

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

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDÍACOS PRODUZIDOS  
PELO AUMENTO CRÔNICO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE  
ANGIOTENSINA-(1-7) EM RATOS HIPERTENSOS QUE  
SUPEREXPRESSAM RENINA [TGR(mRen2)27]**

LUCAS MIRANDA KANGUSSU GOMES OLIVEIRA

BELO HORIZONTE

2014

LUCAS MIRANDA KANGUSSU GOMES OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDÍACOS PRODUZIDOS  
PELO AUMENTO CRÔNICO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE  
ANGIOTENSINA-(1-7) EM RATOS HIPERTENSOS QUE  
SUPEREXPRESSAM RENINA [TGR(mRen2)27]**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Campagnole-Santos.

BELO HORIZONTE

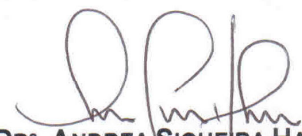
2014

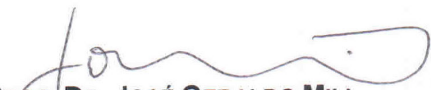
**"CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS CARDÍACOS PRODUZIDOS  
PELO AUMENTO CRÔNICO DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE  
ANGIOTENSINA-(1-7) EM RATOS HIPERTENSOS QUE  
SUPEREXPRESSAM RENINA [TGR(mREN2)27]"**


**LUCAS MIRANDA KANGUSSU GOMES OLIVEIRA**

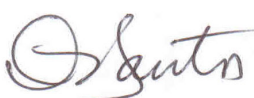
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 25 de julho de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRª. ANDREA SIQUEIRA HAIBARA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. JOSÉ GERALDO MILL**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

  
**PROFA. DRª. MARIA LUIZA MORAIS BARRETO DE CHAVES**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

  
**PROFA. DRª. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE DOS SANTOS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 25 de julho de 2014

**DEDICO ESTE TRABALHO À TIA BILÚ E A VÓ DÉIA  
PELO EXEMPLO, APOIO, INCENTIVO E AMOR INCONDICIONAL.**

**“A VIDA É ASSIM: ESQUENTA E ESFRIA, APERTA E DAÍ AFROUXA, SOSSEGA  
E DEPOIS DESINQUIETA. O QUE ELA QUER DA GENTE É CORAGEM!”**

**(GUIMARÃES ROSA)**

## **AGRADECIMENTOS**

A **Deus**, pelo dom da vida! Por me guiar...

À **Tia Bilú**, pelo apoio incondicional. É difícil descrever em palavras o quanto você é especial e contribuiu para que eu chegasse até aqui. Não consigo expressar em palavras minha gratidão. Quantas saudades!

À **Vó Déia**, alicerce da minha vida, exemplo de ser humano, caráter e amor. Meu agradecimento eterno pelos seus ensinamentos. Quanta falta você me faz!

À minha **Mãe**, um exemplo de coragem e superação, pelo apoio incondicional desde sempre.

Às minhas irmãs **Lívia** e **Lígia**, mesmo distantes sempre tão presentes! Obrigado pelas palavras de incentivo, apoio e carinho. Amo vocês!

À **Patrícia**, meu amor, por ser a melhor namorada do mundo! Pela dedicação, carinho, doçura, amizade, por alegrar meus dias e estar sempre presente me apoiando. Se eu tivesse muitos corações todos seriam seus... De tudo que eu já vivi, você é a melhor parte! Te Amo!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria José Campagne-Santos**, sou-lhe eternamente grato pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos que foram complementares e fundamentais à minha formação e crescimento pessoal e profissional, pelo incentivo, confiança, convívio, carinho, amizade e sabedoria transmitida. Foi uma honra e uma inspiração ter sido seu aluno... É difícil descrever em palavras o quanto você é especial!

Ao **José Roberto da Silva**, sem você esse trabalho não seria possível. Muito obrigado pelo apoio técnico nas diferentes etapas deste estudo, e, principalmente pela amizade garantida para qualquer momento!

Ao **Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, por contribuir com o desenvolvimento deste trabalho, pelas discussões e interpretação dos resultados.

À **Profa. Dra. Andréa Haibara**, pelas discussões, por ser um exemplo de professora e cientista, pela agradável convivência.

À **Marilene Oliveira**, pelo auxílio nos experimentos, excelente apoio técnico e grande amizade!

À **Dra. Priscila Silva Guimarães**, pela colaboração na realização deste estudo! Muito obrigado pelo auxílio nos experimentos, pelas discussões e interpretação dos resultados.

Ao **Marcos Melo**, pela execução e análises dos ecocardiogramas.

À **Dra. Ana Paula Nadu**, pelo auxílio nos experimentos de western blotting, interpretação e discussão dos resultados.

Aos colegas do Laboratório de Hipertensão pela convivência e amizade, em especial a **Gabriel Sanglard** pela parceria ao longo dos anos.



A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia por contribuir com a minha formação científica, em especial: **Adelina Martha dos Reis, Almir de Sousa Martins, Audrey Ivanenko Salgado, Daniele Aguiar, Daniella Bonaventura, Grace Schenatto, Jader Cruz, Leida Botion, Márcio Flávio Moraes, Miguel José Lopes, Maria Aparecida Ribeiro Vieira, Maristela Poletini, Rafaela Fernandes, Sílvia Carolina Guatimosim e Virgínia Soares Lemos.**

Aos grandes amigos desta vida...

À coordenação e membros da Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial, **Cyntia Menezes, Nilda Laurindo e Rodner Almeida.**

À **Bônia Alves** e **Mônica Alves** pelo cuidado exemplar com os animais do biotério e durante os períodos de experimentação.

Por fim, a todos aqueles que participaram direta, ou indiretamente, da minha formação científica e da construção deste trabalho...

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e os projetos apoiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): PRONEX –CBB-APQ-04758-10 e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - NanoBioFar.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\mu\text{m}$  - micrômetro  
 $\mu\text{M}$  - micromolar  
A779 – antagonista seletivo do receptor Mas,D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1–7)  
AD - enzima aspartato-descarboxilase  
Ala - alanina  
Ang – angiotensina  
Ang II – angiotensina II  
Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)  
ANOVA - análise de variância  
AP - enzima aminopeptidase  
APA - enzima aminopeptidase A  
APD - enzima aminopeptidase D  
APN - enzima aminopeptidase N  
Arg - arginina  
Asp - aspartato  
AT<sub>1</sub> - receptor da Ang II do subtipo 1  
AT<sub>2</sub> - receptor da Ang II do subtipo 2  
bpm - batimentos por minuto  
BSA - *bovine serum albumine* - albumina de soro bovino  
Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio  
CEBIO - Centro de Bioterismo  
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal  
cm - centímetros  
CP - enzima carboxipeptidase  
CVLM - *caudal ventrolateral medulla* - área ventrolateral caudal do bulbo  
DCV - doenças cardiovasculares  
DIZE - *diminazene aceturate* - aceturato de diminazeno  
ECA - enzima conversora de angiotensina  
ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2  
EPM - erro padrão da media  
FE - fenilefrina  
FC - frequência cardíaca  
g - gramas  
H<sub>2</sub>O - água

His - histidina  
i.p. - intraperitoneal  
Ile - isoleucina  
K<sup>+</sup> - íon potássio  
KCl - cloreto de potássio  
Kg - quilogramas  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio monobásico  
Leu - leucina  
Mas - receptor da angiotensina-(1-7)  
MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio  
min - minutos  
mL - mililitros  
mM - milimolar  
mmHg - milímetros de mercúrio  
MrgD - *Mas related G-protein coupled receptor* - receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas  
n - número de repetições ou animais  
NaCl - cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio  
NEP - enzima endopeptidase neutra  
ng - nanogramas  
nM - nanomolar  
NO - *nitric oxide* - óxido nítrico  
NOS - *nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase  
°C - graus Celsius  
PA - pressão arterial  
PAD - pressão arterial diastólica  
PAM - pressão arterial média  
PAS - pressão arterial sistólica  
PBS - *phosphate buffered saline* – tampão fosfato salina  
PCP - enzima prolilcarboxipeptidase  
PE10 - tubo de polietileno número 10  
PE50 - tubo de polietileno número 50  
PEP - enzima prolilendopeptidase

Phe - fenilalanina

pM - picomolar

Pro - prolina

RNA - *ribonucleic acid* - ácido ribonucléico

ROS - *reactive oxygen species* - espécies reativas de oxigênio

RT-PCR - *reverse trascription-polymerase chain reaction* - reação da transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase

RVLM - *rostromedullary lateral medulla* - área ventrolateral rostral do bulbo

SHR - *Spontaneously hypertensive rats* - ratos espontaneamente hipertensos

SRA - sistema renina-angiotensina

TGR(mRen2)<sup>27</sup> – ratos hipertensos que superexpressam renina

Tyr - tirosina

Val - valina

VE - ventrículo esquerdo

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Cascata de formação dos peptídeos angiotensinérgicos.....	32
<b>Figura 2</b> - Eixos contra-regulatórios do sistema renina-angiotensina.....	35
<b>Figura 3</b> - Parâmetros cardiovasculares.....	71
<b>Figura 4</b> - PAS, PAD, PAM e FC de ratos hipertensos tratados com A779.....	72
<b>Figura 5</b> - Índice de sensibilidade do controle barorreflexo .....	73
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografias e diâmetro de cardiomiócitos.....	80
<b>Figura 7</b> - Níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$ .....	81
<b>Figura 8</b> - Expressão gênica ( <i>mRNA</i> ) de proteínas da matriz extracelular.....	82
<b>Figura 9</b> - Fotomicrografias representativas de fibrose intersticial do VE.....	83
<b>Figura 10</b> - Expressão gênica ( <i>mRNA</i> ) das enzimas ECA e ECA2.....	87
<b>Figura 11</b> - Atividade das enzimas ECA e ECA2 no VE .....	88
<b>Figura 12</b> - Imunorreatividade dos peptídeos Ang II e Ang-(1-7).....	89
<b>Figura 13</b> - Expressão protéica do receptor AT <sub>1</sub> no ventrículo esquerdo.....	90
<b>Figura 14</b> - Expressão protéica do receptor Mas no ventrículo esquerdo. ....	91
<b>Figura 15</b> - Tônus autonômico cardíaco .....	93



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Especificação dos primers utilizados no RT-PCR.....	60
<b>Figura 2</b> - Parâmetros morfológicos cardíacos .....	75
<b>Figura 3</b> - Função ventricular sistólica e diastólica .....	76

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>XXII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXV</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
1.1 Regulação da pressão arterial, hipertensão e o SRA.....	29
1.2 Eixo ECA2/Angiotensina-(1-7)/ receptor Mas no SNC .....	37
1.3 Sistema Renina-angiotensina Cardíaco .....	39
1.4 Ratos hipertensos que superexpressam renina [TGR(mRen2)27].....	41
<b>II. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 Objetivo geral .....	47
3.2 Estratégias experimentais .....	47
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 Animais.....	50
4.2 Grupos experimentais .....	50
4.3 Registro de parâmetros cardiovasculares por telemetria .....	51
4.4 Cirurgia para a implantação do probe para registro da PA.....	52
4.5 Configuração para a aquisição dos parâmetros cardiovasculares .....	53
4.6 Estereotaxia para infusão crônica intracerebroventricular.....	54
4.7 Canulação de artéria e veia femoral.....	55
4.8 Avaliação da sensibilidade do controle barorreflexo.....	56
4.9 Avaliação da função cardíaca .....	57
4.10 Avaliação da estrutura cardíaca .....	57
4.11 Avaliação dos níveis de ANP, BNP e TGF- $\beta$ .....	58
4.12 Expressão de mRNA RT-PCR .....	58
4.13 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina.....	61
4.14 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina 2.....	62
4.15 Níveis teciduais dos peptídeos Ang II e Ang-(1-7) .....	63
4.16 Expressão protéica dos receptores AT <sub>1</sub> e Mas por western blotting.....	64
4.17 Avaliação do tônus autonômico cardíaco .....	66
4.18 Análise estatística .....	67
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
5.1 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 sobre parâmetros cardiovasculares basais.....	69

5.2 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 no controle barorreflexo da frequência cardíaca.....	70
5.3 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 sobre parâmetros cardíacos morfológicos e funcionais .....	74
5.4 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na estrutura cardíaca .....	77
5.5 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 nos níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$ .....	77
5.6 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 nos níveis colágeno, fibronectina e área de fibrose cardíaca .....	78
5.7 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na expressão de componentes do SRA cardíaco .....	84
5.8 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na modulação do tônus autonômico cardíaco.....	92
5.9 Sumário dos resultados.....	94
<b>VI. DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>VII. CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>109</b>
<b>IV. ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

**RESUMO**

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo sistema hormonal composto por várias enzimas, peptídeos e receptores. Entre os peptídeos descritos como biologicamente ativos está a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A infusão crônica intracerebroventricular (ICV) de Ang-(1-7) atenua a hipertensão arterial e melhora o controle barorreflexo da frequência cardíaca (FC). Apesar de alguns estudos iniciais terem sido realizados investigando a participação da Ang-(1-7) na fisiopatologia da hipertensão em ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina [TGR(mRen2)27], o efeito induzido pela Ang-(1-7) via receptor Mas no SNC nas alterações cardíacas induzidas pela hipertensão arterial ainda não estão caracterizadas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos cardíacos produzidos pelo aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) em TGR(mRen2)27. Ratos Sprague-Dawley (SD) e TGR(mRen2)27, entre a 10<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana de idade, foram divididos em quatro grupos experimentais: ratos SD com infusão crônica (14 dias) ICV de salina, ratos hipertensos com infusão crônica ICV de salina, ratos hipertensos com infusão crônica ICV de Ang-(1-7) (0,2 µg/ hora/ 14 dias) e ratos hipertensos com infusão crônica ICV de Ang-(1-7) (0,2 µg/ hora/ 14 dias) associada ao A779 (1 µg/ hora/ 14 dias). Foram avaliados os parâmetros cardiovasculares por telemetria, a sensibilidade do controle barorreflexo da FC, avaliação da morfologia cardíaca e da função ventricular sistólica e diastólica por ecocardiografia, análise histopatológica do ventrículo esquerdo, ensaio imunoenzimático para determinação dos níveis de marcadores de estresse cardíaco e proliferação celular, avaliação dos níveis de colágeno, fibronectina e componentes do SRA por RT-PCR quantitativo, mensuração da atividade das enzimas ECA e ECA2 do SRA, determinação dos níveis de peptídeos angiotensinérgicos por radioimunoensaio, avaliação da expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> e Mas por Western blotting e avaliação da atividade autonômica cardíaca através de bloqueios farmacológicos. A infusão crônica ICV de Ang-(1-7) em TGR(mRen2)27 reduziu a pressão arterial, melhorou a sensibilidade do controle barorreflexo da FC e atenuou o hiperdinamismo cardíaco. Além disso, os animais tratados apresentaram efeito anti-hipertrófico, redução dos níveis de marcadores de estresse mecânico cardíaco (ANP e BNP) e de proliferação celular (TGF-β), redução dos níveis de colágeno I e fibronectina, que reflete na atenuação do processo de remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão arterial. Interessantemente, os animais (mRen2)27

tratados com Ang-(1-7) ICV apresentaram redução da expressão e atividade da ECA, aumento da expressão e atividade da ECA2 e redução dos níveis de Ang II no VE. Esses efeitos parecem estar associados à modulação do tônus autonômico cardíaco. Todos os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) foram revertidos ou atenuados pelo antagonismo do receptor Mas utilizando o A779. Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a ativação do eixo Ang-(1-7)/ Mas no SNC reduz a pressão arterial e atenua as alterações cardíacas induzidas pela hipertensão arterial podendo se constituir em uma importante estratégia adicional para o tratamento de doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Hipertensão arterial, Sistema renina-angiotensina, Angiotensina-(1-7), Receptor Mas, Função cardíaca, Barorreflexo, Sistema nervoso autônomo.



**ABSTRACT**

The renin-angiotensin system (RAS) is a complex hormonal system composed by several enzymes, peptides and receptors. Ang-(1-7) is one of the biologically active peptides of RAS. Chronic intracerebroventricular (ICV) infusion of Ang-(1-7) attenuates arterial hypertension and improves baroreflex control of heart rate. Some initial studies investigated the participation of Ang-(1-7) in the physiopathology of hypertension in transgenic rats that over express tissue renin [TGR(mRen2)27], however, the cardiac effect mediated by Ang-(1-7)/Mas receptor in nervous central system is not well established. The aim of the present study was to characterize the cardiac effects induced by chronic effect of chronic ICV infusion of Ang-(1-7) in TGR(mRen2)27. Sprague-Dawley (SD) and TGR(mRen2)27 rats, with 10 to 12 weeks of age, were divided in four experimental groups: SD subjected to chronic ICV infusion of saline (14 days), hypertensive rats subjected to chronic ICV infusion of saline (14 days), hypertensive rats subjected to chronic ICV infusion of Ang-(1-7) (0,2 µg/ h for 14 days) and hypertensive rats subjected to chronic ICV infusion of Ang-(1-7) (0,2 µg/ h for 14 days) associated with A779 (1 µg/ h for 14 days). It was evaluated: cardiovascular parameters by telemetry, the sensitivity of the baroreflex control of heart rate, cardiac morphology and systolic and diastolic ventricular function by echocardiography, histopathological analysis of left ventricle, determination of the levels of markers of cardiac stress and cellular proliferation by immunoenzymatic assay, evaluation of collagen, fibronectin and RAS components levels by quantitative RT-PCR, measurement of RAS enzymes, ACE and ACE2 activity, determination of RAS peptides levels by radioimmunoassay, evaluation of protein expression of AT<sub>1</sub> and Mas receptors by Western blotting and measurement of cardiac autonomic tonus by pharmacologic blockade. We showed that chronic ICV infusion of Ang-(1-7) in TGR(mRen2)27 rats leads to reduction in blood pressure, anti-hypertrophic effects in cardiomyocytes, improvement of baroreflex sensitivity, attenuation of cardiac hyperdynamism, reduction in cardiac levels of ANP, BNP and TGF-β, reduction in collagen type 1 and fibronectin levels, that reflects in cardiac remodeling attenuation and alteration in cardiac RAS components (decrease in ACE expression and activity and increased in ACE2 expression and activity, as well as, reduction in Ang II levels). Finally, we showed that these effects might be associated to alteration in the cardiac autonomic tonus, since rats that received Ang-(1-7) showed restoration of its balance. All the effects induced by Ang-(1-7) were

prevented or attenuated by the concomitant infusion with the receptor Mas antagonist, A779. Altogether, the results of the present study show that activation of the Ang-(1-7)/ Mas axis in the CNS lowers blood pressure and attenuates the cardiac alterations induced by arterial hypertension, which may constitute an important additional strategy for the treatment of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Hypertension, Renin-angiotensin system, Angiotensin-(1-7), Mas receptor, Cardiac function, Baroreflex control of heart rate, Autonomic nervous system.

# **I. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Regulação da pressão arterial, hipertensão e o Sistema Renina-Angiotensina

A regulação da pressão arterial (PA) é um processo complexo que envolve diferentes mecanismos, órgãos e sistemas que funcionam de maneira integrada para a manutenção da homeostase. O controle da PA ocorre de forma redundante por sistemas de controle de *feedback* e *feedforward*, que operam a curto, médio e a longo prazo. Estes sistemas reúnem o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, hormônios circulantes e mecanismos de auto-regulação locais (fatores metabólicos e endoteliais), que interagem para controlar o débito cardíaco e a resistência vascular, mantendo a PA numa estreita faixa de variação (Dampney *et al.*, 2002).

No último século as doenças cardiovasculares (DCV) se tornaram a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo. Segundo a American Heart Association, as DCV foram responsáveis apenas em 2008 por 32,8% das mortes nos Estados Unidos (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). A hipertensão arterial constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV, e é uma das doenças com maior prevalência no mundo moderno, sendo responsável pela morte de 7,5 milhões de pessoas a cada ano (Roger *et al.*, 2012)

Durante o desenvolvimento da hipertensão arterial, a faixa de variação da PA (*set point*) é deslocada de forma sustentada para um nível superior. Esta mudança no *set point* da PA decorre de alterações periféricas mantidas persistentes, como aumento da resistência vascular periférica total e/ou aumento do débito cardíaco. Estas alterações periféricas são desencadeadas por alterações centrais, como alterações na sensibilidade barorreflexa (Veerasingham e Raizada, 2003), aumento

na atividade do sistema nervoso simpático (Esler, 2000) e alterações na atividade do sistema renina-angiotensina (SRA), que desempenham um papel chave na patogênese da hipertensão arterial (Santos *et al.*, 1989; Ferrario, 1990; Britto *et al.*, 1997).

O primeiro estudo relacionado ao SRA foi feito em 1898 com a descoberta de que extratos não purificados do córtex renal causavam um aumento prolongado na pressão arterial de coelhos anestesiados. A substância responsável por este aumento da pressão foi denominada de renina (Tiegerstedt e Bergman, 1898), mas por várias décadas, pouco interesse foi atribuído a esta descoberta. Em 1934, Goldblatt *et al.* demonstraram pela primeira vez ser possível produzir uma elevação sustentada da pressão arterial restringindo o fluxo sanguíneo para os rins. Embora já se soubesse que o aumento da pressão arterial poderia ser causado por uma substância presente no sangue, os autores não associaram este efeito à renina (Goldblatt *et al.*, 1934).

Foi somente em 1940 que dois grupos, trabalhando de forma independente, Braun-Menendez *et al.* na Argentina, e Page e Helmer, nos Estados Unidos, ao utilizarem o modelo experimental de hipertensão descrito por Goldblatt, descreveram que o peptídeo pressórico não era a renina, e sim um produto da ação enzimática desta substância sobre uma proteína plasmática (Braun-Menendez *et al.*, 1940; Page e Helmer, 1940a). O primeiro grupo denominou esse produto de hipertensina, e o segundo, de angiotonina. Posteriormente, o termo angiotensina, resultado da agregação entre os termos “hipertensina” e “angiotonina”, passou a ser utilizado na tentativa de padronizar a terminologia (Braun-Menendez e Page, 1958). Aproximadamente dez anos após os trabalhos desses dois grupos, duas formas de angiotensina foram identificadas: angiotensina (Ang) I e Ang II, sendo a primeira

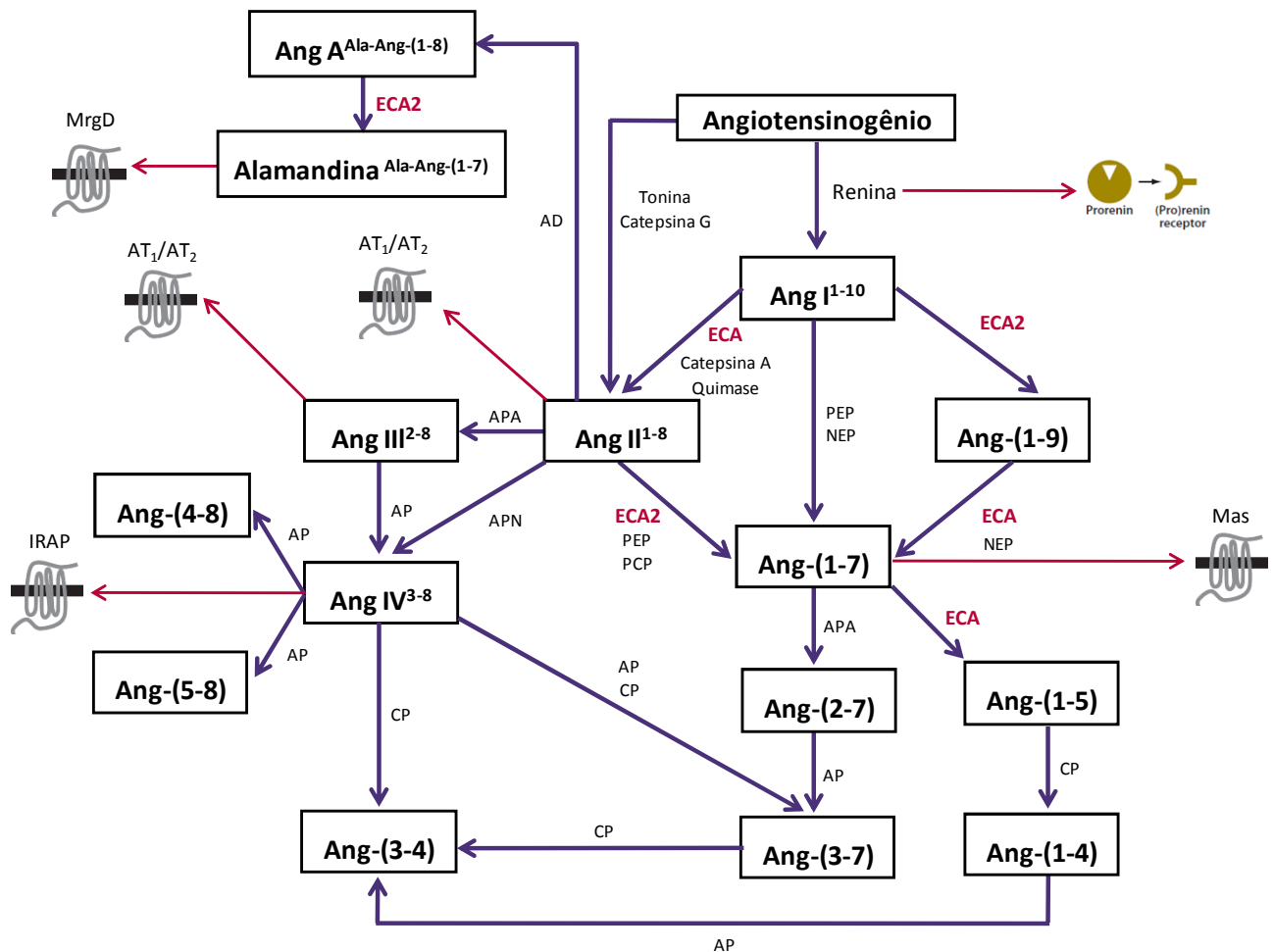
resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda resultado da quebra enzimática da primeira (Skeggs *et al.*, 1954). A partir daí, o SRA começou a ser amplamente estudado.

Atualmente o SRA é considerado um complexo sistema peptidérgico, com características endócrinas, parácrinas e autócrinas e participa da regulação da homeostase cardiovascular, renal e adrenal (Paul *et al.*, 2006). Além de atuar no controle da pressão arterial, na homeostase hidroeletrolítica e na função celular, o SRA exerce papel importante em diferentes patologias, como hipertensão arterial, hipertensão pulmonar, diabetes, hipertrofia e fibrose cardíaca, (Bojestig *et al.*, 2000; Kobori *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Ferreira, Shenoy *et al.*, 2011).

A formação dos peptídeos do SRA (**Figura 1**) se inicia com a clivagem do angiotensinogênio pela renina, uma aspartil-protease que é um fator limitante para o início da cascata do SRA, com a formação de Ang I (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>) (Page e Helmer, 1940b; Skeggs *et al.*, 1956). Para que isso ocorra, a pró-renina deve ser convertida em renina ativa por uma enzima do tipo tripsina (Hsueh e Baxter, 1991). O angiotensinogênio, único precursor dos peptídeos angiotensinérgicos, é secretado principalmente pelo fígado, apesar de poder ser sintetizado em baixas quantidades em outros tecidos, como coração, rins, vasos e cérebro (Atlas, 1998).

A Ang I, formada a partir do angiotensinogênio, é um decapeptídeo biologicamente inativo que, quando clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidilcarboxipeptidase, dá origem ao octapeptídeo Ang II (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), principal peptídeo do SRA (Ng e Vane, 1967). A geração de outro importante peptídeo deste sistema, que foi foco deste estudo, a Ang-(1-7) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), ocorre através de vias enzimáticas

diferentes daquelas observadas na formação da Ang II, sendo a mais importante e eficiente, sob os pontos de vista fisiológico e catalítico, por meio de uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que converte a Ang II em Ang-(1-7) (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2004).



**Figura 1 – Representação esquemática da cascata de formação dos peptídeos angiotensinérgicos.** Ang: angiotensina; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AP: aminopeptidase; AD: aspartato-descarboxilase; APA: aminopeptidase A; APD: aminopeptidase D; APN: aminopeptidase N; CP: carboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolilendopeptidase; AT<sub>1</sub>: receptor de Ang II do tipo 1; AT<sub>2</sub>: receptor de Ang II do tipo 2; Mas: receptor de Ang-(1-7); IRAP: receptor de Ang IV; MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas.



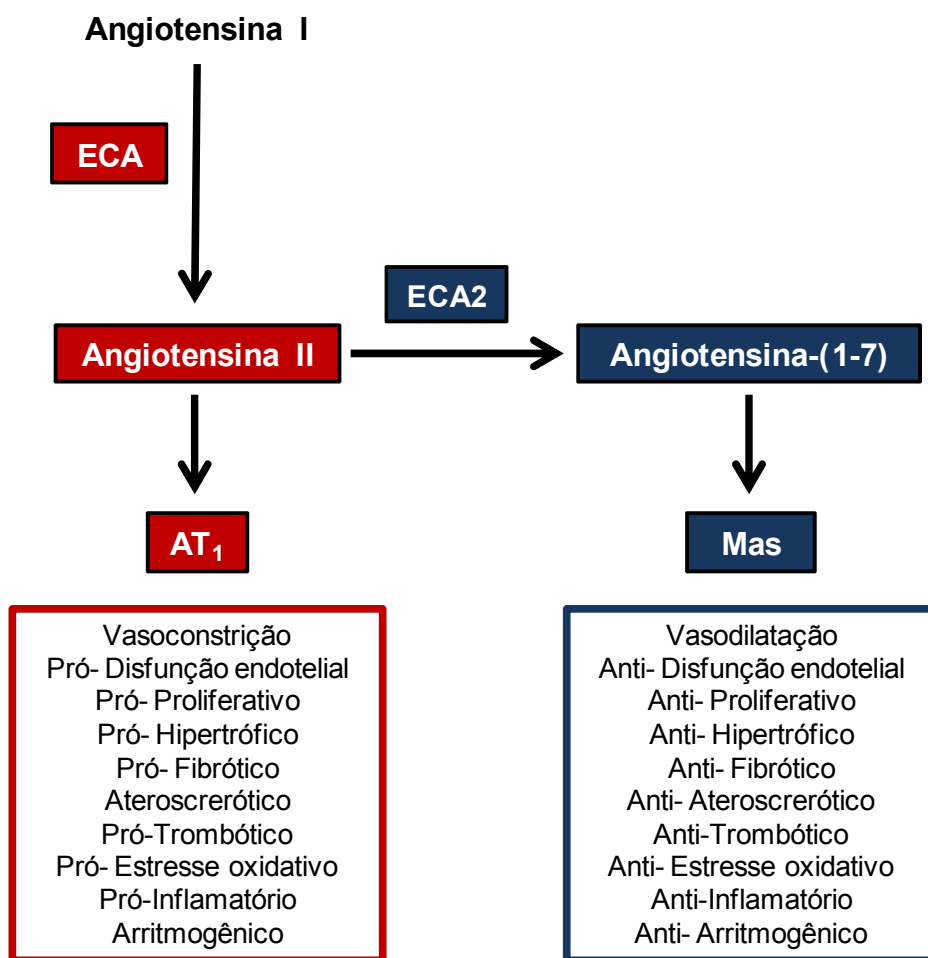
Como observado na **Figura 1**, várias outras vias alternativas podem dar origem a peptídeos do SRA. A Ang I, por exemplo, pode ser clivada diretamente em Ang-(1-7) por endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP). Além disso, Ang I pode ser clivada pela ECA2 com a formação de Ang-(1-9), que por sua vez também pode formar a Ang-(1-7) ao ser clivada por ECA ou NEP (Brosnihan *et al.*, 1998; Tschöpe *et al.*, 2002). A Ang II também pode ser formada independentemente da ECA através da ação da catepsina A e da quimase sobre a Ang I (Ferreira e Santos, 2005). Outros estudos indicam ainda a possibilidade de formação de Ang II independentemente da renina, com a participação de catepsina G, tonina, tripsina ou quimiotripsina (Kokkonen *et al.*, 1998; Belova, 2000; Hu *et al.*, 2003). Tanto a formação desses peptídeos quanto as vias utilizadas são tecido-dependentes, e só ocorrem se os precursores e as enzimas necessárias estiverem presentes.

Nos últimos anos novos peptídeos, receptores e enzimas foram descobertos e adicionados ao complexo SRA. Com a retirada de um aminoácido da extremidade amino-terminal da Ang II pela enzima aminopeptidase A, por exemplo, forma-se a Ang III (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), que por sua vez pode ser clivada pela aminopeptidase N e formar Ang IV (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). Mais recentemente foram identificados ainda a Ang A (Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> - formada pela descarboxilação do aspartato da Ang II por uma aspartato descarboxilase) e Alamandina (Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> – formada pela ECA2 a partir da Ang A) (Jankowski *et al.*, 2007; Lautner *et al.*, 2013). Fragmentos ainda menores, como Ang-(5-8) (Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(4-8) (Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(2-7) (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(3-7) (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(1-5) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>), Ang-(1-4) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>), Ang-(3-4) (Val<sup>3</sup>-

Tyr<sup>4</sup>), bem como as enzimas envolvidas na sua formação, são conhecidos, mas pouco estudados até o momento (Welches *et al.*, 1991; Matsufuji *et al.*, 1995; Neves *et al.*, 1995; Ardaillou, 1997; Axelband *et al.*, 2009).

Após as primeiras descobertas sobre o SRA, há mais de um século, muito se avançou na compreensão de sua fisiologia e fisiopatologia. A descoberta da existência de fragmentos menores biologicamente ativos, como a Ang-(1-7), com ações periféricas e centrais, levaram a uma nova percepção dos mecanismos pelos quais o SRA regula a homeostase cardiovascular (Santos *et al.*, 1988; Campagnole-Santos *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1993; Ferrario *et al.*, 1997; Ferrario, 1998; Ferrario e Iyer, 1998; Roks *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2003; Santos e Ferreira, 2007; Santos *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012).

Atualmente, várias evidências apontam para um novo conceito do SRA, com vias enzimáticas distintas, resultando em dois eixos principais, descritos como vias contra-regulatórias: o eixo ECA/ Ang II/ receptor AT<sub>1</sub> e o eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas (**Figura 2**). Esses eixos desempenham importante função na manutenção da homeostase, e o desequilíbrio nas vias contra-regulatórias do SRA está associado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais (Santos e Ferreira, 2007; Fyhrquist e Saijonmaa, 2008; Bader, 2010; Santiago *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012).



**Figura 2 – Eixos contra-regulatórios do sistema renina-angiotensina.** ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina II; AT<sub>1</sub>: receptor de Ang II do tipo 1; Mas: receptor de Ang-(1-7).

A hiperatividade do eixo formado pela ECA, Ang II e o receptor AT<sub>1</sub>, ocasiona efeitos hipertensivos (Schiffrin e Touyz, 2003b), vasoconstrição (Nguyen Dinh Cat e Touyz, 2011), disfunção endotelial (Rajagopalan *et al.*, 1996; Diep *et al.*, 2002; Endemann e Schiffrin, 2004), proliferação e hipertrofia celular (Lijnen e Petrov, 1999; Touyz *et al.*, 2003; Grobe *et al.*, 2007; Ainscough *et al.*, 2009), remodelamento cardíaco (Grobe *et al.*, 2007) e vascular (Touyz *et al.*, 2003), fibrose e disfunção cardíaca (Auer *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2003; Ainscough *et al.*, 2009), efeitos arritmogênicos (Gavras e Gavras, 2000; Von Lewinski *et al.*, 2008), redução da

sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos *et al.*, 1988; Campagnole-Santos *et al.*, 1992; McMullan *et al.*, 2007), estímulo da secreção de ADH e aldosterona (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008), efeitos pró-trombóticos (Kaminska *et al.*, 2005; Senchenkova *et al.*, 2010), stress oxidativo (Touyz, 2005; Wolf, 2005; Hitomi *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2011), apoptose (Wolf, 2005), inflamação (Schiffrin e Touyz, 2003a; Suzuki *et al.*, 2003; Marchesi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011) e disfunção erétil (Jin, 2009).

Em contrapartida, o eixo formado pela ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas, na maior parte das vezes, possui efeitos contra-regulatórios aos observados pelo eixo ECA/ Ang II/ receptor AT<sub>1</sub> (Iwai e Horiuchi, 2010). A interação da Ang-(1-7) com o receptor Mas resulta em efeitos anti-hipertensivos (Santos *et al.*, 2005; Santos, 2014), vasodilatação em leitos de resistência (Brosnihan *et al.*, 1998; Raffai *et al.*, 2011) e condutância (Lemos *et al.*, 2005), melhora da função endotelial (Ferrario, 2002; Faria-Silva *et al.*, 2005), estímulo da liberação de óxido nítrico e bradicinina (Brosnihan *et al.*, 1996; Sampaio *et al.*, 2007), indução de efeitos anti-hipertróficos, anti-proliferativos, anti-fibróticos (Grobe *et al.*, 2007; Mercure *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2010; Ferreira, Shenoy *et al.*, 2011; Iwata *et al.*, 2011), atenuação da insuficiência cardíaca (Loot *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2010), efeitos anti-arritmogênicos (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004), antitrombóticos (Fraga-Silva *et al.*, 2008), anti-inflamatórios (Da Silveira *et al.*, 2010; Rodrigues-Machado *et al.*, 2013), redução do stress oxidativo (Rabelo *et al.*, 2011), melhora da sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos *et al.*, 1992; Heringer-Walther *et al.*, 2001; Kar *et al.*, 2011; Guimaraes, Santiago, Xavier, Velloso *et al.*, 2012), potenciação do efeito vasodilatador da bradicinina (Fernandes *et al.*,

2001; Carvalho *et al.*, 2007), melhora a função erétil (Da Costa Goncalves *et al.*, 2007), efeitos ansiolíticos e antidepressivos (Kangussu *et al.*, 2013).

## **1.2 Eixo ECA2/ Angiotensina-(1-7)/ receptor Mas no sistema nervoso central**

Estudos do início da década de 70 identificaram os primeiros componentes do sistema renina-angiotensina no cérebro (Fischer-Ferraro *et al.*, 1971; Ganten, Marquez-Julio *et al.*, 1971; Ganten, Minnich *et al.*, 1971; Fuxe *et al.*, 1976). Já no final da década de 80, estudos demonstraram a presença da Ang-(1-7) no cérebro de ratos (Chappell *et al.*, 1989; Ferrario *et al.*, 1990; Schiavone *et al.*, 1990), e em 1992 foi identificado o *mRNA* do receptor Mas no SNC desses animais (Martin *et al.*, 1992). Santos *et al.* (2003) caracterizaram o receptor Mas como receptor específico da Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003), mais recentemente, Becker *et al.* (2007) identificaram o receptor Mas em núcleos cerebrais específicos envolvidos no controle cardiovascular (Becker *et al.*, 2007). Doobay *et al.* (2007) demonstraram que também há expressão da enzima ECA2 no cérebro de camundongos, predominantemente em áreas envolvidas na regulação central das funções cardiovasculares (Doobay *et al.*, 2007).

A demonstração da presença dos componentes do eixo ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas em áreas cerebrais envolvidas no controle cardiovascular, forneceu substrato molecular para explicar a participação da Ang-(1-7) e de outros componentes do SRA na regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos. O aumento agudo ou crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) está relacionado com a melhora de parâmetros cardiovasculares em diferentes modelos experimentais de hipertensão arterial (Britto *et al.*, 1997; Heringer-Walther *et al.*, 2001; Guimaraes,

Santiago, Xavier, Velloso *et al.*, 2012). No SNC, a Ang-(1-7) é amplamente conhecida por ser um potente facilitador do controle barorreflexo da FC (Campagnole-Santos *et al.*, 1989; Campagnole-Santos *et al.*, 1992) e modulador do SNA (Silva *et al.*, 2005; Kar *et al.*, 2011; Guimaraes, Santiago, Xavier, Velloso *et al.*, 2012).

Embora estudos com microinjeção aguda em sítios específicos mostrem que a Ang-(1-7) no SNC promove tanto efeitos simpatoexcitatórios como simpatoinibitórios, dependendo da região cerebral estudada (Silva *et al.*, 1993; Fontes *et al.*, 1997; Alzamora *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005; Alzamora *et al.*, 2006), o aumento crônico dos níveis cerebrais deste peptídeo reduz a PAM de ratos hipertensos, em parte por normalizar o tônus autonômico cardíaco e o controle barorreflexo da FC e da atividade simpática do nervo renal (RSNA) (Guimaraes, Santiago, Xavier, Velloso *et al.*, 2012), bem como por reduzir a RSNA basal em coelhos com insuficiência cardíaca (Kar *et al.*, 2011). Além disso, a deleção do receptor Mas da Ang-(1-7) induziu um importante desequilíbrio no controle neural da pressão arterial, alterando não só o barorreflexo, mas também o quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarisch (De Moura *et al.*, 2010). No entanto, não há na literatura estudos que avaliaram os efeitos do aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) sobre a hipertrofia, fibrose e função cardíaca em ratos hipertensos transgênicos [TGR(mRen-2)27] que apresentam níveis teciduais elevados de Ang II.

Estudos recentes mostraram que a ECA2 também desempenha um importante papel no SNC. Feng *et al.* (2010) mostraram que a superexpressão seletiva da ECA2 no cérebro atenua a hipertensão neurogênica induzida pela infusão de Ang II (Feng *et al.*, 2010). Além disso, Xia *et al.* (2011) mostraram que a deleção do gene da ECA2 em camundongos resulta em estresse oxidativo,

disfunção autonômica e hipertensão arterial (Xia *et al.*, 2011). De forma interessante, a superexpressão da ECA2 na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) de ratos SHR causou uma significativa redução da pressão arterial (Yamazato *et al.*, 2007) e melhora da sensibilidade do controle barorreflexo da FC (Yamazato *et al.*, 2011).

Dentre os principais mecanismos fisiopatológicos da hipertensão arterial está a hiperativação do SRA, caracterizada pela elevação da concentração plasmática ou tecidual de angiotensina II (Ang II). Neste sentido, a ativação dos neurônios localizados nos órgãos circunventriculares pela Ang II, estimula áreas centrais de controle autonômico, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o complexo solitário-vagal (NTS-DMV), o bulbo rostroventrolateral (RVLM) e coluna intermediolateral na medula espinhal (IML) (Zimmerman *et al.*, 2004), contribuindo para a disfunção barorreflexa e hiperatividade do sistema nervoso simpático, os quais promovem vasoconstrição arterial, aumento da variabilidade da PA, redução do fluxo sanguíneo renal e culminam em lesões de órgãos-alvo (Kudo *et al.*, 2009). Adicionalmente, o aumento da expressão de componentes do sistema renina-angiotensina nos diferentes tecidos favorece o aumento da expressão de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias, as quais também estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de lesões em órgãos-alvo como a hipertrofia cardíaca, disfunção endotelial e a esclerose glomerular (Martinka *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

### **1.3 Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco**

Atualmente é muito bem estabelecido que o aumento dos níveis circulantes ou locais de Ang-(1-7) desempenha uma importante contribuição para a manutenção

da fisiologia cardíaca (Kumagai *et al.*, 1990; Danser e Schalekamp, 1996; Danser *et al.*, 1999; Dostal e Baker, 1999; Castro *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2012). Quando em baixas concentrações (230 pM), a Ang-(1-7) é capaz de reduzir a duração e a severidade de arritmias de reperfusão (efeito cardioprotetor, que foi bloqueado pelo antagonista do receptor Mas, A779) e melhorar a função contrátil após isquemia (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004), além de prevenir taquiarritmias e fibrilação atrial em ratos e cães (Ferreira *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). A Ang-(1-7) ainda é capaz de aumentar o débito cardíaco, melhorar a perfusão coronariana, a função cardíaca e reduzir a área de infarto em ratos (Loot *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2011). Além disso, este peptídeo é capaz de atenuar a hipertrofia e fibrose cardíaca induzida por isoproterenol ou pela infusão de Ang II (Grobe *et al.*, 2007; Mercure *et al.*, 2008), provavelmente com a regulação de genes envolvidos na fibrose cardíaca (Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Gava *et al.*, 2012; Patel, Vaibhav B. *et al.*, 2012). A Ang-(1-7) ainda previne o remodelamento patológico de cardiomiócitos através da via óxido nítrico/GMP cíclico, efeito revertido pela administração do A779 (Gomes *et al.*, 2010).

O tratamento sistêmico com inibidores da ECA ou antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> reduz o remodelamento, a hipertrofia e a disfunção cardíaca, provavelmente com a participação de Ang-(1-7) e ECA2, já que existe uma correlação positiva entre a utilização desses inibidores e antagonistas e a expressão de *mRNA* de ECA2 e níveis de Ang-(1-7) cardíacos (Ferrario *et al.*, 2005). Vários trabalhos vêm demonstrando que a ECA2 (cardíaca) é um regulador essencial da função cardíaca, já que é um importante modulador do SRA em condições fisiológicas e patológicas (Crackower *et al.*, 2002; Ferrario *et al.*, 2010; Tikellis e Thomas, 2012). A ECA2 no coração estimula a degradação da Ang I e facilita a formação de Ang-(1-7) (Chappell



*et al.*, 2004). Sua superexpressão no coração apresenta efeitos protetores à fibrose e hipertrofia cardíaca induzida pela Ang II (Huentelman *et al.*, 2005), e a transfecção do gene da ECA2 em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) resultou em efeitos cardioprotetores e anti-hipertensivos (Diez-Freire *et al.*, 2006). Em contrapartida, Trask *et al.* (2010) mostraram que a inibição crônica da ECA2 em ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina promove acúmulo de Ang II no coração e agrava a hipertrofia e a fibrose cardíaca (Trask *et al.*, 2010).

Ratos transgênicos que superexpressam Angiotensina-(1-7) circulante e tecidual [TGR(1-7)3292] apresentam resistência à indução de hipertrofia e fibrose cardíaca induzida por isoproterenol, redução no tempo de arritmias de reperfusão e melhora na função pós-isquêmica em estudos de Langendorff (Santos *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2010). Santiago *et al.* (2010) demonstraram que esses ratos transgênicos também possuem atenuação do remodelamento e disfunção cardíaca induzida pela hipertensão DOCA-sal (Santiago *et al.*, 2010), indicando mais uma vez os efeitos cardioprotetores induzidos pela Ang-(1-7).

#### **1.4 Ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina [TGR(mRen2)27]**

O desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular, genética e bioquímica tem possibilitado a geração de ratos transgênicos, permitindo assim a avaliação da função de genes específicos no sistema cardiovascular *in vivo*. Modelos de ratos transgênicos com alteração de genes relacionados ao SRA têm contribuído para elucidar vários aspectos relacionados a esse sistema (Bader, 1998).

Ratos hipertensos transgênicos que superexpressam o gene Ren2 (renina da glândula submandibular de camundongo) [TGR(mRen2)27], foram desenvolvidos por Mullins *et al.* (1990) para melhor caracterizar os mecanismos envolvidos na interação entre o SRA tecidual e o desenvolvimento de alterações cardiovasculares, especialmente na fisiopatologia da hipertensão arterial. Apesar de apresentarem baixos níveis de Ang II circulante, esse peptídeo foi encontrado em níveis elevados nas glândulas supra-renais, no coração e no cérebro desses animais.

Os ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina desenvolvem hipertensão arterial severa desde muito jovens (Mullins *et al.*, 1990; Bachmann *et al.*, 1992; Bader *et al.*, 1992; Langheinrich *et al.*, 1996), e possuem uma elevada relação Ang II/Ang-(1-7) no hipotálamo e bulbo (Senanayake *et al.*, 1994). Já é bem estabelecido que estes ratos apresentam fibrose cardíaca (Bishop *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Rothermund *et al.*, 2001; Chouabe *et al.*, 2009), remodelamento (Whaley-Connell *et al.*, 2007; Whaley-Connell *et al.*, 2008), hipertrofia (Zolk, Flesch, Nickenig *et al.*, 1998; Zolk, Flesch, Schnabel *et al.*, 1998; Zolk *et al.*, 2002; Chouabe *et al.*, 2009) e disfunção cardíaca (Demarco *et al.*, 2011).

Diz *et al.* (2008) mostraram que esses animais apresentam intensa redução da sensibilidade barorreflexa da frequência cardíaca (Diz *et al.*, 2008), que pode ser restaurada com infusão crônica ICV de Ang-(1-7), através da melhora do componente vagal do barorreflexo (Nautiyal *et al.*, 2012). Garcia-Espinosa *et al.* (2012) mostraram que a administração de Ang-(1-7) na cisterna magna desses animais através de uma proteína de fusão (construct) induz redução da pressão arterial e melhora da sensibilidade barorreflexa (Garcia-Espinosa *et al.*, 2012).

Alguns estudos iniciais foram realizados investigando a participação da Ang-(1-7) na fisiopatologia da hipertensão dos TGR(mRen2)27. Entretanto, os efeitos

cardíacos periféricos induzidos pela ativação do eixo Ang-(1-7)/ receptor Mas no SNC ainda não foram avaliados. Sendo assim, a hipótese deste estudo é que o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) reduz a pressão arterial, melhora a sensibilidade barorreflexa da FC e atenua as alterações cardíacas decorrentes da hipertensão arterial.

## **II. JUSTIFICATIVA**

A importância e a complexidade do SRA têm sido cada vez mais reconhecidas. O eixo Ang-(1-7)/ receptor Mas apresenta efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, sendo um importante contra-regulador de uma série de ações mediadas pela Ang II. Considerando a comprovada relevância do eixo Ang-(1-7)/ receptor Mas, a caracterização dos mecanismos envolvidos nos efeitos cardíacos produzidos pela infusão crônica intracerebroventricular de Ang-(1-7) em ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina poderá ampliar o entendimento sobre o SRA, contribuindo não apenas para o melhor entendimento da participação da Ang-(1-7) na fisiopatologia da hipertensão arterial como também, contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos que visem ampliar as estratégias terapêuticas que poderão atenuar o impacto da hipertensão arterial e contribuir para o tratamento mais efetivo das doenças cardiovasculares

### **III. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar os efeitos cardíacos produzidos pelo aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) em ratos hipertensos transgênicos que superexpressam o gene da renina [TGR(mRen2)<sup>27</sup>].

### **3.2 Estratégias experimentais**

3.2.1 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC altera os níveis basais da PAS, PAD, PAM e da FC em ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina;

3.2.2 Avaliar se o antagonismo do receptor Mas no SNC altera a pressão arterial de TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.3 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC altera a sensibilidade barorreflexa da frequência cardíaca em TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.4 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC atenua as alterações cardíacas (morfológicas e funcionais) em TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.5 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC altera os níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$  em TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.6 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC atenua a fibrose e o remodelamento cardíaco em TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.7 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC altera a expressão e atividade de componentes do SRA cardíaco de TGR(mRen2)<sup>27</sup>;

3.2.8 Avaliar se a ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas no SNC modula o tônus autonômico cardíaco em TGR(mRen2)<sup>27</sup>;



## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos transgênicos heterozigotos que superexpressam o gene da renina de camundongo (Mullins *et al.*, 1990; Langheinrich *et al.*, 1996) e ratos Sprague-Dawley (SD) machos, com idade entre 10 e 12 semanas, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. É importante ressaltar que todos os animais transgênicos utilizados neste estudo foram genotipados e apresentavam o gene Ren2.

Os animais foram mantidos em gaiolas para roedores (3 animais/ caixa) no biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão ao longo de todos os experimentos, com livre acesso a ração padrão de biotério (Nuvilab) e água potável. A temperatura do biotério foi mantida em 21 - 23°C e ciclo claro-escuro de 12h (06:00 h – 18:00 h). Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (protocolo nº – 49/2013).

#### 4.2 Grupos experimentais

**SD**: ratos Sprague-Dawley (controle normotenso), infusão crônica (14 dias) ICV de salina (0,5 µl/ hora);

**(mRen2)27**: ratos hipertensos transgênicos (controle hipertenso), infusão crônica ICV de salina (0,5 µl/ hora);

**(mRen2)27 A7**: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 µg/ hora/ 14 dias);

**(mRen2)27 A7+A779**: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 µg/ hora/ 14 dias) associada ao D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (A-779), antagonista seletivo do receptor Mas (1 µg/ hora/ 14 dias).

### **4.3 Registro de parâmetros cardiovasculares por telemetria**

Os parâmetros cardiovasculares [pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)] foram coletados pelo sistema de telemetria (Data Sciences International, MN). Este sistema foi programado para coletar estes dados durante 10 segundos, na frequência de 500 Hz, a cada 10 minutos, durante todo o protocolo experimental e disponibilizá-los sob a forma de médias aritméticas. A análise desses parâmetros foi realizada através da média aritmética dos valores obtidos em períodos diurnos (06:00 h às 17:50 h) e noturnos (18:00 h às 05:50 h), conforme previamente descrito (Brooks *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 2002).

O Sistema de Telemetria (Data Science International, modelo Dataquest, DataScience A.R.T. – Gold 4.3 EUA) consiste de um dispositivo implantável de rádio-frequência (probe modelo TA11-PA C40), uma placa receptora, uma matriz, um programa para aquisição e outro para análise dos dados que operam a partir do Windows 7.

#### **4.4 Cirurgia para a Implantação do Probe para Registro da Pressão Arterial**

Antes da cirurgia os animais foram aclimatados a sala de registro, onde foram mantidos em caixas individuais sob condições controladas [temperatura (21-23°C) e ciclo claro-escuro de 12h (06:00 h às 18:00 h)], e tiveram livre acesso a água e ração para roedores (Nuvilab), por um período de 10 dias.

Todos os materiais utilizados na cirurgia foram previamente esterilizados e os probes reutilizados foram esterilizados em solução de glutaraldeído 2%. Os animais foram submetidos ao jejum alimentar prévio de 24 horas e anestesiados com tribromoetanol (25mg/ 100g) via intraperitoneal.

Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica, e após tricotomia e assepsia da região abdominal, foi colocado um campo cirúrgico e uma incisão mediana longitudinal de aproximadamente 5 cm foi feita na pele e tecidos subjacentes. A utilização de duas gazes umedecidas com solução salina 0,9% estéril permitiu o deslocamento do mesentério e a visualização da aorta abdominal que foi delicadamente dissecada com o auxílio de pinças cirúrgicas e cotonetes estéreis. Com o auxílio de uma agulha metálica 21G angulada em 90 graus, a aorta foi puncionada e a agulha funcionou como um guia para a introdução do probe na artéria. A agulha metálica foi removida, a área seca e mantida completamente sem sangramento. Imediatamente a seguir, uma gota de cola adesiva biológica foi aplicada sobre o probe e artéria, e sobre estas foi aplicado um pedaço de fibra de celulose (aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>) para auxiliar a adesão do probe no vaso sanguíneo. Para verificar o correto posicionamento do probe dentro da artéria, o probe foi ligado com o auxílio de um imã e aproximou-se um mini-rádio

portátil sintonizado em 550 kHz-AM que capta as ondas de PA reproduzindo o som característico da pulsação do sangue. O corpo do probe foi então suturado juntamente com a camada muscular e a seguir suturou-se a pele do animal. Após a cirurgia foi administrado um antibiótico de amplo espectro (Pentabiótico<sup>®</sup> Veterinário 0,2 mL/ animal, via intramuscular) e um antiinflamatório não-esteroidal (Flunixin Meglumine 1,0 mg/ kg, via subcutânea). O animal foi mantido em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia e posteriormente levado para a sala de registro.

#### **4.5 Configuração do Sistema de Telemetria para a Aquisição dos Parâmetros Cardiovasculares**

Após o período de recuperação da cirurgia de implante do probe (10 dias), os probes foram ligados e então os valores de PAS, PAM, PAD, FC e atividade motora foram coletados a cada 10 minutos durante as 24 horas por 7 dias, os valores basais considerados no presente estudo correspondem a média aritmética dos últimos 3 dias de coleta. Esses dados permitiram avaliar os níveis basais e a variação circadiana da PA, FC e a atividade motora dos animais. Após a obtenção dos valores basais, foi realizada a cirurgia de estereotaxia para o implante do conjunto cânula - mini bomba osmótica para infusão crônica intracerebroventricular de salina, Ang-(1-7) ou Ang-(1-7) associada ao A779 (antagonista seletivo do receptor Mas) por quatorze dias.

#### 4.6 Estereotaxia para Infusão Crônica Intracerebroventricular (ICV)

A infusão crônica intracerebroventricular de Ang-(1-7) (0,2 µg/ hora/ 14 dias), Ang-(1-7)+A779 (0,2 µg/ hora/ 14 dias + 1 µg/ hora/ 14 dias) ou salina estéril (0,5 µl/ hora) foi realizada no ventrículo lateral cerebral direito, com uso de minibombas osmóticas Alzet (modelo 2002 - 0,5 µl/ hora) durante um período de 14 dias.

A cânula ICV foi preparada a partir de um dispositivo de infusão endovenosa (*scalp*), calibre 25G. A agulha foi cortada de modo que o comprimento total estivesse entre 4,0 – 4,2 mm e dobrada em ângulo de 90 graus a fim de conferir a profundidade adequada para canulação do ventrículo lateral. A extremidade posterior do *scalp* foi conectada a um tubo de silicone de 4 cm de comprimento (diâmetro interno= 0,01 mm e diâmetro externo= 0,03 mm) para fazer a conexão entre a bomba osmótica e a cânula ICV.

O conjunto cânula - mini bomba osmótica foi previamente preenchido com solução de Ang-(1-7), Ang-(1-7)+A779 ou solução salina 0,9% estéril e permaneceu imerso em solução salina 0,9% estéril à 37°C por 24 horas antes do procedimento cirúrgico, como recomendado pelo fabricante.

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia com tribromoetanol (25mg/ 100g). Após tricotomia e assepsia da região dorsal da cabeça com álcool iodado 1%, o animal foi posicionado em aparelho esterotáxico a -3,3 mm em relação a linha interaural. Foi realizada uma incisão na pele e os ossos frontais e parietais foram expostos para visualização do ponto de referência Bregma. Dois miniparafusos foram fixados a esquerda do bregma, um no quadrante anterior e outro no posterior. O tecido subcutâneo interescapular foi divulsionado para

acomodação da mini bomba osmótica, e a cânula ICV foi posicionada no ventrículo lateral cerebral direito, de acordo com as seguintes coordenadas: ântero-posterior: 1,0 mm; latero-lateral: 1,6 mm; dorso-ventral: 4,0 mm em relação ao Bregma (Paxinos e Watson, 2007). O conjunto cânula – miniparafusos – ossos parietais foi fixado com uso de cimento e resina ortodôntica e a incisão na pele foi suturada.

Ao final dos experimentos, após a eutanásia dos animais, o volume residual da mini bomba osmótica foi aspirado com a finalidade de verificar a infusão ICV. A presença de volume residual menor que 40 µl confirmou o sucesso da infusão. O posicionamento da cânula ICV também foi verificado após a eutanásia dos animais, pela visualização macroscópica do traçado da cânula em direção ao ventrículo lateral.

#### **4.7 Canulação de artéria e veia femoral**

Em um grupo distinto de ratos no 14<sup>o</sup> dia de infusão ICV, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (25mg/ 100g) e submetidos à canulação de artéria e veia femoral. As cânulas foram preparadas a partir da polimerização por aquecimento de tubos de polietileno PE10 (5 cm - artéria; 3 cm - veia) e PE50 (16 cm) e previamente preenchidas com solução de heparina (5000 UI/ ml) – artéria, ou salina estéril 0,9% - veia. Para o procedimento cirúrgico, a região inguinal esquerda foi tricotomizada e a pele incisada para visualização do feixe vaso-nervoso femoral. Artéria e veia femoral foram dissecadas e canuladas. As cânulas foram acomodadas no tecido subcutâneo e exteriorizadas na região interescapular.

#### 4.8 Avaliação da sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da pressão arterial média (PAM) conforme descrito por Smyth *et al.* (1969) e amplamente utilizado no laboratório (Britto *et al.*, 1997; Heringer-Walther *et al.*, 2001; Caligiorne *et al.*, 2008). Este método consiste na injeção endovenosa de doses crescentes de substâncias vasoconstritoras (fenilefrina, agonista  $\alpha$ -adrenérgico) ou substâncias vasodilatadoras (nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico), que produzem aumento ou redução da PA respectivamente. As alterações na PA causam aumento ou diminuição da atividade dos barorreceptores arteriais, que reflexamente induzem alterações da FC (bradicardia barorreflexa ou taquicardia barorreflexa) (Smyth *et al.*, 1969).

A avaliação do controle barorreflexo da FC foi realizada por meio da razão entre as variações barorreflexas de FC e de PAM obtidas a partir da administração endovenosa em bolus de doses crescentes de fenilefrina (2,5 to 50  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1 ml). Para o cálculo do índice de sensibilidade do barorreflexo, a FC basal e a FC mínima (esta obtida em até 8 segundos após o valor máximo de PAM decorrente da injeção de PE) foram convertidas em intervalos de pulso (IP, milissegundos) pela fórmula  $IP=60000/FC$ ; sendo o índice para cada rato calculado pela média aritmética das razões obtidas entre a variação de IP (ms) e variação de PAM (mmHg) para cada dose de PE. Além disso, foram construídas as retas que correlacionam as variações médias de IP e de PAM para todos os grupos experimentais (regressão linear) (Campagnole-Santos *et al.*, 1988; Guimaraes *et al.*, 2012).



#### **4.9 Avaliação da função cardíaca**

O exame ecocardiográfico foi utilizado para avaliar a morfologia cardíaca e a função ventricular sistólica e diastólica. Os índices ecocardiográficos foram obtidos de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn *et al.*, 1978). A ecocardiografia transtorácica foi realizada através do aparelho de alta resolução VEVO 2100 equipado com transdutores de 16-21 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canada). Primeiramente, os animais foram anestesiados com isoflurano (3,5%). Em seguida, foram submetidos à tricotomia do tórax e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa equipada com eletrodos eletrocardiográficos para o monitoramento contínuo da frequência cardíaca. A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano entre 1% e 1,5% de forma que a frequência cardíaca fosse mantida em torno de 350 batimentos por minuto. Avaliações funcionais e dimensionais foram realizadas *offline* com as imagens geradas em modo M e avaliações bidimensionais com a gravação de CINE loops da visão paraesternal esquerda, eixos curto e longo do coração.

#### **4.10 Avaliação da Estrutura Cardíaca**

Parte do ventrículo esquerdo dos animais utilizados nos estudos fisiológicos foi destinada à análise histológica. Cortes transversais da parede livre do ventrículo esquerdo foram fixados em formol tamponado 10%. Após a inclusão em blocos de parafina, as amostras foram submetidas à microtomia em secções de 5  $\mu$ m com intervalo de 10 cortes. Para análise da hipertrofia cardíaca, três secções de cada animal foram coradas com Hematoxilina e Eosina, visualizadas em um microscópio

de luz (BX41<sup>®</sup>; Olympus, PA, EUA), fotografadas (Q-Color3<sup>™</sup>; Olympus, PA, EUA) sob magnificação de 400x e analisadas com o software ImageJ. O diâmetro do cardiomiócito (50 cardiomiócitos por animal) foi medido na região correspondente ao núcleo celular. Somente cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram considerados para análise.

A fibrose intersticial cardíaca foi avaliada utilizando a coloração de tricrômico de Masson. Depois de coradas, três secções de cada animal foram visualizadas e fotografadas com magnificação de 200x no mesmo sistema utilizado para análise de hipertrofia. A análise da área percentual de fibrose foi realizada no programa ImageJ.

#### **4.11 Avaliação dos níveis de peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e Fator de transformação do crescimento- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

A quantificação dos níveis de ANP no átrio e BNP e TGF- $\beta$  no ventrículo esquerdo dos animais foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se *kits* específicos da Phoenix Pharmaceuticals, Inc., (ANP: EK-005-24; BNP: EK-011-14) e da eBioscience (TGF- $\beta$ : BMS623/2), seguindo criteriosamente o protocolo recomendado pelos fabricantes.

#### **4.12 Expressão de mRNA por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR)**

O ventrículo esquerdo dos animais foi isolado imediatamente após a eutanásia e imerso em solução de *RNAlater* (Life Technologies, AM7024) para

análise da expressão de *mRNA* para colágeno tipo I e III, fibronectina, ECA e ECA2. A técnica de RT-PCR em tempo real foi realizada como descrito resumidamente a seguir:

- a) Extração do RNA total pelo método de guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio, com uso do reagente TRIzol (500  $\mu$ l/ tecido; Invitrogen),
- b) Tratamento do RNA com DNase I (Invitrogen), para eliminação de possível contaminação com DNA genômico,
- c) Quantificação do RNA total e determinação de sua pureza em espectrofotometria (260 nm e razão dos comprimentos de onda 260/ 280 nm),
- d) Transcrição reversa (RT) (1  $\mu$ g RNA total), para construção da fita de cDNA,
- e) Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, que consiste na amplificação do cDNA na região do gene de interesse. Para isto, foram adicionados 3  $\mu$ l do cDNA, primers específicos sense e anti-sense (1pmol/  $\mu$ l; 2  $\mu$ l cada; ver Tabela 1) e o master mix SYBR GREEN (12,5  $\mu$ l; Applied Biosystem). O volume final foi completado para 25  $\mu$ l com água miliQ autoclavada. Esta amplificação foi corrigida pela amplificação do gene de referência, que neste estudo foi o S26, uma proteína ribossômica (ver Tabela 1). O aparelho utilizado para a reação foi o ABI Prism 7000 (Applied Biosystem), sendo realizados 45 ciclos em temperatura de anelamento de 60 °C.

A análise da expressão dos genes foi semi-quantitativa pelo método delta delta CT, onde CT é obtido a partir do *threshold cycle*, que corresponde ao momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso como quantidade

relativa de *mRNA*, segundo o modelo matemático descrito por Livak e Schmittgen *et al.* (2001) (Livak e Schmittgen, 2001).

**Tabela 1. Especificação dos primers utilizados para a realização da RT-PCR.**

<b>Primer</b>	<b>Sequência de nucleotídeos</b>	
Col I	Fw	5' TGTTCACTCTTGTGGACCTC 3'
	Rv	5' CCTTAGGCATTGTGTATGC 3'
Col III	Fw	5' CTTATTTTGGCACAGTCC 3'
	Rv	5' TTTGACATGGTTCTGGCTTCC 3'
Fibronectina	Fw	5' CAGGATCACTTACGGAGAAACAG 3'
	Rv	5' GCCAGTGACAGCATAACAGTG 3'
ECA	Fw	5' CAGAATCTACTCCACTGGCAAGGT 3'
	Rv	5' TCGTGAGGAAGCCAGGATGT 3'
ECA2	Fw	5' GGATACCTACCCTTCCTACATCAGC 3'
	Rv	5' CTACCCACATATCACCAAGCA 3'
S26	Fw	5' CGATTCCTAGCAACCTTGCTATG 3'
	Rv	5' CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT 3'

Col I = Colágeno tipo I; Col III = Colágeno tipo III; ECA= Enzima conversora de angiotensina; ECA2= Enzima conversora de angiotensina 2; S26 = gene de referência; Fw = sequência Forward (sense); Rv= sequência Reverse (antisense)

#### 4.13 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A atividade da ECA foi mensurada por meio de ensaio fluorimétrico, de acordo com o método padronizado por Santos *et al.* 1985 (Santos et al., 1985). As amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas e centrifugadas (1500 rpm) durante 20 minutos a 4 °C. O substrato (Hip-His-Leu) foi utilizado para determinação da atividade enzimática. As etapas do ensaio consistiram em:

- a) Incubação de 30 µL do homogenato de VE em 470 µL de 5 mM do substrato Hip-His-Leu preparado em tampão de sódio borato 0.4 M, NaCl 0,9 M, pH 8.3, durante 30 minutos, a 37 °C.
- b) A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de NaOH 0,34 M; foram adicionados 100 µL de ortoftaldeído (20 mg/mL em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente, 200 µL de HCl 3 N.
- c) Centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foi realizada a leitura do ensaio em leitor de Elisa (BioTek Synergy™ 2; BioTek, VT, EUA) utilizando os seguintes comprimentos de onda: 365 nm de excitação e 495 nm de emissão.
- d) Após a leitura das amostras, os valores obtidos foram normalizados pela concentração de proteína nas respectivas amostras.
- e) A atividade da enzima foi expressa em nmoles de His-Leu/ minuto/ mg de proteína.

#### 4.14 Atividade da Enzima conversora de Angiotensina tipo2 (ECA2)

A atividade da ECA2 foi realizada de acordo com o método previamente descrito por (Huang *et al.*, 2003; Huentelman *et al.*, 2004) e adaptado por (Fraga-Silva *et al.*, 2013). O ensaio cinético foi realizado usando substratos fluorogênicos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) (ECA2: ES007).

Amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão composto por Tris-HCl 75 mM, pH 7.5; NaCl 1M e ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em pH 7.4 com um volume final de 100 µL. A solução de reação continha: homogenato de VE 140 µg, 50 µM de substrato, NaCl 5 M, Tris-HCl 75 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,5 µM, inibidor específico da ECA2 (DX 600) 10 µM e um inibidor específico da ECA (Captopril) 10 µM. Imediatamente após a adição do substrato fluorogênico, a cinética de atividade da enzima com a leitura de fluorescência a cada minuto foi realizada em um leitor de fluorescência Spectra Max (Molecular Devices, EUA), durante 60 minutos, a 37°C. O controle de fluorescência foi realizado com reações sem a presença de amostra. O resultado de cada amostra foi expresso em unidades arbitrárias (u.a.) correspondentes a média dos últimos 5 minutos de leitura, onde a reação atingiu o platô. Além disso, a atividade enzimática foi corrigida pela concentração de proteínas presentes nas amostras. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade da ECA2 foi expressa em fluorescência (u.a.)/ minuto/ mg de proteína.

#### 4.15 Níveis teciduais dos peptídeos Ang II e Ang-(1-7)

Os níveis dos peptídeos foram determinados pela técnica de radioimunoensaio, realizado de acordo com protocolo padronizado pelo Laboratório de Hipertensão do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG (Botelho et al., 1994). Brevemente:

**Homogeneização do VE:** neste estudo as amostras de VE foram homogeneizadas com o auxílio de homogeneizador (Mini MA 102, Marconi) e aparelho ultra-som (Vibra Cell, Sonics e Materials Inc) utilizando-se 2,5 ml de solução 4 Molar de Tiocianato de Guanidina (AMRESCO) preparada em Ácido Trifluoracético 1% (Sigma) em tubos previamente lavados com 10 µl de albumina sérica bovina (BSA) 5%. Após este procedimento, foram retirados 200 µl de cada amostra para a dosagem de proteínas pelo método de (Bradford, 1976). Foram acrescentados 200 µl de clorofórmio P.A (Merck) à cada amostra para a dissolução de gorduras, seguido de centrifugação a 2.700 rpm por 20 minutos a 4 °C.

**Extração das Amostras em Coluna BOND-ELUT C 18:** as amostras de plasma e tecido foram aplicadas nas colunas previamente ativadas, e a solução final coletada (acetonitrila 99%/ ácido heptafluorobutírico 0,1%, 3 ml) foi liofilizada em centrífuga evaporadora (VR-1 *Heto Lab. Equipment*) por 40 - 48 horas até a formação do resíduo contendo os peptídeos. Este resíduo foi estocado a -20 °C até a realização do radioimunoensaio (RIE).

**Radioimunoensaio (RIE):** a técnica de radioimunoensaio para Ang-(1-7) e Ang II e as soluções tampão utilizadas seguiram a padronização de Botelho et al.,

(1994) e a radioatividade foi medida em contador gama (1275 minigamma counter *LKB Wallac*).

**Dosagem de Proteínas:** a quantificação das proteínas presentes nos homogenatos de VE foi realizada pelo método clássico de Bradford (1976). O valor de proteínas totais em cada amostra foi utilizado para expressar os níveis de angiotensinas no tecido.

#### **4.16 Determinação da expressão protéica dos receptores AT<sub>1</sub> e Mas por Western blotting**

Após a remoção do coração, secções de VE foram rapidamente coletadas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise contendo, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, e coquetel de inibidores de proteases contendo ortovanadato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 10 mM. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm por 2 min à 4 °C.

A concentração protéica das amostras foi determinada por leitura em espectrofotômetro, em triplicata e por comparação com curva de solução de albumina em concentrações conhecidas, através do método de Bradford (Bradford, 1976). Para análise das proteínas de interesse, foram utilizadas 60 µg de proteínas totais, preparadas em tampão de amostra Lammeli 5x (4 mL de Tris-HCl 1,5 M, pH 6.8, 10 mL de glicerol, 5 mL de β-mercaptoetanol, 2 g de SDS, 1mL de 1% azul de bromofenol). Todas as alíquotas foram padronizadas para um volume final de 15 µL



completando-se o volume com água Milli-Q, quando necessário. As amostras, depois de preparadas, foram aquecidas a 95°C por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida 4% (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS e Temed) e 10% (1,5 M Tris-HCl, pH 8.8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em tampão de eletroforese (25 mM de Tris-HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 150V por aproximadamente 1 hora, para separação protéica por peso molecular.

Posteriormente as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por meio de nova eletroforese. Para isso, o gel, a membrana e o papel de filtro whatman foram montados de forma sobreposta em presença de tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM e Metanol 20%) e foram mantidos a 4°C durante todo processo de transferência, com corrente constante de 100V por 1,5 horas. Ao final da transferência, as membranas foram coradas com solução Ponceau para verificação da eficiência do processo.

Para eliminar ligações inespecíficas, foi utilizado solução de bloqueio contendo leite desnatado 6% em TBS-T, por período de 1 hora em temperatura ambiente.

Após a realização do bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-AT<sub>1</sub> (1:1000; Millipore), policlonal anti-Mas (1:300; Alomone) e policlonal anti-GAPDH (1:1000 Santa Cruz) overnight à 4 °C. Ao término do período de incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T 1x por 10 minutos seguindo-se a incubação com anticorpo secundário

fluorescente (Licor, Estados Unidos 1:10.000), anti-rabbit ou anti-mouse de acordo com as especificações do animal onde foi produzido o anticorpo primário.

A detecção das proteínas foi realizada por um sistema de scanner de fluorescência (Odyssey – Licor, Estados Unidos) de acordo com o comprimento de onda do anticorpo secundário, por meio do software Odyssey. A intensidade de fluorescência foi quantificada por densitometria (software Odyssey) e normalizada pelo controle endógeno GAPDH.

#### **4.17 Avaliação do tônus autonômico cardíaco**

A atividade autonômica cardíaca foi avaliada pelo bloqueio seqüencial e em dias subseqüentes dos receptores muscarínicos e  $\beta$ -adrenérgicos, conforme previamente descrito (Soato e Krieger, 1974). No 1° dia de avaliação, pelo menos 30 minutos após a avaliação do controle barorreflexo da FC, o animal foi submetido ao bloqueio dos receptores muscarínicos pelo administração endovenosa de metil-atropina (3 mg/ kg). Após um intervalo de 15 minutos foi injetado, também por via endovenosa, o antagonista não seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos propranolol (4 mg/ kg). O registro da PAM e FC foi mantido por mais 15 minutos para obtenção da FC intrínseca. No 2° dia, PAM e FC foram monitorados por pelo menos 30 minutos para obtenção dos valores basais, e na seqüência, foram novamente administrados os antagonistas por via endovenosa, contudo na ordem inversa. Foram considerados os seguintes valores:

- a) FC intrínseca – média da FC obtida após a administração dos dois antagonistas em cada dia;

- b) FC mínima – menor valor de FC obtido após a administração de propranolol (2° dia);
- c) FC máxima – valor máximo de FC obtido após a administração de metil-atropina (1° dia).

Foi considerado o tônus parassimpático a diferença entre a FC intrínseca e a FC mínima; e o tônus simpático a diferença entre a FC máxima e a FC intrínseca.

#### **4.18 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software Corporation, versão 5.00, 2007), utilizando-se a análise de variância ANOVA de uma via (One-Way ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## **V. RESULTADOS**

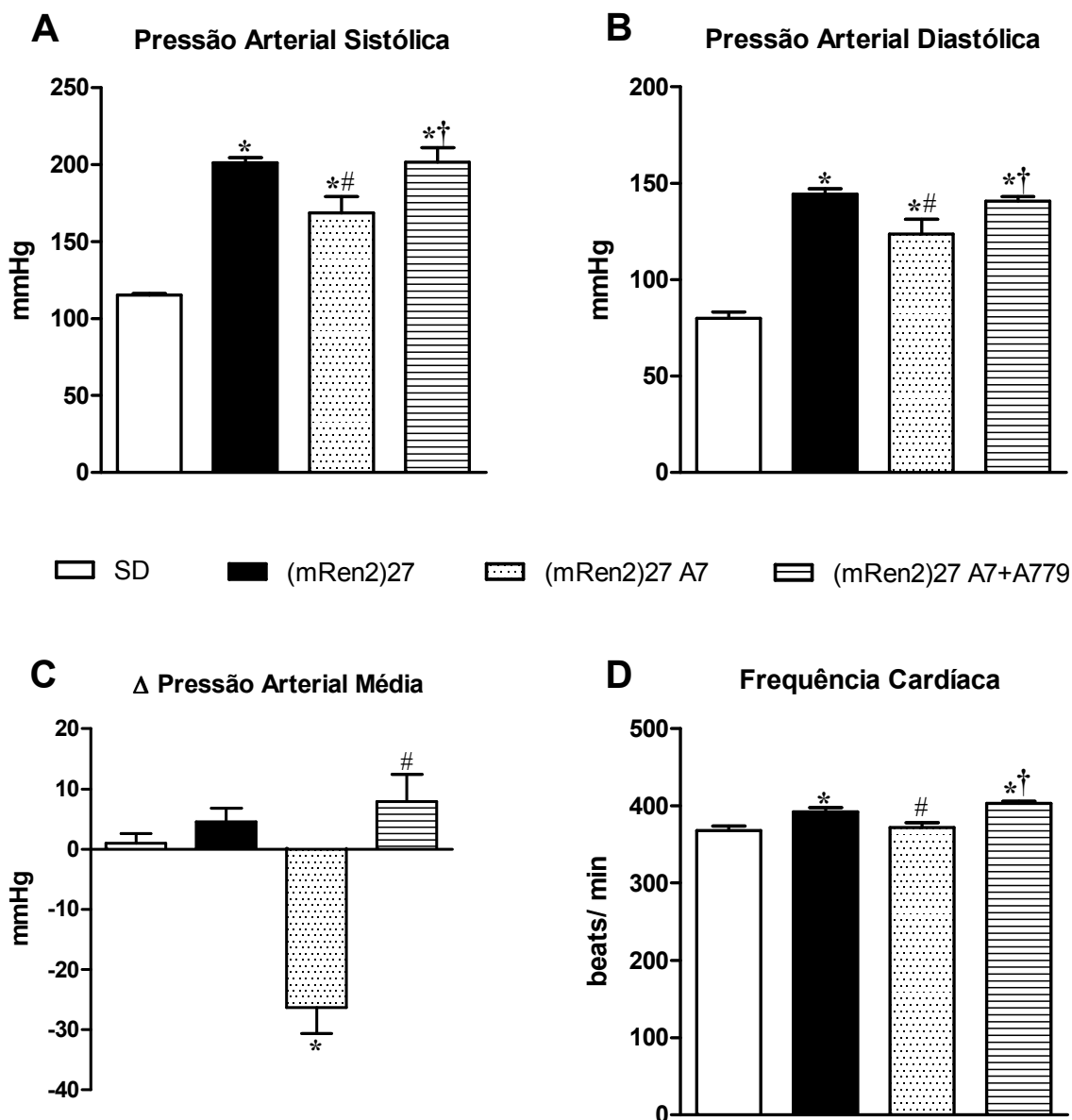
### 5.1 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 sobre parâmetros cardiovasculares basais

Como esperado, a PAS ( $201,3 \pm 3,37$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $144,3 \pm 2,94$  mmHg,  $n= 5$ ) e FC ( $392,2 \pm 5,48$  bpm,  $n= 5$ ) basal dos ratos hipertensos que receberam infusão ICV de salina foi significativamente maior que a observada nos ratos SD: PAS ( $115,3 \pm 0,91$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $79,8 \pm 3,34$  mmHg,  $n= 5$ ) e FC ( $367,9 \pm 5,60$  bpm,  $n= 5$ ). A infusão ICV de Ang-(1-7) por quatorze dias reduziu a PAS ( $168,7 \pm 10,5$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $123,6 \pm 7,77$  mmHg,  $n= 5$ ) e FC ( $371,8 \pm 6,09$  bpm,  $n= 5$ ), além de produzir redução na PAM em comparação ao período basal de cada animal ( $-26,3 \pm 4,28$  mmHg,  $n= 5$ ). Interessantemente, os efeitos induzidos pela infusão crônica ICV de Ang-(1-7) foram totalmente abolidos pela infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 (antagonista seletivo do receptor Mas): PAS ( $201,8 \pm 9,19$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $140,7 \pm 2,33$  mmHg,  $n= 5$ ) e FC ( $402,8 \pm 3,31$  bpm,  $n= 5$ ) figura 3.

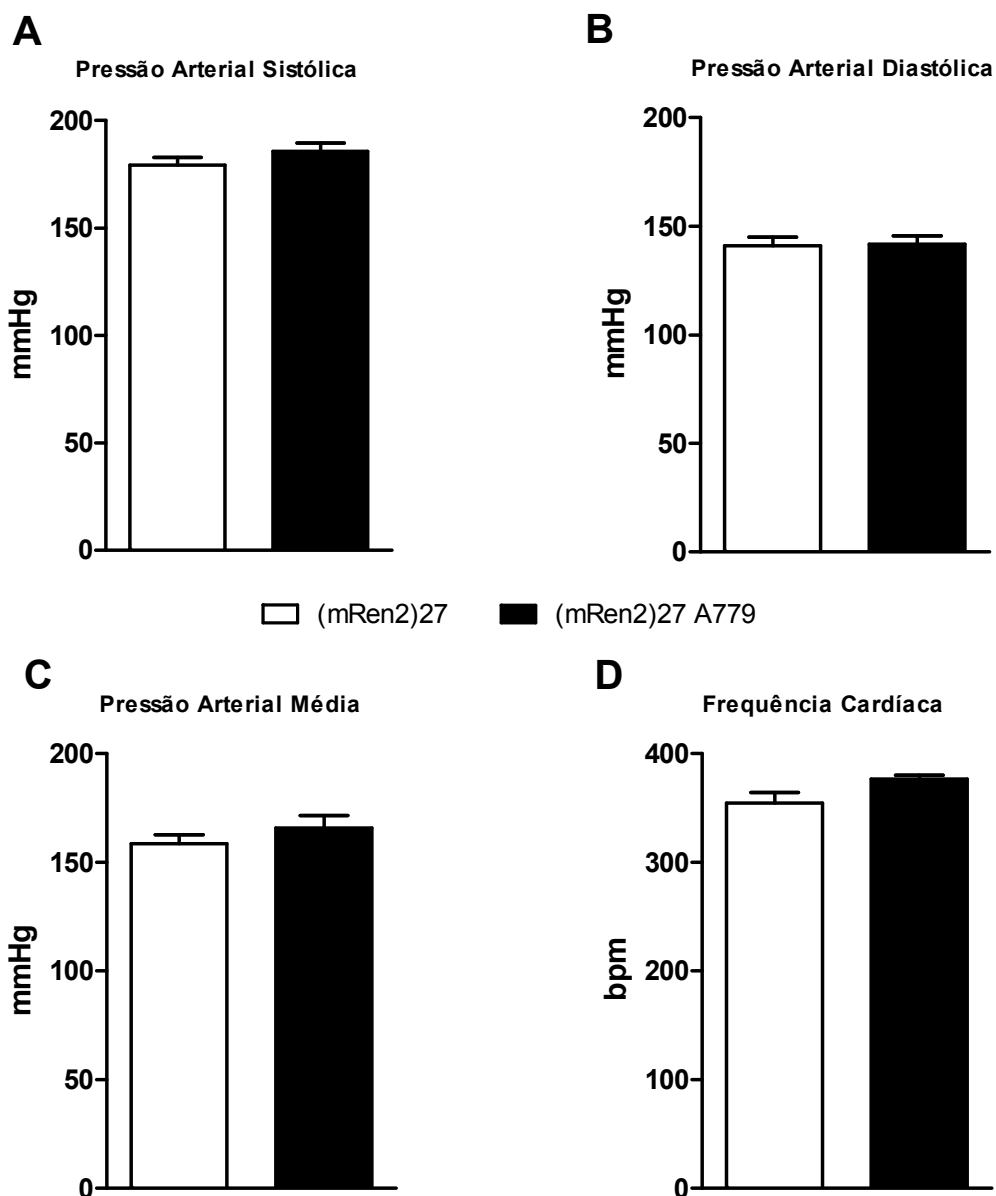
Após ter mostrado que os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) no sistema nervoso central sobre a pressão arterial eram mediados pelo receptor Mas, foi avaliada a participação desse receptor sobre a pressão arterial basal de TGR(mRen2)<sup>27</sup>. Como mostrado na figura 4, a infusão crônica ICV de A779 não alterou a PAS ( $185,6 \pm 4,01$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $141,7 \pm 3,80$  mmHg,  $n= 5$ ), PAM ( $165,8 \pm 5,69$  mmHg,  $n= 5$ ) e FC ( $376,5 \pm 3,32$  bpm,  $n= 5$ ) de ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina quando comparado aos animais que receberam a infusão ICV de salina PAS ( $179,4 \pm 9,19$  mmHg,  $n= 5$ ), PAD ( $140,9 \pm 4,01$  mmHg,  $n= 5$ ), PAM ( $158,4 \pm 4,23$  mmHg,  $n= 5$ ) ou FC ( $354,4 \pm 9,74$  bpm,  $n= 5$ ).

## 5.2 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 no controle barorreflexo da frequência cardíaca

Os ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina apresentaram um prejuízo da sensibilidade do controle barorreflexo da FC comparado aos ratos SD ( $0,39 \pm 0,06$  ms/mmHg,  $n= 5$  vs.  $0,77 \pm 0,07$  ms/mmHg,  $n= 6$ ). A infusão crônica ICV de Ang-(1-7) melhorou a sensibilidade do controle barorreflexo da FC ( $0,64 \pm 0,05$  ms/mmHg,  $n= 6$ ). Esta melhora também pode ser observada pela inclinação da reta que correlaciona as variações médias de PAM e FC (em intervalo de pulso) para todos os grupos. A reta do grupo (mRen2)<sup>27</sup> A7 apresentou maior inclinação quando comparada a reta que representa o grupo (mRen2)<sup>27</sup>, aproximando-se da reta que representa os ratos SD (Figura 5B). Interessantemente, a melhora da sensibilidade do controle barorreflexo da FC promovida pelo aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi totalmente revertida pela infusão ICV simultânea de Ang-(1-7) com o A779 ( $0,31 \pm 0,04$  ms/mmHg,  $n= 6$ ) figuras 5A e 5B.

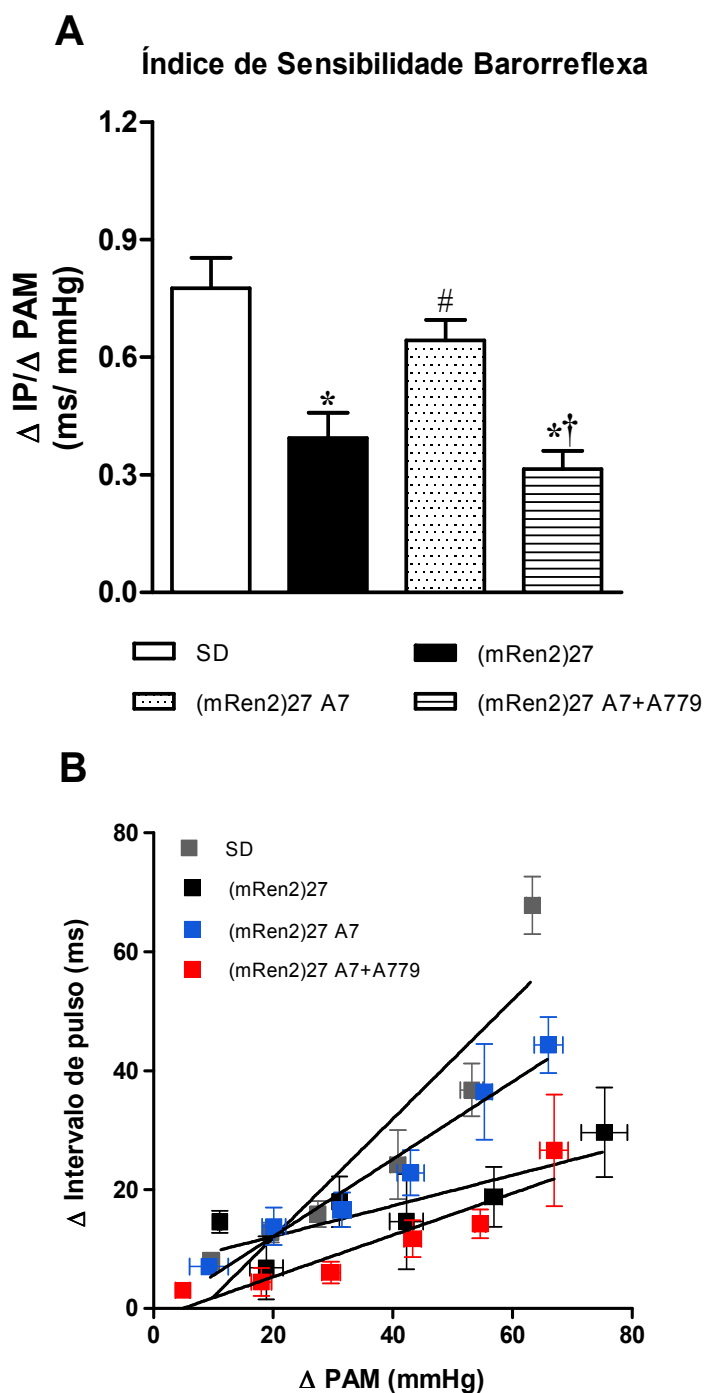


**Figura 3.** Pressão arterial sistólica (A; PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (B; PAD, mmHg),  $\Delta$  pressão arterial média (C;  $\Delta$  PAM, mmHg) e frequência cardíaca (C; FC, bpm) de ratos controle, infusão ICV de salina (SD,  $n=5$ ), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27,  $n=5$ ], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7,  $n=5$ ] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779,  $n=5$ ] ICV. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).



**Figura 4.** Pressão arterial sistólica (A; PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (B; PAD, mmHg), pressão arterial média (C; PAM, mmHg) e frequência cardíaca (D; FC, bpm) de ratos hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27,  $n=5$ ], e hipertensos tratados com A779 [(mRen2)27 A779,  $n=5$ ] ICV. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Teste t-Student).





**Figura 5.** Índice de sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca (ms/mmHg) de ratos controle, infusão ICV de salina (SD,  $n=6$ ), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27,  $n=5$ ], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7,  $n=6$ ] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779,  $n=6$ ] ICV. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

### **5.3 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 sobre parâmetros cardíacos morfológicos e funcionais**

Em relação à morfologia cardíaca avaliada pelo ecocardiograma, os TGR(mRen2)<sup>27</sup> apresentaram aumento do diâmetro interno do VE na sístole e na diástole, aumento da espessura da parede posterior do VE na sístole e na diástole, aumento da espessura do septo interventricular na sístole e intenso aumento da massa do VE. Conforme esperado, a infusão ICV de Ang-(1-7) foi capaz de atenuar o aumento do diâmetro interno do VE na sístole e na diástole, além de reduzir acentuadamente a hipertrofia cardíaca. O tratamento simultâneo de Ang-(1-7) com A779 foi capaz de abolir o efeito anti-hipertrófico induzido pela Ang-(1-7) (Tabela 1).

Para análise da função ventricular foi realizada a análise *in vivo*, também utilizando a técnica de ecocardiografia. Observou-se hiperdinamismo caracterizado por aumento da fração de encurtamento e da fração de ejeção do VE, aumento do débito cardíaco, aumento dos volumes sistólico e diastólico do VE. O tratamento crônico ICV com Ang-(1-7) foi capaz de atenuar parcialmente essas alterações. Além disso, parte desses efeitos foram prevenidos pela infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 (Tabela 2).

Em relação ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), que é um importante indicador da função diastólica, observou-se aumento do TRIV nos animais hipertensos que receberam a infusão ICV de salina e não foram observadas alterações nesse parâmetro nos animais tratados com Ang-(1-7) ou Ang-(1-7) associada ao A779 (Tabela 2). Avaliando ainda a função diastólica pela relação entre as ondas E e A do influxo pela válvula mitral (Razão E/A) não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais.

**Tabela 2. Parâmetros morfológicos cardíacos**

Parâmetro	SD	(mRen2)27	(mRen2)27 A7	(mRen2)27 A7+ A779
Septo interventricular - diástole (mm)	1.31 ± 0.08	1.34 ± 0.11	1.49 ± 0.06	1.93 ± 0.11*#†
Diâmetro interno do VE - diástole (mm)	7.24 ± 0.17	8.73 ± 0.11*	7.86 ± 0.29#	7.70 ± 0.33#
Parede posterior do VE - diástole (mm)	1.57 ± 0.04	2.10 ± 0.07*	2.23 ± 0.12*	2.36 ± 0.19*
Septo interventricular - sístole (mm)	2.30 ± 0.11	2.67 ± 0.16*	2.56 ± 0.18	3.10 ± 0.13*
Diâmetro interno do VE - sístole (mm)	4.45 ± 0.19	5.27 ± 0.08*	4.25 ± 0.09#	4.24 ± 0.33#
Parede posterior do VE - sístole (mm)	2.66 ± 0.07	3.21 ± 0.10*	3.44 ± 0.16*	3.76 ± 0.39*
Massa do VE (mg)	559.1 ± 36.0	990.2 ± 15.4*	777.8 ± 88.0*#	1125.0 ± 36.9*†

Valores expressos como média ± erro padrão da média.  $n=6$  animais por grupo. SD: ratos Sprague-Dawley (controle normotenso), infusão crônica ICV de salina, (mRen2)27: ratos hipertensos transgênicos (controle hipertenso), infusão crônica ICV de salina; (mRen2)27 A7: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias); (mRen2)27 A7+A779: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias) + A779 (Antagonista seletivo do receptor Mas) (1 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias). VE: ventrículo esquerdo; mm: milímetro; mg: miligrama. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

**Tabela 3. Função ventricular sistólica e diastólica**

Parâmetro	SD	(mRen2)27	(mRen2)27 A7	(mRen2)27 A7+ A779
Fração de encurtamento do VE (%)	38.6 ± 1.20	46.6 ± 1.40*	45.6 ± 1.7 0*	45.0 ± 3.03*
Fração de ejeção do VE (%)	67.3 ± 1.56	70.7 ± 2.03	73.6 ± 0.90	74.4 ± 3.33
Débito cardíaco (ml/min)	62.9 ± 2.64	103.0 ± 8.49*	67.56 ± 4.0#	85.14 ± 5.08*†
Volume sistólico (µL)	169.5 ± 7.95	257.6 ± 22.5*	193.8 ± 13.2#	237.4 ± 6.68*†
Volume diastólico final do VE (µL)	277.2 ± 15.2	399.6 ± 21.5*	314.0 ± 24.6#	319.6 ± 30.4#
Volume sistólico final do VE (µL)	91.3 ± 9.09	133.8 ± 4.85*	81.2 ± 4.15#	94.6 ± 12.4
Razão E/A	1.23 ± 0.17	1.26 ± 0.18	1.31 ± 0.08	1.31 ± 0.10
Tempo de relaxamento isovolumétrico (ms)	11.50 ± 0.44	13.24 ± 0.31*	13.70 ± 0.61*	13.52 ± 0.57*

Valores expressos como média ± erro padrão da média.  $n=6$  animais por grupo. SD: ratos Sprague-Dawley (controle normotenso), infusão crônica ICV de salina, (mRen2)27: ratos hipertensos transgênicos (controle hipertenso), infusão crônica ICV de salina; (mRen2)27 A7: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias); (mRen2)27 A7+A779: ratos hipertensos transgênicos (grupo hipertenso tratado), infusão crônica ICV de Angiotensina-(1-7) (0,2 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias) + A779 (Antagonista seletivo do receptor Mas) (1 nmol/ 0,5 µl/ hora/ 14 dias).VE: ventrículo esquerdo; ms: milissegundo.\* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

#### **5.4 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na estrutura cardíaca**

Corroborando os resultados obtidos na avaliação ecocardiográfica, a análise morfométrica na parede livre do VE evidenciou a presença de hipertrofia em cardiomiócitos dos ratos hipertensos (mRen2)<sup>27</sup> ( $14,4 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ,  $n= 6$ ) quando comparado aos ratos SD ( $11,3 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ,  $n= 6$ ). A hipertrofia celular foi significativamente atenuada pelo tratamento crônico ICV com Ang-(1-7) ( $13,2 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ,  $n= 6$ ). Em contraste, o tratamento simultâneo ICV de Ang-(1-7) com o A779 foi capaz de abolir o efeito anti-hipertrófico induzido pela Ang-(1-7) ( $13,7 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ,  $n= 6$ ), confirmando os resultados obtidos na análise ecocardiográfica, esses resultados podem ser observados na figura 6.

#### **5.5 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 nos níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$**

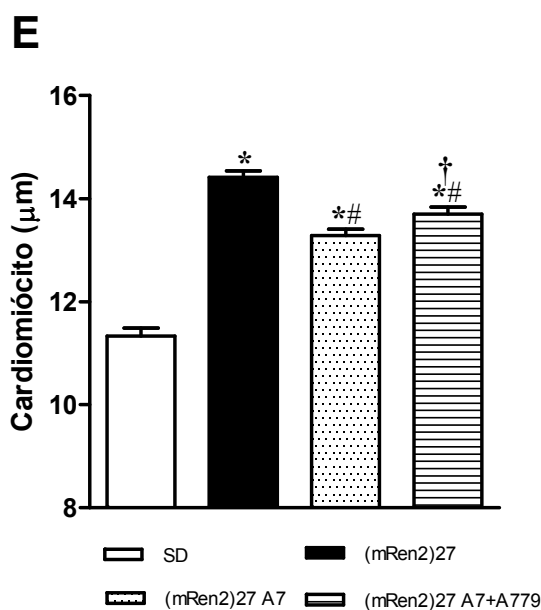
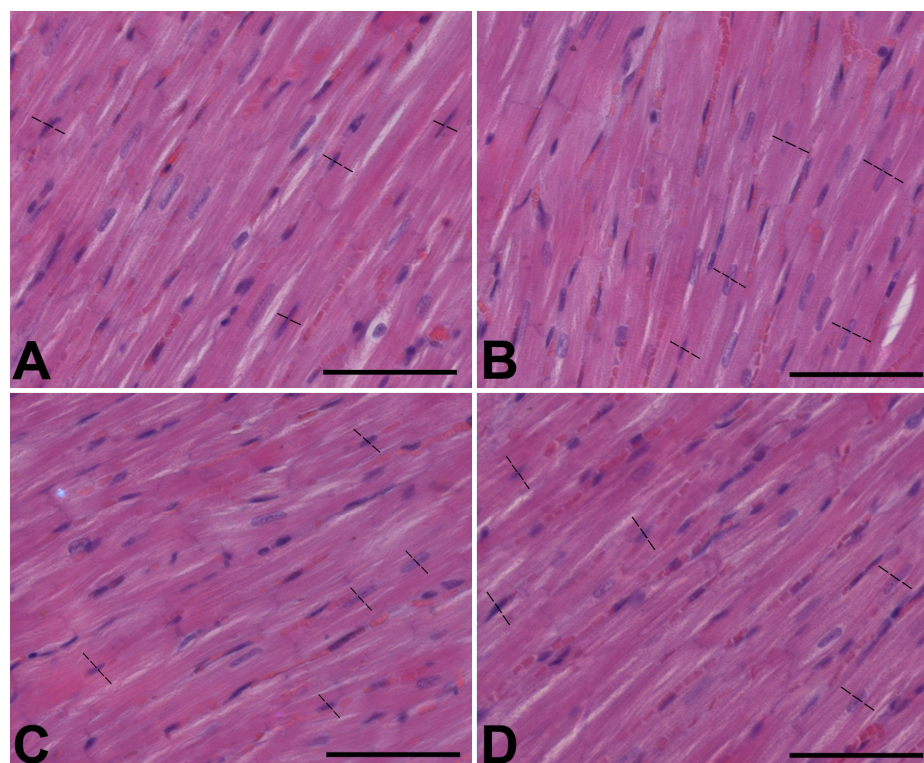
Como esperado, os ratos hipertensos que receberam infusão ICV de salina apresentaram níveis aumentados dos marcadores de estresse mecânico cardíaco: ANP ( $203,2 \pm 23,6 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ), BNP ( $44,6 \pm 8,24 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 4$ ) e de TGF- $\beta$  ( $273,7 \pm 22,9 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ), que é um importante fator de crescimento celular, quando comparado aos ratos normotensos controle: ANP ( $55,2 \pm 14,9 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ), BNP ( $15,5 \pm 3,62 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ) e TGF- $\beta$  ( $167,6 \pm 6,18 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ). O aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir significativamente os níveis destes mediadores: ANP ( $104,8 \pm 18,7 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ ), BNP ( $23,9 \pm 2,14 \text{ pg/mg}$ ,  $n= 5$ )

e TGF- $\beta$  ( $191,5 \pm 16,1$  pg/mg,  $n= 6$ ). Além disso, a infusão crônica ICV simultânea de Ang-(1-7) com o A779 foi capaz de reverter os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) nos níveis de ANP ( $169,1 \pm 20,8$  pg/mg,  $n= 5$ ) e TGF- $\beta$  ( $318,1 \pm 25,1$  pg/mg,  $n= 6$ ) e, apesar de uma tendência não foi capaz de reverter a redução dos níveis de BNP ( $35,5 \pm 5,96$  pg/mg,  $n= 4$ ) figura 7.

### **5.6 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 nos níveis colágeno tipo I e III, fibronectina e área de fibrose cardíaca**

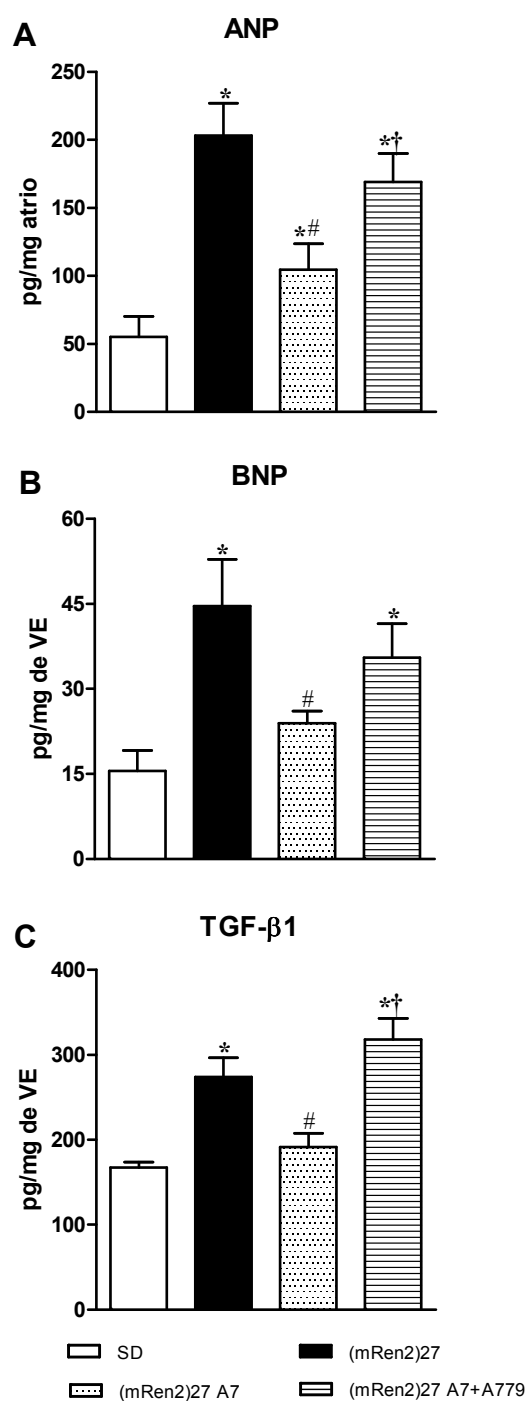
Com o objetivo de avaliar os níveis de componentes da matriz extracelular no VE, foi avaliada a expressão gênica (mRNA) de colágeno tipo I, tipo III e fibronectina. Como previsto, os animais hipertensos que receberam a infusão crônica ICV de salina apresentaram intenso aumento na expressão gênica desses componentes quando comparado aos ratos SD: colágeno I ( $5,49 \pm 0,58$  u.a.,  $n= 4$  vs.  $1,28 \pm 0,34$  u.a.,  $n= 4$ ), colágeno III ( $13,0 \pm 1,08$  u.a.,  $n= 4$  vs.  $1,49 \pm 0,36$  u.a.,  $n= 4$ ) e fibronectina ( $4,89 \pm 0,74$  u.a.,  $n= 4$  vs.  $1,38 \pm 0,12$  u.a.,  $n= 4$ ). De forma interessante, o tratamento crônico ICV com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir os níveis de mRNA do colágeno tipo I ( $2,93 \pm 0,49$  u.a.,  $n= 4$ ) e fibronectina ( $2,60 \pm 0,28$  u.a.,  $n= 4$ ), não alterando os níveis de mRNA do colágeno III ( $12,2 \pm 1,64$  u.a.,  $n= 4$ ). Além disso, o tratamento simultâneo ICV de Ang-(1-7) com o A779 foi capaz de prevenir a redução dos níveis de fibronectina induzido pela Ang-(1-7) ( $5,01 \pm 0,43$  u.a.,  $n= 4$ ), não alterando estatisticamente os níveis de colágeno tipo I ( $4,19 \pm 0,89$  u.a.,  $n= 4$ ) e III ( $13,6 \pm 1,46$  u.a.,  $n= 4$ ) figura 8.

Em concordância com os resultados de expressão gênica, os ratos hipertensos apresentaram intenso aumento da deposição de colágeno intersticial no VE quando comparado aos ratos SD ( $4,27 \pm 0,49 \%$ ,  $n= 5$  vs.  $1,66 \pm 0,25 \%$ ,  $n= 5$ ). No entanto, o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi capaz de atenuar a fibrose cardíaca em TGR(mRen2)27 ( $2,60 \pm 0,45\%$ ,  $n= 5$ ). Em contraste, o tratamento crônico ICV simultâneo de Ang-(1-7) com A779 preveniu o efeito anti-fibrótico induzido pela Ang-(1-7) ( $4,74 \pm 0,54 \%$ ,  $n= 5$ ) figura 9.

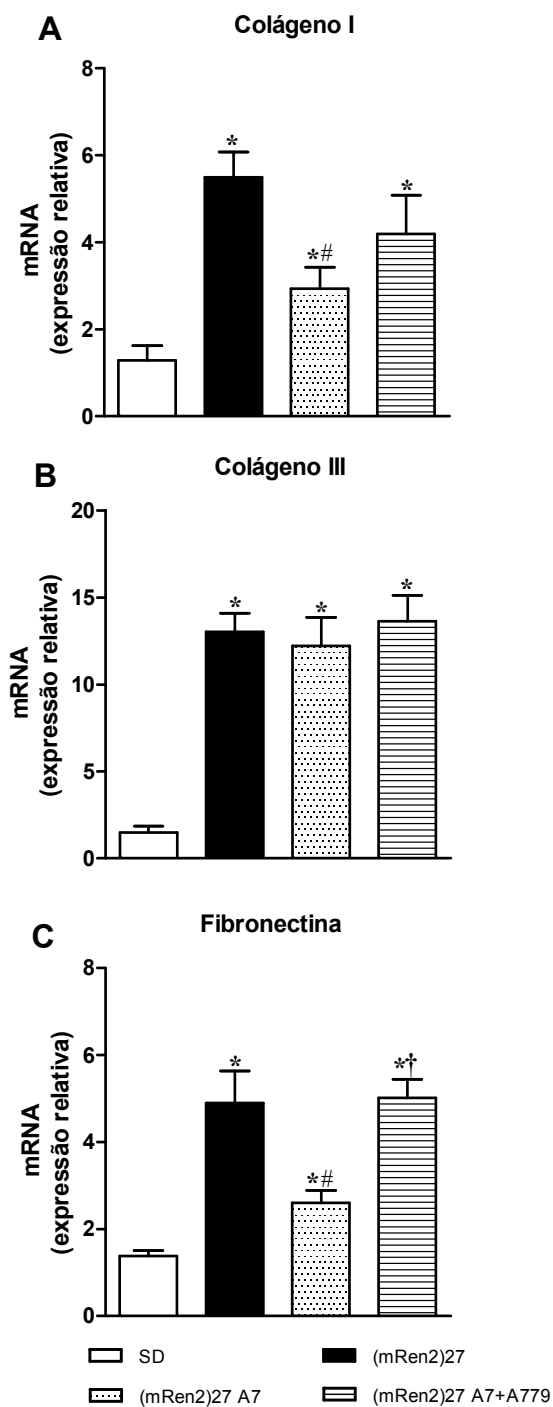


**Figura 6.** Fotomicrografias representativas de cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (A), hipertensos controle, infusão ICV de salina (B), hipertensos tratados com Ang-(1-7) (C) e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 (D) ICV e diâmetro de cardiomiócitos (E).  $n=6$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

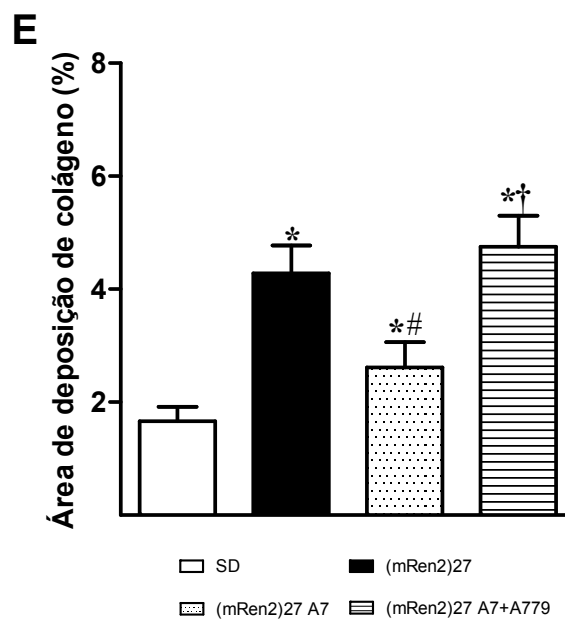
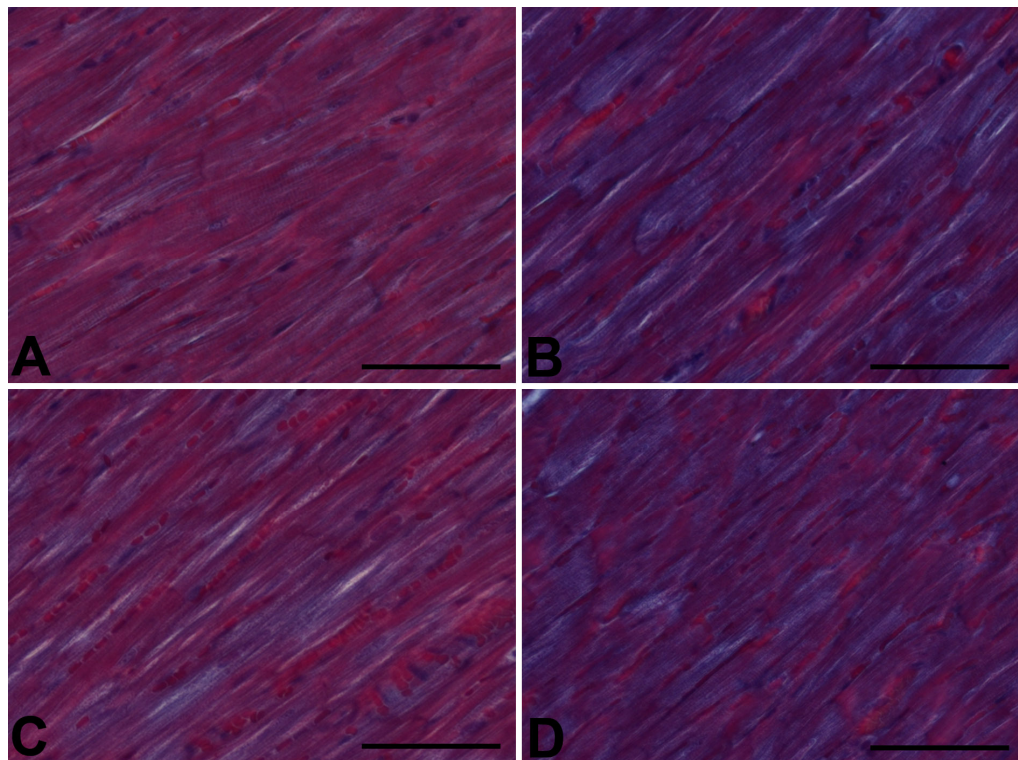




**Figura 7.** Peptídeo natriurético atrial (ANP; A) no átrio, peptídeo natriurético atrial tipo-B (BNP; B) no VE e Fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) no VE, respectivamente, de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n= 4$  a 6 animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).



**Figura 8.** Expressão gênica (*mRNA*) de proteínas da matriz extracelular, colágeno tipo I (A), colágeno tipo III (B) e fibronectina (C) no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n = 4$  a 6 animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).



**Figura 9.** Fotomicrografias representativas de fibrose intersticial do ventrículo esquerdo de ratos controle infusão ICV de salina (A), hipertensos controle infusão ICV de salina (B), hipertensos tratados com Ang-(1-7) (C) e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 (D) e quantificação da área de fibrose intersticial no ventrículo esquerdo (E; %).  $n=5$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

### 5.7 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na expressão de componentes do SRA cardíaco

Os animais hipertensos que receberam a infusão ICV de salina apresentaram intenso aumento da expressão gênica da ECA no VE ( $11,45 \pm 2,96$  u.a.,  $n= 5$ ) quando comparado aos animais SD ( $1,65 \pm 0,11$  u.a.,  $n= 5$ ), que foi atenuado nos animais tratados com Ang-(1-7) ( $4,42 \pm 1,75$  u.a.,  $n= 5$ ). De forma interessante, este efeito induzido pela Ang-(1-7) foi totalmente prevenido pela infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 ( $10,1 \pm 2,06$  u.a.,  $n= 5$ ). Em contrapartida, a expressão gênica da ECA2 no VE de TGR(mRen2)<sup>27</sup> apresentou tendência de redução em comparação com os ratos SD ( $0,16 \pm 0,02$  u.a.,  $n= 5$  vs.  $0,87 \pm 0,36$  u.a.,  $n= 4$ ). Foi observado aumento expressivo da ECA2 no VE de ratos que receberam a infusão crônica de Ang-(1-7) ( $3,69 \pm 0,75$  u.a.,  $n= 5$ ) e, mais uma vez, o efeito produzido pela Ang-(1-7) foi totalmente prevenido pela infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 ( $0,23 \pm 0,12$  u.a.,  $n= 5$ ) figura 10.

Em seguida, foi realizada a avaliação da atividade enzimática da ECA e ECA2. Corroborando os resultados obtidos com a expressão do mRNA por qRT-PCR foi observado um aumento intenso na atividade da ECA no VE dos TGR(mRen2)<sup>27</sup> ( $23,9 \pm 2,34$  nmoles His-Leu/min/mg de proteína,  $n= 5$ ) quando comparado aos ratos SD ( $15,2 \pm 1,06$  nmoles His-Leu/min/mg de proteína,  $n= 6$ ). O aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir significativamente a atividade da ECA no VE dos animais hipertensos ao nível dos ratos SD ( $15,4 \pm 0,69$  nmoles His-Leu/min/mg de proteína,  $n= 5$ ). A infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779, apesar de apresentar tendência, não preveniu

o efeito induzido pela Ang-(1-7) ( $21,1 \pm 2,92$  nmoles His-Leu/min/mg de proteína,  $n=7$ ) figura 11A.

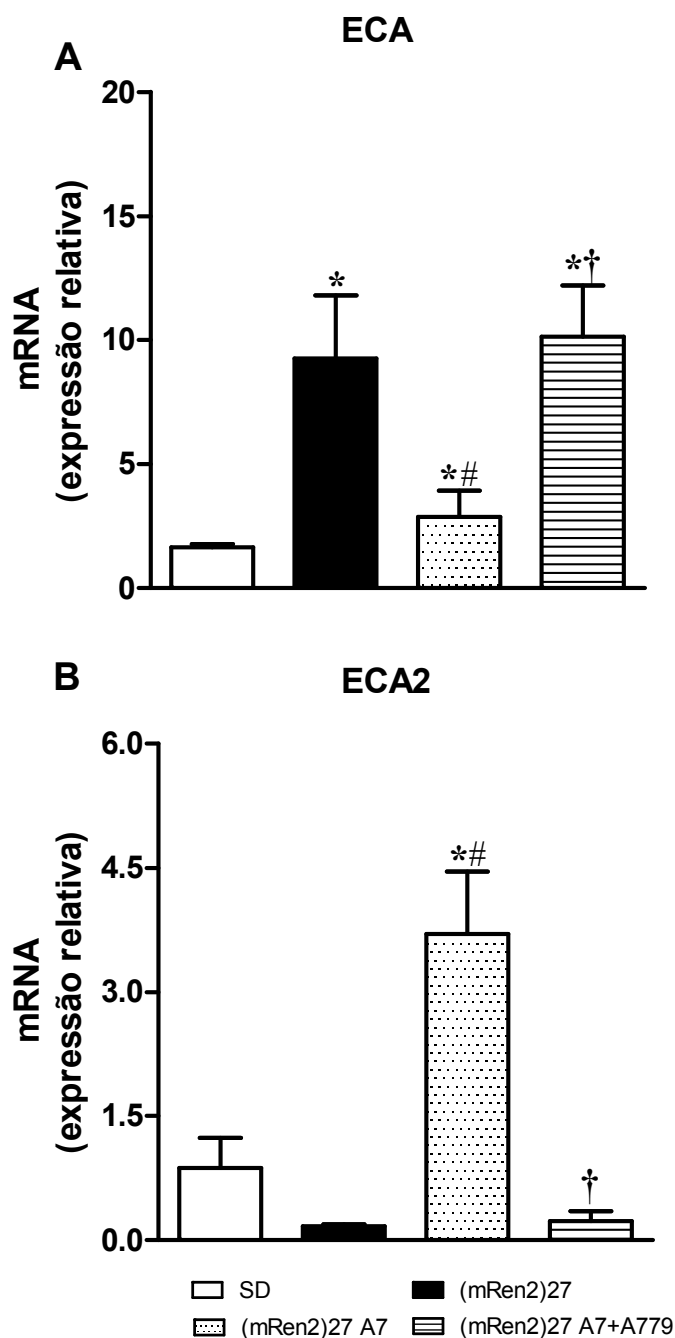
Os ratos hipertensos que receberam infusão crônica ICV de salina, apesar de apresentarem uma tendência de redução da atividade da ECA2 no VE quando comparado aos ratos SD, não apresentaram diferenças significativas ( $174,4 \pm 6,6$  u.a.,  $n=5$  vs.  $216,0 \pm 17,5$  u.a.,  $n=5$ ). No entanto, interessante, o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi capaz de aumentar significativamente a atividade dessa enzima no VE dos animais hipertensos ( $279,4 \pm 35,3$  u.a.,  $n=7$ ). Além disso, a infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 foi capaz de reverter o efeito produzido pela Ang-(1-7) ( $192,3 \pm 14,0$  u.a.,  $n=6$ ) figura 11B.

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos quanto aos níveis dos peptídeos Ang II e Ang-(1-7) no VE dos animais dos diferentes grupos experimentais. Como esperado, os ratos hipertensos que receberam infusão crônica ICV de salina apresentaram aumento dos níveis de Ang II no VE em relação aos animais SD ( $67,4 \pm 19,6$  pg/mg de proteína,  $n=6$  vs.  $20,0 \pm 3,18$  pg/mg de proteína,  $n=5$ ). De forma interessante, o tratamento ICV com Ang-(1-7) por quatorze dias reduziu os níveis de Ang II no VE dos animais hipertensos ao nível dos animais SD ( $20,5 \pm 8,95$  pg/mg de proteína,  $n=7$ ) e o tratamento ICV simultâneo de Ang-(1-7) com o A779 preveniu parcialmente os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) ( $30,4 \pm 1,97$  pg/mg de proteína, pg/mg de proteína,  $n=6$ ) figura 12<sup>a</sup>. Esse resultado está de acordo com a atividade enzimática da ECA. Como pode ser observado na figura 12B não foram observadas diferenças nos níveis cardíacos da Ang-(1-7) nos diferentes grupos experimentais [SD  $5,40 \pm 1,00$  pg/mg de proteína,  $n=6$ ; (mRen2)27  $3,11 \pm 0,59$  pg/mg de proteína,

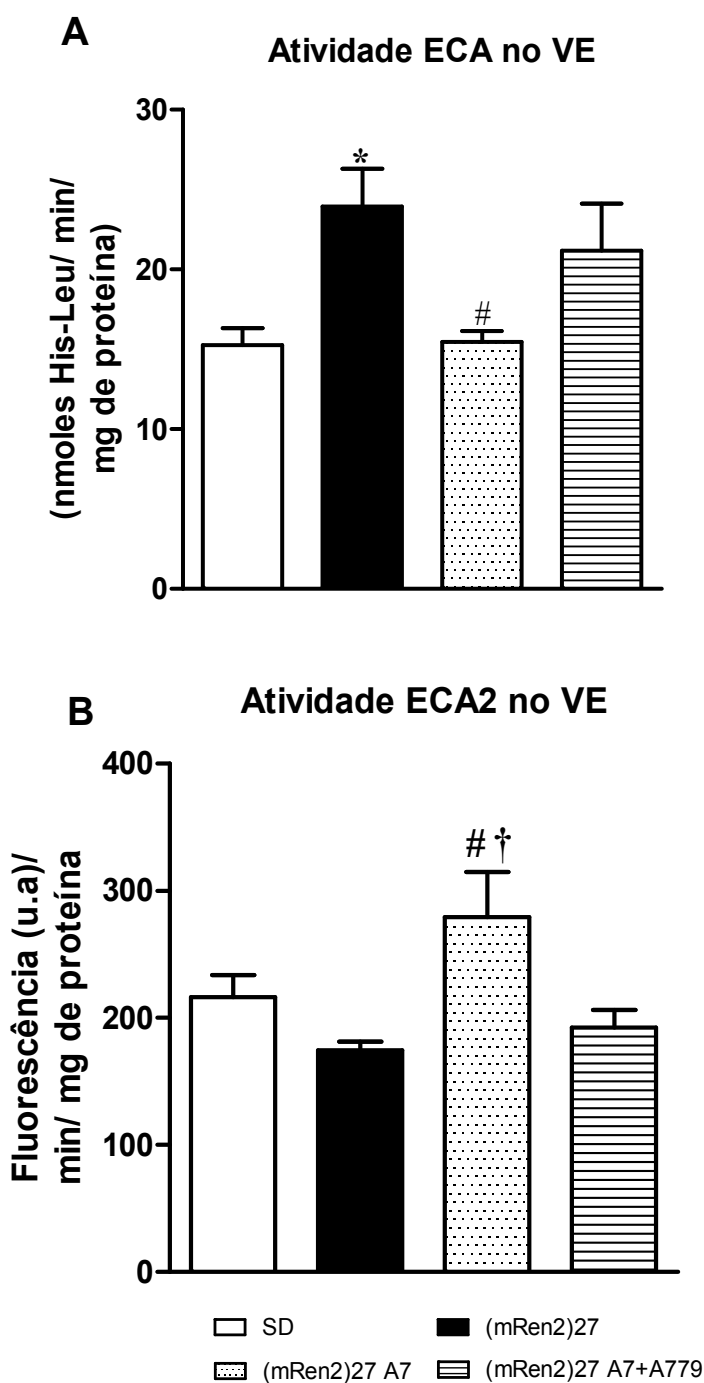
---

$n= 6$ ; (mRen-2)27 A7  $4,37 \pm 1,09$  pg/mg de proteína,  $n= 6$  e (mRen-2)27 A7+A779  $2,77 \pm 0,18$  pg/mg de proteína,  $n= 5$ ] figura 12B.

As Figuras 13 e 14 mostram os resultados da análise da expressão protéica dos receptores  $AT_1$  e Mas no VE de ratos controle e hipertensos tratados ICV com salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779. Como apresentado na figura 13 não foram observadas alterações significativas na expressão cardíaca do receptor  $AT_1$  entre os grupos experimentais [SD  $0,40 \pm 0,07$  a.u.,  $n= 5$ ; (mRen2)27  $0,64 \pm 0,09$  a.u.,  $n= 5$ ; (mRen-2)27 A7  $0,71 \pm 0,05$  a.u.,  $n= 6$  e (mRen-2)27 A7+A779  $0,57 \pm 0,07$  a.u.,  $n= 6$ ]. Em contrapartida, na figura 14 pode-se observar uma redução da expressão do receptor Mas no VE de ratos (mRen2)27 ( $0,92 \pm 0,07$  a.u.,  $n= 6$ ) quando comparado aos ratos SD ( $1,13 \pm 0,07$  a.u.,  $n= 6$ ), no entanto, o tratamento crônico com Ang-(1-7) ( $0,79 \pm 0,07$  a.u.,  $n= 6$ ) ou com Ang-(1-7) associada ao A779 ( $0,69 \pm 0,05$  a.u.,  $n= 7$ ) não alterou a expressão protéica desse receptor no VE.

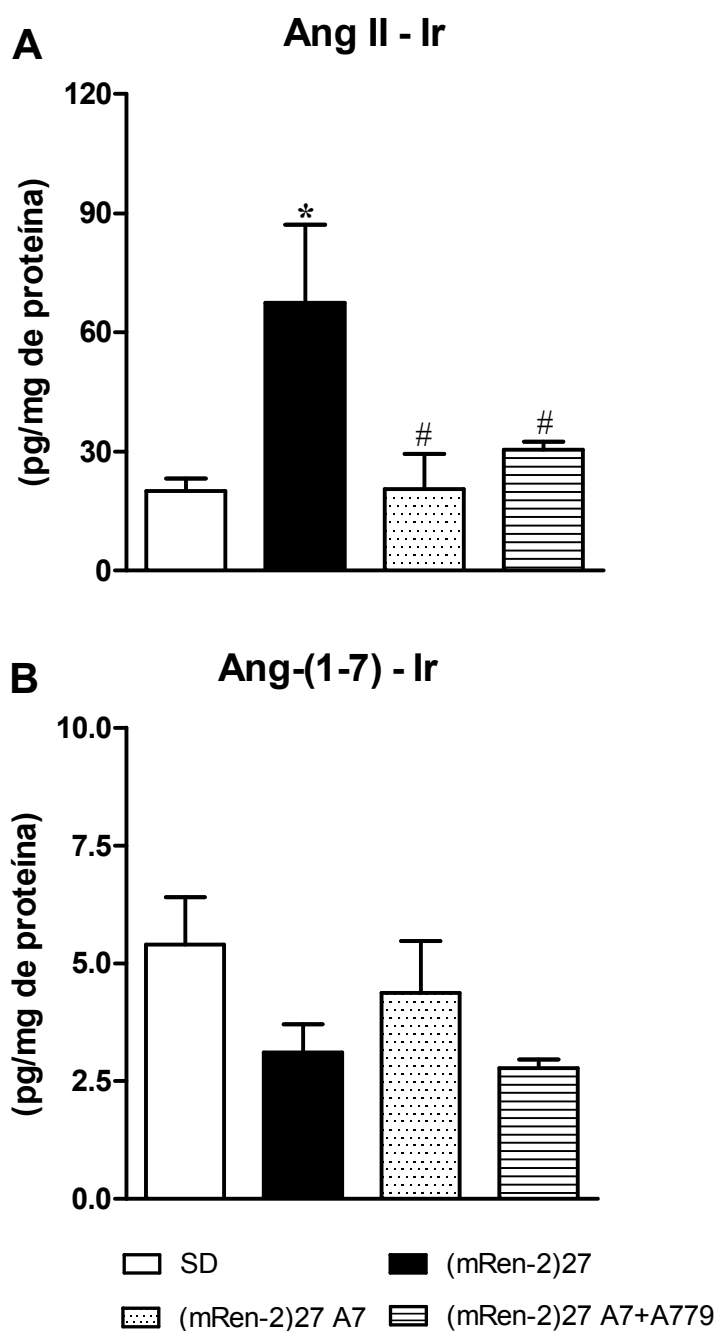


**Figura 10.** Expressão gênica (mRNA) das enzimas ECA (A) e ECA2 (B) no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27,  $n=5$ ], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7,  $n=5$ ] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779,  $n=5$ ] ICV. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

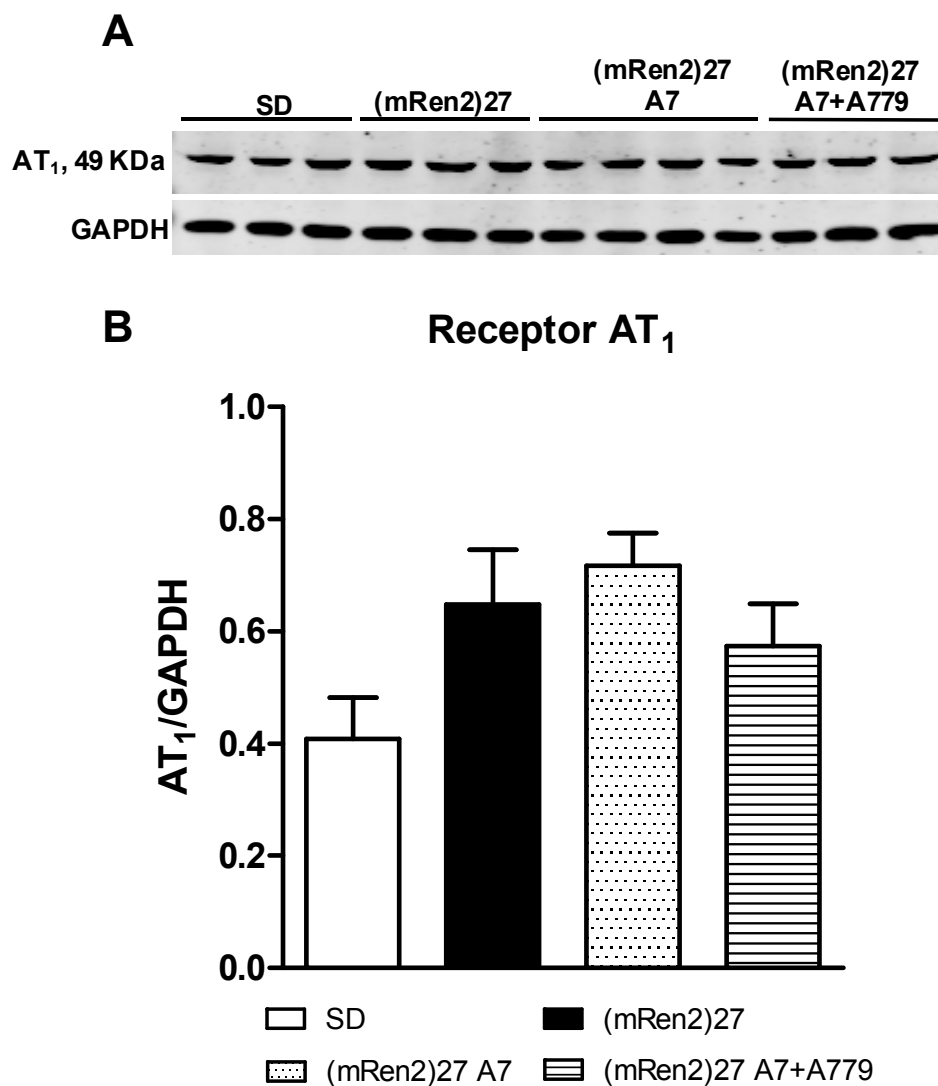


**Figura 11.** Atividade das enzimas ECA (A) e ECA2 (B) no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n = 5$  a  $7$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

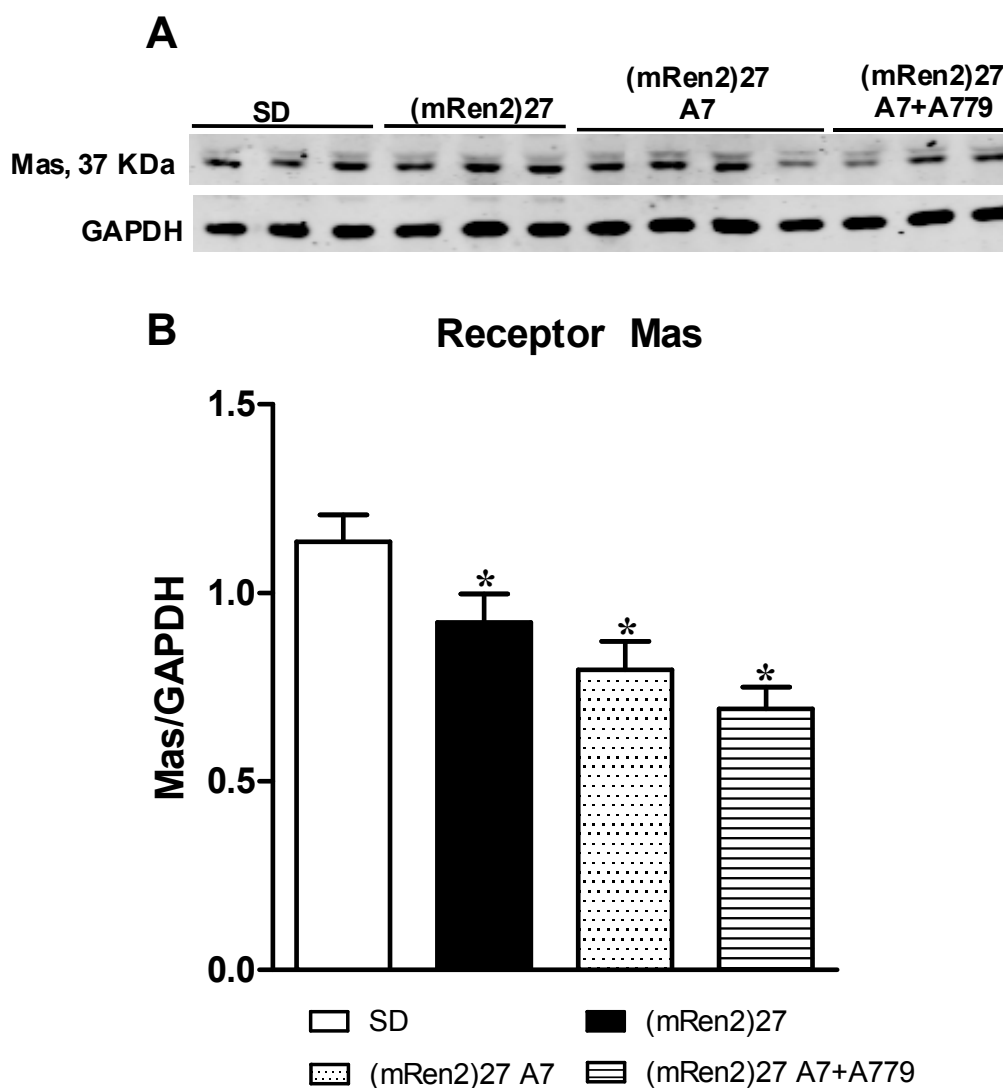




**Figura 12.** Imunorreatividade dos peptídeos Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n= 5$  a  $7$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).



**Figura 13.** Expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub> avaliada por Western blotting no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n= 5$  a 7 animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).



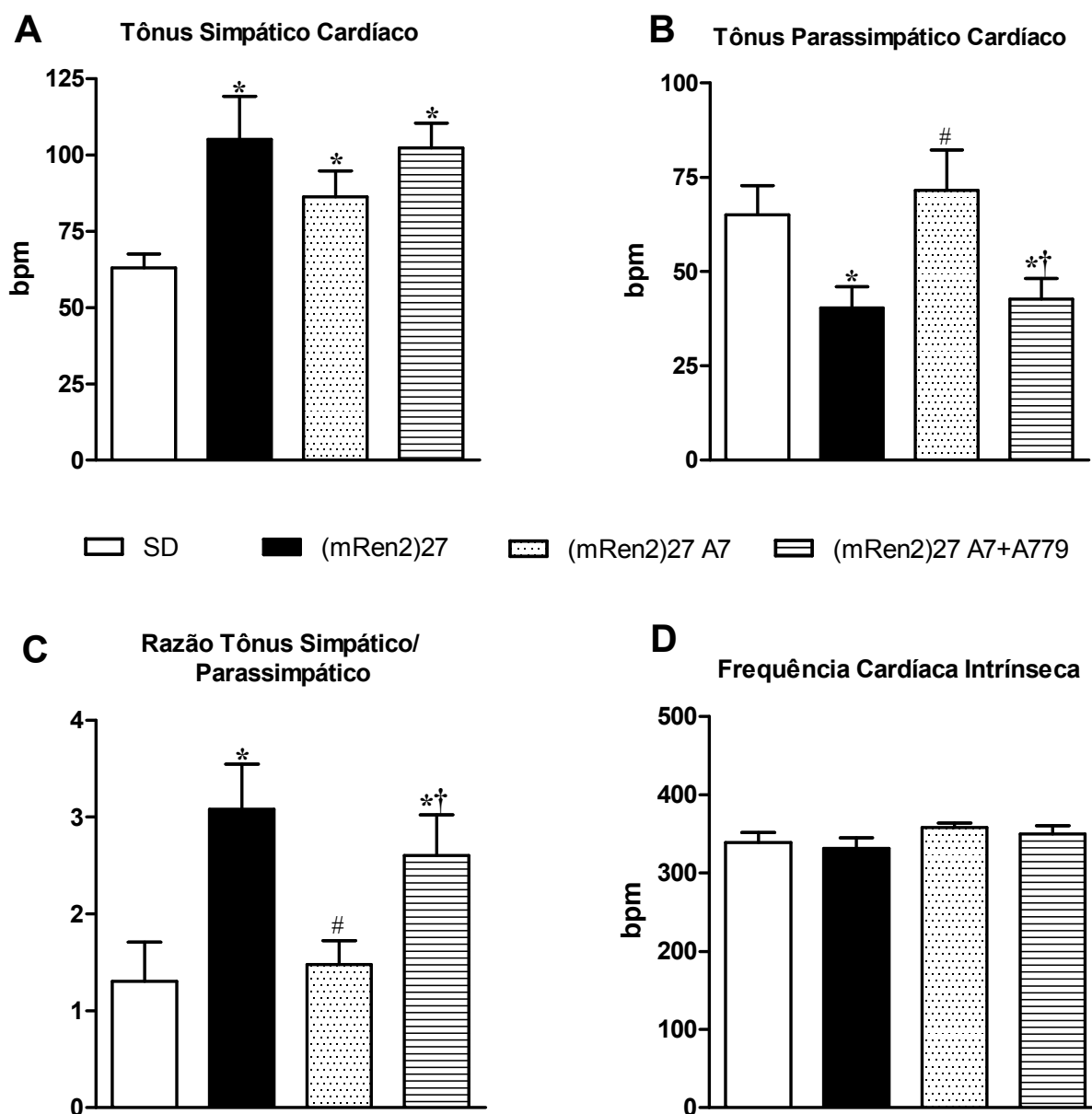
**Figura 14.** Expressão protéica do receptor Mas avaliada por Western blotting no ventrículo esquerdo de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n= 5$  a  $7$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

### 5.8 Efeitos da infusão crônica ICV de salina, Ang-(1-7) e Ang-(1-7) associada ao A779 na modulação do tônus autonômico cardíaco

Os TGR(mRen2)<sup>27</sup> que receberam a infusão ICV de salina apresentaram aumento do tônus simpático cardíaco ( $105,1 \pm 14,0$  bpm,  $n= 7$  vs.  $63,0 \pm 4,50$  bpm,  $n= 6$ ) e redução do tônus parassimpático cardíaco quando comparado aos ratos SD ( $40,3 \pm 5,70$  bpm,  $n= 6$  vs.  $65,0 \pm 7,81$  bpm,  $n= 6$ ). Em contrapartida, a infusão crônica ICV de Ang-(1-7) normalizou o tônus parassimpático cardíaco nos ratos hipertensos ( $71,5 \pm 10,7$  bpm,  $n= 9$ ), não produziu alterações no tônus simpático ( $86,3 \pm 8,46$  bpm,  $n= 9$ ) e o efeito induzido pelo aumento dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) no tônus parassimpático foi totalmente abolido pela infusão simultânea de Ang-(1-7) com o A779 ( $42,6 \pm 5,58$  bpm,  $n= 6$ ).

A alteração do balanço autonômico pode ser visualizada pela razão entre o tônus simpático e o tônus parassimpático cardíaco. A razão simpático/parassimpático aumenta cerca de 2,4 vezes nos ratos hipertensos controles ( $3,07 \pm 0,46$   $n= 7$ ), quando comparado ao grupo de ratos normotensos controle ( $1,30 \pm 0,40$   $n= 6$ ). A infusão de Ang-(1-7) no SNC reverteu essa alteração ( $1,47 \pm 0,24$   $n= 9$ ), restaurando o balanço autonômico cardíaco. A infusão de A779 concomitante a Ang-(1-7) aboliu o efeito produzido pela Ang-(1-7) ( $2,60 \pm 0,41$   $n= 6$ ).

Como mostrado na figura 15, não foram observadas diferenças na frequência cardíaca intrínseca entre os grupos experimentais [SD  $339,0 \pm 12,8$  bpm,  $n= 6$ ; (mRen2)<sup>27</sup>  $331,6 \pm 13,3$  bpm,  $n= 6$ ; (mRen-2)<sup>27</sup> A7  $358,3 \pm 5,67$  bpm,  $n= 9$  e (mRen-2)<sup>27</sup> A7+A779  $349,8 \pm 10,7$  bpm,  $n= 5$ ].



**Figura 15.** Tônus autonômico cardíaco simpático (A), parassimpático (B), razão tônus simpático/parassimpático (C) e frequência cardíaca intrínseca (D) de ratos controle, infusão ICV de salina (SD), hipertensos controle, infusão ICV de salina [(mRen2)27], hipertensos tratados com Ang-(1-7) [(mRen2)27 A7] e hipertensos tratados com Ang-(1-7)+A779 [(mRen2)27 A7+A779] ICV,  $n = 6$  a  $9$  animais por grupo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. SD; # $p < 0.05$  vs. (mRen2)27; † $p < 0.05$  vs. (mRen2)27 A7 (One-way ANOVA / Newman-Keuls post-hoc test).

## 5.9 Sumário dos Resultados

Os resultados do presente estudo mostram que a infusão ICV de Ang-(1-7) em ratos hipertensos que superexpressam o gene da renina produz:

- 1- Redução da pressão arterial dependente da interação com o receptor Mas no sistema nervoso central;
- 2- Melhora da sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca dependente do receptor Mas;
- 3- Atenuação do hiperdinamismo cardíaco;
- 4- Efeito anti-hipertrófico em cardiomiócitos via receptor Mas;
- 5- Redução dos níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$ ;
- 6- Redução da expressão gênica de colágeno tipo I e fibronectina o que reflete na atenuação do processo de remodelamento cardíaco;
- 7- Atenuação das lesões pré-fibróticas no miocárdio;
- 8- Modulação dos componentes do SRA cardíaco: redução da expressão e atividade da ECA, aumento da expressão e atividade da ECA2, redução dos níveis de Ang II no VE;
- 9- Modulação do tônus autonômico cardíaco via receptor Mas.

## **VI. DISCUSSÃO**

Diversos estudos indicam o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas como protetor nas doenças cardiovasculares e renais (Crackower *et al.*, 2002; Gwathmey *et al.*, 2010; Wysocki *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010). Desde a identificação em 1988 como um peptídeo biologicamente ativo do SRA, a Ang-(1-7) se tornou foco de diversos estudos nas áreas de fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (Santos e Campagnole-Santos, 1994; Santos, 2014).

O presente estudo teve como principal objetivo investigar os efeitos produzidos pelo aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) sobre as alterações cardíacas em ratos hipertensos heterozigotos que superexpressam o gene da renina [TGR(mRen2)27]. Estes animais desenvolvem hipertensão arterial grave desde muito jovens (Mullins *et al.*, 1990; Bachmann *et al.*, 1992; Bader *et al.*, 1992; Langheinrich *et al.*, 1996), e apresentam fibrose (Bishop *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Rothermund *et al.*, 2001; Chouabe *et al.*, 2009), remodelamento (Whaley-Connell *et al.*, 2007; Whaley-Connell *et al.*, 2008), hipertrofia (Zolk, Flesch, Schnabel *et al.*, 1998; Zolk *et al.*, 2002; Chouabe *et al.*, 2009) e disfunção cardíaca (Demarco *et al.*, 2011).

Similarmente a estudos anteriores (Bader *et al.*, 1992; Langheinrich *et al.*, 1996; Brosnan *et al.*, 1999; Fontes *et al.*, 2000; Jessup *et al.*, 2006; Whaley-Connell *et al.*, 2007; Diz *et al.*, 2008; Trask *et al.*, 2010; Habibi *et al.*, 2011; Garcia-Espinosa *et al.*, 2012), os TGR(mRen-2)27 utilizados no presente estudo apresentaram níveis elevados de PAS, PAD, PAM, redução da sensibilidade do controle barorreflexo da FC, aumento da atividade simpática cardíaca, redução do tônus parassimpático cardíaco, hiperdinamismo, hipertrofia e fibrose cardíaca. Interessantemente, a infusão crônica ICV de Ang-(1-7) atenuou as alterações observadas nos animais



hipertensos e, esses efeitos foram prevenidos pela infusão concomitante com o antagonista seletivo do receptor Mas, o A779.

O efeito anti-hipertensivo da Ang-(1-7) já foi amplamente descrito em diferentes modelos animais de hipertensão arterial (Benter *et al.*, 1995; Benter *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2010; Garcia-Espinosa *et al.*, 2012; Guimaraes *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2013). Interessantemente, no presente estudo foi observado que a infusão ICV de Ang-(1-7) (0,2 µg/ hora) por 14 dias atenuou a hipertensão nos TGR(mRen2)<sup>27</sup> e o antagonista seletivo do receptor Mas, A779 (1 µg/ hora) por 14 dias foi capaz de abolir totalmente o efeito anti-hipertensivo induzido pela Ang-(1-7). De modo similar a outros estudos, a Ang-(1-7) ICV não normalizou a pressão arterial apesar de ter induzido uma redução importante da hipertensão. Certamente diferentes mecanismos periféricos e centrais estão envolvidos na patogênese da hipertensão arterial dos ratos (mRen2)<sup>27</sup> que não são alterados pela Ang-(1-7) ou dependem de um tempo maior de tratamento.

Dobruc *et al.* (2003) observaram que a infusão aguda ICV de Ang-(1-7) atenua a hipertensão em TGR(mRen2)<sup>27</sup> (Dobruc *et al.*, 2003). Além disso, Garcia-Espinosa *et al.* (2012) mostraram que a injeção de uma proteína de fusão contendo Ang-(1-7) na cisterna magna reduz significativamente a hipertensão e melhora a sensibilidade barorreflexa nesses animais (Garcia-Espinosa *et al.*, 2012).

Recentemente em nosso laboratório, utilizando o modelo de hipertensão arterial DOCA-salt, Guimarães *et al.* (2012) mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7) por 14 dias atenua a hipertensão, reduz o tônus simpático e aumenta o tônus parassimpático cardíaco, melhora a sensibilidade do controle barorreflexo da atividade simpática e da frequência cardíaca e reduz a expressão de colágeno tipo I

(Guimaraes, Santiago, Xavier, Fontes *et al.*, 2012). No entanto, o estudo de Nautiyal, *et al.* (2012), mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7) na dose de (0,1 µg/ hora) por quatorze dias em TGR(mRen2)27 melhorou a sensibilidade barorreflexa da FC sem alterar os níveis de pressão arterial. Vale ressaltar, entretanto, que nesse estudo os níveis de pressão arterial dos TGR(mRen2)27 não foram diferentes dos animais normotensos (Nautiyal *et al.*, 2012).

A melhora do controle barorreflexo da FC é um efeito característico da infusão aguda ou crônica de Ang-(1-7) em animais normotensos ou hipertensos (Campagnole-Santos *et al.*, 1992; Guimaraes, Santiago, Xavier, Fontes *et al.*, 2012). Britto *et al.* (1997) mostraram que a melhora do controle barorreflexo da FC após o tratamento oral crônico com enalapril (inibidor de ECA) em ratos com hipertensão renovascular é bloqueada com a infusão ICV aguda de A779 (Britto *et al.*, 1997). Resultados semelhantes também foram obtidos por Heringer-Walther *et al.* (2001) utilizando o tratamento ICV com ramipril (inibidor de ECA) e A779 em ratos SHR (Heringer-Walther *et al.*, 2001). Chaves *et al.* (2000) mostraram que a microinjeção de Ang-(1-7) no nTS de ratos SHR possui um efeito depressor, bradicárdico e facilitatório sobre o controle barorreflexo da FC; enquanto o bloqueio do receptor Mas neste núcleo promove um prejuízo no controle barorreflexo (Chaves *et al.*, 2000). Além disso, a deleção genética do receptor da Ang-(1-7), Mas, induziu um importante desequilíbrio no controle neural da pressão arterial, alterando não só o barorreflexo, mas também o quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarisch (De Moura *et al.*, 2010).

No presente estudo, os animais hipertensos apresentaram intensa redução da sensibilidade barorreflexa, que foi significativamente revertida pela infusão crônica

ICV de Ang-(1-7). Além disso, o tratamento simultâneo de Ang-(1-7) com o antagonista seletivo do receptor Mas, foi capaz de prevenir totalmente a melhora da sensibilidade barorreflexa induzida pela Ang-(1-7), indicando que os efeitos descritos dependem da interação da Ang-(1-7) com o receptor Mas no SNC.

Os ratos hipertensos utilizados neste estudo apresentaram marcantes alterações na morfologia cardíaca e na função ventricular sistólica e diastólica conforme já é estabelecido (Engler *et al.*, 1998; Demarco *et al.*, 2011; Habibi *et al.*, 2011). Interessantemente, o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) foi capaz de atenuar de forma significativa parte das alterações morfológicas e funcionais cardíacas nesses animais e, além disso, a infusão simultânea com a antagonista seletivo do receptor Mas foi capaz de prevenir parcialmente o efeito induzido pela Ang-(1-7).

O efeito cardioprotetor da interação Ang-(1-7)/receptor Mas é amplamente conhecido em diferentes modelos animais (Ferreira *et al.*, 2001; 2002; Benter *et al.*, 2006; Castro, C. H. *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Ebermann *et al.*, 2008; Mercure *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Patel, V. B. *et al.*, 2012; Patel, Vaibhav B. *et al.*, 2012). Além disso, estudos mostram que camundongos deficientes para o receptor Mas apresentam disfunção cardíaca, com diminuição da tensão sistólica, da velocidade de contração e relaxamento do miocárdio, da pressão no ventrículo esquerdo e da frequência cardíaca e ainda aumento da resistência vascular (Gembardt *et al.*, 2003; Castro, Carlos H. *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).

Grobe *et al.* (2006) estudaram a influência da administração crônica subcutânea de Ang-(1-7) no modelo de hipertensão DOCA-sal e observaram que

este peptídeo reduziu o remodelamento cardíaco, sem entretanto afetar a pressão arterial sistólica, a resposta pressórica à infusão endovenosa de Ang II, nem o peso do ventrículo esquerdo e o diâmetro dos cardiomiócitos, sugerindo uma ação seletiva da Ang-(1-7) administrada periféricamente sobre o remodelamento cardíaco, independente da pressão arterial (Grobe *et al.*, 2006).

Gomes *et al.* (2010) mostraram que ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) circulante e tecidual [TGR(A1-7)3292], após a infusão de Ang II, apresentam redução nos níveis de marcadores de estresse cardíaco, ANP, BNP e  $\beta$ -MHC, quando comparado aos ratos SD que receberam infusão de Ang II (Gomes *et al.*, 2010). Resultados similares foram encontrados em nosso estudo, utilizando um modelo de animal transgênico com níveis elevados de Ang II tecidual. Os ratos (mRen2)<sup>27</sup> apresentaram níveis elevados de ANP, BNP e TGF- $\beta$  e, de maneira surpreendente, a infusão crônica ICV de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir os níveis desses mediadores. Além disso, o efeito da Ang-(1-7) sobre esses mediadores foi prevenido pelo antagonista seletivo do receptor Mas.

Vale ressaltar que no presente estudo foi utilizada a mesma taxa de infusão ICV de estudo anterior do nosso laboratório Guimaraes *et al.* (2012), onde foi mostrado que não há difusão do peptídeo para a circulação periférica após 14 dias de infusão, uma vez que, os níveis circulantes de Ang-(1-7), dosados por RIE, não foram diferentes daqueles encontrados nos animais não tratados.

No presente estudo foi observado que a infusão crônica ICV de Ang-(1-7) induz efeito anti-hipertrófico, além de atenuar o remodelamento cardíaco em ratos hipertensos via receptor Mas. Este efeito anti-hipertrófico e anti-fibrótico induzido pela Ang-(1-7) periféricamente, é extensamente conhecido em diferentes modelos

experimentais como na hipertensão arterial (Grobe *et al.*, 2006; Grobe *et al.*, 2007; Mercure *et al.*, 2008; Pei *et al.*, 2010), no diabetes (Murca *et al.*, 2012), na insuficiência cardíaca (Iwata *et al.*, 2011), e na hipertrofia e remodelamento cardíaco induzido por isoproterenol (Nadu *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010). Nosso estudo estende esses resultados mostrando que a Ang-(1-7) atuando no SNC não apenas reduz a pressão arterial como atenua a hipertrofia e remodelamento cardíaco em ratos (mRen2)27.

Sabe-se que durante a hipertensão arterial, as alterações neurais, mecânicas e hemodinâmicas impostas ao coração alteram o seu arranjo tecidual e seu funcionamento. Esta alteração envolve alterações eletrofisiológicas, hipertrofia celular e aumento da deposição dos colágenos tipo I, III, IV e fibronectina no espaço intersticial e perivascular, principalmente no VE, mas também no VD (Brilla *et al.*, 1990; Delcayre e Swynghedauw, 2002). Além disso, é bem estabelecido que o desequilíbrio da atividade autonômica afeta o remodelamento do miocárdio (Morgan e Baker, 1991; Li *et al.*, 2004; Kasama *et al.*, 2007; Uemura *et al.*, 2007; Sabbah *et al.*, 2011). Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se sugerir que a melhora da sensibilidade barorreflexa, o aumento da atividade parassimpática cardíaca e a restauração do equilíbrio do tônus autonômico cardíaco podem ter contribuído para a redução das lesões pré-fibróticas observadas nos animais hipertensos. Em consonância com essa hipótese, sabe-se que a estimulação crônica do nervo eferente vago tem um impacto benéfico marcante na sobrevivência de ratos com insuficiência cardíaca (Li *et al.*, 2004).

É importante ressaltar, que parte dos efeitos cardíacos observados no presente estudo podem estar relacionados a redução dos níveis pressóricos. No

entanto, a pressão arterial dos animais que receberam Ang-(1-7) ainda estava aumentada em relação aos ratos SD o que pode explicar a não reversão completa da hipertrofia cardíaca. Por outro lado, apesar da pós-carga aumentada, a infusão ICV de Ang-(1-7) produziu uma grande redução de colágeno e dos marcadores de estresse cardíaco.

Uma questão que ainda precisa ser avaliada está relacionada com as áreas diretamente afetadas bem como, identificar a extensão da difusão no SNC produzida pela difusão da Ang-(1-7) após a infusão crônica no ventrículo lateral cerebral. É amplamente sabido que diversas áreas no cérebro expressam componentes e receptores do SRA (Unger *et al.*, 1988; Ferrario *et al.*, 1990; Lippoldt *et al.*, 1995; Lenkei *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998; Von Bohlen Und Halbach e Albrecht, 2006). Neste sentido, duas áreas em especial localizadas nos órgãos circumventriculares podem estar envolvidas nos efeitos induzidos pela Ang-(1-7), o órgão subfornical (SFO) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).

Está bem estabelecido que a SFO é uma região sensível à Ang-(1-7) (Ishibashi *et al.*, 1985), na qual os neurônios se projetam para diferentes núcleos, sendo alguns relacionados ao controle autonômico, como PVN, SON, LH/PFA, entre outros (Smith *et al.*, 2009). Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos na integração das respostas cardiovasculares e autonômicas pode-se destacar o PVN (Swanson e Sawchenko, 1980). O PVN, próximo ao 3º ventrículo, é uma das áreas preferenciais para mediar os efeitos primários da Ang-(1-7) após a infusão no ventrículo lateral. Esse núcleo expressa o receptor Mas e é sensível à Ang-(1-7) (Silva *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2007). A partir de sinais de integração autonômica,

neuroendócrina e comportamental, considera-se que o PVN seja um núcleo crucial na regulação do sistema cardiovascular.

No presente estudo, não foi observada alteração significativa nos níveis de Ang-(1-7) no coração. Interessantemente, o aumento de duas vezes de Ang II no VE dos ratos hipertensos, foi completamente atenuado nos ratos que receberam Ang-(1-7). Esse efeito restaurou o balanço Ang II/Ang-(1-7) no coração contribuindo assim para o efeito anti-hipertrófico e anti-fibrótico induzido pela infusão ICV de Ang-(1-7).

Tallant *et al.* (2005), mostraram a presença do receptor Mas em cardiomiócitos de ratos neonatos e também descreveram que a Ang-(1-7) via receptor Mas previne a hipertrofia e proliferação dessas células através da inibição da atividade da MAPK ERK1/2 (Tallant *et al.*, 2005). Corroborando estes resultados, a hipertrofia de cardiomiócitos e a fibrose intersticial cardíaca induzida pela infusão crônica subcutânea de Ang II em ratos SD foram significativamente atenuadas pela infusão periférica de Ang-(1-7) (Grobe *et al.*, 2007).

Ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) circulante e tecidual apresentam resistência à indução de hipertrofia e fibrose cardíaca induzida por isoproterenol, redução no tempo de arritmias de reperfusão e melhora na função pós-isquêmica em estudos de Langendorff (Santos *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2010). Santiago *et al.* (2010) mostraram que esses ratos transgênicos possuem atenuação do remodelamento e disfunção cardíaca induzida pela hipertensão DOCA-salt (Santiago *et al.*, 2010).

A superexpressão de Ang-(1-7) no coração de ratos melhora a contratilidade cardíaca, além de prevenir o remodelamento cardíaco patológico induzido por isoproterenol (Ferreira *et al.*, 2010). Além disso, Marques *et al.* (2011) mostraram

que ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio ou por isoproterenol, quando tratados por via oral com uma formulação de Ang-(1-7) associada a um composto de inclusão [hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina/angiotensina-(1-7)] apresentam redução da área de infarto, melhora da função cardíaca e redução da hipertrofia de cardiomiócitos (Marques *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos serão necessários para mostrar em que extensão a restauração do controle autonômico contribui para a redução do remodelamento cardíaco nos ratos (mRen2)<sup>27</sup> tratados com Ang-(1-7).

A alteração no nível de Ang II observadas em nosso estudo possivelmente ocorreu em decorrência de alteração na atividade das enzimas, ECA e ECA2. Notavelmente, houve uma atenuação na *expressão do* mRNA da ECA e na atividade da ECA, que foi acompanhada por um aumento no mRNA de ECA2 e na atividade de ECA2 no coração de animais que receberam a infusão crônica ICV de Ang-(1-7). A alteração no balanço entre ECA e ECA2, o desequilíbrio em favor da atividade de ECA nos ratos hipertensos (mRen2)<sup>27</sup>, e a restauração de seu equilíbrio nos animais tratados com Ang-(1-7) pode explicar a mudança nos níveis dos peptídeos angiotensinérgicos no coração. A maior atividade de ECA que não está apenas envolvida na formação de Ang II mas também na degradação de Ang-(1-7) (Chappell *et al.*, 1998), em relação a ECA está em consonância com os níveis aumentados de Ang II no coração de ratos (mRen2)<sup>27</sup>. No grupo de animais tratados com Ang-(1-7), a atividade de ECA foi normalizada e a atividade da ECA2 aumentou aproximadamente 30%, resultando em uma diminuição significativa nos níveis de Ang II e em uma tendência de aumento de Ang-(1-7). Se o efeito da infusão ICV de Ang-(1-7) sobre a atividade dessas enzimas do SRA no coração



envolve o efeito modulatório sobre o tônus autonômico cardíaco é, uma possibilidade que está sendo explorada atualmente em nosso laboratório.

O desequilíbrio nos níveis de peptídeos angiotensinérgicos no coração dos animais hipertensos não tratados era esperado. Entretanto, a expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub> não foi estatisticamente modificada em nenhum dos grupos experimentais e, apesar da infusão de Ang-(1-7) ter restaurado o equilíbrio dos peptídeos angiotensinérgicos, o receptor AT<sub>1</sub> não se modificou. Por outro lado, os ratos hipertensos (mRen2)<sup>27</sup> apresentaram uma menor expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo, a qual também não foi alterada pela infusão de Ang-(1-7) no cérebro ou após a restauração do balanço Ang II/Ang-(1-7) no coração. Dessa forma, esse resultado sugere que não existe uma influência direta da Ang-(1-7) administrada no cérebro sobre a expressão dos receptores AT<sub>1</sub> e Mas no coração, pelo menos no período de tempo estudado. Os efeitos da alteração da disponibilidade de Ang-(1-7) sobre a expressão de seu receptor seletivo Mas ainda não são bem compreendidos. Em circunstâncias normais, níveis aumentados de um determinado agonista causam redução da expressão de seus receptores. No entanto, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Filho *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010) e de outros grupos (Gironacci *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2012) mostraram que, dependendo do estímulo (hipertensão, treinamento físico, etc.), um aumento dos níveis de Ang-(1-7) pode diminuir, aumentar ou não influenciar a expressão do mRNA ou da proteína do receptor Mas. Por exemplo, ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) circulante e tecidual [TGR(1-7)<sup>3292</sup>] têm expressão semelhante do mRNA do receptor Mas no ventrículo esquerdo. Por outro lado, a indução de hipertensão DOCA-sal nesse modelo animal

aumentou os níveis de Ang-(1-7) no ventrículo esquerdo, sem apresentar qualquer efeito sobre a expressão do mRNA do receptor Mas (Santiago *et al.*, 2010).

## **VII. CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo estendem os achados da literatura mostrando que o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) melhora parâmetros cardiovasculares em um modelo experimental de hipertensão arterial induzido pela ativação crônica do SRA.

Este estudo demonstrou que a infusão crônica ICV de Ang-(1-7) em ratos hipertensos que superexpressam o gene renina [TGR(mRen2)27] produz efeito anti-hipertensivo, melhora a sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca, atenua o hiperdinamismo cardíaco, produz efeito anti-hipertrófico em cardiomiócitos, reduz os níveis cardíacos de ANP, BNP e TGF- $\beta$ , reduz a expressão de *mRNA* para o colágeno I e fibronectina, que reflete na atenuação do processo de remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão arterial, além de modular componentes do SRA cardíaco: redução da expressão e atividade da ECA, aumento da expressão e atividade da ECA2, redução dos níveis de Ang II no VE. Esses efeitos parecem estar associados à modulação do tônus autonômico cardíaco. Todos os efeitos induzidos pela Ang-(1-7) foram prevenidos ou atenuados pelo antagonismo do receptor Mas.

Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o aumento dos níveis de Ang-(1-7) no SNC pode ser uma importante estratégia para o tratamento das lesões cardíacas decorrentes hipertensão arterial. Estudos futuros são necessários para caracterizar os mecanismos cerebrais envolvidos nos efeitos produzidos pela infusão crônica ICV de Ang-(1-7) em ratos hipertensos.

## **VIII. REFERÊNCIAS**

- AINSCOUGH, J. F.; DRINKHILL, M. J.; SEDO, A.; TURNER, N. A.; BROOKE, D. A.; BALMFORTH, A. J.; BALL, S. G. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*, v. 81, n. 3, p. 592-600. 2009.
- ALLEN, A. M.; MOELLER, I.; JENKINS, T. A.; ZHUO, J.; ALDRED, G. P.; CHAI, S. Y.; MENDELSON, F. A. Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull*, v. 47, n. 1, p. 17-28. 1998.
- ALZAMORA, A. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 283, n. 5, p. R1187-95. 2002.
- ALZAMORA, A. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 290, n. 4, p. R1027-34. 2006.
- ARDAILLOU, R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 6, n. 1, p. 28-34. 1997.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathway of angiotensin formation. *Mt Sinai J Med*, v. 65, n. 2, p. 87-96. 1998.
- AUER, J. W.; BERENT, R.; EBER, B. Angiotensin II type 1 receptor blockers and congestive heart failure. *Circulation*, v. 104, n. 15, p. E82. 2001.
- AXELBAND, F.; DIAS, J.; MIRANDA, F.; FERRAO, F. M.; BARROS, N. M.; CARMONA, A. K.; LARA, L. S.; VIEYRA, A. A scrutiny of the biochemical pathways from Ang II to Ang-(3-4) in renal basolateral membranes. *Regul Pept*, v. 158, n. 1-3, p. 47-56. 2009.
- BACHMANN, S.; PETERS, J.; ENGLER, E.; GANTEN, D.; MULLINS, J. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int*, v. 41, n. 1, p. 24-36. 1992.
- BADER, M. Transgenic animal models for the functional analysis of vasoactive peptides. *Braz J Med Biol Res*, v. 31, n. 9, p. 1171-83. 1998.
- BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 50, p. 439-65. 2010.
- BADER, M.; ZHAO, Y.; SANDER, M.; LEE, M. A.; BACHMANN, J.; BOHM, M.; DJAVIDANI, B.; PETERS, J.; MULLINS, J. J.; GANTEN, D. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension*, v. 19, n. 6 Pt 2, p. 681-6. 1992.
- BECKER, L. K.; ETELVINO, G. M.; WALTHER, T.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, n. 3, p. H1416-24. 2007.
- BELOVA, L. A. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)*, v. 65, n. 12, p. 1337-45. 2000.

- BENTER, I. F.; FERRARIO, C. M.; MORRIS, M.; DIZ, D. I. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, v. 269, n. 1 Pt 2, p. H313-9. 1995.
- BENTER, I. F.; YOUSIF, M. H.; ANIM, J. T.; COJOCEL, C.; DIZ, D. I. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 290, n. 2, p. H684-91. 2006.
- BISHOP, J. E.; KIERNAN, L. A.; MONTGOMERY, H. E.; GOHLKE, P.; MCEWAN, J. R. Raised blood pressure, not renin-angiotensin systems, causes cardiac fibrosis in TGR m(Ren2)27 rats. *Cardiovasc Res*, v. 47, n. 1, p. 57-67. 2000.
- BOJESTIG, M.; NYSTROM, F. H.; ARNQVIST, H. J.; LUDVIGSSON, J.; KARLBERG, B. E. The renin-angiotensin-aldosterone system is suppressed in adults with Type 1 diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 1, n. 4, p. 353-6. 2000.
- BOTELHO, L. M.; BLOCK, C. H.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*, v. 15, n. 4, p. 723-9. 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54. 1976.
- BRAGA, A. N.; DA SILVA LEMOS, M.; DA SILVA, J. R.; FONTES, W. R.; DOS SANTOS, R. A. Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 282, n. 6, p. R1663-71. 2002.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J. C.; LELOIR, L. F.; MUNOZ, J. M. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*, v. 98, n. 3, p. 283-98. 1940.
- BRAUN-MENENDEZ, E.; PAGE, I. H. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science*, v. 127, n. 3292, p. 242. 1958.
- BRILLA, C. G.; PICK, R.; TAN, L. B.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*, v. 67, n. 6, p. 1355-64. 1990.
- BRITTO, R. R.; SANTOS, R. A.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 549-56. 1997.
- BROOKS, D.; HORNER, R. L.; KOZAR, L. F.; WADDELL, T. K.; RENDER, C. L.; PHILLIPSON, E. A. Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure. *J Appl Physiol*, v. 81, n. 2, p. 1012-8. 1996.
- BROSNAN, M. J.; DEVLIN, A. M.; CLARK, J. S.; MULLINS, J. J.; DOMINICZAK, A. F. Different effects of antihypertensive agents on cardiac and vascular hypertrophy in the transgenic rat line TGR(mRen2)27. *Am J Hypertens*, v. 12, n. 7, p. 724-31. 1999.
- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 523-8. 1996.

- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol Res*, v. 31, n. 3, p. 227-34. 1998.
- CALIGIORNE, S. M.; SILVA, A. Q.; FONTES, M. A.; SILVA, J. R.; BALTATU, O.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Baroreflex control of heart rate and renal sympathetic nerve activity in rats with low brain angiotensinogen. *Neuropeptides*, v. 42, n. 2, p. 159-68. 2008.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1167-71. 1988.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DIZ, D. I.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol*, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324-9. 1989.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HERINGER, S. B.; BATISTA, E. N.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*, v. 263, n. 1 Pt 2, p. R89-94. 1992.
- CARVALHO, M. B.; DUARTE, F. V.; FARIA-SILVA, R.; FAULER, B.; DA MATA MACHADO, L. T.; DE PAULA, R. D.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension*, v. 50, n. 4, p. 762-7. 2007.
- CASTRO, C. H.; SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A. P. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, v. 46, n. 4, p. 937-42. 2005.
- CASTRO, C. H.; SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A. P. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci*, v. 80, n. 3, p. 264-8. 2006.
- CASTRO, C. H.; SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A. P. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sciences*, v. 80, n. 3, p. 264-268. 2006.
- CHAPPELL, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem*, v. 264, n. 28, p. 16518-23. 1989.
- CHAPPELL, M. C.; MODRALL, J. G.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol*, v. 143, p. 77-89. 2004.
- CHAPPELL, M. C.; PIRRO, N. T.; SYKES, A.; FERRARIO, C. M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 362-7. 1998.
- CHAVES, G. Z.; CALIGIORNE, S. M.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the



nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v. 18, n. 12, p. 1841-8. 2000.

CHOUABE, C.; RICCI, E.; KURDI, M.; LEGRAND, C.; BRICCA, G.; BONVALLET, R. Evaluation of remodeling in left and right ventricular myocytes from heterozygous (mRen2)27 transgenic rats. *Gen Physiol Biophys*, v. 28, n. 1, p. 24-38. 2009.

CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; DA COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P. H. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, v. 417, n. 6891, p. 822-8. 2002.

DA COSTA GONCALVES, A. C.; LEITE, R.; FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; REIS, A. B.; REIS, F. M.; TOUYZ, R. M.; WEBB, R. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, n. 4, p. H2588-96. 2007.

DA SILVEIRA, K. D.; COELHO, F. M.; VIEIRA, A. T.; SACHS, D.; BARROSO, L. C.; COSTA, V. V.; BRETAS, T. L.; BADER, M.; DE SOUSA, L. P.; DA SILVA, T. A.; DOS SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol*, v. 185, n. 9, p. 5569-76. 2010.

DAMPNEY, R. A.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y. W.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 29, n. 4, p. 261-8. 2002.

DANSER, A. H.; SARIS, J. J.; SCHUIJT, M. P.; VAN KATS, J. P. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res*, v. 44, n. 2, p. 252-65. 1999.

DANSER, A. H.; SCHALEKAMP, M. A. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart*, v. 76, n. 3 Suppl 3, p. 28-32. 1996.

DE MOURA, M. M.; DOS SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; TODIRAS, M.; BADER, M.; ALENINA, N.; HAIBARA, A. S. Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides*, v. 31, n. 10, p. 1934-9. 2010.

DELCAIRE, C.; SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, v. 34, n. 12, p. 1577-84. 2002.

DEMARCO, V. G.; JOHNSON, M. S.; HABIBI, J.; PULAKAT, L.; GUL, R.; HAYDEN, M. R.; TILMON, R. D.; DELLSPERGER, K. C.; WINER, N.; WHALEY-CONNELL, A. T.; SOWERS, J. R. Comparative analysis of telmisartan and olmesartan on cardiac function in the transgenic (mRen2)27 rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 300, n. 1, p. H181-90. 2011.

DIAS-PEIXOTO, M. F.; SANTOS, R. A.; GOMES, E. R.; ALVES, M. N.; ALMEIDA, P. W.; GRECO, L.; ROSA, M.; FAULER, B.; BADER, M.; ALENINA, N.; GUATIMOSIM, S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*, v. 52, n. 3, p. 542-8. 2008.

- DIEP, Q. N.; EL MABROUK, M.; COHN, J. S.; ENDEMANN, D.; AMIRI, F.; VIRDIS, A.; NEVES, M. F.; SCHIFFRIN, E. L. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation*, v. 105, n. 19, p. 2296-302. 2002.
- DIEZ-FREIRE, C.; VAZQUEZ, J.; CORREA DE ADJOUNIAN, M. F.; FERRARI, M. F.; YUAN, L.; SILVER, X.; TORRES, R.; RAIZADA, M. K. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics*, v. 27, n. 1, p. 12-9. 2006.
- DIZ, D. I.; GARCIA-ESPINOSA, M. A.; GALLAGHER, P. E.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M.; AVERILL, D. B. Angiotensin-(1-7) and baroreflex function in nucleus tractus solitarii of (mRen2)27 transgenic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 51, n. 6, p. 542-8. 2008.
- DOBRUCH, J.; PACZWA, P.; LON, S.; KHOSLA, M. C.; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Hypotensive function of the brain angiotensin-(1-7) in Sprague Dawley and renin transgenic rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 54, n. 3, p. 371-81. 2003.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, v. 87, n. 5, p. E1-9. 2000.
- DOOBAY, M. F.; TALMAN, L. S.; OBR, T. D.; TIAN, X.; DAVISSON, R. L.; LAZARTIGUES, E. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 292, n. 1, p. R373-81. 2007.
- DOSTAL, D. E.; BAKER, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*, v. 85, n. 7, p. 643-50. 1999.
- EBERMANN, L.; SPILLMANN, F.; SIDIROPOULOS, M.; ESCHER, F.; HERINGER-WALTHER, S.; SCHULTHEISS, H. P.; TSCHOPE, C.; WALTHER, T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, v. 590, n. 1-3, p. 276-80. 2008.
- ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, v. 15, n. 8, p. 1983-92. 2004.
- ENGLER, S.; PAUL, M.; PINTO, Y. M. The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept*, v. 77, n. 1-3, p. 3-8. 1998.
- ESLER, M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens*, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 99S-105S. 2000.
- FARIA-SILVA, R.; DUARTE, F. V.; SANTOS, R. A. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*, v. 46, n. 4, p. 948-52. 2005.
- FENG, Y.; XIA, H.; CAI, Y.; HALABI, C. M.; BECKER, L. K.; SANTOS, R. A.; SPETH, R. C.; SIGMUND, C. D.; LAZARTIGUES, E. Brain-selective overexpression of human Angiotensin-

converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension. *Circ Res*, v. 106, n. 2, p. 373-82. 2010.

FERNANDES, L.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; TOSTES, R. C.; SANTOS, R. A.; CATELLI DE CARVALHO, M. H. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*, v. 37, n. 2 Part 2, p. 703-9. 2001.

FERRARIO, C. M. Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. *Drugs*, v. 39 Suppl 2, p. 1-8. 1990.

FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol*, v. 11, n. 6, p. 278-83. 1998.

FERRARIO, C. M. Does angiotensin-(1-7) contribute to cardiac adaptation and preservation of endothelial function in heart failure? *Circulation*, v. 105, n. 13, p. 1523-5. 2002.

FERRARIO, C. M.; AHMAD, S.; JOYNER, J.; VARAGIC, J. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol*, v. 59, p. 197-233. 2010.

FERRARIO, C. M.; BARNES, K. L.; BLOCK, C. H.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*, v. 15, n. 2 Suppl, p. 113-9. 1990.

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 535-41. 1997.

FERRARIO, C. M.; IYER, S. N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept*, v. 78, n. 1-3, p. 13-8. 1998.

FERRARIO, C. M.; JESSUP, J.; CHAPPELL, M. C.; AVERILL, D. B.; BROSNIHAN, K. B.; TALLANT, E. A.; DIZ, D. I.; GALLAGHER, P. E. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation*, v. 111, n. 20, p. 2605-10. 2005.

FERREIRA, A. J.; CASTRO, C. H.; GUATIMOSIM, S.; ALMEIDA, P. W.; GOMES, E. R.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; ALVES, M. N.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; RENTZSCH, B.; GAVA, E.; ALMEIDA, A. P.; GUIMARAES, A. M.; KITTEN, G. T.; REUDELHUBER, T.; BADER, M. et al. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, v. 4, n. 2, p. 83-96. 2010.

FERREIRA, A. J.; MORAES, P. L.; FOUREAUX, G.; ANDRADE, A. B.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. *J Histochem Cytochem*, v. 59, n. 8, p. 761-8. 2011.

FERREIRA, A. J.; MURCA, T. M.; FRAGA-SILVA, R. A.; CASTRO, C. H.; RAIZADA, M. K.; SANTOS, R. A. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *Int J Hypertens*, v. 2012, p. 147825. 2012.

- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, v. 38, n. 4, p. 499-507. 2005.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665-8. 2001.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 9, p. 1083-90. 2002.
- FERREIRA, A. J.; SHENOY, V.; QI, Y.; FRAGA-SILVA, R. A.; SANTOS, R. A.; KATOVICH, M. J.; RAIZADA, M. K. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol*, v. 96, n. 3, p. 287-94. 2011.
- FERREIRA, A. J.; SHENOY, V.; YAMAZATO, Y.; SRIRAMULA, S.; FRANCIS, J.; YUAN, L.; CASTELLANO, R. K.; OSTROV, D. A.; OH, S. P.; KATOVICH, M. J.; RAIZADA, M. K. Evidence for Angiotensin-converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 179, n. 11, p. 1048-1054. 2009.
- FILHO, A. G.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, S. H.; NEVES, S. R.; SILVA CAMARGOS, E. R.; BECKER, L. K.; BELCHIOR, H. A.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*, v. 93, n. 5, p. 589-98. 2008.
- FISCHER-FERRARO, C.; NAHMOD, V. E.; GOLDSTEIN, D. J.; FINKIELMAN, S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *J Exp Med*, v. 133, n. 2, p. 353-61. 1971.
- FONTES, M. A.; BALTATU, O.; CALIGIORNE, S. M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; GANTEN, D.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)27 rats. *Physiol Genomics*, v. 2, n. 3, p. 137-42. 2000.
- FONTES, M. A.; MARTINS PINGE, M. C.; NAVES, V.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; LOPES, O. U.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res*, v. 750, n. 1-2, p. 305-10. 1997.
- FRAGA-SILVA, R. A.; COSTA-FRAGA, F. P.; MURCA, T. M.; MORAES, P. L.; MARTINS LIMA, A.; LAUTNER, R. Q.; CASTRO, C. H.; SOARES, C. M.; BORGES, C. L.; NADU, A. P.; OLIVEIRA, M. L.; SHENOY, V.; KATOVICH, M. J.; SANTOS, R. A.; RAIZADA, M. K. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*, v. 61, n. 6, p. 1233-8. 2013.
- FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONCALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med*, v. 14, n. 1-2, p. 28-35. 2008.

- FUXE, K.; GANTEN, D.; HOKFELT, T.; BOLME, P. Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat. *Neurosci Lett*, v. 2, n. 4, p. 229-34. 1976.
- FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*, v. 264, n. 3, p. 224-36. 2008.
- GANTEN, D.; MARQUEZ-JULIO, A.; GRANGER, P.; HAYDUK, K.; KARSUNKY, K. P.; BOUCHER, R.; GENEST, J. Renin in dog brain. *Am J Physiol*, v. 221, n. 6, p. 1733-7. 1971.
- GANTEN, D.; MINNICH, J. L.; GRANGER, P.; HAYDUK, K.; BRECHT, H. M.; BARBEAU, A.; BOUCHER, R.; GENEST, J. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science*, v. 173, n. 3991, p. 64-5. 1971.
- GARCIA-ESPINOSA, M. A.; SHALTOUT, H. A.; GALLAGHER, P. E.; CHAPPELL, M. C.; DIZ, D. I. In vivo expression of angiotensin-(1-7) lowers blood pressure and improves baroreflex function in transgenic (mRen2)<sup>27</sup> rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 60, n. 2, p. 150-7. 2012.
- GAVA, E.; DE CASTRO, C. H.; FERREIRA, A. J.; COLLETA, H.; MELO, M. B.; ALENINA, N.; BADER, M.; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, R. A.; KITTEN, G. T. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regul Pept*, v. 175, n. 1-3, p. 30-42. 2012.
- GAVRAS, I.; GAVRAS, H. The antiarrhythmic potential of angiotensin II antagonism: experience with losartan. *Am J Hypertens*, v. 13, n. 5 Pt 1, p. 512-7. 2000.
- GEMBARDT, F.; WESTERMANN, D.; HERINGER-WALTHER, S.; SCHULTHEISS, H. P.; TSCHÖPE, C.; WALTER, T. Deficiency in the G protein-coupled receptor Mas leads to cardiomyopathy and demonstrates the importance of the endogenous ligand angiotensin-(1-7) for the cardiac function. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, p. 369. 2003.
- GIRONACCI, M. M.; ADAMO, H. P.; CORRADI, G.; SANTOS, R. A.; ORTIZ, P.; CARRETERO, O. A. Angiotensin (1-7) induces MAS receptor internalization. *Hypertension*, v. 58, n. 2, p. 176-81. 2011.
- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZAL, R. F.; SUMMERVILLE, W. W. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med*, v. 59, n. 3, p. 347-79. 1934.
- GOMES, E. R.; LARA, A. A.; ALMEIDA, P. W.; GUIMARAES, D.; RESENDE, R. R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension*, v. 55, n. 1, p. 153-60. 2010.
- GOMES, E. R.; SANTOS, R. A.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens*, v. 2012, p. 493129. 2012.
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T. A.; MACHADO, J. M.; SPETH, R. C.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J. Prevention of angiotensin II-induced

- cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, n. 2, p. H736-42. 2007.
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; MAO, H.; KATOVICH, M. J. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 290, n. 6, p. H2417-23. 2006.
- GUIMARAES, P. S.; SANTIAGO, N. M.; XAVIER, C. H.; FONTES, M. A.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012.
- GUIMARAES, P. S.; SANTIAGO, N. M.; XAVIER, C. H.; VELLOSO, E. P.; FONTES, M. A.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 303, n. 3, p. H393-400. 2012.
- GWATHMEY, T. M.; PENDERGRASS, K. D.; REID, S. D.; ROSE, J. C.; DIZ, D. I.; CHAPPELL, M. C. Angiotensin-(1-7)-angiotensin-converting enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus. *Hypertension*, v. 55, n. 1, p. 166-71. 2010.
- HABIBI, J.; DEMARCO, V. G.; MA, L.; PULAKAT, L.; RAINEY, W. E.; WHALEY-CONNELL, A. T.; SOWERS, J. R. Mineralocorticoid receptor blockade improves diastolic function independent of blood pressure reduction in a transgenic model of RAAS overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 300, n. 4, p. H1484-91. 2011.
- HERINGER-WALTHER, S.; BATISTA, E. N.; WALTHER, T.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Baroreflex improvement in shr after ace inhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 37, n. 5, p. 1309-14. 2001.
- HITOMI, H.; KIYOMOTO, H.; NISHIYAMA, A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol*, v. 22, n. 4, p. 311-5. 2007.
- HSUEH, W. A.; BAXTER, J. D. Human prorenin. *Hypertension*, v. 17, n. 4, p. 469-77. 1991.
- HU, W. Y.; FUKUDA, N.; IKEDA, Y.; SUZUKI, R.; TAHIRA, Y.; TAKAGI, H.; MATSUMOTO, K.; KANMATSUSE, K.; MUGISHIMA, H. Human-derived vascular smooth muscle cells produce angiotensin II by changing to the synthetic phenotype. *J Cell Physiol*, v. 196, n. 2, p. 284-92. 2003.
- HUANG, L.; SEXTON, D. J.; SKOGERSON, K.; DEVLIN, M.; SMITH, R.; SANYAL, I.; PARRY, T.; KENT, R.; ENRIGHT, J.; WU, Q. L.; CONLEY, G.; DEOLIVEIRA, D.; MORGANELLI, L.; DUCAR, M.; WESCOTT, C. R. et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*, v. 278, n. 18, p. 15532-40. 2003.
- HUENTELMAN, M. J.; GROBE, J. L.; VAZQUEZ, J.; STEWART, J. M.; MECCA, A. P.; KATOVICH, M. J.; FERRARIO, C. M.; RAIZADA, M. K. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*, v. 90, n. 5, p. 783-90. 2005.

- HUENTELMAN, M. J.; ZUBCEVIC, J.; KATOVICH, M. J.; RAIZADA, M. K. Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regul Pept*, v. 122, n. 2, p. 61-7. 2004.
- ISHIBASHI, S.; OOMURA, Y.; GUEGUEN, B.; NICOLAIDIS, S. Neuronal responses in subfornical organ and other regions to angiotensin II applied by various routes. *Brain Res Bull*, v. 14, n. 4, p. 307-13. 1985.
- IWAI, M.; HORIUCHI, M. Role of the ACE2/angiotensin1-7/Mas axis in the cardiovascular system. *Hypertens Res*, v. 33, n. 11, p. 1108-9. 2010.
- IWATA, M.; COWLING, R. T.; YEO, S. J.; GREENBERG, B. Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, v. 51, n. 4, p. 542-7. 2011.
- JANKOWSKI, V.; VANHOLDER, R.; VAN DER GIET, M.; TÖLLE, M.; KARADOĞAN, S.; GOBOM, J.; FURKERT, J.; OKSCHE, A.; KRAUSE, E.; ANH TRAN, T. N.; TEPEL, M.; SCHUCHARDT, M.; SCHLÜTER, H.; WIEDON, A.; BEYERMANN, M. et al. Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 2, p. 297-302. 2007.
- JESSUP, J. A.; GALLAGHER, P. E.; AVERILL, D. B.; BROSNIHAN, K. B.; TALLANT, E. A.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. Effect of angiotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from transgenic Ren-2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 291, n. 5, p. H2166-72. 2006.
- JIN, L. M. Angiotensin II signaling and its implication in erectile dysfunction. *J Sex Med*, v. 6 Suppl 3, p. 302-10. 2009.
- KAMINSKA, M.; MOGIELNICKI, A.; STANKIEWICZ, A.; KRAMKOWSKI, K.; DOMANIEWSKI, T.; BUCZKO, W.; CHABIELSKA, E. Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 56, n. 4, p. 571-85. 2005.
- KANGUSSU, L. M.; ALMEIDA-SANTOS, A. F.; BADER, M.; ALENINA, N.; FONTES, M. A.; SANTOS, R. A.; AGUIAR, D. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behav Brain Res*, v. 257, p. 25-30. 2013.
- KAR, S.; GAO, L.; BELATTI, D. A.; CURRY, P. L.; ZUCKER, I. H. Central angiotensin (1-7) enhances baroreflex gain in conscious rabbits with heart failure. *Hypertension*, v. 58, n. 4, p. 627-34. 2011.
- KASAMA, S.; TOYAMA, T.; HATORI, T.; SUMINO, H.; KUMAKURA, H.; TAKAYAMA, Y.; ICHIKAWA, S.; SUZUKI, T.; KURABAYASHI, M. Evaluation of cardiac sympathetic nerve activity and left ventricular remodeling in patients with dilated cardiomyopathy on the treatment containing carvedilol. *Eur Heart J*, v. 28, n. 8, p. 989-95. 2007.
- KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*, v. 59, n. 3, p. 251-87. 2007.

- KOKKONEN, J. O.; SAARINEN, J.; KOVANEN, P. T. Angiotensin II formation in the human heart: an ACE or non-ACE-mediated pathway? *Ann Med*, v. 30 Suppl 1, p. 9-13. 1998.
- KUDO, H.; KAI, H.; KAJIMOTO, H.; KOGA, M.; TAKAYAMA, N.; MORI, T.; IKEDA, A.; YASUOKA, S.; ANEGAWA, T.; MIFUNE, H.; KATO, S.; HIROOKA, Y.; IMAIZUMI, T. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension*, v. 54, n. 4, p. 832-8. 2009.
- KUMAGAI, H.; KHOSLA, M.; FERRARIO, C.; FOUAD-TARAZI, F. M. Biological activity of angiotensin-(1-7) heptapeptide in the hamster heart. *Hypertension*, v. 15, n. 2 Suppl, p. I29-33. 1990.
- LANGHEINRICH, M.; LEE, M. A.; BOHM, M.; PINTO, Y. M.; GANTEN, D.; PAUL, M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens*, v. 9, n. 5, p. 506-12. 1996.
- LAUTNER, R. Q.; VILLELA, D. C.; FRAGA-SILVA, R. A.; SILVA, N. C.; VERANO-BRAGA, T.; COSTA-FRAGA, F.; JANKOWSKI, J.; JANKOWSKI, V.; DE SOUSA, F. B.; ALZAMORA, A. C.; SOARES, E. R.; BARBOSA, C. M.; KJELDSSEN, F.; OLIVEIRA, A. C.; BRAGA, J. F. et al. Discovery and Characterization of Alamandine, a Novel Component of the Renin-Angiotensin System. *Circ Res*. 2013.
- LEMOS, V. S.; SILVA, D. M.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 46, n. 3, p. 274-9. 2005.
- LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTES, C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*, v. 18, n. 4, p. 383-439. 1997.
- LI, L.; YI-MING, W.; LI, Z. Z.; ZHAO, L.; YU, Y. S.; LI, D. J.; XIA, C. Y.; LIU, J. G.; SU, D. F. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res*, v. 58, n. 3-4, p. 196-201. 2008.
- LI, M.; ZHENG, C.; SATO, T.; KAWADA, T.; SUGIMACHI, M.; SUNAGAWA, K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation*, v. 109, n. 1, p. 120-4. 2004.
- LI, Y.; WU, J.; HE, Q.; SHOU, Z.; ZHANG, P.; PEN, W.; ZHU, Y.; CHEN, J. Angiotensin (1-7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. *Hypertens Res*, v. 32, n. 5, p. 369-74. 2009.
- LIJNEN, P.; PETROV, V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, v. 31, n. 5, p. 949-70. 1999.
- LIPPOLDT, A.; PAUL, M.; FUXE, K.; GANTEN, D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens*, v. 17, n. 1-2, p. 251-66. 1995.



- LIU, E.; XU, Z.; LI, J.; YANG, S.; YANG, W.; LI, G. Enalapril, irbesartan, and angiotensin-(1-7) prevent atrial tachycardia-induced ionic remodeling. *International Journal of Cardiology*, v. 146, n. 3, p. 364-370. 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8. 2001.
- LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R. J.; BROWN, T. M.; CARNETHON, M.; DAI, S.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FORD, E.; FURIE, K.; GILLESPIE, C.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.; HO, P. M. et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 121, n. 7, p. e46-e215. 2010.
- LOOT, A. E.; ROKS, A. J.; HENNING, R. H.; TIO, R. A.; SUURMEIJER, A. J.; BOOMSMA, F.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, v. 105, n. 13, p. 1548-50. 2002.
- MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, v. 29, n. 7, p. 367-74. 2008.
- MARQUES, F. D.; FERREIRA, A. J.; SINISTERRA, R. D.; JACOBY, B. A.; SOUSA, F. B.; CALIARI, M. V.; SILVA, G. A.; MELO, M. B.; NADU, A. P.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C.; ALMEIDA, A. P.; SANTOS, R. A. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension*, v. 57, n. 3, p. 477-83. 2011.
- MARQUES, F. D.; MELO, M. B.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C.; SINISTERRA, R. D.; DE SOUSA, F. B.; SAVERGNINI, S. Q.; BRAGA, V. B.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of Angiotensin-(1-7) in infarcted rats. *Int J Hypertens*, v. 2012, p. 795452. 2012.
- MARTIN, K. A.; GRANT, S. G.; HOCKFIELD, S. The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 68, n. 1, p. 75-82. 1992.
- MARTINKA, P.; FIELITZ, J.; PATZAK, A.; REGITZ-ZAGROSEK, V.; PERSSON, P. B.; STAUSS, H. M. Mechanisms of blood pressure variability-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in mice with impaired baroreflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, n. 3, p. R767-76. 2005.
- MATSUFUJI, H.; MATSUI, T.; OHSHIGE, S.; KAWASAKI, T.; OSAJIMA, K.; OSAJIMA, Y. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 59, n. 8, p. 1398-401. 1995.
- MCMULLAN, S.; GOODCHILD, A. K.; PILOWSKY, P. M. Circulating angiotensin II attenuates the sympathetic baroreflex by reducing the barosensitivity of medullary cardiovascular neurones in the rat. *J Physiol*, v. 582, n. Pt 2, p. 711-22. 2007.
- MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; WALTHER, T.; TOUYZ, R. M.; REUDELHUBER, T. L. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res*, v. 103, n. 11, p. 1319-26. 2008.

- MORGAN, H. E.; BAKER, K. M. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation*, v. 83, n. 1, p. 13-25. 1991.
- MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, v. 344, n. 6266, p. 541-4. 1990.
- MURCA, T. M.; MORAES, P. L.; CAPURUCO, C. A.; SANTOS, S. H.; MELO, M. B.; SANTOS, R. A.; SHENOY, V.; KATOVICH, M. J.; RAIZADA, M. K.; FERREIRA, A. J. Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regul Pept*, v. 177, n. 1-3, p. 107-15. 2012.
- NADU, A. P.; FERREIRA, A. J.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR(A1-7)3292 rats. *J Am Soc Hypertens*, v. 2, n. 5, p. 341-8. 2008.
- NAUTIYAL, M.; SHALTOUT, H. A.; DE LIMA, D. C.; DO NASCIMENTO, K.; CHAPPELL, M. C.; DIZ, D. I. Central angiotensin-(1-7) improves vagal function independent of blood pressure in hypertensive (mRen2)27 rats. *Hypertension*, v. 60, n. 5, p. 1257-65. 2012.
- NEVES, L. A.; ALMEIDA, A. P.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol*, v. 50, n. 9, p. 1451-9. 1995.
- NG, K. K.; VANE, J. R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*, v. 216, n. 5117, p. 762-6. 1967.
- NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. M. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. *Curr Hypertens Rep*, v. 13, n. 2, p. 122-8. 2011.
- PAGE, I. H.; HELMER, O. M. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med*, v. 71, n. 1, p. 29-42. 1940a.
- PAGE, I. H.; HELMER, O. M. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *Journal of Experimental Medicine*, v. 71, n. 1, p. 29-42. 1940b.
- PATEL, V. B.; BODIGA, S.; FAN, D.; DAS, S. K.; WANG, Z.; WANG, W.; BASU, R.; ZHONG, J.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Cardioprotective effects mediated by angiotensin II type 1 receptor blockade and enhancing angiotensin 1-7 in experimental heart failure in angiotensin-converting enzyme 2-null mice. *Hypertension*, v. 59, n. 6, p. 1195-203. 2012.
- PATEL, V. B.; BODIGA, S.; FAN, D.; DAS, S. K.; WANG, Z.; WANG, W.; BASU, R.; ZHONG, J.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Cardioprotective Effects Mediated by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade and Enhancing Angiotensin 1-7 in Experimental Heart Failure in Angiotensin-Converting Enzyme 2-Null Mice. *Hypertension*, v. 59, n. 6, p. 1195-1203. 2012.
- PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, v. 86, n. 3, p. 747-803. 2006.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th. Amsterdam ; Boston ; : Academic Press/Elsevier, 2007.

- PEI, Z.; MENG, R.; LI, G.; YAN, G.; XU, C.; ZHUANG, Z.; REN, J.; WU, Z. Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs. *Toxicol Lett*, v. 199, n. 2, p. 173-81. 2010.
- PINTO, Y. M.; PINTO-SIETSMA, S. J.; PHILIPP, T.; ENGLER, S.; KOSSAMEHL, P.; HOCHER, B.; MARQUARDT, H.; SETHMANN, S.; LAUSTER, R.; MERKER, H. J.; PAUL, M. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat. *Hypertension*, v. 36, n. 5, p. 747-54. 2000.
- RABELO, L. A.; ALENINA, N.; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res*, v. 34, n. 2, p. 154-60. 2011.
- RAFFAI, G.; DURAND, M. J.; LOMBARD, J. H. Acute and chronic angiotensin-(1-7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 301, n. 4, p. H1341-52. 2011.
- RAJAGOPALAN, S.; KURZ, S.; MUNZEL, T.; TARPEY, M.; FREEMAN, B. A.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, v. 97, n. 8, p. 1916-23. 1996.
- RICE, G. I.; THOMAS, D. A.; GRANT, P. J.; TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*, v. 383, n. Pt 1, p. 45-51. 2004.
- RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MAGALHAES, G. S.; CARDOSO, J. A.; KANGUSSU, L. M.; MURARI, A.; CALIARI, M. V.; OLIVEIRA, M. L.; CARA, D. C.; NOVIELLO, M. L.; MARQUES, F. D.; PEREIRA, J. M.; LAUTNER, R. Q.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Br J Pharmacol*, v. 170, n. 4, p. 835-46. 2013.
- ROGER, V. L.; GO, A. S.; LLOYD-JONES, D. M.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BORDEN, W. B.; BRAVATA, D. M.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J. et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 125, n. 1, p. e2-e220. 2012.
- ROKS, A. J.; VAN GEEL, P. P.; PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; HENNING, R. H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 34, n. 2, p. 296-301. 1999.
- ROTHERMUND, L.; PINTO, Y. M.; VETTER, R.; HERFORT, N.; KOSSMEHL, P.; NEUMAYER, H. H.; PAUL, M.; KREUTZ, R. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens*, v. 19, n. 8, p. 1465-72. 2001.
- SABBAH, H. N.; GUPTA, R. C.; IMAI, M.; IRWIN, E. D.; RASTOGI, S.; ROSSING, M. A.; KIEVAL, R. S. Chronic electrical stimulation of the carotid sinus baroreflex improves left

ventricular function and promotes reversal of ventricular remodeling in dogs with advanced heart failure. *Circ Heart Fail*, v. 4, n. 1, p. 65-70. 2011.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, v. 58, n. 6, p. 1072-83. 1978.

SAMPAIO, W. O.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS, R. A. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 284, n. 6, p. H1985-94. 2003.

SAMPAIO, W. O.; SOUZA DOS SANTOS, R. A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L. T.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, v. 49, n. 1, p. 185-92. 2007.

SANTIAGO, N. M.; GUIMARAES, P. S.; SIRVENTE, R. A.; OLIVEIRA, L. A.; IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*, v. 55, n. 4, p. 889-96. 2010.

SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 63, n. 6, p. 1138-47. 2014.

SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153-7. 1988.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, v. 27, n. 4, p. 1033-47. 1994.

SANTOS, R. A.; CASTRO, C. H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S. V.; ALMEIDA, A. P.; PAULA, R. D.; CRUZ, J. S.; RAMOS, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*, v. 47, n. 5, p. 996-1002. 2006.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 16, n. 2, p. 122-8. 2007.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N.; DE ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BALTATU, O.; ILIESCU, R.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*, v. 17, n. 3, p. 292-9. 2004.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; SAMPAIO, W. O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 14, n. 8, p. 1019-31. 2005.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMOES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, v. 93, n. 5, p. 519-27. 2008.

- SANTOS, R. A.; GREENE, L. J.; KRIEGER, E. M. Changes in plasma ACE activity during the development and reversal of one-kidney, one clip hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens A*, v. 11, n. 2, p. 189-203. 1989.
- SANTOS, R. A.; KRIEGER, E. M.; GREENE, L. J. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*, v. 7, n. 2, p. 244-52. 1985.
- SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 14, p. 8258-63. 2003.
- SATO, H.; YAOITA, H.; MAEHARA, K.; MARUYAMA, Y. Attenuation of heart failure due to coronary stenosis by ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 285, n. 1, p. H359-68. 2003.
- SCHIAVONE, M. T.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-[1-7]: evidence for novel actions in the brain. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 16 Suppl 4, p. S19-24. 1990.
- SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n. 5, p. 707-9. 2003a.
- SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol*, v. 42, n. 5, p. 911-3. 2003b.
- SENANAYAKE, P. D.; MORIGUCHI, A.; KUMAGAI, H.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M.; BROSNIHAN, K. B. Increased expression of angiotensin peptides in the brain of transgenic hypertensive rats. *Peptides*, v. 15, n. 5, p. 919-26. 1994.
- SENCHENKOVA, E. Y.; RUSSELL, J.; ALMEIDA-PAULA, L. D.; HARDING, J. W.; GRANGER, D. N. Angiotensin II-mediated microvascular thrombosis. *Hypertension*, v. 56, n. 6, p. 1089-95. 2010.
- SHAH, A.; OH, Y. B.; LEE, S. H.; LIM, J. M.; KIM, S. H. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 302, n. 11, p. H2372-80. 2012.
- SILVA, A. Q.; SANTOS, R. A.; FONTES, M. A. Blockade of endogenous angiotensin-(1-7) in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces renal sympathetic tone. *Hypertension*, v. 46, n. 2, p. 341-8. 2005.
- SILVA, L. C.; FONTES, M. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; KHOSLA, M. C.; CAMPOS, R. R., JR.; GUERTZENSTEIN, P. G.; SANTOS, R. A. Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res*, v. 613, n. 2, p. 321-5. 1993.
- SKEGGS, L. T., JR.; MARSH, W. H.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med*, v. 99, n. 3, p. 275-82. 1954.

- SKEGGS, L. T.; LENTZ, K. E.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P.; WOODS, K. R. The Amino Acid Sequence of Hypertensin-li. *Journal of Experimental Medicine*, v. 104, n. 2, p. 193-197. 1956.
- SMITH, P. M.; CHAMBERS, A. P.; PRICE, C. J.; HO, W.; HOPF, C.; SHARKEY, K. A.; FERGUSON, A. V. The subfornical organ: a central nervous system site for actions of circulating leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 296, n. 3, p. R512-20. 2009.
- SMYTH, H. S.; SLEIGHT, P.; PICKERING, G. W. Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man. A quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. *Circ Res*, v. 24, n. 1, p. 109-21. 1969.
- SOATO, G. G.; KRIEGER, E. M. Heart rate after acute hypertension in the rat. *Am J Physiol*, v. 227, n. 6, p. 1389-93. 1974.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 35, n. 6, p. 881-900. 2003.
- SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, v. 31, n. 6, p. 410-7. 1980.
- TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 289, n. 4, p. H1560-6. 2005.
- TAN, Z.; WU, J.; MA, H. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 12, n. 4, p. 413-9. 2011.
- TIEGERSTEDT, R.; BERGMAN, P. Niere und Kreislauf. *Skandinävisches Archiev für Physiologie*, p. 223-271. 1898.
- TIKELLIS, C.; THOMAS, M. C. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int J Pept*, v. 2012, p. 256294. 2012.
- TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, v. 275, n. 43, p. 33238-43. 2000.
- TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, v. 7, n. 9-10, p. 1302-14. 2005.
- TOUYZ, R. M.; TABEL, F.; SCHIFFRIN, E. L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 30, n. 11, p. 860-6. 2003.
- TRASK, A. J.; GROBAN, L.; WESTWOOD, B. M.; VARAGIC, J.; GANTEN, D.; GALLAGHER, P. E.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. Inhibition of angiotensin-

converting enzyme 2 exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis in Ren-2 hypertensive rats. *Am J Hypertens*, v. 23, n. 6, p. 687-93. 2010.

TSCHOPE, C.; SCHULTHEISS, H. P.; WALTHER, T. Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 39, n. 4, p. 478-87. 2002.

UEMURA, K.; LI, M.; TSUTSUMI, T.; YAMAZAKI, T.; KAWADA, T.; KAMIYA, A.; INAGAKI, M.; SUNAGAWA, K.; SUGIMACHI, M. Efferent vagal nerve stimulation induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 293, n. 4, p. H2254-61. 2007.

UNGER, T.; BADOER, E.; GANTEN, D.; LANG, R. E.; RETTIG, R. Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation*, v. 77, n. 6 Pt 2, p. I40-54. 1988.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol*, v. 139, n. 2, p. 191-202. 2003.

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.; TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, v. 277, n. 17, p. 14838-43. 2002.

VON BOHLEN UND HALBACH, O.; ALBRECHT, D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*, v. 326, n. 2, p. 599-616. 2006.

VON LEWINSKI, D.; KOCKSKAMPER, J.; RUBERTUS, S. U.; ZHU, D.; SCHMITTO, J. D.; SCHONDUBE, F. A.; HASENFUSS, G.; PIESKE, B. Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur J Heart Fail*, v. 10, n. 12, p. 1172-6. 2008.

WELCHES, W. R.; SANTOS, R. A. S.; CHAPPELL, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Evidence That Prolyl Endopeptidase Participates in the Processing of Brain Angiotensin. *Journal of Hypertension*, v. 9, n. 7, p. 631-638. 1991.

WHALEY-CONNELL, A.; GOVINDARAJAN, G.; HABIBI, J.; HAYDEN, M. R.; COOPER, S. A.; WEI, Y.; MA, L.; QAZI, M.; LINK, D.; KARUPARTHI, P. R.; STUMP, C.; FERRARIO, C.; SOWERS, J. R. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 293, n. 1, p. E355-63. 2007.

WHALEY-CONNELL, A.; HABIBI, J.; COOPER, S. A.; DEMARCO, V. G.; HAYDEN, M. R.; STUMP, C. S.; LINK, D.; FERRARIO, C. M.; SOWERS, J. R. Effect of renin inhibition and AT1R blockade on myocardial remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 295, n. 1, p. E103-9. 2008.

WOLF, G. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, v. 7, n. 9-10, p. 1337-45. 2005.

WYSOCKI, J.; YE, M.; RODRIGUEZ, E.; GONZALEZ-PACHECO, F. R.; BARRIOS, C.; EVORA, K.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M.;

- PENNINGER, J. M.; BATLLE, D. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, v. 55, n. 1, p. 90-8. 2010.
- XIA, H.; SUDA, S.; BINDOM, S.; FENG, Y.; GURLEY, S. B.; SETH, D.; NAVAR, L. G.; LAZARTIGUES, E. ACE2-mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22682. 2011.
- XU, S.; ZHI, H.; HOU, X.; COHEN, R. A.; JIANG, B. I $\kappa$ B $\beta$  attenuates angiotensin II-induced cardiovascular inflammation and fibrosis in mice. *Hypertension*, v. 58, n. 2, p. 310-6. 2011.
- XUE, B.; ZHANG, Z.; JOHNSON, R. F.; GUO, F.; HAY, M.; JOHNSON, A. K. Central endogenous angiotensin-(1-7) protects against aldosterone/NaCl-induced hypertension in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 305, n. 5, p. H699-705. 2013.
- YAMAMOTO, K.; OHISHI, M.; KATSUYA, T.; ITO, N.; IKUSHIMA, M.; KAIBE, M.; TATARA, Y.; SHIOTA, A.; SUGANO, S.; TAKEDA, S.; RAKUGI, H.; OGIHARA, T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension*, v. 47, n. 4, p. 718-26. 2006.
- YAMAZATO, M.; FERREIRA, A. J.; YAMAZATO, Y.; DIEZ-FREIRE, C.; YUAN, L.; GILLIES, R.; RAIZADA, M. K. Gene transfer of angiotensin-converting enzyme 2 in the nucleus tractus solitarius improves baroreceptor heart rate reflex in spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 12, n. 4, p. 456-61. 2011.
- YAMAZATO, M.; YAMAZATO, Y.; SUN, C.; DIEZ-FREIRE, C.; RAIZADA, M. K. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 49, n. 4, p. 926-31. 2007.
- ZHONG, J.; BASU, R.; GUO, D.; CHOW, F. L.; BYRNS, S.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; WANG, X. H.; PENNINGER, J. M.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation*, v. 122, n. 7, p. 717-28, 18 p following 728. 2010.
- ZHONG, J.; GUO, D.; CHEN, C. B.; WANG, W.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; PENNINGER, J. M.; SCHOLEY, J. W.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G. Y. Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension*, v. 57, n. 2, p. 314-22. 2011.
- ZIMMERMAN, M. C.; LAZARTIGUES, E.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res*, v. 95, n. 2, p. 210-6. 2004.
- ZIMMERMAN, M. C.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells. *Hypertension*, v. 45, n. 4, p. 717-23. 2005.



ZOLK, O.; FLESCHE, M.; NICKENIG, G.; SCHNABEL, P.; BOHM, M. Alteration of intracellular Ca<sup>2+</sup>-handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats. *Cardiovasc Res*, v. 39, n. 1, p. 242-56. 1998.

ZOLK, O.; FLESCHE, M.; SCHNABEL, P.; TEISMAN, A. C.; PINTO, Y. M.; VAN GILST, W. H.; PAUL, M.; BOHM, M. Effects of quinapril, losartan and hydralazine on cardiac hypertrophy and beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in transgenic (mREN2)27 rats. *Br J Pharmacol*, v. 123, n. 3, p. 405-12. 1998.

ZOLK, O.; QUATTEK, J.; SEELAND, U.; EL-ARMOUCHE, A.; ESCHENHAGEN, T.; BOHM, M. Activation of the cardiac endothelin system in left ventricular hypertrophy before onset of heart failure in TG(mREN2)27 rats. *Cardiovasc Res*, v. 53, n. 2, p. 363-71. 2002.

**ANEXOS**

**Produção científica: Estudos desenvolvidos durante o doutorado (abril de 2012 a julho 2014):**

- **Kangussu LM**, Almeida-Santos AF, Bader M, Alenina N, Fontes MA, Santos RA, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Behavioural Brain Research**. v. 257, p. 25-30, 2013.
- Rodrigues-Machado MG, Magalhaes GS, Cardoso JA, **Kangussu LM**, Murari A, Caliari MV, Oliveira ML, Cara DC, Noviello ML, Marques FD, Pereira JM, Lautner RQ, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Ave 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. **British Journal of Pharmacology**. v. 170, p. 835-46, 2013.