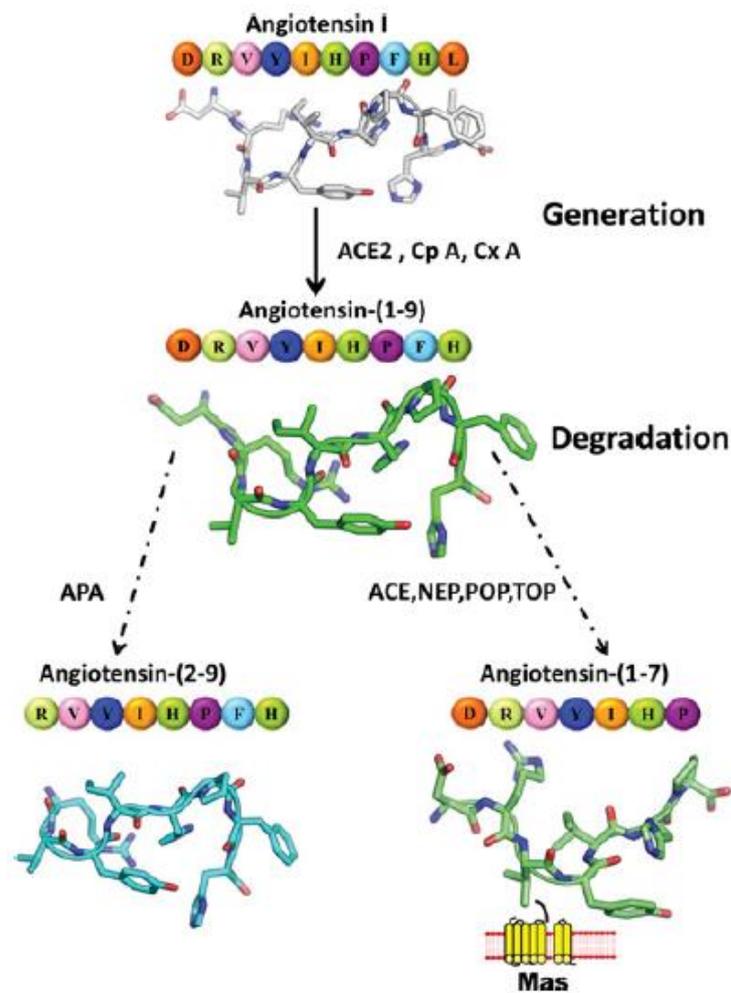
Ainda com intuito de testar a participação das cicloxigenase, utilizamos o ibuprofeno, primeiramente para as curvas concentração resposta para Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7). Foi observado que o ibuprofeno não altera de forma significativa o efeito induzido pela Ang-(1-9), entretanto o mesmo atenuou o efeito vaso relaxante da Alamandina e Ang-(1-7). Já para os grupos pré tratados com Ang-(1-9), a presença do ibuprofeno foi capaz de atenuar o efeito inibitório induzido sobre as curvas concentração resposta para Ang-(1-9) e Ang-(1-7), porém não foi observado

diferença estatística sobre o grupo da Alamandina a bem como para Alamandina pré incubada sobre a Ang-(1-9) na presença do ibuprofeno.

Também foi avaliado de forma mais específica a participação da COX-1, inicialmente testamos suas implicações sobre o efeito da Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7) através do SC 560, que não alterou o efeito vasorrelaxante induzido pela Ang-(1-9), porém atenuou o mesmo efeito para Alamandina e Ang-(1-7). Porém quando o SC 560 foi pré incubado juntamente com a Ang-(1-9) nas curvas concentração resposta para Ang-(1-9) e Alamandina não observamos diferença quando comparado com o não tratado com o antagonista. Esse inibidor, no entanto, atenuou o efeito inibitório induzido pela Ang-(1-9) sobre o efeito vasorrelaxante induzido pela Ang-(1-7).

Na sequência experimental, avaliamos também o possível envolvimento do receptor AT_1 na inibição cruzada induzida pela Ang-(1-9). Para isso seguindo os critérios do nosso protocolo experimental, avaliamos o efeito da Ang-(1-9), Alamandina e Ang-(1-7) na presença do Losartan. Foi observado que o antagonista seletivo para AT_1 atenuou o efeito vasorrelaxante induzido pela Ang-(1-9) e Alamandina, contudo o a Ang-(1-7) teve seu efeito potencializado na presença do losartan. Já para o efeito de inibição cruzada induzida pela Ang-(1-9) pré incubada, a presença do losartan surpreendentemente foi capaz de reverter completamente o efeito inibitório da Ang-(1-9) pré incubada com ela mesma, o que interessante também foi observado na curva para Ang-(1-7), no entanto a presença do losartan não alterou o efeito inibitório da Ang-(1-9) sobre o efeito vaso relaxante da almandina. Sugerindo extraordinária participação do receptor AT_1 no efeito inibitório induzido pela Ang-(1-9) pré incubada com ela mesma, assim como, quando pré incubada com na curva para Ang-(1-7).

Levando em consideração o eixo contra regulatório do SRA sabemos que a Ang-(1-7) pode ser formada por meio da ação da ECA, e como em nossos experimentos in vivo não utilizamos antagonistas de Mas, devemos considerar também a possibilidade do efeito anti-hipertensivo ser devido a degradação da Ang-(1-9) em Ang-(1-7) por via de alguma peptidase como por exemplo a ECA (Fig 17 e 18) (Keidar *et al.*, 2007; Ocaranza *et al.*, 2014a; Santos, 2014).



Cascata simplificada de formação da Ang- (1-9). Cascata simplificada de formação da Ang- (1-9). A seta contínua indica a formação da Ang- (1-9) a partir da Ang I via CxA, CPA ou através da atividade ECA2. A seta tracejada indica degradação, conversão de Ang- (1 9) em Ang- (2-9) pela APA ou em Ang- (1-7) pela ACE, NEP, POP ou TOP.

VI. CONCLUSÃO

Sumarizando, os resultados obtidos neste estudo confirmam, reforçam e estendem as evidências de ação da Ang-(1-9) no sistema vascular. Porém, diferente do que vem sendo descrito na literatura, mostramos através de métodos *ex vivo* que esse peptídeo não induz seus efeitos biológicos por interagir com o receptor AT₂. Além disso, também por meio desses experimentos excluimos sua ação via os outros dois receptores com mecanismo de ação cardiovascular similar, Mas e MrgD. Sendo assim podemos sugerir que a Ang-(1-9) no leito aórtico realiza suas ações através de outro receptor, ainda não identificado, que em algumas situações pode ser sensível ao bloqueio pelo PD1231

Com relação a interação entre Ang-(1-9) com Alamandina e Ang-(1-7), observamos que Ang-(1-9), atenua o efeito tanto da Ang-(1-7) quanto da alamandina. E essa interação parece envolver COX-1, COX-2 e direta ou indiretamente o receptores AT1.

VI. REFERÊNCIA

- AbdAlla, S., Lother, H., and Quitterer, U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94–98.
- Atlas, S.A. (1998). The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathway of angiotensin formation. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 65, 87–96.
- Atlas, S.A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm. JMCP* 13, 9–20.
- Berry, C., Touyz, R., Dominiczak, A.F., Webb, R.C., and Johns, D.G. (2001). Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H2337–2365.
- Braun-Menendez, E., and Page, I.H. (1958). Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science* 127, 242.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., and Munoz, J.M. (1940). The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98, 283–298.
- Britto, R.R., Santos, R.A., Fagundes-Moura, C.R., Khosla, M.C., and Campagnole-Santos, M.J. (1997). Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 30, 549–556.
- Carey, R.M., Jin, X.H., and Siragy, H.M. (2001). Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am. J. Hypertens.* 14, 98S–102S.
- Cheng, Z.J., Vapaatalo, H., and Mervaala, E. (2005). Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 11, RA194–205.
- Dampney, R. a. L., Coleman, M.J., Fontes, M. a. P., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y.W., Polson, J.W., Potts, P.D., and Tagawa, T. (2002). Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 261–268.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, E1–9.
- Esler, M. (2000). The sympathetic system and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 13, 99S–105S.
- Ferrario, C.M. (1990). Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. *Drugs* 39 Suppl 2, 1–8.

Ferreira, A.J., and Santos, R.A.S. (2005). Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI* 38, 499–507.

Flores-Munoz, M., Work, L.M., Douglas, K., Denby, L., Dominiczak, A.F., Graham, D., and Nicklin, S.A. (2012). Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension* 59, 300–307.

Flores-Muñoz, M., Smith, N.J., Haggerty, C., Milligan, G., and Nicklin, S.A. (2011). Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J. Physiol.* 589, 939–951.

Flores-Muñoz, M., Godinho, B.M.D.C., Almalik, A., and Nicklin, S.A. (2012). Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor. *PloS One* 7, e45564.

Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., and Summerville, W.W. (1934). STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *J. Exp. Med.* 59, 347–379.

Guimaraes, P.S., Santiago, N.M., Xavier, C.H., Velloso, E.P.P., Fontes, M.A.P., Santos, R.A.S., and Campagnole-Santos, M.J. (2012). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H393–400.

Hein, L. (1998). Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 76, 756–763.

Iyer, S.N., Averill, D.B., Chappell, M.C., Yamada, K., Allred, A.J., and Ferrario, C.M. (2000). Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension* 36, 417–422.

Johnson, H., Kourtis, S., Waters, J., and Drummer, O.H. (1989). Radioimmunoassay for immunoreactive [des-Leu10]-angiotensin I. *Peptides* 10, 489–492.

Keidar, S., Kaplan, M., and Gamliel-Lazarovich, A. (2007). ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7). *Cardiovasc. Res.* 73, 463–469.

Kim, S., and Iwao, H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* 52, 11–34.

Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., et al. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* 112, 1104–1111.

LENTZ, K.E., SKEGGS, L.T., Jr, WOODS, K.R., KAHN, J.R., and SHUMWAY, N.P. (1956). The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. *J. Exp. Med.* 104, 183–191.

Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., et al. (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121, 948–954.

Matrougui, K., Loufrani, L., Heymes, C., Lévy, B.I., and Henrion, D. (1999). Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension* 34, 659–665.

McKinney, C.A., Fattah, C., Loughrey, C.M., Milligan, G., and Nicklin, S.A. (2014). Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 126, 815–827.

Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., Berberich, C., Bunnemann, B., and Ganten, D. (1995). Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* 357, 27–32.

Ocaranza, M.P., and Jalil, J.E. (2012). Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int. J. Hypertens.* 2012, 594361.

Ocaranza, M.P., Michea, L., Chiong, M., Lagos, C.F., Lavandero, S., and Jalil, J.E. (2014a). Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1-9) in the cardiovascular system. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 127, 549–557.

Ocaranza, M.P., Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., Pinto, M., Escudero, N., García, L., Novoa, U., et al. (2014b). Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J. Hypertens.* 32, 771–783.

Ocaranza,MP; Riquelme,JA; Garcia, L; Jalil, JÁ; Chiong, M; Santos, RAS; Lavandero, S. (2019) Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*.

Page, I.H., and Helmer, O.M. (1940). A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *J. Exp. Med.* 71, 29–42.

Peach, M.J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 57, 313–370.

Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., et al. (2012). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125, 188–197.

Santos, R.A. (2014). Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 63, 1138–1147.

Santos, R.A., Greene, L.J., and Krieger, E.M. (1989). Changes in plasma ACE activity during the development and reversal of one-kidney, one clip hypertension in rats. *Clin. Exp. Hypertens. A*. 11, 189–203.

Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., Baracho, N.C., Fontes, M.A., Silva, L.C., Neves, L.A., Oliveira, D.R., Caligiorne, S.M., Rodrigues, A.R., and Gropen Júnior, C. (1994). Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res. Bull.* 35, 293–298.

Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., and Andrade, S.P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul. Pept.* 91, 45–62.

Santos, R.A.S., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., et al. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8258–8263.

Santos, R.A.S., Ferreira, A.J., Pinheiro, S.V.B., Sampaio, W.O., Touyz, R., and Campagnole-Santos, M.J. (2005). Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14, 1019–1031.

Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*98: 505–553

SKEGGS, L.T., Jr, MARSH, W.H., KAHN, J.R., and SHUMWAY, N.P. (1954). The existence of two forms of hypertensin. *J. Exp. Med.* 99, 275–282.

SKEGGS, L.T., Jr, KAHN, J.R., and SHUMWAY, N.P. (1956). The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103, 295–299.

Snyder, R.A., and Wintroub, B.U. (1986). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu¹⁰-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 871, 1–5.

Snyder, R.A., Watt, K.W., and Wintroub, B.U. (1985). A human platelet angiotensin I-processing system. Identification of components and inhibition of angiotensin-converting enzyme by product. *J. Biol. Chem.* 260, 7857–7860.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.(2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Oct 27;275(43):33238-43.*

Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., et al. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest. 104, 925–935.*

Turner, A.J., Tipnis, S.R., Guy, J.L., Rice, G., and Hooper, N.M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallocarboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol. 80, 346–353.*

Veerasingham, S.J., and Raizada, M.K. (2003). Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br. J. Pharmacol. 139, 191–202.*

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem. 277, 14838–14843.*

Walther, T., Wessel, N., Kang, N., Sander, A., Tschöpe, C., Malberg, H., Bader, M., and Voss, A. (2000). Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI 33, 1–9.*

Ye, M., Wysocki, J., Naaz, P., Salabat, M.R., LaPointe, M.S., and Battle, D. (2004). Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension 43, 1120–1125.*