



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

**EFEITOS DA DELEÇÃO DO RECEPTOR MAS NA  
FUNÇÃO CARDIOVASCULAR DE CAMUNDONGOS  
MACHOS E FÊMEAS**

**Fernanda Brandão Machado**

**Belo Horizonte**

**2015**

**FERNANDA BRANDÃO MACHADO**

**EFEITOS DA DELEÇÃO DO RECEPTOR MAS NA  
FUNÇÃO CARDIOVASCULAR DE CAMUNDONGOS  
MACHOS E FÊMEAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Departamento e Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

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

**Belo Horizonte**

**2015**

***Dedico esse trabalho aos meus pais  
Eduardo e Amelinha, à minha irmã Daniela  
e ao meu marido Ivan, pelo amor,  
dedicação e por serem imprescindíveis em  
minha vida.***

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por ter me dado saúde, amor, força e dedicação para a realização desse trabalho.

Aos professores Adelina Reis e Robson Santos, pelos ensinamentos, confiança e pelo exemplo de dedicação e comprometimento com a carreira acadêmica.

Ao professor Cândido pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Maurício e Patzak pela confiança, ensinamentos e oportunidades.

Ao Marcos, Walkyria, Kinulpe, Augustinho, Paula e Mihail pela amizade e pela disponibilidade de me ajudarem nos experimentos.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo (Luciana, Paula, Mauro, Laura, Juliana, Samuel, Daniel, Paulo, Henrique, Roberta, Nayara, Cristina, Fernandinha) pela amizade, e por tornarem meus dias muito mais alegres.

Aos amigos Analina, Fred, Carina, Daniela, Gleisy, Lucas e Helton pelos ensinamentos, amizade, cumplicidade e paciência.

Às amigas Anica, Zhizhao e Valéria por tornarem meus dias em Berlim ainda mais especiais.

À bioterista Luíza pela dedicação e por ser sempre tão gentil.

À minha família, avô, tios, primos e sobrinhos pelo carinho e incentivo.

Aos meus pais e minha irmã por dividirem comigo cada momento, me dando força e coragem. Agradeço pelo amor incondicional e pelos valores que me ensinaram.

Ao meu querido Luquinhas, o presente mais especial que já ganhei! Obrigada por iluminar meus dias, por tornar a minha vida ainda mais feliz e por me deixar ser um pouco sua mãe.

Ao meu amado Chaninho, agradeço pela cumplicidade, pelo carinho, pelo zelo, pelo incentivo e pela paciência, fundamentais para essa conquista. Obrigada por ter enfrentado comigo a distância, a saudade e os inúmeros desafios nesses quatro anos. Sou muito feliz por dividir com você os meus sonhos. Obrigada por ser meu exemplo de coragem, fé, dedicação e responsabilidade. Sua presença em minha vida faz de mim uma pessoa melhor.

***“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”***

Marcelo Camelo

## RESUMO

MACHADO, F. B. Efeitos da deleção do receptor Mas na função cardiovascular de camundongos machos e fêmeas

Fatores sexuais intrínsecos modulam o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) determinando menores valores de pressão arterial (PA) nas mulheres em idade fértil em relação aos homens. Diferenças sexuais semelhantes existem em roedores, nos quais as fêmeas são mais resistentes ao desenvolvimento de hipertensão. Essa proteção apresentada pelas fêmeas parece resultar de uma maior ativação do eixo vasodilatador do SRA, representado pela Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e o seu receptor específico, o receptor Mas. Entretanto, a contribuição do eixo Ang-(1-7)/Mas para a regulação fisiológica da PA em cada sexo ainda não é conhecida. Nesse sentido, avaliamos os efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função cardiovascular, e a resposta vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) em artérias renais de camundongos. Foram realizadas telemetria para medida da PA, ecocardiografia, medida da resistência periférica total (RPT), da resistência vascular (RV) e avaliação da função endotelial *in vivo* em camundongos machos e fêmeas FVB/N com deleção gênica do receptor Mas (Mas<sup>-/-</sup>) e *wild type* (Mas<sup>+/+</sup>). No coração desses animais foi avaliada a expressão de proteínas da matriz extracelular (ME) e dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. A ultraestrutura das artérias mesentéricas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Experimentos em vasos isolados avaliaram a resposta vasodilatadora *in vitro* induzida pela Ang-(1-7) em artérias interlobares renais de machos e fêmeas Mas<sup>+/+</sup>. Nesses mesmos vasos foi avaliada a expressão gênica de vários componentes do SRA por RT-PCR, bem como a expressão do receptor Mas por imuno-histoquímica. Surpreendentemente, a deleção gênica do receptor Mas provocou efeitos opostos sobre a PA nos dois sexos. As fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentaram diminuição da PA resultante de disfunção cardíaca e diminuição da RV em importantes órgãos como rins, fígado e pele. Por outro lado, nos machos Mas<sup>-/-</sup> foi observado aumento da PA associado a maior deposição de ME tanto no coração como na parede das artérias resultando em fibrose cardíaca, aumento da RPT e disfunção endotelial. A fibrose observada no coração dos machos Mas<sup>-/-</sup> resulta de maior expressão de AT<sub>1</sub> e ativação da via ERK1/2-MAP-quinase. Outros mecanismos parecem causar a disfunção cardíaca nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup>, visto que a expressão de AT<sub>1</sub> está diminuída no coração destas. As arteríolas renais de fêmeas Mas<sup>+/+</sup> apresentaram maior relaxamento induzido pela Ang-(1-7), esse efeito é mediado pelo receptor Mas e resulta de uma maior ativação da via óxido nítrico. Em geral, o eixo Ang-(1-7)/Mas modula tanto a função cardíaca como a RV, mostrando-se crítico para as diferenças sexuais sobre a PA de camundongos. Apesar de as fêmeas apresentarem maior resposta vasodilatadora à Ang-(1-7) *in vitro*, a deleção gênica do receptor Mas provocou efeitos mais acentuados sobre o sistema cardiovascular dos machos. Esses resultados refletem a importância do eixo Ang-(1-7)/Mas na busca por um tratamento mais específico da hipertensão em homens e mulheres. **Palavras chave:** Mas knockout, Angiotensina-(1-7), diferenças sexuais, pressão arterial, função cardiovascular.

## ABSTRACT

---

MACHADO, F. B. Effects of Mas deletion in cardiovascular function of male and female mice

Intrinsic sexual factors modulate the Renin Angiotensin System (RAS) determining lower blood pressure (BP) in women of reproductive age in comparison with men. Similar sex differences exist in rodents, in which females are more resistant to the development of hypertension. This protection found in females appears to be caused by a greater activation of the vasodilator axis of RAS, represented by Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] and its specific receptor, Mas. However, the real contribution of Ang-(1-7)/Mas for the physiological regulation of BP in each gender is not yet known. Therefore, we evaluated the effects of genetic Mas ablation on cardiovascular function, and the vasodilator effect of Ang-(1-7) in renal arteries of mice. BP of Mas-deficient (Mas<sup>-/-</sup>) and wild type (Mas<sup>+/+</sup>) mice was measured by telemetry. High-resolution echocardiography was performed and the Total peripheral resistance (TPR) and regional vascular resistance (VR) were measured by fluorescent microsphere infusion. The cardiac expression of extracellular matrix (EM) proteins, AT1 and AT2 receptors were assessed by western blotting. We also evaluated endothelial function in vivo and the ultrastructure of mesenteric artery by electron microscopy. The in vitro vasodilator response induced by Ang-(1-7) were assessed in renal interlobar arteries of male and female Mas<sup>+/+</sup> mice using a small vessel myograph. The gene expression of RAS components was assessed by RT-PCR and the Mas receptor expression by immunohistochemistry in renal vessels. Surprisingly, genetic Mas ablation caused opposite effects in BP of male (hypertension) and female (hypotension) mice. Decreased BP in female Mas<sup>-/-</sup> resulted from cardiac dysfunction and decreased RV in important organs such as kidneys, liver and skin. On the other hand, the increased BP found in males Mas<sup>-/-</sup> resulted from an increased deposition of EM in both, heart and arterial wall resulting in cardiac fibrosis, increased TPR and endothelial dysfunction. The fibrosis observed in the hearts of male Mas<sup>-/-</sup> resulted from higher expression of AT1 and increased activation of the ERK1/2 MAP kinase pathway. Other mechanisms appear to cause cardiac dysfunction in females Mas<sup>-/-</sup> since AT1 expression is reduced in their heart. Renal vessels from female mice presented increased Ang-(1-7) relaxation response, this effect was mediated by receptor Mas and resulted from higher NO bioavailability. Altogether, our data showed Ang-(1-7)/Mas modulates cardiac function and VR, supporting a critical role of this axis in sex-related differences in BP regulation. Although females show higher vasodilator response to Ang-(1-7) in vitro, genetic Mas ablation caused clearer effects on the cardiovascular system of male mice. These results reflect the importance of Ang-(1-7)/Mas for future therapeutic strategies for treating hypertension tailored according to the sex. **Key words: Mas-knockout, Angiotensin-(1-7), sex-difference, blood pressure, cardiovascular function.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Ach: acetilcolina

Ang II: Angiotensina II

Ang-(1-7): Angiotensina 1-7

AT1: Receptor para angiotensina II tipo 1

AT2: Receptor para angiotensina II tipo 2

CDR: curva dose-resposta

DCV: Doenças cardiovasculares

ECA 2: Enzima conversora de angiotensina tipo II

ECA: Enzima conversora de angiotensina

eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial

HA: Hipertensão arterial

LVIDd: dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole

LVIDs: dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole

Mas: Receptor Mas

Mas<sup>+/+</sup>: Camundongo selvagem, *wild type*

Mas<sup>-/-</sup>: Camundongo com deleção gênica do receptor Mas, *Mas-Knockout*

ME: Matriz extracelular

MrgD: receptor D da família dos receptores ligados à proteína G semelhantes ao

Mas

NEP: Endopeptidase neutra

NO: Óxido nítrico

PA: Pressão arterial

RPT: Resistência Periférica Total

RV: Resistência Vascular

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SNP: Nitroprussiato de sódio

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1:</b> VISÃO ATUAL DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA. ....	28
<b>FIGURA 2:</b> INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS GONADAIS E CROMOSSOMOS SEXUAIS (XX E XY) SOBRE O BALANÇO VASOCONSTRICTOR/VASODILATADOR DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA). ....	36
<b>FIGURA 3:</b> PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE CAMUNDONGOS FVB/N MACHOS E FÊMEAS MAS <sup>-/-</sup> .....	61
<b>FIGURA 4:</b> MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) POR TELEMETRIA EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS MAS <sup>-/-</sup> E MAS <sup>+/+</sup> NÃO ANESTESIADOS. ....	62
<b>FIGURA 5:</b> REPRESENTAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA (MODO M) DA CONTRAÇÃO CARDÍACA.....	66
<b>FIGURA 6:</b> ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS FEITA POR WESTERN BLOTTING. ....	68
<b>FIGURA 7:</b> ANÁLISE DA EXPRESSÃO CARDÍACA DE RECEPTORS AT1 E AT2 FEITA POR WESTERN BLOTTING... ..	69
<b>FIGURA 8:</b> PARÂMETROS HEMODINÂMICOS OBTIDOS EM CAMUNDONGOS MAS <sup>-/-</sup> ANESTESIADOS. ....	71
<b>FIGURA 9:</b> RESISTÊNCIA VASCULAR REGIONAL EM DIFERENTES ÓRGÃOS E TECIDOS DE CAMUNDONGOS MAS <sup>-/-</sup> ANESTESIADOS. ....	73
<b>FIGURA 10:</b> FUNÇÃO ENDOTELIAL EM MACHOS E FÊMEAS MAS <sup>-/-</sup> NÃO ANESTESIADOS. ....	76
<b>FIGURA 11:</b> FOTOMICROGRAFIA DA PAREDE DA ARTÉRIA MESENTÉRICA.....	78
<b>FIGURA 12:</b> ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PAREDE DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DE CAMUNDONGOS MAS <sup>-/-</sup> . .....	79
<b>FIGURA 13:</b> CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANG-(1-7) EM ARTÉRIA INTERLOBAR RENAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS. ....	81
<b>FIGURA 14:</b> CURVA DOSE-RESPOSTA DA ACETILCOLINA (ACH) EM ARTÉRIA INTERLOBAR RENAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS.....	82
<b>FIGURA 15:</b> CURVA DOSE-RESPOSTA DE NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (SNP) EM ARTÉRIA INTERLOBAR RENAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS. ....	83
<b>FIGURA 16:</b> CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANG-(1-7) EM ARTÉRIA INTERLOBAR RENAL DE CAMUNDONGOS MACHOS (ESQUERDA) E FÊMEAS (DIREITA). ....	85
<b>FIGURA 17:</b> EXPRESSÃO DE RNAM DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) POR PCR EM TEMPO REAL NA ARTÉRIA INTERLOBAR RENAL DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS. ....	87
<b>FIGURA 18:</b> MARCAÇÃO DO RECEPTOR MAS PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA EM ARTÉRIAS RENAIS DE CAMUNDONGOS.....	88
<b>FIGURA 19:</b> CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE NITRITO EM CAMUNDONGOS FVB/N MACHOS E FÊMEAS.....	89

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA.	55
TABELA 2: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS OBTIDOS EM MACHOS E FÊMEAS MAS <sup>-/-</sup>	64
TABELA 3: PARÂMETROS HEMODINÂMICOS EM CAMUNDONGOS MAS <sup>-/-</sup>	71
TABELA 4: FLUXO SANGUÍNEO REGIONAL EM CAMUNDONGOS MAS <sup>-/-</sup>	74

## SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Justificativa.....	19
1.2 Revisão Bibliográfica.....	23
2. HIPÓTESE.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Animais.....	46
4.2 Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda.....	46
4.3 Medida das variações circadianas na pressão arterial por telemetria.....	47
4.4 Ecocardiografia.....	47
4.5 Avaliação de expressão cardíaca de proteínas da matriz extracelular e de receptores AT1 e AT2 por Western Blot.....	49
4.6 Medida da resistência periférica total pela injeção de microesferas fluorescentes.....	50
4.7 Avaliação da função endotelial in vivo.....	51
4.8 Análise da ultraestrutura dos vasos de resistência por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	52
4.9 Preparação das artérias interlobares renais para reatividade vascular in vitro.....	53
4.10 Avaliação do efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na artéria interlobar renal de camundongos.....	54
4.11 PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real para avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA na artéria interlobar renal.....	54
4.12 Imuno-histoquímica para avaliar a expressão do receptor Mas nas artérias interlobares renais.....	55
4.13 Medida indireta da produção de Óxido Nítrico (NO) pela dosagem da concentração urinária de nitrito.....	57
4.14 Análise Estatística.....	57
5. RESULTADOS.....	60
5.1 Parte 1: Efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função cardiovascular em machos e fêmeas.....	60
5.2 Parte 2: Diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).....	80
6. DISCUSSÃO.....	91
7. RESUMO DOS RESULTADOS.....	101

7.1 PARTE 1: Efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função cardiovascular de camundongos machos e fêmeas.....	101
7.2 PARTE 2: Diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal de camundongos .....	102
8. CONCLUSÃO.....	104
9. FINANCIAMENTO.....	105
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Justificativa

Evidências epidemiológicas sugerem a participação de determinantes sexuais sobre a incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (ROSENTHAL; OPARIL, 2000). Assim, os homens tipicamente apresentam valores mais altos de pressão arterial (PA) e desenvolvem DCV mais cedo em relação às mulheres. Porém, após a menopausa, as mulheres passam a apresentar maior prevalência de casos de hipertensão arterial (HA) em relação aos homens de mesma idade (LIMA; WOFFORD; RECKELHOFF, 2012). Condições semelhantes podem ser observadas em modelos experimentais como ratos e camundongos, em que machos jovens possuem valores basais elevados de PA e são mais propensos a desenvolverem HA em relação às fêmeas (TATCHUMTALOM; EYSTER; MARTIN, 2005; XUE *et al.*, 2013). As diferenças sexuais na PA refletem complexas interações entre os cromossomos sexuais, hormônios gonadais e sistemas críticos para a regulação da PA como o Sistema Renina Angiotensina (SRA) (FISCHER; BAESSLER; SCHUNKERT, 2002).

Variações específicas na atividade do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) em homens e mulheres determinam diferenças na evolução e no tratamento da HA. Atualmente sabe-se que a eficácia terapêutica dos anti-hipertensivos é reduzida em mulheres e que estas apresentam maior incidência de efeitos adversos. Apesar dessas evidências, a escolha dos medicamentos para o tratamento da HA ainda se baseia em estudos clínicos realizados predominantemente em homens, utilizando-se fármacos testados predominantemente em animais machos (“Multiple risk factor intervention trial. Risk factor changes and mortality results. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group”, 1982; SAMAD *et al.*, 2008). Dessa maneira,

destaca-se a necessidade de se compreender melhor a influência dos fatores sexuais intrínsecos sobre os componentes do SRA e conseqüente regulação da PA.

Basicamente a formação dos peptídeos angiotensinérgicos ocorre pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina originando o decapeptídeo angiotensina I que, por sua vez, sofre ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) formando a angiotensina II (Ang II). O octapeptídeo Ang II, por sua vez, pode originar outros peptídeos menores como a angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] com efeitos biológicos importantes sobre o sistema cardiovascular (CHAPPELL, MARK C. *et al.*, 2004; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2006). A Ang II é considerada o agente efetor clássico do SRA, a qual, ligando-se ao Receptor para Angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>), promove vasoconstrição, aumento da formação de espécies reativas de oxigênios, aumento da reabsorção de sódio e conseqüente elevação da PA (BREWSTER; PERAZELLA, 2004; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). A Ang-(1-7), por sua vez, exerce efeitos contra-regulatórios sobre as ações da Ang II ligando-se a um receptor específico acoplado a proteína G, o receptor Mas (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003). O heptapeptídeo Ang-(1-7) é parte da via “não-clássica” do SRA, sendo formado a partir da Ang II por ação da enzima conversora de angiotensina tipo II (ECA 2). Dentre suas principais ações, a Ang-(1-7) causa vasodilatação, inibição da proliferação celular, aumento do fluxo renal e cardioproteção (BROSNIHAN, K B *et al.*, 1998).

Estudos sugerem que os determinantes sexuais possam modular os eixos regulatórios e contra-regulatórios do SRA. Acredita-se que o estradiol e o par cromossômico XX favoreçam a formação da Ang-(1-7) em detrimento à Ang II, resultando nos valores de PA mais baixos encontrados nas mulheres antes da menopausa (BHATIA; ZIMMERMAN; SULLIVAN, 2013; BROSNIHAN, K. BRIDGET *et al.*, 1997; PENDERGRASS *et al.*, 2008). Em contrapartida, a testosterona e o gene *Sry*

localizado no cromossomo Y estimulam a ativação do receptor  $AT_1$  pela Ang II, determinando o perfil hipertensivo encontrado nos machos (ARNOLD, 2009; JI *et al.*, 2010). Assim, o eixo vasodilatador ECA 2/Ang-(1-7)/Mas parece estar mais ativo nas fêmeas, enquanto nos machos, predomina a ativação do eixo vasoconstrictor ECA/Ang II/ $AT_1$  (EATMAN *et al.*, 2001; HILLIARD *et al.*, 2013; SULLIVAN, 2008).

Apesar das evidências acerca da modulação diferencial do SRA nos dois sexos, o tratamento farmacológico da HA pouco evoluiu na busca por uma individualização considerando as peculiaridades inerentes aos homens e mulheres em suas diferentes etapas evolutivas (juventude, senescência, menopausa, gravidez, etc). Atualmente, grande parte da terapia anti-hipertensiva se baseia no bloqueio dos efeitos mediados pela Ang II (BADER, 2010). Com essa finalidade são prescritos inibidores da ECA, bloqueadores do receptor  $AT_1$ , e inibidores diretos de renina, sendo que na maioria dos casos esses fármacos são utilizados em associações com diuréticos, betabloqueadores e antagonistas dos canais de cálcio. Essa estratégia farmacológica reduz a incidência de infarto, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca, mas essa terapêutica é muito mais eficaz para homens do que para mulheres (SAMAD *et al.*, 2008; WILKINS; GEE; CAMPBELL, 2012).

Estudos farmacológicos recentes exploram o efeito anti-hipertensivo da Ang-(1-7) por meio de estratégias que aumentem a ativação da ECA 2 e/ou a ativação direta do receptor Mas (FERREIRA, ANDERSON J.; BADER; SANTOS, 2012; HERNÁNDEZ PRADA *et al.*, 2008). Assim, em ratos, o tratamento com Ang-(1-7) atenuou a insuficiência cardíaca e o remodelamento cardíaco induzidos por isoproterenol (MARQUES *et al.*, 2012) e o agonista não peptídico do receptor Mas, o AVE 0991 apresentou efeitos vasodilatadores e hipotensores (WIEMER *et al.*, 2002).

Trabalhos utilizando modelos experimentais demonstram que as fêmeas apresentam maior ativação do eixo ECA 2/Ang-(1-7)/Mas em relação aos machos,

especialmente em situações que envolvam um desequilíbrio nos componentes do SRA como durante a HA e a gestação (BHATIA; ZIMMERMAN; SULLIVAN, 2013; EATMAN *et al.*, 2001; NEVES, L. A. A.; WILLIAMS; *et al.*, 2003; SULLIVAN, 2008; SULLIVAN *et al.*, 2010; VALDÉS *et al.*, 2001; ZIMMERMAN; HARRIS; SULLIVAN, 2014). Nesse contexto, novas formulação que ativem as vias reguladas pela Ang-(1-7) surgem como uma estratégia eficaz e mais específica para o tratamento da HA em mulheres (FERREIRA, ANDERSON J.; BADER; SANTOS, 2012).

Os rins são fundamentais para o controle da PA garantindo o equilíbrio hidroeletrolítico. E, vários estudos revelaram que as fêmeas apresentam uma relativa proteção contra a incidência e progressão de doenças renais (GANDOLFO *et al.*, 2004; NEUGARTEN; ACHARYA; SILBIGER, 2000; SILBIGER; NEUGARTEN, 2003). Essa proteção renal existente nas fêmeas está associada a maior ativação do eixo vasodilatador do SRA (SAMPSON; MORITZ; DENTON, 2012; SAMPSON *et al.*, 2008; SULLIVAN *et al.*, 2010). O tônus vascular das artérias renais é um fator de grande importância para o controle da perfusão renal, e é modulado principalmente pelo SRA. Nesse sentido, a resistência nas artérias interlobares renais influencia diretamente a PA (DERCHI *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a contração induzida pela Ang II em artérias interlobares de camundongos é menor nas fêmeas (VIEGAS *et al.*, 2012). Tendo em vista o papel da Ang-(1-7) como um antagonista fisiológico dos efeitos da Ang II, acreditamos que a avaliação da resposta vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) em artérias interlobares renais seja importante para compreensão sobre as diferenças sexuais na PA.

Em paralelo, reafirma-se a necessidade de se conhecer melhor o papel fisiológico da Ang-(1-7) e do seu receptor Mas no sistema cardiovascular de machos e fêmeas. Camundongos com deleção gênica do receptor Mas (*Mas knockout*,  $Mas^{-/-}$ ), tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo do eixo vasodilatador do SRA

(WALTHER, THOMAS *et al.*, 1998). Os camundongos machos Mas<sup>-/-</sup> apresentam disfunção cardíaca e endotelial e elevação da PA, mas pouco se sabe sobre o fenótipo cardiovascular das fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e conseqüentemente, sobre a contribuição fisiológica específica do receptor Mas no sexo feminino (PEIRÓ *et al.*, 2007; RABELO *et al.*, 2008; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2008b). Nesse contexto, o presente estudo avaliou as alterações cardiovasculares provocadas pela deleção gênica do receptor Mas e o conseqüente efeito sobre a PA, bem como o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em vasos renais de camundongos machos e fêmeas.

## **1.2 Revisão Bibliográfica**

### **1.2.1 Hipertensão Arterial (HA) e doenças cardiovasculares (DCV) em homens e mulheres: Epidemiologia, sintomas e fatores de risco**

A HA caracteriza-se por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (>140/90 mmHg) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). De origem multifatorial, a HA associa-se a disfunções nos sistemas cardíaco, vascular, renal, nervoso e endócrino, surgindo como principal fator de risco para DCV. Em nosso país, as DCV são as principais causas de morte, totalizando cerca de 30% dos óbitos em homens e mulheres com mais de 30 anos de idade (MANSUR; FAVARATO, 2012). Dentre as DCV mais comumente associadas à HA merecem destaque as doenças coronarianas, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca, devido à sua severidade e alta letalidade. Estudos epidemiológicos revelam que na população brasileira entre 60 e 65 anos a prevalência de HA é superior a 50%, alcançando 75% após os 70 anos de idade (CESARINO *et al.*, 2008; PINHO; PIERIN, 2013; ROSÁRIO *et al.*, 2009). Em conseqüência, as complicações associadas à HA

são responsáveis por uma alta frequência de internações hospitalares, gerando um elevado custo socioeconômico. Nesse contexto, a detecção, o tratamento e controle da HA assumem um papel prioritário no âmbito da Atenção Primária à Saúde.

Até os 50 anos de idade, a prevalência de HA é superior entre os homens mas nos anos subsequentes essa prevalência se inverte. Após a menopausa, as mulheres passam a apresentar maior número de casos de HA em relação aos homens de mesma faixa etária (LESSA, 2001; RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004; ROSENTHAL; OPARIL, 2000). No ano de 2012, o Sistema de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos do Ministério da Saúde uma taxa de internação decorrente de doenças hipertensivas de 6,85 para mulheres e 4,96 (número de internações por 100.000 habitantes) para homens (Ministério da Saúde/SE/Datasus). Dados recentes mostram que na população brasileira em geral a HA atinge maior percentual de mulheres (26,9%) do que de homens (21,3%) (Ministério da Saúde/SE/Datasus, 2013).

Estudos mostram que a incidência de fatores de risco para hipertensão é maior entre mulheres em relação aos homens. Dentre os fatores de risco mais comumente encontrados no sexo feminino destacam-se obesidade, envelhecimento (especificamente o período pós-menopausa), colesterol total elevado, diminuição na concentração plasmática de lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL) e ausência de monitoramento da pressão arterial pelo médico por mais de seis meses (ONG *et al.*, 2008). Estima-se que no ano de 2015 haverá aproximadamente 2,3 bilhões de indivíduos com sobrepeso e dentre estes uma média de 700 milhões de homens e mulheres se tornarão obesos (NGUYEN; EL-SERAG, 2010). Mulheres com obesidade classe I (índice de massa corporal, IMC, entre 30-35 Kg/m<sup>2</sup>) possuem 04 vezes mais chance de se tornarem hipertensas em comparação com mulheres não

obesas, e, para um IMC maior que 35 Kg/m<sup>2</sup> (obesidade classe II) essa chance aumenta para 6 vezes (BATEMAN *et al.*, 2012).

O uso de contraceptivos orais por período igual ou superior a 6 anos aumenta o risco de desenvolvimento de HA. Essas evidências destacam a necessidade de cautela por parte dos médicos ao prescreverem contraceptivos para mulheres hipertensas ou com histórico familiar da doença e a Organização Mundial de Saúde contraindica a prescrição em casos de pressão arterial maior que 160/100 mmHg (BATEMAN *et al.*, 2012).

Estudos referentes aos efeitos da terapia de reposição hormonal sobre a pressão arterial de mulheres na pós-menopausa são contraditórios. Em 2002 foram publicados os resultados do "Women's Health Initiative" (WHI), que avaliou mais de 17.000 mulheres com idade média de 63 anos. Esse estudo mostrou aumento de 25% no risco de HA em mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal, contrariando trabalhos com modelos experimentais e estudos *in vitro* que demonstravam um claro efeito cardioprotetor mediado pelo estradiol (ROSSOUW *et al.*, 2002). As contradições sobre os benefícios da reposição de estrogênio decorrem das inúmeras variáveis associadas a esse tipo de tratamento, entre elas podemos citar: a formulação estrogênica usada, a dose, a via de administração, associação com progestinas, e principalmente, a duração e o tempo decorrido entre a entrada na menopausa e o início do tratamento. O uso de 17 $\beta$ -estradiol por via transdérmica, por exemplo, reduz em aproximadamente quatro vezes, o risco de desenvolvimento de doenças tromboembolísticas em relação à administração oral desse hormônio (VONGPATANASIN *et al.*, 2001). Efeitos benéficos também foram relatados em estudos nos quais a TRH teve início no período perimenopausa, por evitar a formação da maioria das placas de ateroma (SCHUNKERT *et al.*, 1997).

Estudos recentes destacam a existência de diferenças relativas ao gênero sobre os sintomas prodrômicos associados às principais DCV. Por exemplo, mulheres com Síndrome Coronariana Aguda podem apresentar fadiga, insuficiência respiratória, dispneia, dores no queixo e nas costas, palpitação, tosse, náuseas, vômitos e indigestão (BAHR *et al.*, 2001). Esses sintomas atípicos diferem muito dos sintomas clássicos presentes na literatura, como dor no peito, que em sua maioria foram descritos a partir de estudos realizados apenas com indivíduos do sexo masculino. Dessa maneira, complicações decorrentes de diagnóstico e tratamento tardios das DCV tornam-se mais comuns entre mulheres (DEVON; ZERWIC, 2002). Esses dados demonstram a necessidade de novos trabalhos que abordem as disparidades referentes à manifestação das DCV entre os gêneros.

## **1.2.2 O Sistema Renina-Angiotensina (SRA)**

### **1.2.2.1 Visão Clássica do Sistema Renina-Angiotensina**

O SRA possui importante papel na regulação da pressão sanguínea, no controle do balanço hidroeletrolítico, no metabolismo intermediário e na hemodinâmica regional de órgãos, como coração, vasos sanguíneos e rins. Além disso, o SRA está fortemente associado à patogênese da HA e outras DCV (ARDAILLOU; MICHEL, 1999). Em consequência, o SRA vem sendo extensivamente estudado desde o século XX e ainda recentemente novas enzimas, peptídeos e receptores vêm sendo descobertos, ampliando assim o conhecimento de suas vias e mecanismos de ação.

Inicialmente acreditava-se que o SRA atuava apenas a nível humoral, através das substâncias lançadas na corrente sanguínea. Dentre essas substâncias, a Ang II apresentava-se como principal efetora sendo formada a partir da clivagem do angiotensinogênio pela renina originando o decapeptídeo Ang I que por sua vez sofre

ação da ECA formando a Ang II. O octapeptídeo Ang II ao ser liberado no sangue segue então para órgãos como rins, coração e vasos sanguíneos onde se liga ao receptor  $AT_1$  desencadeando seus efeitos hipertensivos clássicos (HORIUCHI; IWANAMI; MOGI, 2012). A ativação do receptor  $AT_1$  pela Ang II promove vasoconstrição, estimula a síntese e secreção de aldosterona e a reabsorção tubular de sódio. No cérebro a Ang II modula o controle central da pressão arterial, a atividade simpática, o apetite pelo sal e a sede (MCKINLEY *et al.*, 2001).

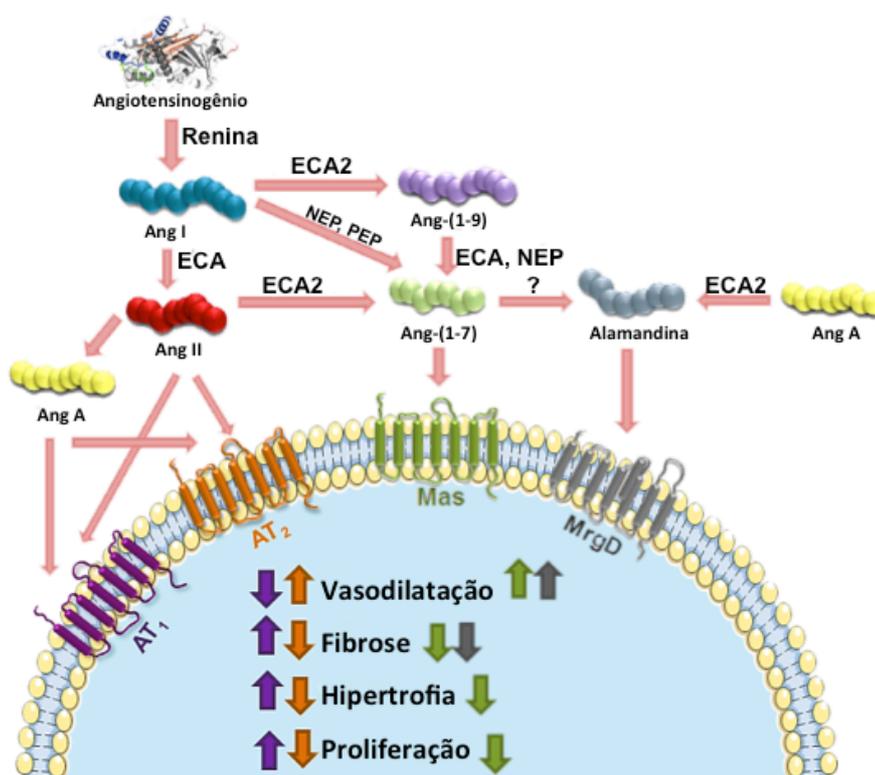
Além do  $AT_1$ , a Ang II pode se ligar a receptores do subtipo  $AT_2$  desencadeando efeitos biológicos específicos, os quais, em diversas situações, se opõem aos efeitos mediados pela ativação de  $AT_1$ . Nos rins, por exemplo, o receptor  $AT_2$  medeia ações contra-regulatórias sobre a natriurese e regulação da pressão sanguínea (GALLINAT *et al.*, 2000). Além do papel modulador exercido pelo  $AT_2$  sobre o efeito hipertensivo induzido pela Ang II, a ativação desse receptor é aumentada em processos patológicos. No sistema cardiovascular o papel do receptor  $AT_2$  é controverso, sendo que alguns trabalhos sugerem que sua ativação possa induzir a fibrose. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que fatores regulatórios tanto extra quanto intracelulares regulem a expressão várias células e tecidos. Assim, as ações mediadas pelo receptor  $AT_2$  podem tanto favorecer o equilíbrio fisiológico quanto estar envolvidas na gênese de patologias (GALLINAT *et al.*, 2000).

### **1.2.2.2 Visão atual do Sistema Renina-Angiotensina**

Com os avanços na área, estudos demonstraram que o SRA humoral atua em conjunto com o SRA descrito como tecidual, que é capaz de produzir localmente praticamente todos os componentes do SRA. Assim, as ações desencadeadas pelo SRA são ampliadas por meio dos precursores, peptídeos, enzimas e receptores produzidos em diversos tecidos como sistema nervoso central, tecido adiposo,

músculos, rins, adrenais, fígado, coração, vasos sanguíneos e gônadas. Além da formação local, os componentes circulantes do SRA podem ser capturados pelos tecidos ilustrando a complexa regulação fisiológica característica do SRA (BADER, 2010).

Outro grande avanço no conhecimento do SRA foi alcançado com a identificação de outros peptídeos biologicamente ativos além da Ang II, bem como novos receptores e vias enzimáticas redundantes. Através dessas vias a Ang I e Ang II podem sofrer biotransformação, originando peptídeos menores com atividade fisiológica como a Angiotensina III, Angiotensina IV e Ang-(1-7) como mostra a Fig.1 (DELL'ITALIA; FERRARIO, 2013; ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014).



**Figura 1:** Visão atual dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina. As setas apontadas para cima indicam aumento e as setas apontadas para baixo indicam diminuição. Ang A, angiotensina A; ECA, enzima conversora de Angiotensina; ECA 2, enzima conversora de Angiotensina tipo 2; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; AT<sub>1</sub>, receptor de angiotensina tipo 1; AT<sub>2</sub>, receptor de angiotensina

tipo 2; Mas, receptor para Ang-(1-7); MrgD, receptor D da família dos receptores ligados à proteína G semelhantes ao Mas (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014).

Em 1988 foi verificada alta atividade da ECA em regiões monoaminérgicas no tronco encefálico e medula espinhal de cães. O homogenato desses tecidos revelou que a Ang-(1-7) era o principal produto do metabolismo *in vitro* da Ang I tanto na ausência como na presença de inibidores da ECA (SANTOS, R. A. *et al.*, 1988). As características peculiares da Ang-(1-7) ganharam importância a partir da constatação do seu efeito hipotensor quando injetada em pequenas doses no núcleo do trato solitário de ratos (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). A partir de então, a descoberta dos novos componentes do SRA, tais como a ECA 2 e o receptor de renina, promoveu uma mudança da visão clássica desse sistema (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003).

Além da ECA 2, várias outras enzimas podem formar a Ang-(1-7), como endopeptidase neutra (NEP), prolil-endopeptidase (PEP) e prolil-carboxipeptidase (PCP). Essa característica torna-se importante na medida em que a formação da Ang-(1-7) ocorre em paralelo à destruição da Ang II, conferindo um caráter anti-hipertensivo a essa via (SANTOS, R. A. S.; FERREIRA; SIMÕES E SILVA, 2008). De forma geral, a Ang-(1-7) apresenta ações contrárias às exercidas pela Ang II, aumentando a secreção de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO) e fortalecendo o efeito vasodilatador mediado pela bradicinina (BROSNIHAN, K B *et al.*, 1999).

Estudos utilizando o A-779, um antagonista seletivo da Ang-(1-7) indicaram a existência de um receptor para a Ang-(1-7), distinto dos receptores clássicos para a Ang II, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (SANTOS, R A; CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994). A partir de então, estudos mais aprofundados realizados por Santos e colaboradores demonstraram que

as ações vasodilatadoras, natriuréticas e fibrinolíticas mediadas pela Ang-(1-7) seriam iniciadas a partir da ligação desse peptídeo ao seu receptor específico, o receptor Mas (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003). O gene que origina o receptor Mas, descrito inicialmente como um protooncogene, codifica um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembrânicos (YOUNG *et al.*, 1986; ZOHN *et al.*, 1998). Em mamíferos, o Mas é expresso predominantemente nos testículos, sendo encontrado também no cérebro, rins, coração, vasos sanguíneos, tecido adiposo e ovários (BUNNEMANN *et al.*, 1990; METZGER *et al.*, 1995; PEREIRA *et al.*, 2009; SANTOS, R. A. S.; FERREIRA; SIMÕES E SILVA, 2008; VAZ-SILVA, J. *et al.*, 2012).

A ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas ativa uma via de sinalização dependente da proteína Akt (também chamada proteína quinase B) que, dentre outras ações, aumenta a liberação de óxido nítrico (NO) endotelial (SAMPAIO, WALKYRIA OLIVEIRA *et al.*, 2007). Todavia, outros mecanismos como o aumento da produção de ácido araquidônico (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003), bem como a potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina, podem estar envolvidos nos efeitos finais da Ang-(1-7) (FERNANDES *et al.*, 2005).

Numa visão, geral o SRA pode ser dividido em dois eixos principais com ações antagônicas sobre o sistema cardiovascular. O primeiro, o eixo ECA/Ang II/AT<sub>1</sub> está envolvido nas ações clássicas desencadeadas pela Ang II como vasoconstrição, proliferação, inflamação, aumento do estresse oxidativo, trombogênese e fibrose (SANTOS, ROBSON AUGUSTO, 2014; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). O segundo, o eixo ECA 2/Ang-(1-7)/Mas, é responsável pelas ações contrarregulatórias mediadas pela Ang-(1-7) como efeito antiproliferativo e vasodilatador (BROSNIHAN, K B *et al.*, 1998; SAMPAIO, WALKYRIA O.; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Além da Ang-(1-7), a Ang II via receptor AT<sub>2</sub> complementa as ações do eixo vasodilatador sobre a função cardiovascular (DANYEL *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Papel fisiológico da Angiotensina-(1-7)

#### 1.2.3.1 Ação da Angiotensina-(1-7) no coração

Diversos trabalhos demonstram que o coração e os vasos sanguíneos são os principais alvos para ação da Ang-(1-7). Essas ações incluem alterações bioquímicas que resultam na melhora da função cardíaca e vasodilatação (BROSNIHAN, K. B.; LI; FERRARIO, 1996; LOOT *et al.*, 2002). A presença de ECA 2 em cardiomiócitos confirmou a existência de uma produção local de Ang-(1-7) que, de forma aguda, aumenta a síntese de NO (COSTA *et al.*, 2010; SANTOS, R. A. *et al.*, 1990). A exposição crônica a níveis elevados de Ang-(1-7), por sua vez, parece estimular o manejo de cálcio nessas células (DIAS-PEIXOTO *et al.*, 2008; GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012).

Em 2001 Ferreira e colaboradores descreveram pela primeira vez o efeito antiarritmogênico exercido pela Ang-(1-7) em coração isolado de rato (FERREIRA, A J; SANTOS; ALMEIDA, 2001). Mais tarde, verificou-se que esse efeito era limitado a baixas doses (200 pmol/L), visto que, em doses 10 vezes mais altas a Ang-(1-7) apresentou efeito pró-arritmogênico. Resultados semelhantes foram obtidos em animais transgênicos [TG(A1-7)L-3292] que possuem níveis circulantes mais altos de Ang-(1-7), demonstrando que a ação antiarritmogênica envolve a ativação da bomba de sódio e consequente hiperpolarização da membrana plasmática dos cardiomiócitos aumentando a velocidade de condução do potencial de ação (FERREIRA, ANDERSON J. *et al.*, 2010).

Além da ação antiarritmogênica, vários estudos demonstram que a Ang-(1-7) reduz o remodelamento ventricular, caracterizado pela hiperplasia de fibroblastos e o acúmulo de componentes da ME que levam à fibrose do miocárdio (GROBE *et al.*,

2006; MCCOLLUM; GALLAGHER; TALLANT, 2012). Esse efeito protetor exercido pela Ang-(1-7) contra o remodelamento cardíaco patológico foi confirmado por meio do antagonismo farmacológico do receptor Mas (CASTRO, CARLOS HENRIQUE DE *et al.*, 2005), bem como pelo uso de animais com deleção gênica desse receptor resultando em dano cardíaco em ambos (GAVA *et al.*, 2012; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2006).

Em relação à hipertrofia dos cardiomiócitos, o papel da Ang-(1-7) ainda não foi bem definido (SANTOS, ROBSON AUGUSTO, 2014). Em um modelo de hipertensão induzida (DOCA-sal) o tratamento com Ang-(1-7) atenuou a fibrose cardíaca, mas não apresentou efeito significativo sobre a hipertrofia cardíaca (GROBE *et al.*, 2006). Por outro lado, em cultura de cardiomiócitos, a incubação com Ang-(1-7) atenuou a hipertrofia induzida pela Ang II, e esse efeito se dá pela via NO/cGMP (GOMES *et al.*, 2010).

Além das ações diretas exercidas pela Ang-(1-7) sobre o miocárdio, esse heptapeptídeo exerce efeito cardioprotetor de forma indireta, por meio da potencialização da ação da bradicinina e do antagonismo da Ang II (ALMEIDA *et al.*, 2000; BROSNIHAN, K. B.; LI; FERRARIO, 1996).

### **1.2.3.2 Ação da Angiotensina-(1-7) nos vasos sanguíneos**

A formação local de Ang-(1-7) bem como a presença do receptor Mas foram descritas tanto no endotélio como no músculo liso vascular de humanos e outras espécies (DA COSTA GONÇALVES *et al.*, 2007; SAMPAIO, WALKYRIA OLIVEIRA *et al.*, 2007; SANTOS, R. A. *et al.*, 1992). A Ang-(1-7) apresentou efeito vasodilatador em uma variedade de leitos vasculares, como arteríolas aferentes de coelhos (REN; GARVIN; CARRETERO, 2002), artérias coronárias de porcos (PÖRSTI *et al.*, 1994) e cães (BROSNIHAN, K. B.; LI; FERRARIO, 1996), artérias mesentéricas de ratos

(NEVES, L. A. .; AVERILL; *et al.*, 2003), aorta de ratos (LEMOS, VIRGÍNIA S. *et al.*, 2002) e de camundongos (LEMOS, VIRGINIA S. *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* também demonstraram a capacidade da Ang-(1-7) de reduzir a resistência vascular periférica (RVP) (SAMPAIO, WALKYRIA O.; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Esses resultados foram recentemente confirmados em camundongos machos com deleção do receptor Mas os quais apresentaram aumento da RVP bem como diminuição do fluxo sanguíneo regional em tecidos importantes como rins, fígado, adrenais, baço e mesentério (BOTELHO-SANTOS *et al.*, 2012). Em conjunto esses dados sugerem a existência de um tônus basal mediado pelo eixo Ang-(1-7)/Mas sobre os vasos sanguíneos.

Dentre os mecanismos envolvidos, observou-se que a Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor Mas promove a liberação de NO pela via fosfatidilinositol-3-quinase/AKT (SAMPAIO, WALKYRIA OLIVEIRA *et al.*, 2007). Além desse mecanismo, a Ang-(1-7) também reduz os efeitos mediados pela Ang II por via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinases* - MAPK) (SAMPAIO, WALKYRIA O. *et al.*, 2007). O importante papel exercido pela Ang-(1-7) sobre o leito vascular se confirma em diferentes trabalhos que descreveram uma severa disfunção endotelial em animais com deleção gênica do receptor Mas (RABELO *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008b).

### **1.2.3.3 Ações renais da Angiotensina-(1-7)**

Um número cada vez maior de estudos destaca a importância da Ang-(1-7) para o controle da função renal (PINHEIRO; SIMÕES E SILVA, 2012). Tanto na medula como no córtex renal, as concentrações de Ang-(1-7) são equivalentes às concentrações de Ang II, sendo a ECA 2 sua principal enzima formadora (CHAPPELL, M. C. *et al.*, 1998; CHAPPELL, MARK C. *et al.*, 2004). Diferente do que ocorre na

circulação periférica, no tecido renal a NEP é responsável tanto pela síntese como pelo metabolismo da Ang-(1-7) levando à formação de Ang-(1-4) e Ang-(1-5) (CHAPPELL, M. C.; ALLRED; FERRARIO, 2001).

As ações renais da Ang-(1-7) são complexas e variam de acordo com a espécie, com as concentrações locais ou sistêmicas desse peptídeo, com os níveis de ativação do SRA e com o perfil hidroeletrólítico do indivíduo (FERRARIO *et al.*, 2005). As ações diurética/natriurética mediadas pela Ang-(1-7) são descritas tanto *in vitro* (ANDREATA-VAN LEYEN *et al.*, 1993) quanto em modelos animais (HANDA, 1999). Em sua maioria, essas ações são consequência da inibição da reabsorção de sódio no túbulo proximal (DELLIPIZZI; HILCHEY; BELL-QUILLEY, 1994).

Apesar de os efeitos tubulares da Ang-(1-7) serem extensivamente estudados, a ação direta desse peptídeo sobre os vasos renais ainda é pouco conhecida. O efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi inicialmente descrito em arteríolas aferentes de coelhos (REN; GARVIN; CARRETERO, 2002). Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que a ação vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) se dava pelo aumento da liberação de NO e era COX-independente. Após a descoberta do Mas como sendo o receptor específico para Ang-(1-7) (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2003), Chappell e colaboradores demonstraram a presença desse receptor na arteríola aferente de camundongos (CHAPPELL, MARK C. *et al.*, 2004).

Experimentos com arteríola interlobar renal de ratos mostram que a Ang-(1-7) é capaz de bloquear o efeito vasoconstritor induzido pela Ang II nesses vasos (VAN DER WOUDE *et al.*, 2006). O tônus vascular das arteríolas pré-glomerulares é um fator de grande importância para o controle da perfusão renal. Foi verificado que apenas um pequeno aumento na impedância desses vasos pode prejudicar gravemente a função renal tanto em humanos (DERCHI *et al.*, 2005) quanto em modelos de insuficiência renal (GSCHWEND *et al.*, 2002; OCHODNICKÝ *et al.*, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que o receptor  $AT_2$  é responsável pelas diferenças sexuais existentes na resposta vasoconstritora induzida pela Ang II em artérias interlobares renais de camundongos (VIEGAS *et al.*, 2012). Neste trabalho, as fêmeas apresentaram um resposta contra-regulatória mais eficiente à ação da Ang II, na qual a maior liberação de NO a partir da ativação de  $AT_2$  determinou uma menor vasoconstrição no sexo feminino. Como a resistência nas artérias interlobares renais se relaciona positivamente com a PA sistólica, as diferenças sexuais na resposta à Ang II observadas nesses vasos assume grande importância para o entendimento sobre a regulação específica da PA em machos e fêmeas.

Tendo em vista o papel exercido pela Ang-(1-7) como um regulador fisiológico da PA, antagonizando os efeitos deletérios da Ang II, em nosso trabalho avaliamos as diferenças sexuais existentes na resposta vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) em artérias interlobares renais de camundongos.

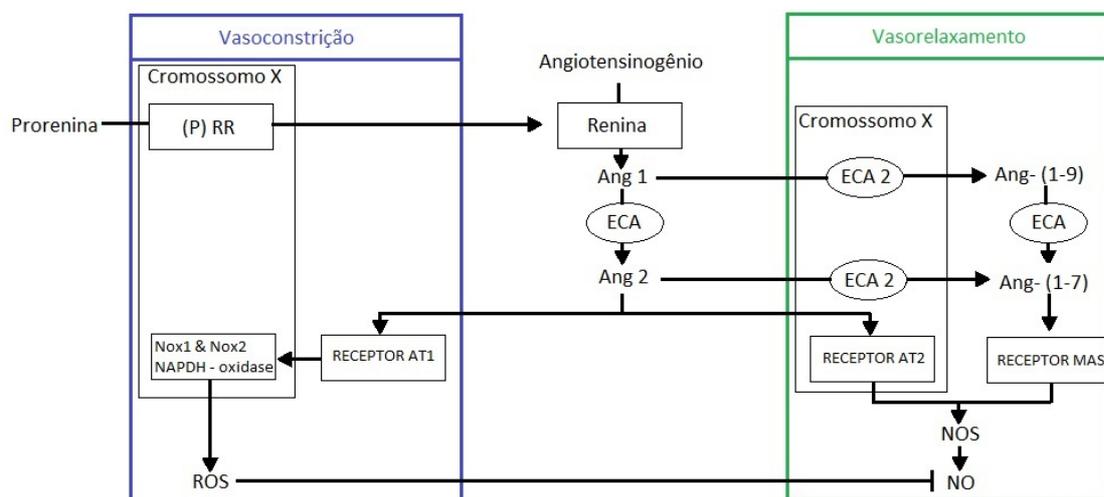
#### **1.2.4 Sistema Renina-Angiotensina: diferenças sexuais**

A combinação de diferentes perfis hormonais e diferentes genes localizados nos cromossomos sexuais (XX e XY) determinam transcriptomas específicos responsáveis pelas variações anatômicas, fisiológicas e metabólicas existentes entre homens e mulheres. Esse dimorfismo sexual se apresenta como diferenças na PA, na sensibilidade à Ang II, na eficácia terapêutica dos anti-hipertensivos e na severidade das DCV (TE RIET *et al.*, 2015).

##### **1.2.4.1 Hormônios sexuais e o Sistema Renina-Angiotensina**

Os hormônios sexuais influenciam a expressão dos componentes do SRA e modulam a sensibilidade à Ang II. Apesar da discrepância existente entre os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro*, de forma geral o estradiol parece estimular a

produção de angiotensinogênio, a expressão de ECA 2, a densidade dos receptores  $AT_2$  e da enzima NO sintase endotelial (eNOS). Por outro lado, o estradiol reduz a expressão de renina, ECA,  $AT_1$  e das subunidades Nox1 e Nox2 da enzima NADPH oxidase (ver Fig. 2) (HILLIARD *et al.*, 2013; SCHUNKERT *et al.*, 1997).



	Homem	Mulheres na Pre-menopausa	Mulheres na Pos-menopausa
Cromossomos Sexuais	XY	XX	XX
Androgênios	+++++	+	+
Estrogênios	+	+++++	+
Efeito	Vasoconstrição	Vasorelaxamento	Vasoconstrição

**Figura 2.** Influência dos hormônios gonadais e cromossomos sexuais (XX e XY) sobre o balanço vasoconstrictor/vasodilatador do Sistema Renina-Angiotensina (SRA). A figura destaca os genes para os componentes dos SRA que estão localizados no cromossomo X incluindo o gene para o receptor de (pro)renina [(P)RR] (TE RIET *et al.*, 2015).

De forma geral, o estradiol favorece a ativação do eixo vasodilatador do SRA, aumentando a formação de Ang-(1-7) e estimulando os receptores  $AT_2$  resultando no aumento da formação de NO e redução da formação de espécies reativas de oxigênio. Esses achados se confirmam *in vivo* por meio de trabalhos que demonstram que

doses baixas de Ang II reduzem a PA em fêmeas, mas não em machos (SAMPSON *et al.*, 2008), e ainda, doses elevadas de Ang II causam aumento mais acentuado na PA dos machos, e esse efeito pode ser revertido após a castração destes (XUE; PAMIDIMUKKALA; HAY, 2005). Esses resultados corroboram a ideia originalmente proposta por Brosnihan e colaboradores, na qual os efeitos cardioprotetores dos estrogênios se dariam pela estimulação do eixo vasodilatador, ECA 2/Ang-(1-7)/Mas, em detrimento ao eixo vasoconstrictor ECA/Ang II/AT<sub>1</sub> (BROSNIHAN, K. BRIDGET *et al.*, 1997).

A testosterona, por sua vez, estimula a formação de renina e de ECA, e ainda aumenta a expressão dos receptores AT<sub>1</sub>, favorecendo assim o eixo vasoconstrictor do SRA (KOMUKAI; MOCHIZUKI; YOSHIMURA, 2010). Outros trabalhos demonstram que a orquidectomia reduz a expressão gênica de angiotensinogênio nos rins, enquanto a reposição com testosterona reverte esse quadro (ELLISON *et al.*, 1989). Além disso, os machos apresentam uma correlação direta entre a atividade da renina plasmática e a atividade da testosterona (RECKELHOFF, 2001).

#### **1.2.4.2 Cromossomos sexuais e o Sistema Renina-Angiotensina**

Dentre os mamíferos os machos são heterogaméticos possuindo um cromossomo X e um cromossomo Y, enquanto as fêmeas são homogaméticas, possuindo dois cromossomos X. Esta característica determina o dimorfismo sexual decorrente das variações na expressão gênica. Assim, os genes localizados no cromossomo Y são responsáveis principalmente pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais masculinos, produção de testosterona e fertilidade (BELLOTT *et al.*, 2014).

Trabalhos recentes sugerem que os cromossomos sexuais influenciem a PA por meio da regulação da expressão de genes que codificam componentes do SRA. Como os genes para ECA 2, AT<sub>2</sub> e (P)RR estão localizados no cromossomo X, esses componentes podem apresentar maior expressão no sexo feminino visto que, em

mulheres, 15% a 25% dos genes ligados ao cromossomo X escapam da inativação total ou parcialmente (CARREL; WILLARD, 2005). Em camundongos, esse percentual de escape é menor, porém ainda pode contribuir para as diferenças sexuais na expressão gênica observados nessa espécie (YANG *et al.*, 2010).

Vários estudos mostraram a participação do locus Sry do cromossomo Y na regulação da PA de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (ELY, D. L.; TURNER, 1990; ELY, D. *et al.*, 2007, 2011). Ely e colaboradores observaram que o aumento na PA de SHR machos é acompanhado por um aumento na expressão de Sry no rim e na adrenal destes animais (ELY, D. *et al.*, 2007, 2009). Corroborando essa ideia, foi demonstrado que o Sry é capaz de estimular a expressão de angiotensinogênio, renina e ECA favorecendo a ativação do eixo vasoconstrictor do SRA (MILSTED *et al.*, 2010).

Diante da dificuldade de se estudar isoladamente os efeitos provocados pelos hormônios gonadais e pelos cromossomos sexuais, foi criado o modelo de camundongos FCG (*Four core genotypes*) no qual os complementos XX e XY são expressos de forma independente do sexo gonadal (LOVELL-BADGE; ROBERTSON, 1990). Assim, o Sry original foi deletado e um Sry funcional inserido em um autossomo, assim a formação dos testículos passa a ser determinada por um autossomo e XY e XX não determinam mais o sexo gonadal. São originados 4 genótipos diferentes que permitem a comparação de camundongos com diferentes complementos cromossômicos (XX ou XY) mas como mesmo tipo gonadal (ovários ou testículos) (ARNOLD; CHEN, 2009; ARNOLD, 2009). A partir desse modelo foi demonstrado que o complemento XX facilita a bradicardia barorreflexa, responsável pelos ajustes que mantém constante a PA (CAEIRO *et al.*, 2011).

#### **1.2.4.3 O eixo ECA 2 / Ang-(1-7) / Mas no sexo feminino**

Em diferentes modelos de HA as fêmeas apresentaram maior concentração de Ang-(1-7) em relação aos machos tanto no córtex renal (SULLIVAN *et al.*, 2010) como no plasma (PENDERGRASS *et al.*, 2008). Porém, os mecanismos responsáveis pelas diferenças sexuais na produção de Ang-(1-7) ainda não foram esclarecidos. As duas principais enzimas envolvidas na síntese da Ang-(1-7) são a ECA 2 e a endopeptidase neutra (ou neprilisina, NEP). A ECA 2 pode originar Ang-(1-7) a partir da clivagem da Ang-(1-9) ou, principalmente, a partir da Ang II. A NEP, por sua vez forma Ang-(1-7) diretamente a partir da Ang I, atuando principalmente a nível renal (RICE *et al.*, 2004).

Foram descritas diferenças sexuais na atividade tanto da NEP como da ECA 2, sendo que essas diferenças sexuais são dependentes dos valores basais da PA e da espécie estudada. Assim, os resultados ainda são controversos, porém indicam que em animais normotensos a atividade da ECA 2 renal é aumentada nos machos em relação às fêmeas (LIU *et al.*, 2010; PENDERGRASS *et al.*, 2008) ou semelhante em ambos os sexos (BHATIA; ZIMMERMAN; SULLIVAN, 2013). Porém, em situações que alterem o equilíbrio do SRA como a gravidez (BROSNIHAN, K. BRIDGET *et al.*, 2003), hipertensão (SHENOY *et al.*, 2009) e insuficiência renal (JI *et al.*, 2008) essa atividade parece ser aumentada pelo estradiol. A expressão/atividade de NEP, por sua vez, parece ser aumentada nas fêmeas tanto hipertensas como normotensas, contribuindo para elevação nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (NEVES, L. A. A. *et al.*, 2006; PENDERGRASS *et al.*, 2008). Muitas vezes as diferenças sexuais observadas sobre os componentes do SRA ocorre especificamente em alguns tecidos; por exemplo, a elevação da expressão de ECA 2 observada nos rins dos machos da linhagem mRen(2).Lewis em relação às fêmeas, não se reflete no coração ou no fígado (PENDERGRASS *et al.*, 2008).

Até o momento, poucos trabalhos avaliaram a expressão diferencial do receptor Mas em machos e fêmeas. Sullivan e colaboradores (2010) demonstraram que as fêmeas espontaneamente hipertensas (SHR) possuem uma menor expressão de Mas no córtex renal em relação aos machos SHR. Porém, após a administração de Ang II por duas semanas as fêmeas SHR apresentaram aumento na expressão renal de Mas, atingindo valores semelhantes ao encontrados nos machos SHR (SULLIVAN *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram descritos no modelo de hipertensão induzida pela administração de aldosterona/NaCl, no qual as fêmeas apresentaram um aumento no RNAm para Mas na lâmina terminal (XUE *et al.*, 2013).

Em ratos normotensos, observou-se maior expressão gênica do Mas nos rins das fêmeas adultas em relação aos machos. Esse aumento observado nas fêmeas resulta de uma elevação crescente na expressão do receptor Mas desde o nascimento até a fase adulta (110 dias). Por outro lado, os machos apresentaram uma expressão decrescente, resultando em níveis baixos de RNAm para o receptor Mas nos rins de ratos adultos (SAMPSON; MORITZ; DENTON, 2012). Nesse mesmo trabalho, não foram encontradas diferenças sexuais na expressão gênica do receptor Mas no ventrículo direito dos ratos.

## 2. HIPÓTESE

A Ang-(1-7) parece exercer um papel mais importante na regulação da PA em fêmeas. Assim, esperamos que a deleção gênica do receptor Mas provoque efeitos mais severos sobre a PA e o sistema cardiovascular das fêmeas, e que o efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-7) se mostre mais acentuado nos vasos renais extraídos de fêmeas.

**OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a contribuição do eixo Ang-(1-7)/Mas para as diferenças sexuais encontradas na função cardiovascular de camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

##### 3.2.1 Parte 1: Estudar os efeitos cardiovasculares provocados pela deleção gênica do receptor Mas em machos e fêmeas.

###### A) Pressão arterial

- Determinar a PA e frequência cardíaca por pletismografia de cauda e por telemetria;

###### B) Componente cardíaco

- Avaliar a função e morfologia cardíaca por ecocardiografia;
- Quantificar a expressão cardíaca de proteínas da matriz extracelular por Western Blot;
- Analisar a expressão cardíaca de receptores para Ang II por Western Blot;

###### C) Componente vascular

- Determinar a Resistência Periférica Total (RPT) e a Resistência Vascular regional (RV) pela técnica de infusão de microesferas fluorescentes;
- Avaliar a função endotelial *in vivo* por meio da resposta pressórica induzida pela Acetilcolina (Ach);

- Analisar a ultraestrutura dos vasos de resistência por Microscopia Eletrônica de Transmissão;

### **3.2.2 Parte 2: Estudar as diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal de camundongos.**

- Comparar as curvas dose-resposta da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal extraída de camundongos machos e fêmeas;
- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico do receptor Mas utilizando seu antagonista específico (A-779) sobre a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) nos dois sexos;
- Avaliar a contribuição do NO para a resposta vasodilatadora induzida pela Ang-(1-7) utilizando o inibidor não seletivo da enzima NO sintase - L-N-nitroarginina metil éster (L- NAME) - nos vasos extraídos de machos e fêmeas;
- Comparar a expressão gênica de componentes do SRA nas artérias interlobares renais extraídas de machos e fêmeas;
- Avaliar a expressão do receptor Mas nas artérias interlobares renais de machos e fêmeas por imuno-histoquímica;
- Realizar a avaliação indireta da produção de NO pela quantificação de nitrito na urina de machos e fêmeas.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem FVB/N com deleção gênica do receptor Mas ( $Mas^{-/-}$ ) e *wild type* ( $Mas^{+/+}$ ). Esses animais foram fornecidos pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, com 8 semanas de idade, após genotipagem para confirmação e seleção dos  $Mas^{-/-}$ . Os animais foram mantidos no biotério setorial de camundongos com luz e temperatura controladas (12h claro, 12h escuro;  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais utilizando  $Mas^{-/-}$  foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG (CETEA 094/11). Os experimentos em artéria interlobar renal foram previamente aprovados pelo comitê de ética do *Nierengefäßphysiologie Institut für Vegetative Physiologie – Charité, Berlim*

### 4.2 Medida indireta da pressão arterial por pletismografia de cauda

Os registros de PA foram realizados por pletismografia utilizando o aparelho LE 5001 (Panlab), que consiste em um sistema de medida não invasivo que detecta os pulsos do fluxo arterial através da cauda. Os registros foram analisados pelo programa SedaCom 32.

Para reduzir o estresse no momento da realização dos registros, cada animal passou por um processo de adaptação ao contensor e ao pletismógrafo. Esse período de adaptação teve duração de 5 dias, nos quais o camundongo foi submetido a simulações diárias do momento do registro, incluindo todas as etapas desse processo: contensão, aquecimento, fixação do *cuff* na cauda e reprodução do som emitido pelo

aparelho. O aquecimento (35° C) foi realizado com aquecedor próprio para roedores por 10 minutos antes da aferição, e teve como objetivo promover vasodilatação na cauda para facilitar a aquisição dos registros.

### **4.3 Medida das variações circadianas na pressão arterial por telemetria**

Camundongos machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup> receberam um implante para telemetria (TA11-PA20; Data Sciences International, St.Paul, Minnesota, USA), como descrito anteriormente por (GROSS *et al.*, 2005). Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamine (10mg/kg) e xilasina (5mg/kg). O transmissor foi inserido na aorta abdominal e fixado na parede da cavidade, em seguida, o intestino foi delicadamente recolocado em sua posição original e a cavidade abdominal foi fechada por sutura. Todos os camundongos foram colocados em gaiolas individuais em uma sala apropriada, com ruídos controlados. Os camundongos foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h com as luzes acesas a partir das 6:00 horas. Ao fim da cirurgia, todos os animais passaram por um período de 7 dias de recuperação antes que os valores basais de pressão arterial fossem registrados por um período de três dias consecutivos.

### **4.4 Ecocardiografia**

Animais dos quatro grupos (machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>) foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico (cego) de alta resolução sob anestesia inalatória induzida por isoflurano (2,5%). A análise da morfologia e função cardíaca de forma não invasiva foi realizada utilizando-se o aparelho Vevo 2100 equipado com transdutores de 16 e 40 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). O procedimento foi realizado em um animal por vez, assim, o camundongo anestesiado

foi colocado em posição supina sobre uma plataforma apropriada, onde foi submetido à tricotomia do tórax e abdômen. Essa plataforma foi equipada com eletrodos para monitorização da FC e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal (37°C). Foram obtidas imagens de alta resolução em posição paraesternal direita e esquerda nos eixos longo, curto e apical. As medidas e cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

Animais de cada grupo foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico (cego) de alta resolução sob anestesia inalatória induzida por isoflurano (2,5%). A análise da morfologia e função cardíaca de forma não invasiva foi realizada utilizando-se o aparelho Vevo 2100 equipado com transdutores de 16 e 40 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). O procedimento foi realizado em um animal por vez, assim, o camundongo anestesiado foi colocado em posição supina sobre uma plataforma apropriada, onde foi submetido à tricotomia do tórax e abdômen. Essa plataforma foi equipada com eletrodos para monitorização da FC e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal (37°C). A captura das imagens foi realizada por um técnico experiente que recebeu treinamento apropriado. Foram obtidas imagens de alta resolução em posição paraesternal direita e esquerda nos eixos longo, curto e apical. As medidas e cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

No modo M, foram realizadas as seguintes medidas: dimensão interna do ventrículo esquerdo (VE) na sístole e diástole (LVIDs e LVIDd); espessura da parede posterior do VE na sístole e diástole e espessura do septo interventricular na sístole e diástole. A partir dessas medidas foram calculados os volumes sistólico e diastólico finais, fração de encurtamento, fração de ejeção, volume de ejeção e débito cardíaco.

#### **4.5 Avaliação de expressão cardíaca de proteínas da matriz extracelular e de receptores AT1 e AT2 por Western Blot**

Os corações foram homogeneizados em tampão de lise (50 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1% Triton X-100 e um coquetel de inibidores específicos da Roche, USA) usando o aparelho Precellys com esferas cerâmicas de 2.4 mm. Na sequência, os tubos foram centrifugados à 6500 G durante 20 segundos. O tecido processado foi transferido para tubos de 1,5 mL nos quais foram homogeneizados por sonicação e centrifugados à 14000 rpm por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. Alíquotas de 50 microgramas de proteína de cada amostra foram aplicadas em um gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, em seguida foram separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Na sequência, as membranas foram bloqueadas com uma solução contendo leite em pó a 5% por uma hora, e depois foram incubadas por aproximadamente 16 horas à temperatura de 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-AT<sub>1</sub> (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-AT<sub>2</sub> (1:500, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-Colágeno tipo I (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-Colágeno tipo III (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-Fibronectina (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-p-ERK1/2 (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA); anti-Total ERK1/2 (1:1000, Millipore, Billerica, MA, USA), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:2000, Calbiochen). Na sequência, anticorpos secundários fluorescentes (1:10.000) foram incubados por 1h em temperatura ambiente. As bandas contendo as proteínas foram detectadas pelo sistema de escâner Odyssey (Li-Cor, USA) e os resultados foram quantificados por densitometria (Odyssey software).

#### 4.6 Medida da resistência periférica total pela injeção de microesferas fluorescentes

Os animais foram anestesiados (uretana 1,2g/Kg, i.p.) para canulação da artéria femoral esquerda (monitorização da PA e frequência cardíaca) e da artéria femoral direita (retirada da amostra de sangue). Por último foi introduzida uma cânula no ventrículo esquerdo via carótida para infusão das microesferas fluorescentes. Após estabilização do animal as microesferas foram injetadas (50.000 microesferas - Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) e iniciou-se a coleta de sangue por 1 minuto (0,25ml/min). Após 10 minutos o animal foi eutanasiado e os tecidos (coração, rins, tecido adiposo, fígado, cérebro, testículos/ovários, vesícula seminal/útero, músculo, pele, baço, adrenais) foram removidos e pesados. Em sequência, os tecidos foram colocados em 1.4 ml de solução 4M de KOH (em etanol) com 1% de Tween-80, por 24 horas em banho aquecido (50°C). Posteriormente os tecidos foram homogeneizados e centrifugados por 20 min a 10.000 g para a formação de precipitado contendo as microesferas e alguns debris. Após 3 centrifugações foram adicionados ao sobrenadante 4 ml de acetato de etila para liberação do composto fluorescente. Após repouso por 1 hora as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante separado para realização da leitura da fluorescência (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer/Varian).

Para o cálculo dos parâmetros cardiovasculares a partir da fluorescência foram utilizadas as seguintes equações:

- Fluxo Sanguíneo Regional ( $Q_o$ , ml/ min.g órgão)

$$Q_o = \frac{\text{Fluorescência do órgão} \times Q_f}{\text{peso do órgão (g)} \times R_f}$$

Onde: Rf = fluorescência da amostra sanguínea, Qf = peso da amostra sanguínea de referência (g) x 60/densidade do sangue (1.06) x tempo de coleta do sangue (60s).

- Resistência Regional (RV, mmHg/ ml/ min .g órgão)

$$RV = \frac{PAM}{Qo}$$

- Débito Cardíaco (DC, ml/min)

$$DC = \frac{T}{fc \times Rf \times 2}$$

Onde: T é o total de microesferas injetadas menos as microesferas remanescentes na seringa. Fator de correção (fc) = [(tubo1/fluorescência tubo1) + (tubo2/fluorescência tubo2) + (tubo3/fluorescência tubo3)]/3, Rf = fluorescência da amostra sanguínea.

- Volume Sistólico (VS, ml)

$$VS = \frac{DC}{FC}$$

Onde: DC é o débito cardíaco e FC é a frequência cardíaca (bpm).

- Índice Cardíaco (IC, ml/min/100g)

$$IC = \frac{DC}{\text{peso corporal}}$$

- Resistência Periférica Total (RPT, mmHg/ml/min.100g)

$$RPT = \frac{PAM}{IC}$$

#### 4.7 Avaliação da função endotelial *in vivo*

Para avaliar a função endotelial *in vivo*, usamos uma técnica previamente descrita por Xu e colaboradores (2008). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano 5.0% e tiveram uma cânula inserida na artéria femoral e uma segunda

cânula inserida na aorta descendente a partir da artéria carótida esquerda. A localização da segunda cânula garantiu que as drogas injetadas atingissem apenas os vasos de resistência. Ambas as cânulas foram exteriorizadas na parte posterior do pescoço do animal. Após 24h, a pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas por um transdutor (modelo MLT 1050) conectado a um computador acoplado a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, AD Instruments). Dessa maneira os registros foram feitos enquanto os animais se movimentavam livremente pela caixa. Após o período de uma a duas horas de aquisição de dados, a função endotelial dos animais foi avaliada por meio da medida da variação da pressão arterial média após a injeção intra-aórtica de acetilcolina (Ach). A Ach foi injetada no volume de 1  $\mu$ L por 10 g de peso corporal nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 ng/kg.

#### **4.8 Análise da ultraestrutura dos vasos de resistência por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os animais foram anestesiados (quetamina/xilazina - 2mg/kg) e em seguida foram realizadas laparotomia e toracotomia para a perfusão. Foi injetado tampão fosfato (0,05 mol/L PBS) heparanizado via ventrículo esquerdo, e posteriormente, foi injetada solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4). As artérias mesentéricas foram isoladas utilizando-se um microscópio cirúrgico, e armazenadas em solução fixadora por 24h à 4°C. A pós-fixação foi feita com uma mistura de tetróxido de ósmio 2% e ferrocianeto de potássio 1,5% por 2h. As amostras foram lavadas com água destilada e mantidas por 24h em solução de acetate de uranila 2% em bloco de fixação. Em seguida, as amostras foram desidratadas e fixadas em Epon 812. Posteriormente as amostras foram seccionadas em cortes com 50 nm de espessura e coradas com citrato de chumbo de Reynolds. A microscopia

eletrônica foi realizada utilizando-se FEI Tecnai G2-12 Spirit a 80kV. A análise morfológica foi realizada pelo método clássico de contagem de pontos (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

#### **4.9 Preparação das artérias interlobares renais para reatividade vascular in vitro**

Camundongos machos e fêmeas da linhagem FVB/N, com 3 meses de idade, foram sacrificados por deslocamento cervical. Os rins foram removidos delicadamente e colocadas em uma solução gelada de Krebs-Henseleit (KHS, composição: NaCl 118; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; MgSO<sub>4</sub> 1,1; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucose 11 (mM). As artérias interlobares foram expostas e seccionadas em anéis de 2 mm de comprimento conforme protocolo previamente estabelecido (VIEGAS *et al.*, 2012). Esses anéis de diferentes ramos foram delicadamente montados num fio de aço inoxidável de 40 µm de diâmetro acoplado a um miógrafo para pequenos vasos (modelo 500 A; DMT, Aarhus Denmark). As respostas foram registradas usando-se transdutores de tensão isométrica (AD Instruments, Pty Ltd. Bela Vista, Australia) conectados a um amplificador (QUAD Bridge, AD Instruments, Pty Ltd. Bela Vista, Australia). O programa Power Lab versão 7.1 foi utilizado para a aquisição e análise dos dados. Foi aplicada uma força de contração máxima com 100 mmol/l KCl em todos os vasos, esse valor foi usado como padrão para comparação dos efeitos vasodilatadores das substâncias. Após a contração induzida por KCl o vaso passou por diferentes protocolos.

#### **4.10 Avaliação do efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na artéria interlobar renal de camundongos**

Para se obter as curvas dose-resposta (CDR) de drogas com efeito vasodilatador, inicialmente induzimos uma pré-contracção com fenilefrina (Phe) correspondente a 50% da contracção máxima induzida pelo KCl. Os valores de relaxamento foram expressos como porcentagem da contracção com fenilefrina. Para testar o relaxamento dependente de endotélio, foi feita uma CDR para acetilcolina (ACh) ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/l) ou Ang-(1-7). O relaxamento independente de endotélio foi avaliado por uma CDR para o nitroprussiato de sódio (SNP) ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  mol/l).

Para se avaliar o papel do NO nas diferenças sexuais relacionadas á reatividade vascular os vasos foram incubados com o inibidor não-seletivo da enzima NO-sintase, L-N-nitroarginina metil éster (L- NAME,  $10^{-4}$  mol/l por 15 minutos).

Para se avaliar a influência do receptor Mas nas diferenças sexuais na resposta vasodilatadora à Ang-(1-7) os vasos foram incubados com o antagonista específico para esse receptor, A-779 ( $10^{-6}$  mol/l) por 30 minutos. Em seguida foi realizada uma CDR para Ang-(1-7) (protocolo 1). Para se investigar o papel do NO na função vasodilatadora mediada pelo Mas, os vasos foram incubados com A-779 juntamente com L-NAME.

#### **4.11 PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real para avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA na artéria interlobar renal**

As arteríolas interlobares renais foram cuidadosamente isoladas em solução KHS.

Foram avaliadas a expressão de RNAm para ECA, ECA 2, NEP, Angiotensinogênio,  $AT_1$ ,  $AT_2$ , MrgD e Mas (Tabela 1). O RNA total foi isolado

utilizando-se o kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A transcrição reversa do RNAm foi realizada utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit com primers universais (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA). Análise quantitativa do PCR em tempo real foi realizada utilizando-se GeneAmp StepOne Plus (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Para a detecção da fluorescência do DNA gerado foi utilizado o SYBR Green (Bioline, Luckenwalde, Germany). As reações de PCR foram realizadas num volume de 12.5 µl com 0.4 pmol/ml de cada primer, e duas vezes o mix *ready-to-use reaction-mix* (Bioline); 10 ng de cDNA foram usados como molde.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese e amplificação do cDNA.

Nucleotídeo	Senso	Anti-senso
ECA	CTCAGCCTGGGACTTCTACAAC	CTCCATGTTTACAGAGGTACTACT
ECA 2	GGCTCCTTCTCAGCCTTG	TTCATAAAAGGCAGACCATTG
Mas	GCCATGAATACCTCCAGCAG	GTCATGATGACCCAGTGC
Angiotensinogênio	TGTGACAGGGTGAAGATGA	CAGGCAGCTGAGAGAAACCT
MrgD	CTCTCCGTGCTTTTCCCCAT	ATGACCGGCATGAAGATCCC
AT1	CCATTGTCCACCCGATGAAG	TGCAGGTGACTTTGGCCAC
AT2	TTTATGATAACTGCTTTAAACACTGG	TGCCAGTTGCGTTGAGATTA
NEP	CCTCACGGTGCTGCTGGAAA	CTGCTGCGTCCACCAGTCAA

#### 4.12 Imuno-histoquímica para avaliar a expressão do receptor Mas nas artérias interlobares renais

Após a eutanásia dos animais, os rins foram removidos e armazenados em freezer -80°C. Os rins foram cortados longitudinalmente em criostato à temperatura controlada de -16°C. As lâminas foram submetidas a 3 banhos consecutivos em etanol a 100%, 95% e 75% por 10 minutos cada. Na sequência foi realizado o bloqueio

da peroxidase endógena com uma solução contendo peróxido de hidrogênio 3% e metanol 30%, após 30 minutos nessa solução as lâminas foram mergulhadas em tampão fosfato salina (PBS) por 2 vezes de 5 minutos cada. Na sequência as lâminas foram aquecidas em tampão citrato de sódio por 4 vezes de 5 minutos cada para recuperação antigênica. Novamente as lâminas foram mergulhadas em PBS por 2 vezes de 5 minutos cada. Posteriormente foi realizado o bloqueio da formação do complexo avidina/biotina endógeno. Em seguida os cortes foram incubados com soro de cabra por 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubadas com anticorpo primário anti-Mas (Alomone, 1:150) overnight em câmara úmida na geladeira.

No segundo dia as lâminas foram lavadas em PBS por 2 vezes de 30 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário (anti-imunoglobulina) por uma hora. Após lavagem em PBS (2 vezes de 5 minutos) os cortes foram incubadas como complexo avidina-biotina por 30 minutos. Para a revelação das ligações antígeno-anticorpo utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 8 minutos e depois as lâminas foram lavadas em água corrente.

A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Para montagem das lâminas foi realizada desidratação em 2 banhos de etanol 95% por 5 minutos seguidos por 3 banhos em xilol por 5 minutos cada; fixação da lamínula com resina sintética.

A positividade pela imuno-histoquímica foi determinada pela presença da cor marrom-castanho nas artérias renais. Assim, os vasos eram classificados como marcados ou não marcados. Foram avaliados de 12 a 15 vasos em diferentes cortes de cada animal (n=3 por grupo) totalizando aproximadamente 40 vasos nas fêmeas e 40 vasos nos machos. O aumento utilizado para análise das lâminas foi de 400X e as fotografias foram retiradas nos aumentos de 400X e 1000X. Foi utilizado como critério

para garantir a especificidade da marcação um controle negativo constando de uma lâmina na qual o anticorpo primário foi omitido.

#### **4.13 Medida indireta da produção de Óxido Nítrico (NO) pela dosagem da concentração urinária de nitrito**

O reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina paminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). 100  $\mu$ L de urina centrifugada (2000 rpm 5 min) foram transferidos para placa de 96 poços e adicionou-se 100  $\mu$ L do reagente de Griess. Após a incubação por 10 minutos no escuro à temperatura ambiente a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

#### **4.14 Análise Estatística**

O delineamento utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Os animais de mesmo peso e idade foram distribuídos de maneira aleatória. Foram mantidos em ambiente com condições controladas de temperatura e luminosidade. Existindo, portanto, três fontes de variação: a individual, a devida ao sexo (macho ou fêmea) e a devida ao genótipo (FVB/N *Mas-knockout* ou *wild type*).

Para comparar as médias entre os grupos foi determinada a variação individual ou variação do erro ( $s^2$ ), por meio de análise de variância ANOVA two way, seguida do

teste de comparação entre curvas do tipo Newman-Keuls. A comparação dentro do mesmo genótipo foi realizada por meio do teste t de Student, visto que a comparação de média foi realizada entre dois grupos apenas.

Os resultados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média usando o Software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Como critério para significância, foi considerado  $p$  menor que 0,05.

**RESULTADOS**

---

## 5. RESULTADOS

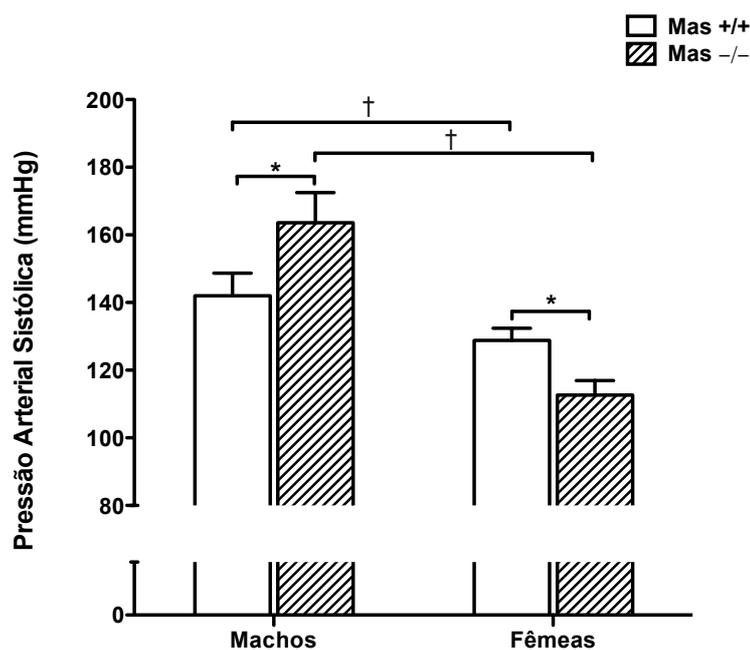
### 5.1 Parte 1: Efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função cardiovascular em machos e fêmeas

#### 5.1.1 A deleção gênica do receptor Mas provoca alterações opostas sobre a pressão arterial de machos e fêmeas

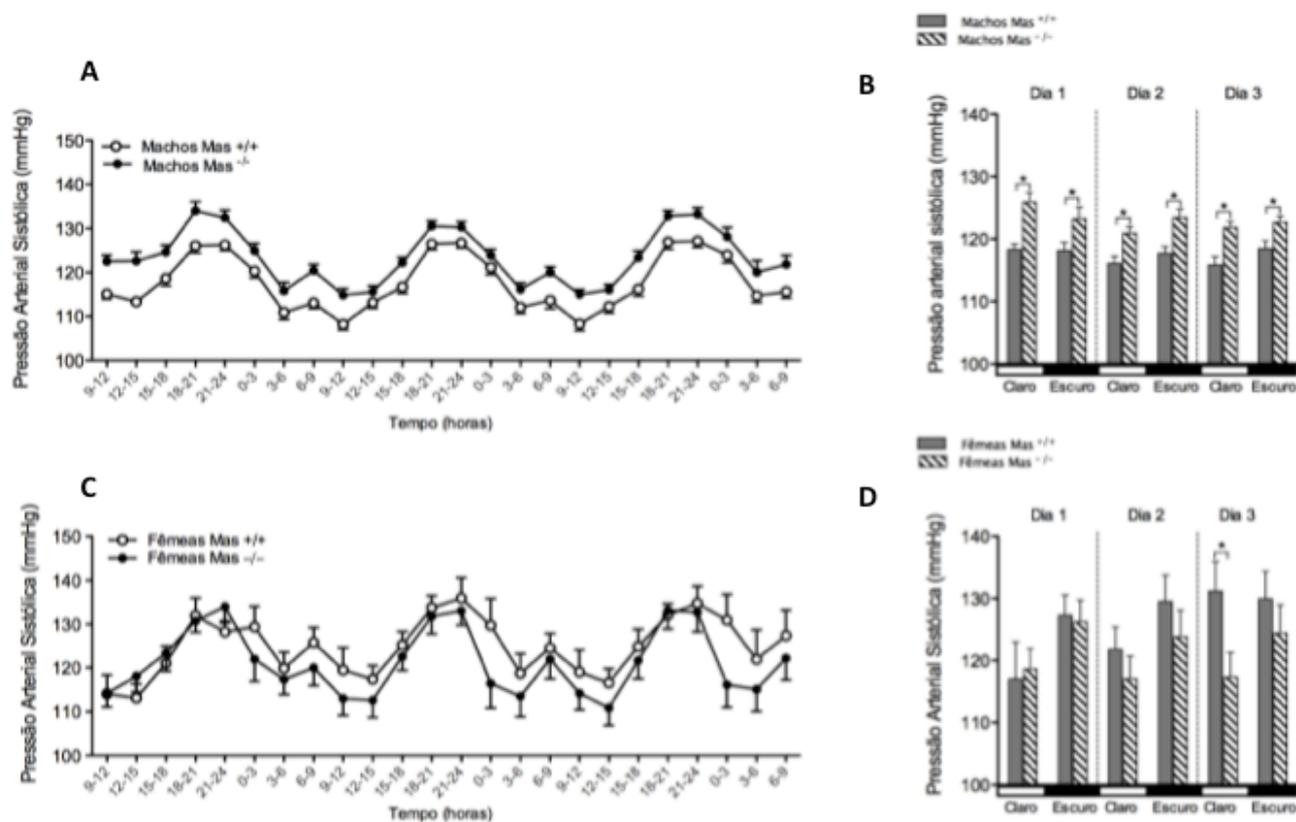
Nossos resultados confirmam a elevação na PA descrita anteriormente para os machos  $Mas^{-/-}$  (XU *et al.*, 2008) e mostram pela primeira vez que as fêmeas  $Mas^{-/-}$  apresentam redução da PA (Fig. 3). Esse resultado surpreendente nos estimulou a estudar a fundo as alterações cardiovasculares que determinam esse efeito oposto sobre a PA de machos e fêmeas a partir da deleção gênica do receptor Mas.

Em nosso trabalho, essas diferenças sexuais sobre a PA de camundongos  $Mas^{-/-}$  foram confirmadas por três diferentes técnicas: pletismografia (Fig. 3), telemetria (Fig. 4) e medida direta na aorta abdominal (Fig. 8). Dados obtidos por pletismografia de cauda em animais não anestesiados mostraram uma redução de 11 mmHg nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  ( $Mas^{-/-}$ :  $114 \pm 4$  vs.  $Mas^{+/+}$ :  $125 \pm 4$  mmHg;  $p < 0,05$ ; Fig. 3); e por outro lado, um aumento de aproximadamente 30 mmHg na PA sistólica dos machos  $Mas^{-/-}$  ( $Mas^{-/-}$ :  $170 \pm 6$  vs.  $Mas^{+/+}$ :  $140 \pm 3$  mmHg,  $p < 0,05$ , Fig. 3). A avaliação de possíveis alterações circadianas sobre a PA mostrou que as diferenças na PAM dos animais  $Mas^{-/-}$  são intensificadas durante a fase clara do ciclo, mostrando diferenças significativas nos três dias de registro para os machos e no terceiro dia para as fêmeas ( $p < 0,05$ , Fig. 4-B e 4-D). Confirmando as diferenças descritas anteriormente, a PAM registrada nos camundongos instrumentados para medida da RPT, sobre anestesia, mostrou-se aumentada nos machos  $Mas^{-/-}$  ( $Mas^{-/-}$ :  $84 \pm 3$  vs.

Mas<sup>+/+</sup>: 71 ± 6 mmHg,  $p < 0.05$ , Figure 8-A) e reduzida nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup> (Mas<sup>-/-</sup>: 62 ± 4 vs. Mas<sup>+/+</sup>: 80 ± 6 mmHg,  $p < 0.05$ , Figure 5-A).



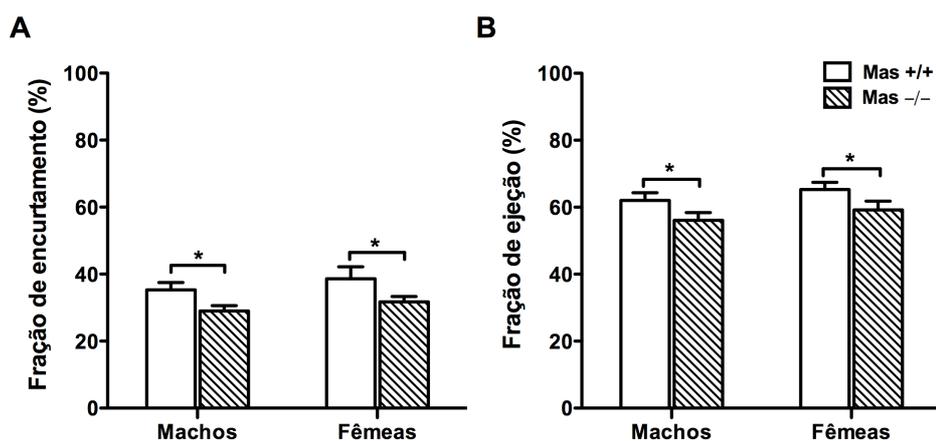
**Figura 3:** Pressão arterial sistólica de camundongos FVB/N machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>. A medida indireta foi realizada por pletismografia de cauda em animais não anestesiados utilizando contensores apropriados. \*  $p < 0,05$  vs. Mas<sup>+/+</sup> do mesmo sexo; †  $p < 0,05$  vs. machos do mesmo genótipo (n=5 machos Mas<sup>+/+</sup> e Mas<sup>-/-</sup>; n=10 fêmeas Mas<sup>+/+</sup> e Mas<sup>-/-</sup>).



**Figura 4:** Medida da Pressão Arterial Média (PAM) por telemetria em camundongos machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup> não anestesiados. Variações circadianas na PAM em machos Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>, **A**; e em fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>, **C**; Médias diárias da PAM durante três dias consecutivos em machos Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>, **B** e em fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>, **D**, durante a fase clara (barra branca horizontal) e fase escura (barra preta horizontal). \**p* < 0.05 vs. Mas<sup>+/+</sup> do mesmo sexo; †*p* < 0.05 vs. mesmo grupo na fase escura (n=12 machos Mas<sup>+/+</sup> e Mas<sup>-/-</sup>; n=8 fêmeas Mas<sup>+/+</sup> e Mas<sup>-/-</sup>).

### 5.1.2 Disfunção cardíaca e alterações estruturais específicas no coração de machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>

Para melhor compreender o papel do receptor Mas nas diferenças sexuais observadas na PA, nós avaliamos a função e morfologia cardíacas por ecocardiografia de alta resolução (Vevo<sup>®</sup> 2010). Como demonstrado na Fig. 5, tanto machos quanto fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentaram fração de ejeção e de encurtamento reduzidas em relação aos camundongos Mas<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ ). A análise morfológica dos corações dos machos Mas<sup>-/-</sup> indicou uma diminuição na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE) na diástole, enquanto as fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento da espessura em relação ao coração das fêmeas Mas<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ , Tabela 2 e Fig. 6). Além disso, as fêmeas Mas<sup>-/-</sup> também apresentaram diminuição da dimensão interna do VE na diástole e volume de ejeção reduzido em relação ao grupo Mas<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ , Tabela 2 e Fig. 6). Por outro lado, os machos Mas<sup>-/-</sup> exibiram um aumento na dimensão interna do VE na sístole e na diástole, bem como maiores volumes sistólico e diastólico finais em relação aos animais Mas<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ , Tabela 2). A avaliação da velocidade das ondas de enchimento diastólico mostrou aumento da onda E de enchimento inicial nos machos Mas<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ , Tabela 2), porém não foram encontradas alterações na onda A de enchimento tardio nem na razão E/A. Apesar das alterações morfológicas descritas nos corações de machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>, ambos apresentaram redução do débito cardíaco ( $p < 0,05$ , Tabela 2).

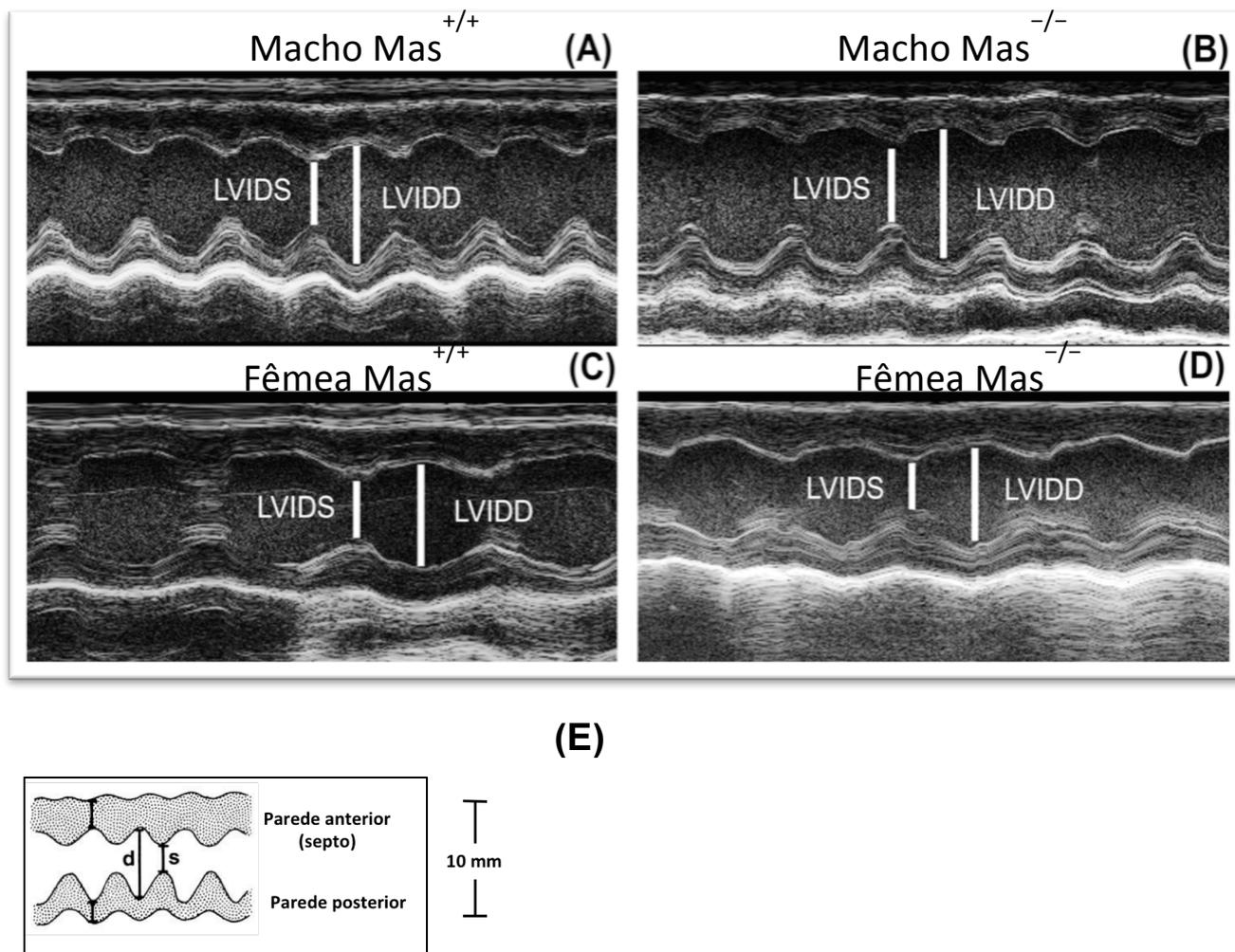


**Figura 5:** Função cardíaca em machos e fêmeas *Mas*<sup>-/-</sup>. Fração de encurtamento **A** e Fração de ejeção **B**; calculados a partir dos parâmetros ecocardiográficos obtidos em camundongos machos e fêmeas *Mas*<sup>-/-</sup> e *Mas*<sup>+/+</sup> anestesiados. \**p*<0.05 vs. *Mas*<sup>+/+</sup> do mesmo sexo; (n=12 machos *Mas*<sup>+/+</sup> e *Mas*<sup>-/-</sup>; n=8 fêmeas *Mas*<sup>+/+</sup> e *Mas*<sup>-/-</sup>).

**Tabela 2: Parâmetros ecocardiográficos obtidos em machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>**

	Machos		Fêmeas	
	+/+	-/-	+/+	-/-
	n = 12	n = 12	n = 8	n = 8
Peso corporal. g	32.0 ± 0.51	30.8 ± 0.82	29.1 ± 0.93	28.3 ± 0.71
Espessura da parede posterior na diástole. mm	0.84 ± 0.04	0.73 ± 0.02*	0.74 ± 0.0†	0.83 ± 0.02*†
Espessura da parede posterior na sístole. mm	1.07 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.14 ± 0.08	1.17 ± 0.05†
Espessura do septo interventricular na diástole. mm	0.74 ± 0.05	0.76 ± 0.05	0.73 ± 0.02	0.75 ± 0.04
Espessura do septo interventricular na sístole. mm	1.08 ± 0.08	1.07 ± 0.06	1.08 ± 0.06	1.15 ± 0.04
Dimensão interna do VE na sístole. mm	2.63 ± 0.09	2.94 ± 0.11*	2.43 ± 0.15	2.47 ± 0.06†
Dimensão interna do VE na diástole. mm	4.00 ± 0.05	4.17 ± 0.08*	3.87 ± 0.06†	3.62 ± 0.04*†
Volume sistólico final. µL	28.5 ± 2.49	35.2 ± 3.0*†	21.0 ± 2.3†	22.8 ± 1.5†
Volume diastólico final. µL	69.8 ± 3.44	80.0 ± 4.0*	59.4 ± 3.2†	56.1 ± 1.5†
Velocidade de enchimento mitral inicial (E,mm/s)	602.7 ± 42	706 ± 38*	613 ± 49	521 ± 31
Razão E/A (A, enchimento ativo na systole atrial)	1.57 ± 0.06	1.82 ± 0.15	1.64 ± 0.13	1.77 ± 0.22
Peso do coração /Peso corporal	0.45 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.02
Volume sistólico. µL	43.0 ± 2.3	45.8 ± 2.7	38.3 ± 1.2	33.2 ± 1.7*†
Frequência cardíaca. bpm	443 ± 8	415 ± 16	416 ± 16	433 ± 12
Débito cardíaco. mL/min	20.0 ± 0.9	17.6 ± 0.6*	16.0 ± 0.9†	14.1 ± 0.8*†

Ecocardiograma transtorácico realizado em camundongos anestesiados com isoflurano (\* $p < 0.05$  vs. Mas<sup>-/-</sup> mesmo sexo; † $p < 0.05$  vs. machos do mesmo genótipo).



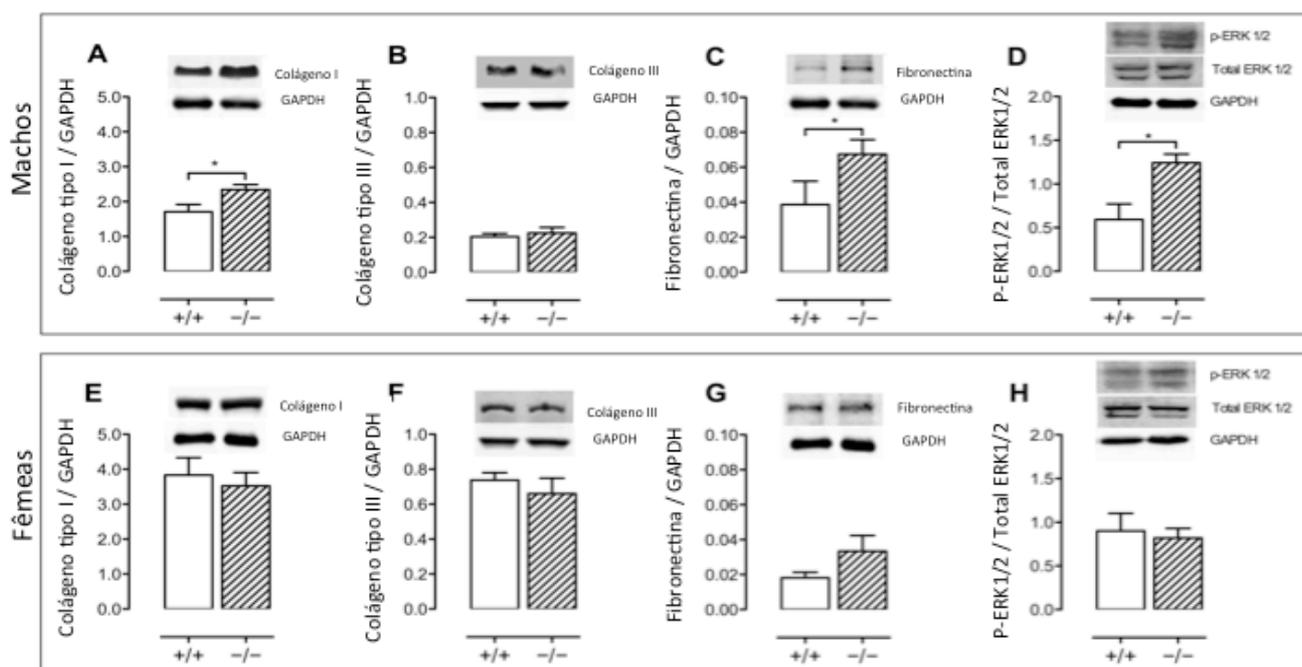
**Figura 6:** Representação ecocardiográfica (modo M) da contração cardíaca nos animais machos Mas<sup>+/+</sup>, A; machos Mas<sup>-/-</sup>, B; fêmeas Mas<sup>+/+</sup>, C; e Fêmeas Mas<sup>-/-</sup>, D. Em E, representamos a escala para as medidas de A, B, C e D; LVIDS: dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole; LVIDD: dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole. As fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentam diminuição da LVIDD (comparar C e D), enquanto os machos Mas<sup>-/-</sup> apresentam aumento de LVIDD e LVIDS (comparar A e B); \*p<0.05, Tabela 2.

### 5.1.3 Avaliação da expressão diferencial de proteínas da matriz extracelular e dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no coração de machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>

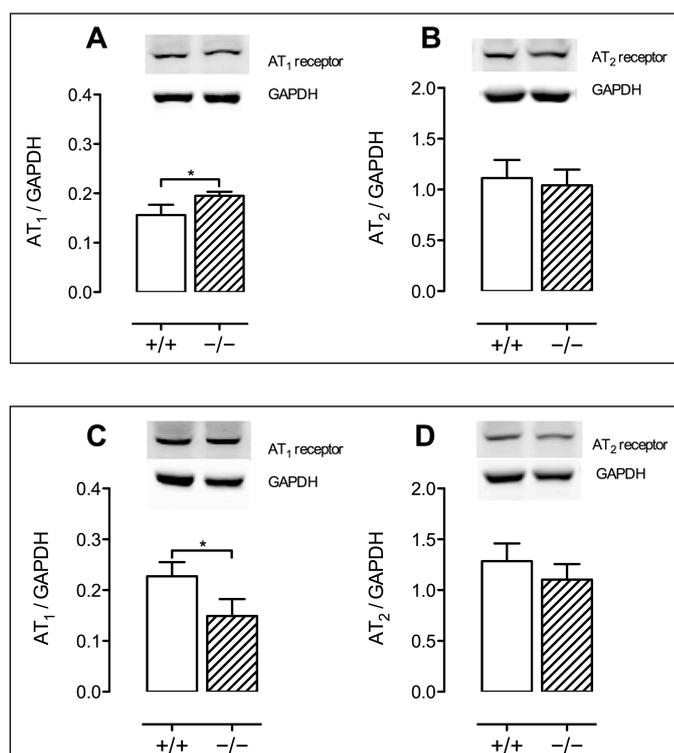
Para investigar os mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca observada em machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> avaliamos por meio da técnica de Western Blotting a expressão de proteínas envolvidas no processo de fibrose do miocárdio, bem como a expressão dos receptores para Ang II AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>.

A figura 7 revela níveis aumentados de Colágeno do tipo I e Fibronectina no coração de machos Mas<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ; Figure 7-A e 7-C), sugerindo que a disfunção cardíaca observada nesses animais esteja relacionada com um processo de fibrose do miocárdio. Além disso, o aumento da expressão do receptor AT<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ; Figuras 8-A) e da ativação da via ERK1/2-MAP-quinase ( $p < 0,05$ ; Figura 7-D) sugere que essa possa ser a principal via pró-fibrótica envolvida. Esse processo parece ser independente do receptor AT<sub>2</sub> (Figura 8-B) e não envolve aumento da expressão de colágeno tipo III (Figura 7-B).

Por outro lado, a disfunção cardíaca observada nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup> não parece estar relacionada com a ocorrência de fibrose (Figuras 7-E,F,G,H), sugerindo o envolvimento de outros mecanismos, como possíveis alterações nas expressão/atividade de proteínas contráteis. Ao contrário do que foi observado nos machos Mas<sup>-/-</sup>, as fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentaram diminuição na expressão dos receptores AT<sub>1</sub>, sem diferenças na expressão de AT<sub>2</sub> (Figuras 8-C e 8-D).



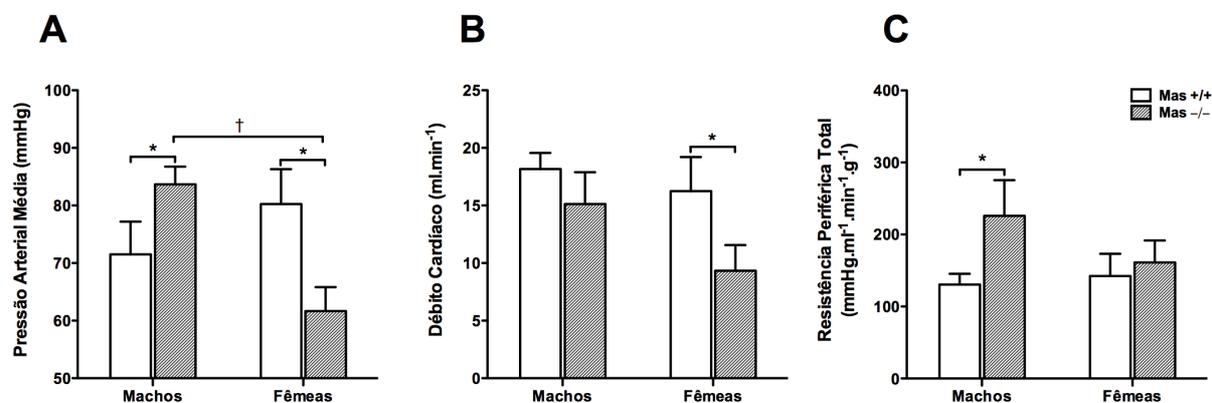
**Figura 7:** Análise da expressão de proteínas cardíacas feita por Western blot. Colágeno tipo I; Colágeno tipo III; Fibronectina; ERK1/2-fosforilada e ERK1/2-total, respectivamente, em: machos (A, B, C e D) e fêmeas (E, F, G e H)  $Mas^{-/-}$  e  $Mas^{+/+}$ . \* $p < 0.05$  vs.  $Mas^{+/+}$  (n=4-6 animais em cada grupo).



**Figura 8:** Análise da expressão cardíaca de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> feita por Western blot: machos (A e B) e fêmeas (C e D) *Mas*<sup>-/-</sup> e *Mas*<sup>+/+</sup>. \**p*<0.05 vs. *Mas*<sup>+/+</sup> (n=4-6 animais em cada grupo).

#### 5.1.4 Diferenças sexuais na Resistência Periférica Total (RPT) de camundongos Mas<sup>-/-</sup>

Dando continuidade aos experimentos, avaliamos os efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função hemodinâmica e possível repercussão sobre a PA. Para esse objetivo realizamos medidas in vivo utilizando microesferas fluorescentes. Os resultados apresentados na figura 9 demonstram que elevação na PA dos machos Mas<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ; Fig. 9-A) foi acompanhada por um aumento da RPT (Mas<sup>-/-</sup>:  $226 \pm 50$  vs. Mas<sup>+/+</sup>:  $131 \pm 15$  mmHg.ml<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ; Fig. 9-C); porém, sem alterações no débito cardíaco (Fig. 9-B). Por outro lado, a diminuição da PA observada nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup> foi acompanhada por uma redução expressiva de 44% no débito cardíaco (Mas<sup>-/-</sup>:  $9.3 \pm 2.2$  vs. Mas<sup>+/+</sup>:  $16.3 \pm 3.0$  ml/min;  $p < 0,05$ ; Fig.9-A e 9-B), porém sem alterações na RPT (Fig.9-C). Confirmando os dados obtidos na ecocardiografia, a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos utilizando as microesferas fluorescentes também indicou uma redução do volume sistólico nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup> (Tabela 3) sem alteração na frequência cardíaca dos animais anestesiados (Tabela 3).



**Figura 9:** Parâmetros hemodinâmicos obtidos em camundongos Mas<sup>-/-</sup> anestesiados. Pressão arterial média obtida por medida direta na artéria femoral, **A**; Débito cardíaco, **B** e Resistência Periférica Total (RPT), **C**; obtidos em machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> e Mas<sup>+/+</sup>. \*  $p < 0,05$  vs. Mas<sup>+/+</sup> do mesmo sexo; †  $p < 0,05$  vs. machos do mesmo genótipo. (n=6 machos Mas<sup>+/+</sup> e Mas<sup>-/-</sup>; n=5 fêmeas Mas<sup>+/+</sup>; n=6, fêmeas Mas<sup>-/-</sup>).

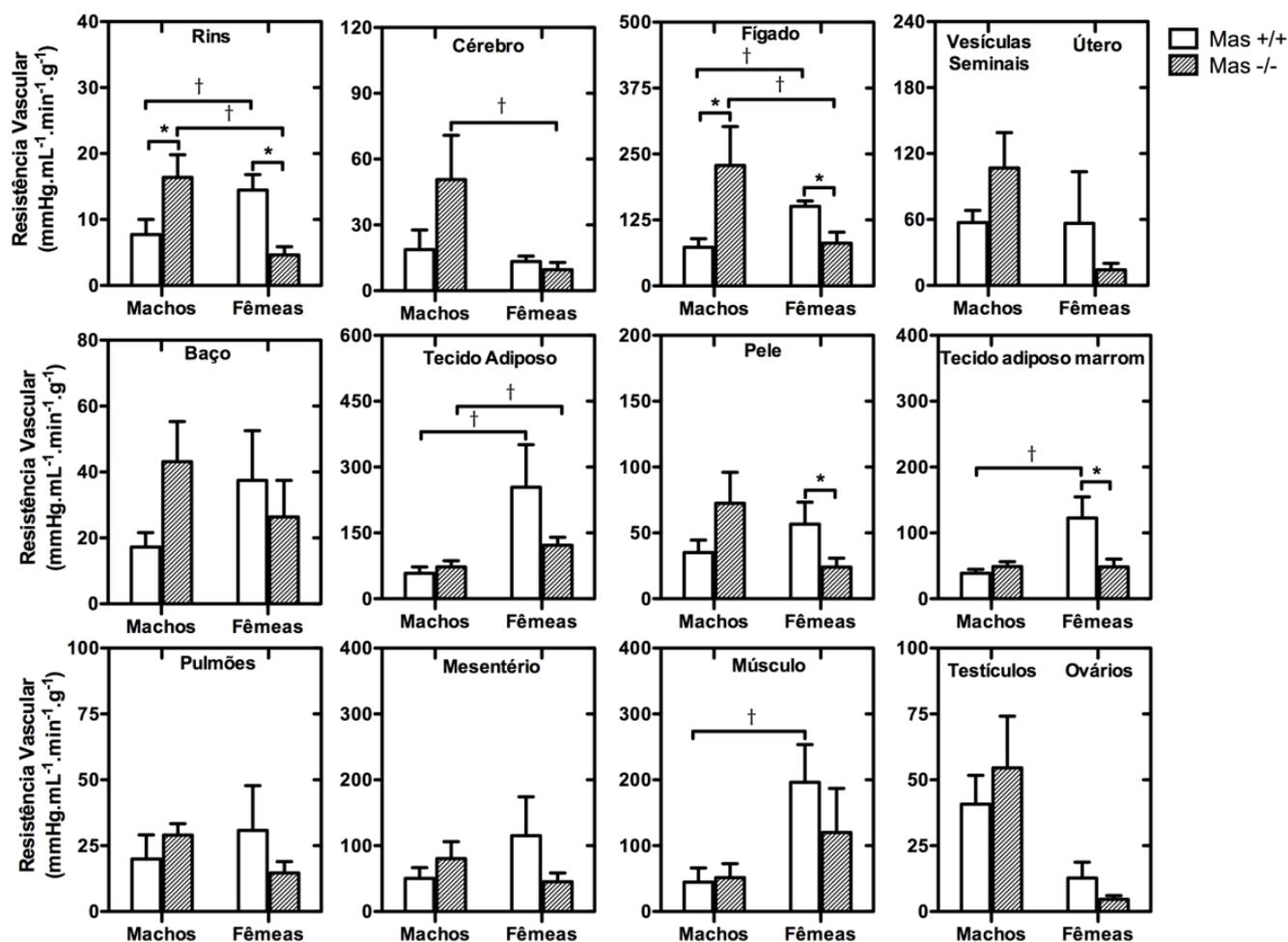
**Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos em camundongos Mas<sup>-/-</sup>**

	Machos		Fêmeas	
	+/+	-/-	+/+	-/-
Volume sistólico. $\mu\text{L}$	$34.0 \pm 4.0$	$25.9 \pm 4.5$	$31.5 \pm 7.0$	$15.8 \pm 4.0^*$
Índice cardíaco. mL/min/g	$0.57 \pm 0.05$	$0.49 \pm 0.09$	$0.62 \pm 0.08$	$0.34 \pm 0.1^*$
Frequência cardíaca. bpm	$551 \pm 31$	$583 \pm 14$	$535 \pm 31$	$494 \pm 13$

\* $p < 0,05$  vs. Mas<sup>+/+</sup> do mesmo sexo.

### 5.1.5 A deleção gênica do receptor Mas provoca alterações opostas na resistência vascular local de machos e fêmeas

Os efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a resistência vascular e o fluxo sanguíneo regional foram avaliados em diferentes órgãos e tecidos. Novamente, machos e fêmeas  $Mas^{-/-}$  apresentaram alterações opostas sobre as variáveis analisadas. Assim, enquanto os machos  $Mas^{-/-}$  exibiram aumento da resistência vascular local medida nos rins e fígado, as fêmeas  $Mas^{-/-}$  apresentaram diminuição da resistência vascular nesses dois locais e ainda na pele e tecido adiposo marrom (TAM) ( $p < 0,05$ ; Fig. 10). De forma correspondente, um fluxo sanguíneo aumentado foi observado nos rins, TAM, baço e músculo das fêmeas  $Mas^{-/-}$ , enquanto os machos apresentaram diminuição do fluxo sanguíneo no cérebro e baço ( $p < 0,05$ ; Tabela 4). Além disso, a resistência vascular e o fluxo sanguíneo foram medidos nos pulmões, adrenais, mesentério, ovários, testículos, vesículas seminais e útero, demonstrando uma tendência global para aumento da resistência nos machos e diminuição nas fêmeas  $Mas^{-/-}$ .



**Figura 10:** Resistência vascular regional em diferentes órgãos e tecidos de camundongos *Mas*<sup>-/-</sup> anestesiados. \* $p < 0,05$  vs. *Mas*<sup>+/+</sup> do mesmo sexo; † $p < 0,05$  vs. machos do mesmo genótipo; (n=6 machos *Mas*<sup>+/+</sup> e *Mas*<sup>-/-</sup>, n=5 fêmeas *Mas*<sup>+/+</sup>, n=6, fêmeas *Mas*<sup>-/-</sup>).

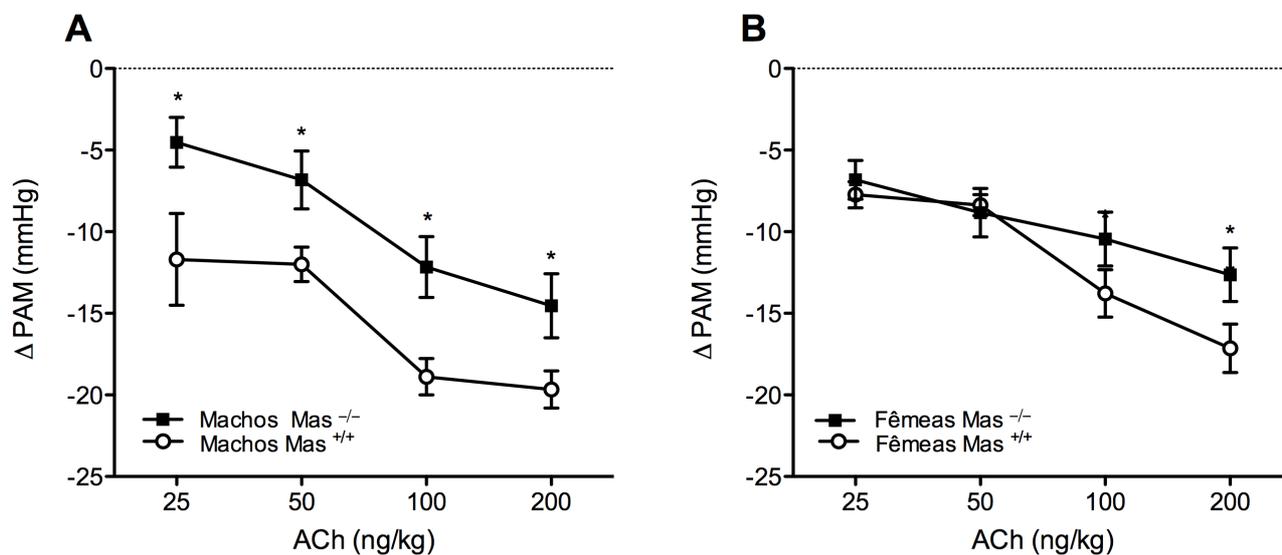
**Tabela 4: Fluxo Sanguíneo Regional em camundongos Mas<sup>-/-</sup>**

Fluxo sanguíneo local (mL.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Machos		Fêmeas	
	+/+	-/-	+/+	-/-
Rins	9.49 ± 1.82	6.25 ± 1.36	4.92 ± 1.62 <sup>†</sup>	19.33 ± 4.75 <sup>*†</sup>
Cérebro	14.31 ± 6.13	3.65 ± 0.97 <sup>*</sup>	8.98 ± 1.27	9.61 ± 2.39 <sup>†</sup>
Fígado	2.32 ± 1.42	0.84 ± 0.28	0.40 ± 0.13	1.51 ± 0.72
Pele	3.44 ± 1.52	1.47 ± 0.37	1.51 ± 0.06	2.88 ± 0.83
Tecido adiposo branco	1.74 ± 0.57	1.07 ± 0.12	0.51 ± 0.19	0.63 ± 0.19 <sup>†</sup>
Tecido adiposo marrom	1.90 ± 0.31	1.59 ± 0.16	0.80 ± 0.30 <sup>†</sup>	1.70 ± 0.39 <sup>*</sup>
Pulmões	4.93 ± 1.57	3.23 ± 0.63	5.41 ± 2.00	6.52 ± 1.67 <sup>†</sup>
Baço	4.82 ± 0.77	2.62 ± 0.57 <sup>*</sup>	2.25 ± 0.88 <sup>†</sup>	5.28 ± 1.27 <sup>*†</sup>
Mesentério	5.74 ± 3.80	1.47 ± 0.30	0.87 ± 0.35	2.15 ± 0.78
Testículos	2.85 ± 1.12	1.00 ± 0.52	/	/
Ovários	/	/	21.31 ± 12.07	21.88 ± 6.08
Vesículas Seminais	2.50 ± 1.25	1.28 ± 0.35	/	/
Útero	/	/	1.87 ± 1.56	6.60 ± 3.41
Músculo	3.27 ± 1.08	2.54 ± 0.61	0.39 ± 0.21 <sup>†</sup>	1.31 ± 0.27 <sup>*</sup>

Valores apresentados como a média ± desvio padrão da média. \*  $p < 0,05$  vs. Mas<sup>+/+</sup> do mesmo sexo, <sup>†</sup> $p < 0,05$  vs. machos do mesmo genótipo.

### 5.1.6 Diferenças sexuais na função endotelial de camundongos Mas<sup>-/-</sup>

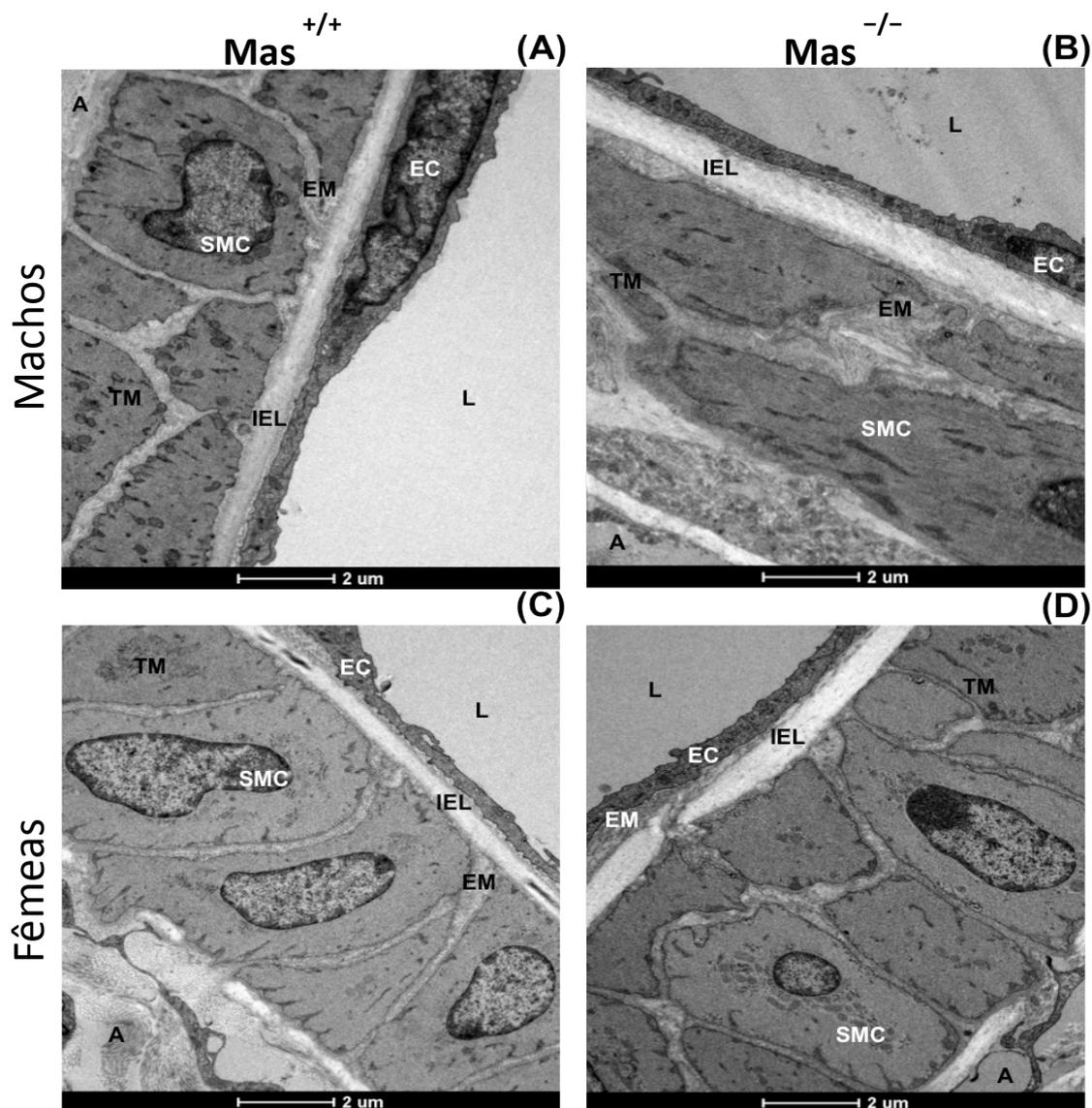
Para avaliar as consequências da deleção gênica do receptor Mas sobre a função endotelial foi medida a reatividade vascular em camundongos machos e fêmeas não anestesiados. A resposta vasodilatadora à injeção intra-aórtica de acetilcolina (Ach) apresentou-se diminuída nos animais Mas<sup>-/-</sup> de ambos os sexos ( $p < 0,05$ ; Fig. 11). Porém, a diminuição dessa resposta vasodilatadora dependente de endotélio se mostrou expressivamente mais acentuada nos machos Mas<sup>-/-</sup>, visto que esses apresentaram uma redução significativa da vasodilatação induzida por todas as quatro doses de Ach utilizada, enquanto para as fêmeas Mas<sup>-/-</sup> a redução só foi significativa para a dose mais elevada de Ach.



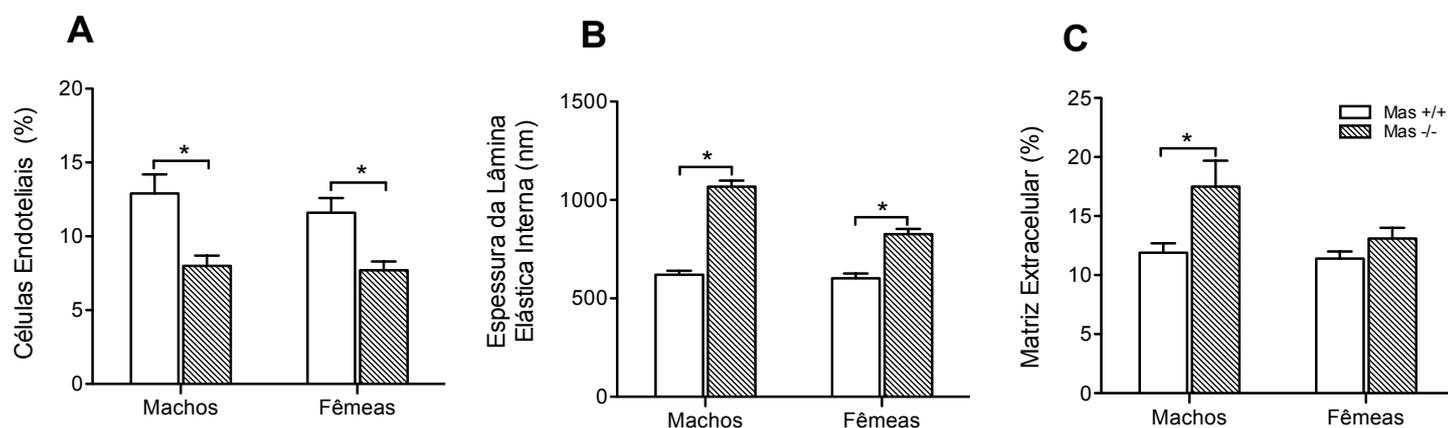
**Figura 11:** Função endotelial em machos e fêmeas *Mas*<sup>-/-</sup> não anestesiados. Resposta vascular às concentrações crescentes de Acetilcolina em machos, **A** e fêmeas, **B**. \* $p < 0.05$  vs. *Mas*<sup>+/+</sup> do mesmo sexo (n=5 machos *Mas*<sup>+/+</sup> e *Mas*<sup>-/-</sup>; n=6 fêmeas *Mas*<sup>+/+</sup> e *Mas*<sup>-/-</sup>).

### 5.1.7 Diferenças sexuais nas alterações provocadas pela deleção gênica do receptor Mas na ultraestrutura da parede arterial

Para investigar os mecanismos responsáveis pelas diferenças sexuais na resistência vascular regional e na função endotelial dos animais Mas<sup>-/-</sup> foi analisada a ultraestrutura das artérias mesentéricas por microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 12). Machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução na densidade correspondente à camada de células endoteliais ( $p < 0,05$ ; Fig. 13-A). A lâmina elástica interna apresentou-se regular e contínua em todos os grupos, porém, camundongos Mas<sup>-/-</sup> de ambos os sexos apresentaram um aumento em sua espessura comparada ao grupo Mas<sup>+/+</sup> ( $p < 0,05$ ; Fig. 13-B). A túnica média apresentou-se como duas camadas de células musculares lisas dispostas circunferencialmente. As fotomicrografias não revelaram células musculares lisas fragmentadas ou vacúolos intracelulares em nenhum grupo analisado. Diferenças sexuais também foram verificadas no conteúdo de ME que estava aumentado apenas nos machos Mas<sup>-/-</sup> ( $p < 0,05$ ; Fig. 13-C).



**Figura 12:** Fotomicrografia da parede da artéria mesentérica de machos  $Mas^{+/+}$  (A), machos  $Mas^{-/-}$  (B), fêmeas  $Mas^{+/+}$  (C) e fêmeas  $Mas^{-/-}$  (D); aumento = 6000 X. *Endothelial cells*, EC; *adventitia*, A; *vessel lumen*, L; *internal elastic lamina*, IEL; *smooth muscle cells*, SMC; *tunica media*, TM, *extracellular matrix*, EM.

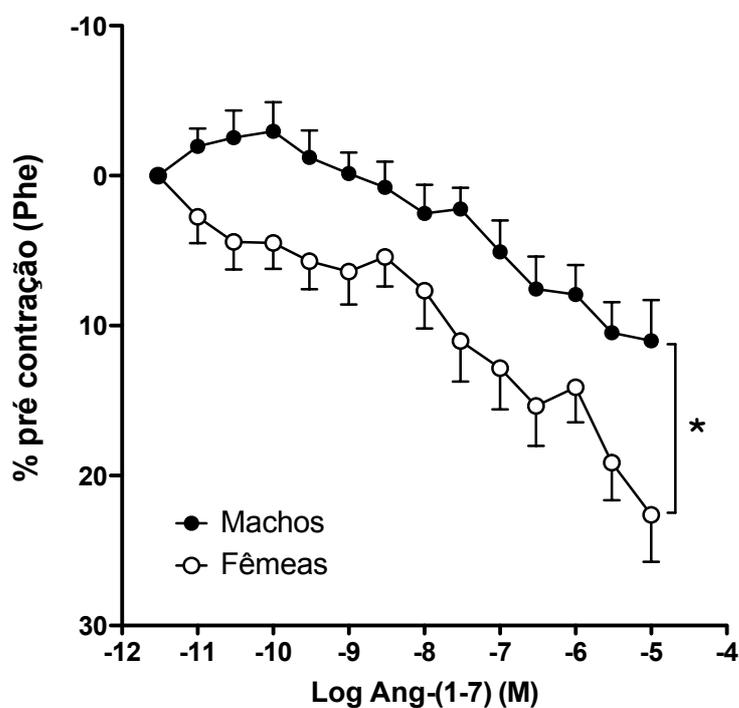


**Figura 13:** Análise morfométrica da parede da artéria mesentérica de camundongos  $Mas^{-/-}$ . Densidade da camada de células endoteliais, **A**; Espessura da lâmina elástica interna, **B**; Densidade da matriz extracelular, **C**; \* $p < 0.05$  vs.  $Mas^{+/+}$  do mesmo sexo; † $p < 0.05$  vs. machos do mesmo genótipo (n=3 machos  $Mas^{+/+}$  e  $Mas^{-/-}$ ; n=3 fêmeas  $Mas^{+/+}$  e  $Mas^{-/-}$ ).

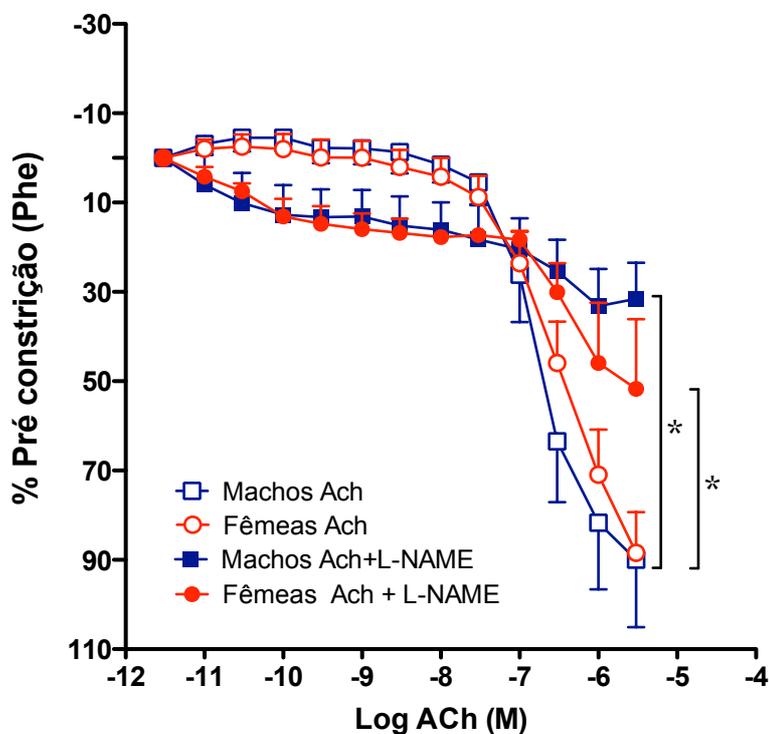
## **5.2 Parte 2: Diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7)**

### **5.2.1 A Ang-(1-7) provocou maior relaxamento nas artérias renais de fêmeas**

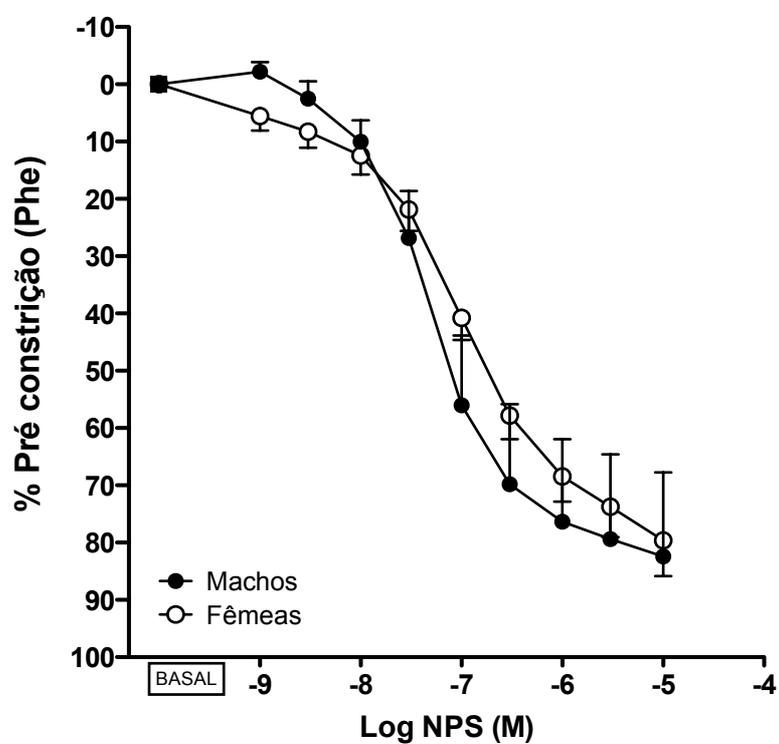
Os vasos das fêmeas apresentaram maior relaxamento em resposta à Ang-(1-7) em comparação aos vasos dos machos (fêmeas Emax:  $26,7 \pm 3,8$  vs. machos  $15,4 \pm 2,8$  machos;  $p < 0,05$ ; Fig. 14). Por outro lado, a curva dose-resposta para ACh foi semelhante para ambos os sexos (Fig. 15), sugerindo que as diferenças observadas na resposta vasodilatadora mediada pela Ang-(1-7) (Fig. 14) não sejam decorrentes de diferenças na capacidade intrínseca de relaxamento dependente do endotélio dos machos e das fêmeas. O tratamento com inibidor seletivo da NO sintase, L-N-nitroarginina metil ester (L-NAME,  $10^{-4}$  mol/l por 15 minutos) reduziu de forma semelhante o relaxamento induzido pela ACh em machos e fêmeas ( $p < 0,05$ ; Fig. 15). Também não foram observadas diferenças sexuais no relaxamento independente do endotélio induzido pelo SNP (Fig. 16).



**Figura 14:** Curva dose-resposta da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal de camundongos machos e fêmeas. Foram utilizados vasos com endotélio preservado, e estes foram pré-contraídos com fenilefrina (n = 26 machos e n = 22 fêmeas FVB/N). As arteríolas das fêmeas apresentam maior relaxamento em resposta à Ang-(1-7); \*p<0.05.



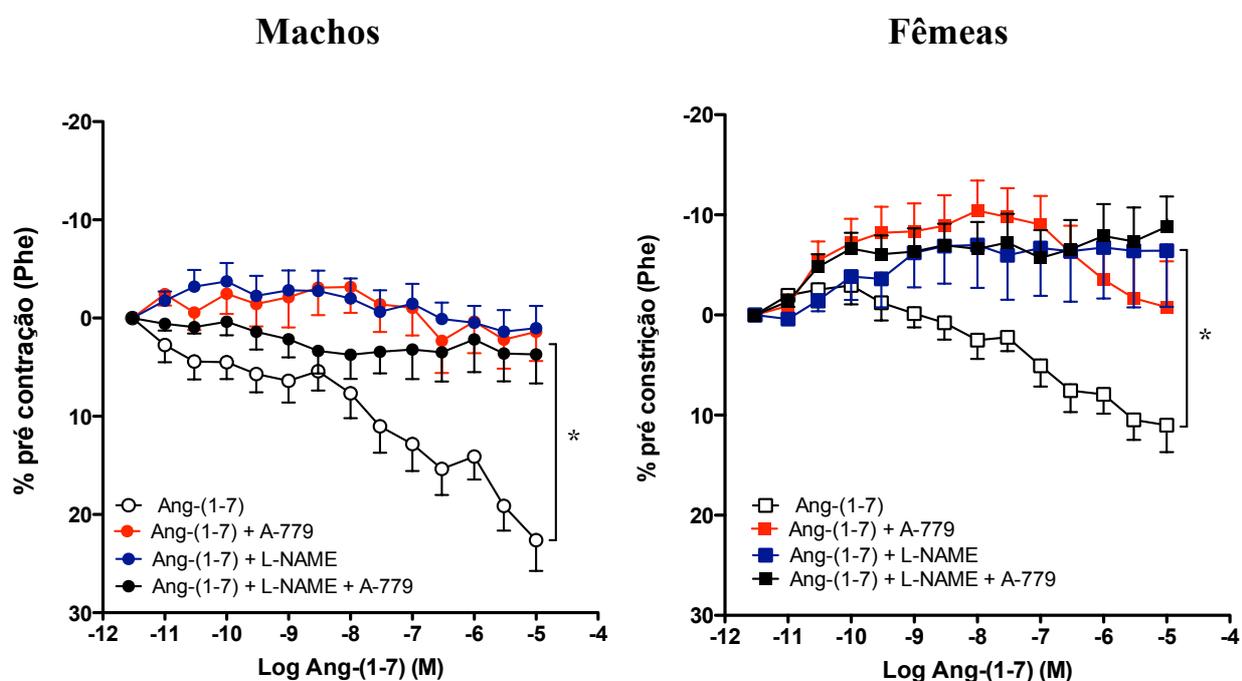
**Figura 15:** Curva dose-resposta da Acetilcolina (ACh) em artéria interlobar renal de camundongos machos e fêmeas. Foram utilizados vasos com endotélio preservado, e estes foram pré-contraídos com fenilefrina. Parte dos vasos foram incubados com L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) (n=8 machos e 8 fêmeas) ou permaneceram sobre condições controle (n=12 machos e 16 fêmeas). O relaxamento induzido pela ACh foi semelhante em machos e fêmeas, e o tratamento com L-NAME reduziu a resposta máxima da ACh em ambos os grupos. \*p<0.05.



**Figura 16:** Curva dose-resposta de nitroprussiato de sódio (NPS) em artéria interlobar renal de camundongos machos e fêmeas. Foram utilizados vasos com endotélio preservado, e estes foram pré-contraídos com fenilefrina. (n = 6 machos e n = 11 fêmeas FVB/N). As arteríolas de machos e fêmeas apresentam relaxamento semelhante.

### **5.2.2 Participação do receptor Mas nas diferenças sexuais observadas no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na artéria interlobar renal de camundongos**

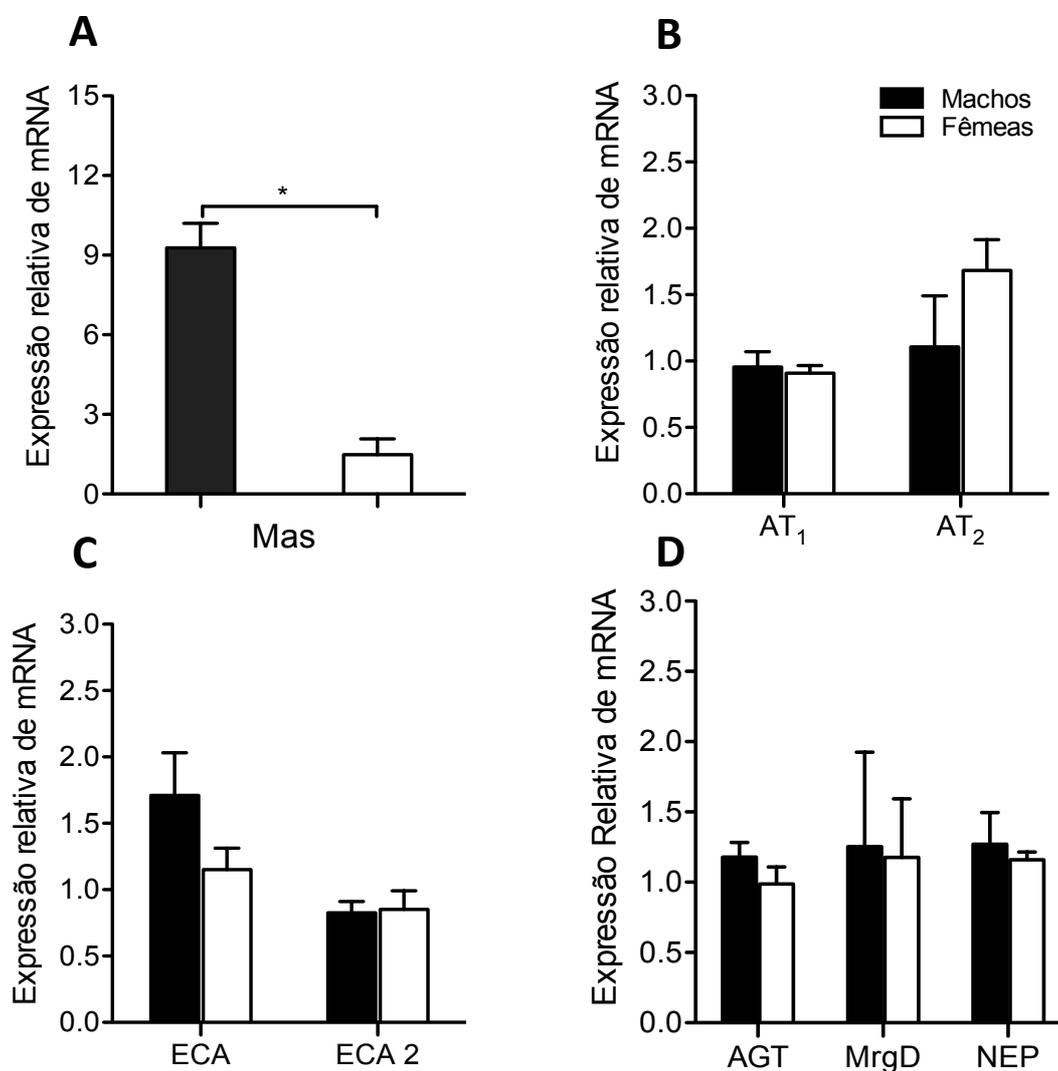
Em fêmeas o bloqueio do receptor Mas pelo antagonista A77-9 aboliu o relaxamento induzido pela Ang-(1-7) (Emax Ang-(1-7):  $26,7 \pm 4$  vs. Ang-(1-7) + A77-9:  $1,39 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ ). Nos machos, o tratamento com A77-9 além de abolir o relaxamento induzido pela Ang-(1-7), provocou uma resposta contrátil sobre as artérias interlobares, como pode ser observado na Figura 17 (Emax Ang-(1-7):  $15,4 \pm 3$  vs. Ang-(1-7) + A77-9:  $-3,18 \pm 2,16$ ,  $p < 0,05$ ).



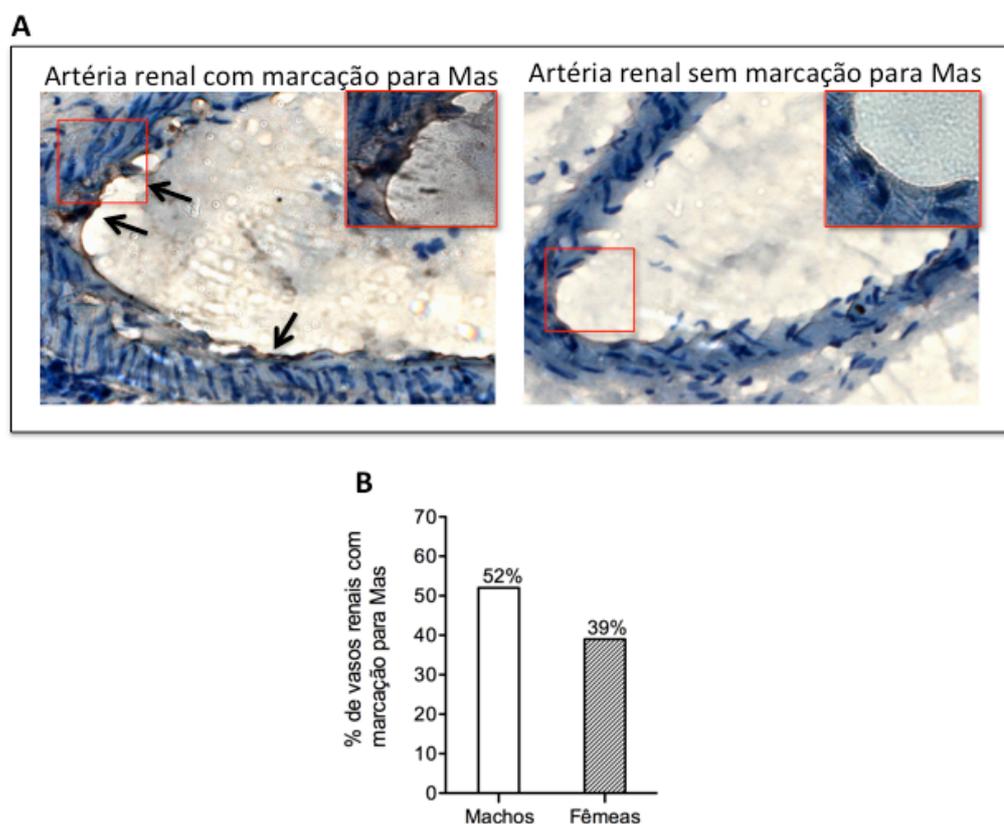
**Figura 17:** Curva dose-resposta da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal de camundongos machos (esquerda) e fêmeas (direita). Foram utilizados vasos com endotélio preservado, e estes foram pré-contraídos com fenilefrina (n = 26 machos e n = 22 fêmeas). Parte dos vasos foi incubada com o antagonista seletivo do receptor Mas, A-779 (n = 33 machos e n = 14 fêmeas); outra parte foi incubada com L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) (n=13 machos e 11 fêmeas) ou com a associação A-779 + L-NAME (n=10 machos e 9 fêmeas). Em machos e fêmeas todos os três tratamentos (A-779, L-NAME ou A-779 + L-NAME) aboliram o efeito vasodilatador da Ang-(1-7); \*p<0.05.

### **5.2.3 Maior expressão do receptor Mas na artéria interlobar renal de machos**

As artérias extraídas dos rins de camundongos machos apresentaram expressivo aumento nos níveis de RNAm que codifica o receptor Mas (Fig. 18-A;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, a expressão de ECA, ECA 2, AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AGT, NEP e MrgD foi semelhante em ambos os sexos (Fig. 18-B,C,D). O aumento do RNAm para Mas observado nos vasos renais dos machos foi acompanhado por uma maior expressão desse receptor, como mostrado pela técnica de imuno-histoquímica (Fig. 19).



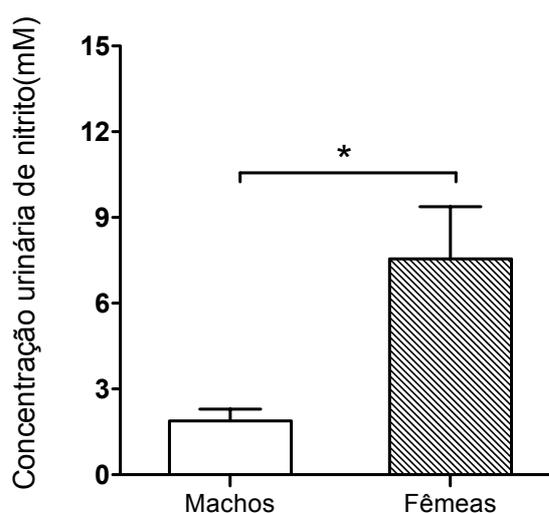
**Figura 18:** Expressão gênica dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) por PCR em tempo real na artéria interlobar renal de camundongos machos e fêmeas. O receptor Mas, **A**; Receptores para Angiotensina II AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, **B**; Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e ECA 2, **C**; Angiotensinogênio (AGT), MrgD, (receptor D da família dos receptores ligados à proteína G semelhantes ao Mas) e NEP (endopeptidase neutra), **D**. (n=16 machos e 16 fêmeas); \*p<0.05.



**Figura 19:** Marcação do receptor Mas pela técnica de imuno-histoquímica em artérias renais de camundongos. Fotografias representativas mostrando artérias com e sem marcação para o receptor Mas, A. Porcentagem de vasos com marcação para o receptor Mas em camundongos machos e fêmeas FVB/N, B. Aumento usado para fotografia: 400X para a imagem maior e 1000X para o detalhe destacado dentro do quadrado vermelho. As setas destacam a marcação para o receptor Mas; n=3 por grupo, aproximadamente 40 vasos foram analisados em cada grupo.

#### 5.2.4 Maior ativação da via óxido nitrérgica nas fêmeas

Foram encontrados níveis urinários elevados de nitrito nas fêmeas (Fig. 20), sugerindo que a maior produção de NO esteja relacionada ao maior efeito vasodilatador exercido pela Ang-(1-7) nos vasos renais.



**Figura 20:** Concentração urinária de nitrito em camundongos FVB/N machos e fêmeas. (n=8 machos e 11 fêmeas); \*p<0.05

***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo a fornecer uma visão global sobre a participação do eixo Ang-(1-7)/Mas na função cardiovascular específica de machos e fêmeas. Em conjunto, os resultados demonstram como o SRA pode influenciar diferentemente as variáveis hemodinâmicas que determinam a PA em cada sexo. Dentre os principais achados desse estudo destaca-se o efeito oposto provocado pela deleção gênica do receptor Mas sobre a PA de camundongos machos e fêmeas. Inicialmente essa descoberta contraria a hipótese proposta nesse trabalho, na qual a deleção gênica do receptor Mas provocaria efeitos ainda mais severos sobre o sistema cardiovascular das fêmeas em relação aos efeitos previamente descritos para os machos Mas<sup>-/-</sup> (hipertensão e disfunção endotelial). A partir dessa descoberta vários experimentos foram realizados para investigar as alterações hemodinâmicas, bem como os mecanismos celulares relacionados à diminuição da PA observada na fêmea Mas<sup>-/-</sup>.

Em resumo, a diminuição da PA provocada pela deleção gênica do receptor Mas nas fêmeas FVB/N resulta de uma disfunção cardíaca grave associada a uma diminuição da resistência vascular em importantes órgãos como rins, fígado e pele. Por outro lado, os machos Mas<sup>-/-</sup> apresentaram aumento da PA, confirmando dados anteriores de Xu e colaboradores (2008). Nossos resultados sugerem que o aumento da PA nos machos Mas<sup>-/-</sup> seja decorrente de uma deposição aumentada de ME tanto no coração como na parede das artérias resultando em fibrose cardíaca, aumento da RPT e disfunção endotelial.

Diferenças sexuais também foram encontradas sobre o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) *in vitro*. Demonstramos que as artérias interlobares renais de fêmeas FVB/N apresentam maior relaxamento induzido pela Ang-(1-7). Esse efeito é decorrente da maior ativação da via óxido nítrico mediada pelo receptor Mas nas fêmeas.

Em conjunto, nossos resultados destacam a gama de diferenças existentes entre o SRA em machos e fêmeas com especial atenção para os componentes do eixo vasodilatador ECA 2/Ang-(1-7)/Mas. Essas diferenças sexuais reforçam a ideia de que os hormônios gonadais, bem como os cromossomos sexuais (XX e XY) influenciam significativamente a expressão e atividade dos componentes do SRA periférico e tecidual. Sendo que o último, por ser responsável pela formação local de grandes quantidades de Ang II e Ang-(1-7) em tecidos como rins e coração, se destaca na literatura atual sobre novas estratégias farmacológicas para o tratamento da hipertensão arterial.

Estudos demonstram que a Ang-(1-7) exerce um importante papel na regulação da PA no sexo feminino, especialmente em situações que desafiem o equilíbrio do SRA, como modelos de hipertensão, administração de Ang II ou tratamento com bloqueadores do receptor  $AT_1$  (SULLIVAN *et al.*, 2010; ZIMMERMAN; HARRIS; SULLIVAN, 2014). Entretanto, a contribuição do eixo Ang-(1-7)/Mas para o controle fisiológico da PA nas fêmeas ainda é pouco conhecido (BHATIA; ZIMMERMAN; SULLIVAN, 2013; PENDERGRASS *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, as diferenças na PA de camundongos  $Mas^{-/-}$  foram observadas inicialmente por medida indireta (pletismografia de cauda), sendo posteriormente confirmadas por telemetria. O aumento da PA observado nos machos  $Mas^{-/-}$  está de acordo com trabalhos anteriores que também utilizaram camundongos FVB/N (SANTOS, S. H. S. *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008a). Em relação às fêmeas FVB/N  $Mas^{-/-}$ , este é o primeiro estudo a descrever uma diminuição nos valores basais de PA. Trabalhos anteriores utilizando fêmeas C57BL/6  $Mas^{-/-}$  não encontraram alterações na PA, apenas na variabilidade da frequência cardíaca (WALTHER, T *et al.*, 2000) e na resistência à hipertensão induzida por ingestão de sal (HERINGER-

WALTHER *et al.*, 2012). Assim, a diminuição da PA nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  parece ser restrita ao *background* FVB/N.

A diminuição da PA observada nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  não representa uma resposta adaptativa favorável visto que está relacionada a alterações tanto na função cardíaca quanto na resistência vascular.

Importantes alterações morfológicas e funcionais foram observadas no coração dos animais com deleção gênica do receptor Mas, reforçando o papel cardioprotetor exercido pela Ang-(1-7). O coração das fêmeas  $Mas^{-/-}$  apresentou hipertrofia concêntrica caracterizada por um aumento da espessura da parede posterior do VE na diástole e diminuição da dimensão interna do VE. Estudos demonstram que essas alterações morfológicas estão normalmente associadas a uma redução da capacidade de relaxamento do miocárdio e da sua complacência, características que antecedem a ocorrência de disfunção diastólica (GROBAN *et al.*, 2012).

Alterações cardíacas semelhantes foram descritas em modelos de pós-menopausa, sugerindo que a deficiência de estrogênios possa contribuir para a disfunção cardíaca observada nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  (NIJENKAMP *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2014). Porém, níveis normais de estradiol foram observados nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  ( $Mas^{-/-}$ :  $12.3 \pm 2.2$  vs.  $Mas^{+/+}$ :  $11.7 \pm 2.9$  pg/ml; n=8) contrariando essa hipótese. Assim, a disfunção cardíaca observada nas fêmeas  $Mas^{-/-}$  parece ser causada pela perda do efeito protetor local exercido pela Ang-(1-7) via Mas, e não por alterações no perfil hormonal desses animais.

Os machos  $Mas^{-/-}$ , por sua vez, sofreram um remodelamento cardíaco específico, determinando dilatação do ventrículo esquerdo e redução da sua capacidade contrátil. Essas alterações descritas confirmam trabalhos anteriores que mostraram aumento da ativação simpática e disfunção cardíaca em machos,  $Mas^{-/-}$  C57BL/6 (SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2006; WALTHER, T *et al.*, 2000). Nesse sentido, o

coração dos machos  $Mas^{-/-}$  apresentou um perfil fibrótico com aumento dos níveis de colágeno tipo I e fibronectina, compatíveis com uma maior ativação da via ERK1/2-MAPK. Alterações semelhantes foram descritas no coração de camundongos  $Mas^{-/-}$  neonatos, descartando a possibilidade de uma resposta adaptativa aos níveis elevados de PA (GAVA *et al.*, 2012). Entretanto, as fêmeas  $Mas^{-/-}$  não apresentaram indícios de fibrose no miocárdio, levantando a necessidade de se investigar outros mecanismos relacionados à capacidade contrátil como a expressão das proteínas do manejo de cálcio envolvidas no acoplamento excitação-contração.

As discrepâncias encontradas nos parâmetros cardiovasculares dos machos e fêmeas  $Mas^{-/-}$  sugere que, diante da deleção gênica do receptor Mas, o SRA seja ativado de forma diferenciada nos dois sexos. Rabelo e colaboradores (2008) demonstraram que machos C57Bl/6  $Mas^{-/-}$  apresentam níveis normais de Ang I e Ang II, e que a atividade da renina plasmática também está preservada nesses animais. Em relação à expressão cardíaca de receptores de Ang II, nosso estudo mostrou um aumento para o  $AT_1$  nos machos  $Mas^{-/-}$  e uma diminuição desse receptor nas fêmeas  $Mas^{-/-}$ . Nesse sentido, uma maior ativação dos receptores  $AT_1$  pela Ang II explicaria o perfil fibrótico observado no coração dos machos  $Mas^{-/-}$ , enquanto as fêmeas  $Mas^{-/-}$ , com redução na expressão desse receptor não apresentaram acúmulo de colágeno ou fibronectina. Resultados semelhantes foram descritos por Guimarães e colaboradores (2012), confirmando a existência de um desequilíbrio que favorece a ativação dos receptores  $AT_1$  e reduz os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) nos machos  $Mas^{-/-}$ .

Estudos recentes demonstraram que em cardiomiócitos de ratos neonatos, o silenciamento do gene para o receptor Mas promoveu aumento da expressão de Sry e esse mecanismo parece envolver a ativação da via ERK1/2 e JNK (ALVES, 2014). Nesse mesmo trabalho, a transfecção do gene Sry em ratos promoveu aumento da PA. Nesse sentido, podemos sugerir que o aumento da PA observados nos machos

com deleção gênica do receptor Mas esteja relacionado a uma maior expressão do gene Sry. Essa ideia pode ser reforçada pela presença de uma maior ativação da via ERK1/2 no coração dos machos Mas<sup>-/-</sup>. Isso explicaria também a ausência desse efeito nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup>.

Em relação à expressão de AT<sub>2</sub> no coração dos camundongos Mas<sup>-/-</sup>, não foram encontradas diferenças, corroborando dados anteriores obtidos no ventrículo esquerdo e no fígado desses animais (GUIMARÃES *et al.*, 2012; SILVA, A. R. *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que a Ang-(1-7) tem um efeito protetor local contra o remodelamento cardíaco patológico, além do seu efeito anti-hipertrofico, desempenhando um importante papel na homeostase cardíaca (CASTRO, CARLOS H *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2010). O efeito cardioprotetor mediado pela Ang-(1-7) torna-se fundamental em condições patológicas como na hipertensão arterial e outras DCV (BADER, 2010).

Além do efeito cardioprotetor exercido Ang-(1-7), importante efeito vasodilatador foi descritor para esse peptídeo. Por conseguinte, avaliamos o efeito da deleção gênica do receptor Mas sobre a distribuição do débito cardíaco, a função endotelial e a estrutura vascular em machos e fêmeas. Em nosso estudo, apenas os machos Mas<sup>-/-</sup> apresentaram elevação da RPT, confirmando trabalhos anteriores (BOTELHO-SANTOS *et al.*, 2012). Nesse sentido, a elevação da PA observada nos machos Mas<sup>-/-</sup> parece resultar de uma dissociação entre disfunção cardíaca e elevação da RPT.

Enquanto a RPT é regulada principalmente por fatores extrínsecos como o sistema nervoso simpático e hormônios, a regulação do fluxo sanguíneo local nos órgão e tecidos é principalmente determinada por fatores intrínsecos que se originam a partir do próprio vaso e do tecido circundante (DAVIS; HILL, 1999). Assim, para termos uma visão integrada sobre o sistema vascular dos camundongos Mas<sup>-/-</sup>, avaliamos a

RV local, a função endotelial e a ultra-estrutura dos vasos de resistência. Novamente, importantes diferenças sexuais foram encontradas. Os machos  $Mas^{-/-}$  apresentaram aumento global da RV, disfunção endotelial (demostrada por uma resposta pressórica reduzida à Ach) e maior deposição de ME na parede arterial. Por outro lado, as fêmeas  $Mas^{-/-}$  apresentaram diminuição da RV, função endotelial preservada sem alterações significativas na deposição de ME nos vasos de resistência.

Esses achados nos permitem sugerir que, semelhante ao observado no coração, exista também nos vasos sanguíneos uma maior ativação do eixo vasoconstritor do SRA nos machos  $Mas^{-/-}$ . As fêmeas  $Mas^{-/-}$ , por sua vez, parecem possuir mecanismos redundantes que preservam a função endotelial mesmo na ausência do receptor Mas. Uma possibilidade seria a existência de uma conversão mais eficiente de Ang-(1-7) em outro peptídeo com propriedades vasodilatadoras semelhantes, como a Alamandina. A Alamandina, ou Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro, descoberta em 2013 por Lautner e colaboradores, está presente no sangue humano, e, assim como a Ang-(1-7), possui efeito vasodilatador e anti-hipertensivo. A Alamandina pode ser formada a partir da Angiotensina A por ação da ECA 2, ou a partir da Ang-(1-7), e exerce seus efeitos biológicos por meio da ligação ao seu receptor específico MrgD (*Mas-related G-protein-coupled receptor, member D*) (LAUTNER *et al.*, 2013). Até o momento não foram realizados estudos comparativos sobre a formação/ação da Alamandina em machos e fêmeas.

Com base nas diferenças encontradas na função e estrutura vascular de machos e fêmeas  $Mas^{-/-}$  partimos para um estudo mais aprofundado sobre as diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) e o papel do receptor Mas nesse processo. Para isso, na segunda etapa desse trabalho realizamos o estudo *in vitro* da ação da Ang-(1-7) em artérias interlobares renais extraídas de camundongos FVB/N machos e fêmeas. A escolha desse leito vascular para realização dos experimentos foi

baseada na relação direta existente entre a resistência vascular nas artérias interlobares e a PA (DERCHI *et al.*, 2005). Além disso, é conhecido que as mulheres apresentam uma relativa proteção contra o desenvolvimento de doenças renais, e esta proteção está associada à expressão diferencial de componentes do SRA (SILBIGER; NEUGARTEN, 2003). A técnica de reatividade vascular *in vitro* utilizando artérias interlobares de camundongos no miógrafo para pequenos vasos foi aprendida em 2013 durante doutorado sanduíche realizado junto ao grupo que primeiro relatou a existência de diferenças sexuais na resposta à Ang II nesse leito vascular (VIEGAS *et al.*, 2012).

Confirmando nossa hipótese, o efeito vasodilatador *in vitro* induzido pela Ang-(1-7) foi maior nas artérias interlobares extraídas das fêmeas. Esse efeito é mediado pelo receptor Mas visto que seu antagonista específico A-779 bloqueou a vasodilatação causada pela Ang-(1-7) em ambos os sexos. A incubação com L-NAME aboliu o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) demonstrando ser este mediado pela liberação de NO endotelial.

Nossos achados demonstram ainda que o efeito vasodilatador mais potente induzido pela Ang-(1-7) nas fêmeas não se deve a uma expressão aumentada do receptor Mas nas artérias interlobares. Ao contrário, as fêmeas apresentaram níveis reduzidos de RNAm para Mas e a imuno-histoquímica revelou menor porcentagem de vasos renais marcados para Mas em relação aos machos. A princípio esse dado parece se opor aos trabalhos que relatam níveis aumentados de Mas nos rins das fêmeas (SAMPSON; MORITZ; DENTON, 2012), entretanto, analisamos pela primeira vez a expressão de Mas nos vasos renais isolados, e não no tecido renal como um todo. A maior expressão de Mas nos vasos renais de machos pode ser decorrente de uma *up regulation* desses receptores, provavelmente como consequência de uma menor ativação da sua via efetora.

Nesse sentido, sugerimos que o efeito vasodilatador acentuado induzido pela Ang-(1-7) nas arteríolas renais das fêmeas seja decorrente de uma maior ativação da via óxido nítrico. Nesse sentido, estudos demonstram que as fêmeas possuem uma produção aumentada de NO (FORTE *et al.*, 1998), bem como maior atividade e expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (JI *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2003) em relação aos machos. Corroborando essa ideia, encontramos níveis aumentados de nitrito urinário nas fêmeas, sugerindo que a maior produção de NO esteja relacionada ao maior efeito vasodilatador exercido pela Ang-(1-7) nos vasos renais.

Em ambos os sexos, o efeito causado pela L-NAME não foi diferente do efeito provocado pelo antagonista A77-9, sugerindo que o NO seja o mecanismo predominante na vasodilatação renal induzida pela Ang-(1-7). Dentre os mecanismos responsáveis pela maior produção de NO nas fêmeas os estrogênios assumem papel de destaque visto que estimulam a síntese de eNOS (ORSHAL; KHALIL, 2004). Apesar de nossos resultados indicarem a produção de NO como mecanismo predominante na vasodilatação renal induzida pela Ang-(1-7), não podemos descartar a possível participação de prostanóides (HILCHEY; BELL-QUILLEY, 1995) e bradicinina (PAULA *et al.*, 1995) previamente relacionadas a ação da Ang-(1-7).

O efeito vasodilatador induzido pela Ach mostrou-se semelhante nos dois sexos, bem como o bloqueio desse efeito pelo L-NAME. Esse resultado indica que as diferenças sexuais observadas são específicas para ação vasodilatadora da Ang-(1-7). Por conseguinte, a resposta induzida pelo SNP foi semelhante em machos e fêmeas, indicando que as diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) são decorrentes de alterações na produção endotelial de NO e não na resposta das células musculares lisas ao NO.

Não foram observadas diferenças sexuais na expressão gênica de Angiotensinogênio, ECA, ECA 2, NEP ou dos receptores angiotensinérgicos AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e MrgD. Em conjunto nossos resultados refletem a posição de destaque ocupada pelo eixo Ang-(1-7)/Mas nas diferenças sexuais na resistência vascular renal, e contribui para o entendimento acerca dos mecanismos que regulam a PA em homens e mulheres.

## ***RESUMO DOS RESULTADOS***

---

## 7. RESUMO DOS RESULTADOS

### 7.1 PARTE 1: Efeitos da deleção gênica do receptor Mas sobre a função cardiovascular de camundongos machos e fêmeas

- Nos machos Mas<sup>-/-</sup> a disfunção cardíaca está associada a ocorrência de fibrose do miocárdio. Esse efeito parece ser decorrente de maior ativação da via ERK1/2-MAPK pelos receptores AT<sub>1</sub>.
- Essas alterações na matriz extracelular não parecem ser uma resposta adaptativa ao aumento da PA → perfil semelhante em machos C57BL/6 Mas<sup>-/-</sup> normotensos adultos e neonatos (GAVA *et al.*, 2012; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2006).
- Disfunção cardíaca nas fêmeas Mas<sup>-/-</sup> → Possíveis alterações nas proteínas responsáveis pelo manejo de cálcio no acoplamento excitação-contracção (DIAS-PEIXOTO *et al.*, 2008; GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012).
- A disfunção cardíaca *per se* não explica as alterações observadas na PA dos machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup>.
- O eixo Ang-(1-7)/Mas possui um papel fundamental nas diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular de camundongos.
- Apesar da disfunção cardíaca presente, os efeitos opostos sobre a PA de machos e fêmeas Mas<sup>-/-</sup> são influenciados principalmente por alterações na função vascular.
- As fêmeas parecem apresentar mecanismos redundantes que preservam a função vascular mesmo na ausência do receptor Mas.

- Estudos recentes demonstram a existência de interações complexas entre os mecanismos que regulam a expressão gênica do Mas e Sry. Assim, a elevação da PA nos machos *Mas*<sup>-/-</sup> pode estar relacionada a maior expressão do Sry no sistema cardiovascular (ALVES, 2014; ARAUJO *et al.*, 2015).

## **7.2 PARTE 2: Diferenças sexuais no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em artéria interlobar renal de camundongos**

- As fêmeas apresentam maior vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) em artérias renais. Esse efeito é mediado pelo receptor Mas e parece resultar da maior ativação da via óxido nítrico.
- Nossos resultados contribuem para maior compreensão acerca das diferenças sexuais na regulação da PA.

---

**CONCLUSÃO**

## 8. CONCLUSÃO

O eixo Ang-(1-7)/Mas é crítico para as diferenças sexuais sobre a pressão arterial, influenciando tanto a função cardíaca como a resistência vascular. Apesar de a Ang-(1-7) apresentar maior efeito vasodilatador *in vitro* nas fêmeas, a deleção gênica do receptor Mas provocou efeitos mais acentuados sobre o sistema cardiovascular dos machos. Nesse sentido, um conhecimento mais profundo acerca do papel exercido pelos fatores sexuais intrínsecos sobre o SRA torna-se primordial na busca por um tratamento mais específico da hipertensão em homens e mulheres.

## 9. FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência dos auxílios concedidos pelo CNPq, CAPES e INCT-Nanobiofar. Os experimentos com vaso renal isolado foram realizados no *Nierengefäßphysiologie Institut für Vegetative Physiologie – Charité* em Berlim, na vigência da bolsa de Doutorado Sanduiche (CNPQ - 245907/2012-2).

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P. *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]*, PMID: 10829099, v. 33, n. 6, p. 709–713, jun. 2000.

ALVES, F. *O papel do Sry humano na regulação da pressão arterial e sua interação com o sistema renina angiotensina*. 2014. 119 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica, 2014.

ANDREATTA-VAN LEYEN, S. *et al.* Modulation of phospholipase A2 activity and sodium transport by angiotensin-(1-7). *Kidney International*, PMID: 8264152, v. 44, n. 5, p. 932–936, nov. 1993.

ARAUJO, F. C. *et al.* Similarities and differences of X and Y chromosome homologous genes, SRY and SOX3, in regulating the renin-angiotensin system promoters. *Physiological Genomics*, PMID: 25759379PMCID: PMC4421791, v. 47, n. 5, p. 177–186, maio 2015.

ARDAILLOU, R.; MICHEL, J. B. The relative roles of circulating and tissue renin-angiotensin systems. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, PMID: 10069173, v. 14, n. 2, p. 283–286, fev. 1999.

ARNOLD, A. P. Mouse Models for Evaluating Sex Chromosome Effects that Cause Sex Differences in Non-Gonadal Tissues. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 21, n. 4, p. 377–386, 2009.

ARNOLD, A. P.; CHEN, X. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Frontiers in neuroendocrinology*, PMID: 19028515, v. 30, n. 1, p. 1–9, jan. 2009.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, PMID: 20055710, v. 50, p. 439–465, 2010.

BAHR, R. *et al.* Prodromal symptoms of acute myocardial infarction: overview of evidence. *Maryland medicine: MM: a publication of MEDCHI, the Maryland State Medical Society*, PMID: 11434061, v. Suppl, p. 49–59, 2001.

BATEMAN, B. T. *et al.* Hypertension in women of reproductive age in the United States: NHANES 1999-2008. *PloS One*, PMID: 22558371 PMCID: PMC3340351, v. 7, n. 4, p. e36171, 2012.

BELLOTT, D. W. *et al.* Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature*, PMID: 24759411PMCID: PMC4139287, v. 508, n. 7497, p. 494–499, 24 abr. 2014.

BHATIA, K.; ZIMMERMAN, M. A.; SULLIVAN, J. C. Sex Differences in Angiotensin-Converting Enzyme Modulation of Ang (1–7) Levels in Normotensive WKY Rats. *American Journal of Hypertension*, v. 26, n. 5, p. 591–598, 1 maio 2013.

BOTELHO-SANTOS, G. A. *et al.* Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, PMID: 23045193, v. 6, n. 5, p. 201–211, out. 2012.

BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *The American journal of medicine*, PMID: 14969655, v. 116, n. 4, p. 263–272, 15 fev. 2004.

BROSNIHAN, K B *et al.* Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biological research*, PMID: 9830510, v. 31, n. 3, p. 227–234, 1998.

BROSNIHAN, K B *et al.* Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, PMID: 10347798, v. 32, n. 4, p. 373–381, abr. 1999.

BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, PMID: 8613197, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 523–528, mar. 1996.

BROSNIHAN, K. BRIDGET *et al.* Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy. *Hypertension*, PMID: 12874086, v. 42, n. 4, p. 749–753, out. 2003.

BROSNIHAN, K. BRIDGET *et al.* Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, PMID: 9435644, v. 273, n. 6, p. R1908–R1915, 1 dez. 1997.

BUNNEMANN, B. *et al.* Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience Letters*, v. 114, n. 2, p. 147–153, 3 jul. 1990. Acesso em: 1 abr. 2013.

CAEIRO, X. E. *et al.* Sex chromosome complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response. *Hypertension*, PMID: 21810650, v. 58, n. 3, p. 505–511, set. 2011.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *The American Journal of Physiology*, PMID: 2750946, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324–329, jul. 1989.

CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, PMID: 15772666, v. 434, n. 7031, p. 400–404, 17 mar. 2005.

CASTRO, CARLOS H *et al.* Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life sciences*, PMID: 17055538, v. 80, n. 3, p. 264–268, 23 dez. 2006.

CASTRO, CARLOS HENRIQUE DE *et al.* Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, PMID: 16157793, v. 46, n. 4, p. 937–942, out. 2005.

CESARINO, C. B. *et al.* Prevalence and sociodemographic factors in a hypertensive population in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, PMID: 18660942, v. 91, n. 1, p. 29–35, jul. 2008.

CHAPPELL, M. C. *et al.* Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, PMID: 9453329, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 362–367, jan. 1998.

CHAPPELL, M. C.; ALLRED, A. J.; FERRARIO, C. M. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, PMID: 11369816, v. 16 Suppl 1, p. 22–26, 2001.

CHAPPELL, MARK C. *et al.* Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contributions to Nephrology*, PMID: 15248357, v. 143, p. 77–89, 2004.

COSTA, M. A. *et al.* Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 20675563, v. 299, n. 4, p. H1205–1211, out. 2010.

DA COSTA GONÇALVES, A. C. *et al.* Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 17616753, v. 293, n. 4, p. H2588–2596, out. 2007.

DANYEL, L. A. *et al.* Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integrated Blood Pressure Control*, PMID: 24379697 PMID: PMC3873809, v. 6, p. 153–161, 2013.

DAVIS, M. J.; HILL, M. A. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiological reviews*, PMID: 10221985, v. 79, n. 2, p. 387–423, abr. 1999.

DELL'ITALIA, L. J.; FERRARIO, C. M. The Never-ending Story of Angiotensin Peptides Beyond Angiotensin I and II. *Circulation Research*, PMID: 23580768, v. 112, n. 8, p. 1086–1087, 12 abr. 2013.

DELLIPIZZI, A. M.; HILCHEY, S. D.; BELL-QUILLEY, C. P. Natriuretic action of angiotensin(1-7). *British Journal of Pharmacology*, PMID: 8012686 PMID: PMC1910022, v. 111, n. 1, p. 1–3, jan. 1994.

DERCHI, L. E. *et al.* Mild renal dysfunction and renal vascular resistance in primary hypertension. *American Journal of Hypertension*, PMID: 16053994, v. 18, n. 7, p. 966–971, jul. 2005.

DEVON, H. A.; ZERWIC, J. J. Symptoms of acute coronary syndromes: are there gender differences? A review of the literature. *Heart & Lung: The Journal of Critical Care*, PMID: 12122387, v. 31, n. 4, p. 235–245, ago. 2002.

DIAS-PEIXOTO, M. F. *et al.* Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*, PMID: 18695148, v. 52, n. 3, p. 542–548, set. 2008.

EATMAN, D. *et al.* Gender differences in the attenuation of salt-induced hypertension by angiotensin (1-7). *Peptides*, v. 22, n. 6, p. 927–933, jun. 2001.

ELLISON, K. E. *et al.* Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *The Journal of Clinical Investigation*, PMID: 2723066PMCID: PMC303916, v. 83, n. 6, p. 1941–1945, jun. 1989.

ELY, D. *et al.* Delivery of sry1, but not sry2, to the kidney increases blood pressure and sns indices in normotensive wky rats. *BMC physiology*, PMID: 19500370PMCID: PMC2699329, v. 9, p. 10, 2009.

ELY, D. *et al.* Sry delivery to the adrenal medulla increases blood pressure and adrenal medullary tyrosine hydroxylase of normotensive WKY rats. *BMC cardiovascular disorders*, PMID: 17324261PMCID: PMC1810322, v. 7, p. 6, 2007.

ELY, D. *et al.* The Sry3 Y chromosome locus elevates blood pressure and renin-angiotensin system indexes. *Gender Medicine*, PMID: 21536231PMCID: PMC3087190, v. 8, n. 2, p. 126–138, abr. 2011.

ELY, D. L.; TURNER, M. E. Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension*, PMID: 2394486, v. 16, n. 3, p. 277–281, set. 1990.

ETELVINO, G. M.; PELUSO, A. A. B.; SANTOS, R. A. S. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Current Hypertension Reports*, PMID: 24760442, v. 16, n. 6, p. 433, jun. 2014.

FERNANDES, L. *et al.* Role of PGI<sub>2</sub> and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regulatory Peptides*, v. 127, n. 1–3, p. 183–189, Abril 2005.

FERRARIO, C. M. *et al.* Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney International*, PMID: 16221218, v. 68, n. 5, p. 2189–2196, nov. 2005.

FERREIRA, A J; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, PMID: 11566952, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665–668, set. 2001.

FERREIRA, ANDERSON J. *et al.* Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, PMID: 20051448, v. 4, n. 2, p. 83–96, abr. 2010.

FERREIRA, ANDERSON J.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the renin-angiotensin system: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, PMID: 22510001, v. 22, n. 5, p. 567–574, maio 2012.

FISCHER, M.; BAESSLER, A.; SCHUNKERT, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*, PMID: 11861038, v. 53, n. 3, p. 672–677, 15 fev. 2002.

FORTE, P. *et al.* Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension*, PMID: 9774371, v. 32, n. 4, p. 730–734, out. 1998.

GALLINAT, S. *et al.* The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, PMID: 10710489, v. 278, n. 3, p. E357–374, mar. 2000.

GANDOLFO, M. T. *et al.* Gender and the progression of chronic renal diseases: does apoptosis make the difference? *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology*, PMID: 15195027, v. 56, n. 1, p. 1–14, mar. 2004.

GAVA, E. *et al.* Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regulatory peptides*, PMID: 22285513, v. 175, n. 1-3, p. 30–42, 10 abr. 2012.

GOMES, E. R. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension*, PMID: 19996065, v. 55, n. 1, p. 153–160, jan. 2010.

GOMES, E. R. M.; SANTOS, R. A. S.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *International Journal of Hypertension*, PMID: 22518286 PMCID: PMC3303610, v. 2012, p. 493129, 2012.

GROBAN, L. *et al.* Differential effects of late-life initiation of low-dose enalapril and losartan on diastolic function in senescent Fischer 344 x Brown Norway male rats. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, PMID: 21720770 PMCID: PMC3682061, v. 34, n. 4, p. 831–843, ago. 2012.

GROBE, J. L. *et al.* Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 16415071, v. 290, n. 6, p. H2417–2423, jun. 2006.

GROSS, V. *et al.* Autonomic nervous system and blood pressure regulation in RGS2-deficient mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, PMID: 15661972, v. 288, n. 5, p. R1134–1142, maio 2005.

GSCHWEND, S. *et al.* Endothelial Dilatory Function Predicts Individual Susceptibility to Renal Damage in the 5/6 Nephrectomized Rat. *Journal of the American Society of Nephrology*, PMID: 12444209, v. 13, n. 12, p. 2909–2915, 1 dez. 2002.

GUIMARÃES, G. G. *et al.* Exercise induces renin–angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides*, v. 38, n. 1, p. 54–61, nov. 2012.

HANDA, R. K. Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT(4) receptor system. *The American Journal of Physiology*, PMID: 10409300, v. 277, n. 1 Pt 2, p. F75–83, jul. 1999.

HERINGER-WALTHER, S. *et al.* The genetic deletion of Mas abolishes salt induced hypertension in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 689, n. 1–3, p. 147–153, 15 ago. 2012.

HERNÁNDEZ PRADA, J. A. *et al.* Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*, PMID: 18391097, v. 51, n. 5, p. 1312–1317, maio 2008.

HILCHEY, S. D.; BELL-QUILLEY, C. P. Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I<sub>2</sub> release. *Hypertension*, PMID: 7768568, v. 25, n. 6, p. 1238–1244, jun. 1995.

HILLIARD, L. M. *et al.* The “his and hers” of the renin-angiotensin system. *Current Hypertension Reports*, PMID: 23180053, v. 15, n. 1, p. 71–79, fev. 2013.

HORIUCHI, M.; IWANAMI, J.; MOGI, M. Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. *Clinical Science (London, England: 1979)*, PMID: 22548405, v. 123, n. 4, p. 193–203, 1 ago. 2012.

Jl, H. *et al.* Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Experimental Physiology*, PMID: 18296494, v. 93, n. 5, p. 648–657, maio 2008.

Jl, H. *et al.* Sex chromosome effects unmasked in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, PMID: 20231528, v. 55, n. 5, p. 1275–1282, maio 2010.

Jl, H. *et al.* Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 15319201, v. 288, n. 1, p. H43–47, jan. 2005.

KOMUKAI, K.; MOCHIZUKI, S.; YOSHIMURA, M. Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, PMID: 20608988, v. 24, n. 6, p. 687–698, dez. 2010.

LAUTNER, R. Q. *et al.* Discovery and Characterization of Alamandine A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circulation Research*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 12 abr. 2013.

LEMOS, VIRGINIA S. *et al.* The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, PMID: 16116331, v. 46, n. 3, p. 274–279, set. 2005.

LEMOS, VIRGÍNIA S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *British Journal of Pharmacology*, PMID: 11934815 PMCID: PMC1573295, v. 135, n. 7, p. 1743–1748, abr. 2002.

LESSA, Í. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev. bras. hipertens*, p. 383–392, 2001.

LIMA, R.; WOFFORD, M.; RECKELHOFF, J. F. Hypertension in Postmenopausal Women. *Current Hypertension Reports*, Cited by 0005, v. 14, n. 3, p. 254–260, 1 jun. 2012.

LIU, J. *et al.* Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17 $\beta$ -oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biology of sex differences*, PMID: 21208466, v. 1, n. 1, p. 6, 2010.

LOOT, A. E. *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, PMID: 11927520, v. 105, n. 13, p. 1548–1550, 2 abr. 2002.

LOVELL-BADGE, R.; ROBERTSON, E. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development (Cambridge, England)*, PMID: 2401216, v. 109, n. 3, p. 635–646, jul. 1990.

MANSUR, A. DE P.; FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, PMID: 22735870, v. 99, n. 2, p. 755–761, ago. 2012.

MARQUES, F. *et al.* Beneficial Effects of Long-Term Administration of an Oral Formulation of Angiotensin-(1&#8211;7) in Infarcted Rats. *International Journal of Hypertension*, v. 2012, 9 fev. 2012.

MCCOLLUM, L. T.; GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts. *Peptides*, PMID: 22326709 PMCID: PMC3326596, v. 34, n. 2, p. 380–388, abr. 2012.

MCKINLEY, M. J. *et al.* Brain angiotensin and body fluid homeostasis. *The Japanese Journal of Physiology*, PMID: 11492952, v. 51, n. 3, p. 281–289, jun. 2001.

METZGER, R. *et al.* Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters*, v. 357, n. 1, p. 27–32, 2 jan. 1995.

MILSTED, A. *et al.* Regulation of multiple renin-angiotensin system genes by Sry. *Journal of Hypertension*, PMID: 19809364 PMCID: PMC2897148, v. 28, n. 1, p. 59–64, jan. 2010.

Multiple risk factor intervention trial. Risk factor changes and mortality results. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, PMID: 7050440, v. 248, n. 12, p. 1465–1477, 24 set. 1982.

NEUGARTEN, J.; ACHARYA, A.; SILBIGER, S. R. Effect of Gender on the Progression of Nondiabetic Renal Disease A Meta-Analysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, n. 2, p. 319–329, 1 fev. 2000.

NEVES, L. A. .; AVERILL, D. B.; *et al.* Characterization of angiotensin-(1–7) receptor subtype in mesenteric arteries. *Peptides*, v. 24, n. 3, p. 455–462, mar. 2003.

NEVES, L. A. A. *et al.* Effect of estrogen on neprilysin expression in uterus and kidney of Sprague-Dawley normotensive and heterozygous (mRen2)<sup>27</sup>-transgenic hypertensive rats. *Peptides*, PMID: 16890325, v. 27, n. 11, p. 2912–2918, nov. 2006.

NEVES, L. A. A.; WILLIAMS, A. F.; *et al.* Pregnancy Enhances the Angiotensin (Ang)-(1–7) Vasodilator Response in Mesenteric Arteries and Increases the Renal Concentration and Urinary Excretion of Ang-(1–7). *Endocrinology*, v. 144, n. 8, p. 3338–3343, 1 ago. 2003.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology Clinics of North America*, PMID: 20202574 PMCID: PMC2833287, v. 39, n. 1, p. 1–7, mar. 2010.

NIJENKAMP, L. L. A. M. *et al.* Sex-dependent pathophysiological mechanisms in hypertrophic cardiomyopathy: implications for rhythm disorders. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*, PMID: 25446151, v. 12, n. 2, p. 433–439, fev. 2015.

OCHODNICKÝ, P. *et al.* Endothelial function predicts the development of renal damage after combined nephrectomy and myocardial infarction. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, PMID: 16565247, v. 17, n. 4 Suppl 2, p. S49–52, abr. 2006.

ONG, K. L. *et al.* Gender difference in blood pressure control and cardiovascular risk factors in Americans with diagnosed hypertension. *Hypertension*, PMID: 18259031, v. 51, n. 4, p. 1142–1148, abr. 2008.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 286, n. 2, p. R233–R249, 1 fev. 2004.

PAULA, R. D. *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, PMID: 7498987, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1154–1159, dez. 1995.

PEIRÓ, C. *et al.* Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *Journal of hypertension*, PMID: 17984663, v. 25, n. 12, p. 2421–2425, dez. 2007.

PENDERGRASS, K. D. *et al.* Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 18456730, v. 295, n. 1, p. H10–H20, 1 jul. 2008.

PEREIRA, V. M. *et al.* Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1–7) and MAS receptor in the rat ovary. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, PMID: 19703990, v. 16, n. 12, p. 1165–1174, dez. 2009.

PINHEIRO, S. V. B.; SIMÕES E SILVA, A. C. Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. *International Journal of Hypertension*, PMID: 22518283 PMCID: PMC3296191, v. 2012, p. 414128, 2012.

PINHO, N. DE A.; PIERIN, A. M. G. Hypertension control in brazilian publications. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, PMID: 24061761 PMCID: PMC4032316, v. 101, n. 3, p. e65–73, set. 2013.

PÖRSTI, I. *et al.* Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *British Journal of Pharmacology*, PMID: 8019744 PMCID: PMC1910086, v. 111, n. 3, p. 652–654, mar. 1994.

RABELO, L. A. *et al.* Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 2, n. 6, p. 418–424, nov. 2008.

RECKELHOFF, J. F. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension*, v. 37, n. 5, p. 1199–1208, 1 maio 2001.

RECKELHOFF, J. F.; FORTEPIANI, L. A. Novel Mechanisms Responsible for Postmenopausal. *Hypertension*, PMID: 15023933, v. 43, n. 5, p. 918–923, 1 maio 2004.

REN, Y.; GARVIN, J. L.; CARRETERO, O. A. Vasodilator Action of Angiotensin-(1-7) on Isolated Rabbit Afferent Arterioles. *Hypertension*, PMID: 11897767, v. 39, n. 3, p. 799–802, 1 mar. 2002.

RICE, G.I. *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *The Biochemical Journal*, PMID: 15283675 PMCID: PMC1134042, v. 383, n. Pt 1, p. 45–51, 1 out. 2004.

ROSÁRIO, T. M. DO *et al.* Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, PMID: 20379643, v. 93, n. 6, p. 622–628, 672–678, dez. 2009.

ROSENTHAL, T.; OPARIL, S. Hypertension in women. *Journal of human hypertension*, PMID: 11095160, v. 14, n. 10-11, p. 691–704, nov. 2000.

ROSSOUW, J. E. *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, PMID: 12117397, v. 288, n. 3, p. 321–333, 17 jul. 2002.

SAMAD, Z. *et al.* Closing the Gap: Treating Hypertension in Women. *Cardiology in Review*, v. 16, n. 6, p. 305–313, nov. 2008.

SAMPAIO, WALKYRIA O. *et al.* Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells. *Hypertension*, PMID: 17984366, v. 50, n. 6, p. 1093–1098, 1 dez. 2007.

SAMPAIO, WALKYRIA O.; NASCIMENTO, A. A. S.; SANTOS, R. A. S. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 284, n. 6, p. H1985–H1994, 1 jun. 2003.

SAMPAIO, WALKYRIA OLIVEIRA *et al.* Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*, PMID: 17116756, v. 49, n. 1, p. 185–192, 1 jan. 2007.

SAMPSON, A. K. *et al.* Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats. *Hypertension*, PMID: 18711010, v. 52, n. 4, p. 666–671, out. 2008.

SAMPSON, A. K.; MORITZ, K. M.; DENTON, K. M. Postnatal Ontogeny of Angiotensin Receptors and ACE2 in Male and Female Rats. *Gender Medicine*, v. 9, n. 1, p. 21–32, fev. 2012.

SANTIAGO, N. M. *et al.* Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*, PMID: 20212262, v. 55, n. 4, p. 889–896, abr. 2010.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, PMID: 8087084, v. 27, n. 4, p. 1033–1047, abr. 1994.

SANTOS, R. A. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, PMID: 2831145, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153–1157, fev. 1988.

SANTOS, R. A. *et al.* Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*, PMID: 1310484, v. 19, n. 2 Suppl, p. 1156–61, fev. 1992.

SANTOS, R. A. *et al.* The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension*, PMID: 2404854, v. 15, n. 2 Suppl, p. 1121–1127, fev. 1990.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*, PMID: 16567589, v. 47, n. 5, p. 996–1002, maio 2006.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES E SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology*, PMID: 18310257, v. 93, n. 5, p. 519–527, maio 2008.

SANTOS, ROBSON AUGUSTO. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, PMID: 24664288, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, jun. 2014.

SANTOS, S. H. S. *et al.* Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, PMID: 18025412, v. 57, n. 2, p. 340–347, fev. 2008.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, PMID: 22930834, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SCHUNKERT, H. *et al.* Effects of Estrogen Replacement Therapy on the Renin-Angiotensin System in Postmenopausal Women. *Circulation*, PMID: 8994414, v. 95, n. 1, p. 39–45, 7 jan. 1997.

SHENOY, V. *et al.* 17beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides*, PMID: 19747516, v. 30, n. 12, p. 2309–2315, dez. 2009.

SILBIGER, S. R.; NEUGARTEN, J. The role of gender in the progression of renal disease. *Advances in renal replacement therapy*, PMID: 12616458, v. 10, n. 1, p. 3–14, jan. 2003.

SILVA, A. R. *et al.* Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, T.PMID: 24089374, v. 305, n. 11, p. R1323–R1330, 1 dez. 2013. Acesso em: 6 fev. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Arq Bras Cardiol. VI *Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*, 2010. 95(1 supl.1), p. 1–51.

SULLIVAN, J. C. *et al.* Angiotensin (1-7) Receptor Antagonism Equalizes Angiotensin II-Induced Hypertension in Male and Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, v. 56, n. 4, p. 658–666, 1 out. 2010. Acesso em: 11 abr. 2013.

SULLIVAN, J. C. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 294, n. 4, p. R1220–R1226, 1 abr. 2008. Acesso em: 18 abr. 2013.

TATCHUM-TALOM, R.; EYSTER, K. M.; MARTIN, D. S. Sexual dimorphism in angiotensin II-induced hypertension and vascular alterations. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, PMID: 15897923, v. 83, n. 5, p. 413–422, maio 2005.

TAYLOR, T. A. *et al.* Gender differences in ET and NOS systems in ETB receptor-deficient rats: effect of a high salt diet. *Hypertension*, PMID: 12623975, v. 41, n. 3 Pt 2, p. 657–662, mar. 2003.

TE RIET, L. *et al.* Hypertension: Renin-Angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research*, PMID: 25767283, v. 116, n. 6, p. 960–975, 13 mar. 2015.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*, PMID: 11121512, v. 52, n. 4, p. 639–672, dez. 2000.

VALDÉS, G. *et al.* Urinary vasodilator and vasoconstrictor angiotensins during menstrual cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrine*, PMID: 11887932, v. 16, n. 2, p. 117–122, nov. 2001.

VAN DER WOUDE, E. A. *et al.* The role of angiotensin(1-7) in renal vasculature of the rat. *Journal of Hypertension*, PMID: 16957556, v. 24, n. 10, p. 1971–1978, out. 2006.

VAZ-SILVA, J. *et al.* Tissue specific localization of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in the uterus of ovariectomized rats. *Journal of molecular histology*, PMID: 22684246, v. 43, n. 5, p. 597–602, out. 2012.

VIEGAS, V. U. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor mediates sex differences in mice renal interlobar arteries response to angiotensin II. *Journal of Hypertension*, PMID: 22895020, v. 30, n. 9, p. 1791–1798, set. 2012.

VONGPATANASIN, W. *et al.* Transdermal Estrogen Replacement Therapy Decreases Sympathetic Activity in Postmenopausal Women. *Circulation*, PMID: 11413078, v. 103, n. 24, p. 2903–2908, 19 jun. 2001.

WALTHER, T *et al.* Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, PMID: 10625868, v. 33, n. 1, p. 1–9, jan. 2000.

WALTHER, THOMAS *et al.* Sustained Long Term Potentiation and Anxiety in Mice Lacking theMas Protooncogene. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 19, p. 11867–11873, 8 maio 1998.

WIEMER, G. *et al.* AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*, PMID: 12468568, v. 40, n. 6, p. 847–852, dez. 2002.

WILKINS, K.; GEE, M.; CAMPBELL, N. The difference in hypertension control between older men and women. *Health Reports*, PMID: 23356043, v. 23, n. 4, p. 33–40, dez. 2012.

XU, P. *et al.* Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*, PMID: 18180400, v. 51, n. 2, p. 574–580, fev. 2008.

XUE, B. *et al.* Central Endogenous Angiotensin-(1-7) Protects against Aldosterone/NaCl-induced Hypertension in Female Rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, PMID: 23812385, 28 jun. 2013.

XUE, B.; PAMIDIMUKKALA, J.; HAY, M. Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 15626687, v. 288, n. 5, p. H2177–2184, maio 2005.

YANG, F. *et al.* Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Research*, PMID: 20363980PMCID: PMC2860163, v. 20, n. 5, p. 614–622, maio 2010.

YOUNG, D. *et al.* Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*, PMID: 3708691, v. 45, n. 5, p. 711–719, 6 jun. 1986.

ZHAO, Z. *et al.* Role of estrogen in diastolic dysfunction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, PMID: 24414072 PMCID: PMC3949059, v. 306, n. 5, p. H628–640, 1 mar. 2014.

ZIMMERMAN, M. A.; HARRIS, R. A.; SULLIVAN, J. C. Female spontaneously hypertensive rats are more dependent on ANG (1-7) to mediate effects of low-dose AT1 receptor blockade than males. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, PMID: 24647710PMCID: PMC4024730, v. 306, n. 10, p. F1136–1142, 15 maio 2014.

ZOHN, I. E. *et al.* Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Molecular and Cellular Biology*, PMID: 9488437 PMCID: PMC108835, v. 18, n. 3, p. 1225–1235, mar. 1998.