

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

**Avaliação dos efeitos cardiovasculares da
Angiotensina-(1-9)**

GABRIEL SANGLARD SANTOS RESENDE

BELO HORIZONTE

2014

GABRIEL SANGLARD SANTOS RESENDE

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

Dissertação 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 mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Sousa Santos.

BELO HORIZONTE

2014

Resende, Gabriel Sanglard Santos.

Avaliação dos efeitos cardiovasculares da angiotensina-(1-9) [manuscrito] / Gabriel Sanglard Santos Resende. - 2014.

54 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Robson Augusto Sousa Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Angiotensina - Teses. 2. Angiotensina-(1-9). 3. Receptor MAS. 4. Receptor tipo 2 de angiotensina. 5. Fisiologia - Teses. I. Santos, Robson Augusto Sousa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

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

NÃO HÁ FATOS ETERNOS, COMO NÃO HÁ VERDADES ABSOLUTAS.

(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

À minha **Mãe**, por tantos anos de lutas ao meu lado, por tudo que aprendi, e pelo que sou.

À **Tia Sarah**, pelo apoio incondicional, por tantas portas abertas, por tudo que aprendi e aprendo com você.

À **Vovó Tuca**, por todo carinho e aprendizado no decorrer dos anos.

A minha irmã **Jéssica**, pelo apoio e carinho.

Ao **Lucas Kangussu**, pelos anos de amizade, por estar sempre disponível, sempre com boa vontade em ajudar. Vlw Brother!!!!!!

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

Ao **Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos**, pela oportunidade, pela paciência, apoio, confiança e todos os ensinamentos.

A todos os amigos do Laboratório de Hipertensão!

E a todos que contribuíram com este trabalho de forma direta ou indireta.

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

ECA2: Enzima conversora de angiotensina tipo II

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

Ang-(1-9): Angiotensina 1-9

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

AT1: Receptor para angiotensina II tipo 1

AT2: Receptor para angiotensina II tipo 2

AT2KO: “Nocaute” para o receptor para angiotensina II tipo 2

CHO: Células de ovário de hamster chinês

C21: Composto 21

DAF-FM: 4-amino-5-metilamino-2,7-diacetato de difluorofluorescia

FC: Frequência cardíaca

Mas: Receptor Mas

MasKO: “Nocaute” para o receptor Mas

NO: Óxido nítrico

PAM: Pressão arterial média

RAS: Sistema renina angiotensina

SHR-SP: Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat

WT: Wild Type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via clássica do sistema renina angiotensina	06
Figura 2 - Ilustração mais atualizada do sistema renina-angiotensina	10
Figura 3 - Esquema representativo do experimento de reatividade vascular	18
Figura 4 - Cirurgia de implante das cânulas em artérias e veia femorais	21
Figura 5 - Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes ...	22
Figura 6 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N.	25
Figura 7 - Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N <i>Knockout</i> pro receptor Mas	26
Figura 8 - Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N <i>Knockout</i> pro receptor AT ₂	27
Figura 9 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley	28
Figura 10 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de A-779.....	29
Figura 11 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de D-Pro7	30
Figura 12 - Efeito induzido pelo peptídeo Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de PD123319	31
Figura 13 - Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de A-779 e D-Pro7	32
Figura 14 - Representação da fluorescência relativa em microscopia com focal usando DAF-FM em células CHO	34
Figura 15 - Média da variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 20min da injeção em bolos de doses crescentes angiotensina-(1-9)	35
Figura 16 - Variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 6 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9)	36
Figura 17 - Média da variação da FC de ratos SHR-SP conscientes após 6 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9).....	37
Figura 18 - Média da variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 3 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9).....	38

Figura 19 - Média da variação da FC de ratos SHR-SP conscientes após 3 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9).....	38
Figura 20 - Cascata simplificada de formação da Ang- (1-9).....	46

SUMÁRIO

I. Introdução	01
1.1 SRA Clássico.....	02
1.2 ECA 2 e visão Moderna do SRA.....	07
1.3 ANGIOTENSINA-(1-9).....	10
II. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2Objetivos específicos	14
III. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Animais Experimentais.....	16
3.2 Montagem e preparação dos vasos:.....	16
3.3 Protocolos expereimentais.....	18
3.4 Avaliação da liberação de oxido nítrico (NO) em células CHO transfectadas de forma estável.....	19
3.5 Canulação de veias e artérias.....	20
3.6 Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes.....	21
3.7 Análise estatística.....	23
IV. RESULTADOS	25
4.1 Efeito do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N e <i>Knockout</i> para o receptor MAS e para o receptor AT ₂	25
4.1.1 Ação do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N.....	26
4.1.2 Avaliação do receptor Mas na Resposta Relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N Mas <i>Knockout</i>	26
4.1.3 Avaliação do receptor AT ₂ na Resposta Relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N AT ₂ <i>Knockout</i>	27

4.2. Efeitos do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de ratos Sprague-Dawley com e sem antagonismo farmacológico dos receptores Mas, AT ₂ e Mrgd.....	28
4.2.1 Ação do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de ratos Sprague-Dawley.....	28
4.2.2 Efeito do bloqueio do receptor Mas pelo antagonista A-779, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.....	29
4.2.3 Efeito do bloqueio do receptor Mas e MrgD pelo antagonista D-Pro7, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.....	30
4.2.4 Efeito do bloqueio do receptor AT ₂ pelo antagonista PD123319, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.....	31
4.2.5 Efeito do bloqueio dos receptores Mas, AT ₂ e MrgD pelos antagonistas D-Pro7 e PD123139, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.....	32
4.3 Análise da Liberação de Óxido Nítrico em células CHO transfectadas.....	33
4.4 Efeito da administração de doses crescentes do peptídeo angiotensina-(1-9) sobre os níveis pressóricos de ratos espontaneamente hipertensos após 20 min de cada dose.	35
4.5 Efeito da administração do peptídeo angiotensina-(1-9) e angiotensina-(1-7) sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos após 6 hrs.....	36
4.6 Efeito da administração de angiotensina-(1-9) e angiotensina-(1-7) sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos 3hrs após a injeção <i>in bolos</i>	37
V. DISCUSSÃO.....	39
VI. BIBLIOGRAFIA.....	49

RESUMO

A Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] é um nonapeptídeo formado pela hidrólise da Ang I via ECA 2, que parece ter ações contra-regulatórias do eixo clássico do SRA. Estudos recentes sugerem que a Ang-(1-9) exerce seus efeitos via receptor AT₂, contudo, a ferramenta farmacológica que vem sendo utilizada para avaliar a interação Ang-(1-9) com o receptor AT₂, o PD123319, recentemente foi descrito como antagonista não específico do receptor AT₂, interagindo também com o receptor MrgD. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos receptores AT₂, Mas e MrgD nos efeitos cardiovasculares da Ang-(1-9). Foram realizadas técnicas de reatividade vascular, experimentos de transfecção de receptores em culturas celulares e avaliação de parâmetros cardiovasculares *in vivo*. A Ang-(1-9) produziu um relaxamento vascular dose-dependente em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley (SD), que não foi modificado pelo antagonista seletivo do Mas (A779), resultados similares foram observados com o antagonismo farmacológico dos receptores AT₂ e MrgD PD123319. Houve uma atenuação da vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) nos anéis de aorta de camundongos Mas nocaute quando comparado com os animais WT, mas a resposta não foi abolida. Não houve diferença na resposta relaxante entre os camundongos AT₂ nocaute e WT. Além disso, a Ang-(1-9) não estimulou a produção de NO em células CHO transfectadas de forma estável com receptor Mas, AT₂ ou MrgD. *In vivo*, após 6 horas de uma única dose de Ang-(1-9) injetada na veia femoral observou-se atenuação da hipertensão com diminuição significativa da pressão arterial média (15.16 ±1,217) de ratos espontaneamente hipertensos (SHR-SP). Em contrapartida, não observamos efeitos cardiovasculares em ratos SHR-SP através da administração de doses crescentes da Ang-(1-9) em curto prazo. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que Ang-(1-9) não induz seus efeitos biológicos por interagir com o receptor AT₂. Além disso, os efeitos induzidos pela Ang-(1-9) não são mediados pelos receptores angiotensinérgicos Mas e MrgD. Sendo assim podemos sugerir que a Ang-(1-9) realiza suas ações através de outro receptor, ainda não identificado, que em algumas situações poderia ser sensível a PD123319.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-9), Mas, AT₂, MrgD.

ABSTRACT

Angiotensin-(1-9) is a nonapeptide formed by the hydrolysis of angiotensin I by ACE2 that seems to counter-regulate the classical RAS axis. Recent studies suggest that Ang-(1-9) acts via AT₂ receptors (AT2R), however the pharmacological tool used to assess this Ang-(1-9) /AT2R mediated interaction, is the AT2R antagonist, PD123319, that appears to have a great deal of inespecificity . Two other candidates for the ligation of Ang-(1-9), that have protective effects similar to the AT2R are the MAS and the recently described MrgD receptor. Thus, in this study we addressed if Ang-(1-9) could be a ligand for AT₂, MAS or MrgD receptors using aortic rings taken from AT₂ and Mas knockout mice and AT2R or MrgD-transfected CHO cells. Materials and methods: The endothelium-dependent vasodilatory response to Ang-(1-9) was tested in aortic rings taken from Wild-Type, AT2KO and MASKO mice and Sprague-Dawley rats, pre-contracted with phenylephrine (0.1 umoles/L). NO release from AT2R or MrgD stable transfected CHO cells was evaluated using the NO indicator 4-amino-5 methylamino-2, 7 difluorofluoresceindiacetate (DAF-FM) after Ang-(1-9) stimulation. Analyzed the *in vivo* cardiovascular parameters were recorded by a signal sent to a transducer connected to the cannula inserted into the abdominal aorta through the femoral artery, through data acquisition system (Biopac System, model MP150).Results: In aortic rings from SD rats Ang-(1-9) produced a dose-related relaxation which was not modified by A-779, the Mas/MrgD antagonist D-Pro7-Ang-(1-7); or by PD123319. In aortic rings taken from Mas KO there was a minor attenuation of the Ang-(1-9) vasorelaxant effect when compared to the WT. No difference between AT₂KO and WT mice was observed regarding the vasorelaxation produced by Ang-(1-9). Moreover, the vasorelaxing effect of Ang-(1-9) was not affected by the association of PD123319 and D-Pro7-Ang-(1-7).In addition, the nonapeptide did not stimulate NO production in AT2R-stably transfected CHO cells or MrgD stably transfected cells. *In vivo*, we observed in SHR-SP rats cardiovascular effects of increasing doses of Ang-(1-9) within (20 min) injected into the carotid artery. But when injected into the femoral vein after 6hrs, we observed a significant decrease in mean arterial pressure. As attenuated the action of Ang II in the neurogenic model in mice.

Keywords: Angiotensin-(1-9), Mas, AT₂, MrgD.

I. INTRODUÇÃO

1.1 SRA Clássico

O complexo processo da regulação da pressão arterial (PA) envolve diferentes mecanismos, uma rede integrada de órgãos e sistemas que para manutenção da homeostase, trabalham de forma associada. O controle da PA ocorre de forma redundante por sistemas de controle de *feedback* e *feedforward*, que atuam a curto, médio e a longo prazo. Nestes sistemas participam 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 estável (Dampney et al., 2002).

Atualmente as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo que 32,8% das mortes, em 2008, nos Estados Unidos foram em decorrência de DCV, segundo a “American Heart Association” (Lloyd-Jones et al., 2010). O principal fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças é a hipertensão arterial, sendo a mesma uma das patologias com maior prevalência no mundo, levando a óbito cerca de 7,5 milhões de pessoas a cada ano (Roger et al., 2012).

No período de instauração da hipertensão arterial, a faixa de variação da PA (*set point*) é deslocada de forma sustentada para um nível superior. Esta mudança decorre de alterações periféricas mantidas constantes, como aumento da resistência vascular periférica total e/ou aumento do débito cardíaco. Estas alterações periféricas são desencadeadas por alterações

centrais, como alterações na sensibilidade barorreflexa (Veerasingham and Raizada, 2003), aumento na atividade do sistema nervoso simpático (Esler, 2000) e alterações na atividade do sistema renina angiotensina (SRA), que desempenham um papel chave na patogênese da hipertensão arterial (Britto et al., 1997; Ferrario, 1990; Santos et al., 1989).

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

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

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

Já em 1940, Braun-Menendez e cols., na Argentina, e Page e Helmer, nos Estados Unidos, trabalhando de forma independente descreveram que o

peptídeo pressórico não era a renina, e sim um produto da ação enzimática dessa substância sobre uma proteína plasmática (Braun-Menendez *et al.*, 1940; Page and Helmer, 1940). O primeiro grupo denominou esse produto de hipertensina e o segundo de angiotonina. Posteriormente o termo angiotensina, resultado da agregação entre os termos “hipertensina”, originado na Argentina e “angiotonina”, nos Estados Unidos, passou a ser usado na tentativa de unificar essa terminologia (Braun-Menendez and Page, 1958).

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

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

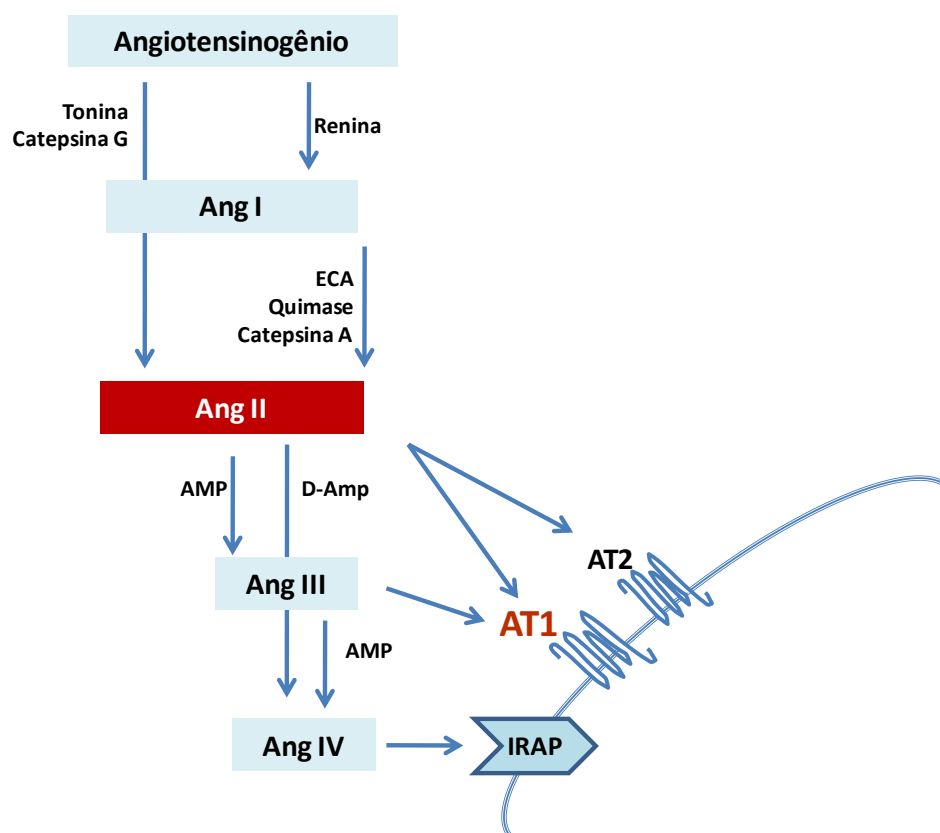
O octapeptídeo Ang II é o principal componente do SRA e sua formação consiste em dois estágios. Inicialmente, ocorre clivagem da alfa-glicoproteína angiotensinogênio, liberada pelo fígado, através da ação da enzima renina, formando o decapeptídeo Ang I. A Ang I é biologicamente inativa e, sob a ação da ECA, forma a Ang II (Atlas, 2007; Lentz *et al.*, 1956). Atualmente, é aceito que Ang II também pode ser formada a partir de vias independentes de renina/ECA, e que Ang I e Ang II podem ser convertidas em peptídeos angiotensinérgicos menores, biologicamente ativos, como a Ang III, Ang IV e Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2005).

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

Os receptores AT1 medeiam à maioria das ações clássicas da Ang II nos tecidos dos sistemas cardiovascular e neuroendócrino, onde se encontram amplamente distribuídos. Dentre as principais ações da Ang II, via AT₁, destacam-se: vasoconstrição, aumento na retenção de sódio e água (por ação direta ou via liberação de aldosterona e vasopressina), aumento da síntese de renina, diminuição da sensibilidade do reflexo pressórico, proliferação celular (angiogênese, remodelamento da matriz extracelular, liberação de

noradrenalina pelas terminações simpática e adrenal, aumento da atividade simpática no sistema nervoso central, hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos, estimulação de fibrose no miocárdio e vasos sanguíneos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cheng *et al.*, 2005; Keidar *et al.*, 2007).

Figura 1: Ilustração esquemática do sistema renina-angiotensina mostrando a via



“clássica” de formação da angiotensina II e seu receptor. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; AT1, Receptor de Angiotensina II.

Enquanto os receptores AT1 são amplamente distribuídos, a expressão dos receptores AT₂ é mais limitada. Sabe-se que esses receptores estão presentes principalmente em tecidos fetais em desenvolvimento, o que sugere uma possível participação na morfogênese dos órgãos (Kim and Iwao, 2000).

Em adultos, o AT₂ é encontrado no útero, em células granulosas do ovário, na medula adrenal, em diferentes núcleos cerebrais, cardiomiócitos, células da musculatura lisa vascular e células endoteliais (Kim and Iwao, 2000; Matrougui *et al.*, 1999). Estudos sugerem que a interação da Ang II com o receptor AT₂ desencadeia, na maior parte das vezes, efeitos contrários aos observados pela interação da Ang II com o receptor AT₁ (Berry *et al.*, 2001; Carey *et al.*, 2001). Neste sentido, Tsutsumi e cols. em 1999 sugeriram que a ativação dos receptores AT₂, nos vasos sanguíneos, pode desencadear uma resposta vasodilatadora dependente da síntese de cininas e óxido nítrico (NO) (Tsutsumi *et al.*, 1999). Estudos *in vivo*, baseando-se na superexpressão ou deleção genética do receptor AT₂, demonstraram que este receptor é capaz de inibir várias ações mediadas pelo receptor AT₁ (Hein, 1998). Abdalla *et al.* em 2001, demonstraram que o receptor AT₂ pode formar heterodímeros com o receptor AT₁ independentemente da ligação da Ang II, sugerindo que a interação entre esses dois receptores possa promover uma alteração conformacional em AT₁ impossibilitando a ativação de suas vias de sinalização. Apesar destes achados literários, a importância funcional dos receptores AT₂ em humanos e os mecanismos envolvidos na transdução de sinal não estão ainda claramente elucidados (AbdAlla *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2001).

1.2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

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

Estruturalmente, o gene que codifica a ECA2 possui 18 exons e as várias similaridades entre a sequência genômica da ECA2 e a sequência da ECA, sugere uma relação evolutiva entre esses dois tipos de genes (Turner *et al.*, 2002). Porém, a especificidade da ECA2 é diferente da ECA. A ECA2 hidrolisa a Ang I, a Ang II e o metabólito da bradicinina [des-Arg9], mas não hidrolisa a bradicinina. Sugerindo que a especificidade da ECA2 parece estar relacionada à sua função como carboxipeptidase com uma preferência por um resíduo hidrofóbico C-terminal, ou seja, uma ação com carboxipeptidase A (CP-A) o que justifica a ausência de hidrólise da bradicinina, que apresenta um resíduo básico na porção C-terminal (Vickers *et al.*, 2002). Estruturalmente, entretanto a ECA2 é diferente da CP-A e da ECA e tal distinção é comprovada pelo fato da ECA2 não ser inibida por inibidores clássicos da ECA (captopril, lisinopril, enalapril) e nem por inibidores da CP-A. Mais importante nesse contexto é que ao hidrolisar a Ang II e a Ang I, a ECA2 apresenta uma via metabólica para a formação de Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] e Angiotensina-(1-7) [Ang-1-7] (Vickers *et al.*, 2002), dessa forma a caracterização da ECA2 possibilitou a divisão dos dois eixos distintos de formação de peptídeo no sistema, cujas as ações são aparentemente modulatórias.

Em 2003, Santos e cols. identificaram o receptor Mas como um receptor funcional, específico, seletivo para a Ang-(1-7). O receptor Mas possui sete domínios transmembrana e é acoplado à proteína G (GPCR) (Santos *et al.*, 2003). Este receptor é altamente expresso nos testículos e cérebro (Metzger *et al.*, 1995; Walther *et al.*, 2000). Santos e cols. em 2003 fizeram uma ampla caracterização do receptor Mas e demonstraram que: (1) há um único sítio específico de ligação para Ang (1-7) e estudos com o antagonista seletivo deste heptapeptídeo, A-779, indicaram a existência de um receptor específico da Ang- (1-7), (2) a deleção genética deste receptor aboliu a ligação da Ang-(1-7) em rins de camundongos, (3) camundongos deficientes para o receptor Mas perderam completamente a ação antidiurética induzida pela Ang-(1-7) após uma sobrecarga aguda de água, (4) a Ang-(1-7) interage com o receptor Mas em células transfectadas promovendo liberação de ácido araquidônico e (5) animais deficientes para receptor Mas tem o relaxamento vascular na aorta induzida pela Ang-(1-7) abolido. Estudos indicam que vários efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) podem ser completamente abolidos pelo antagonista seletivo do receptor Mas, A-779, sugerindo um papel importante do eixo Ang-(1-7)-Mas no sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2000, 2003, 2005).

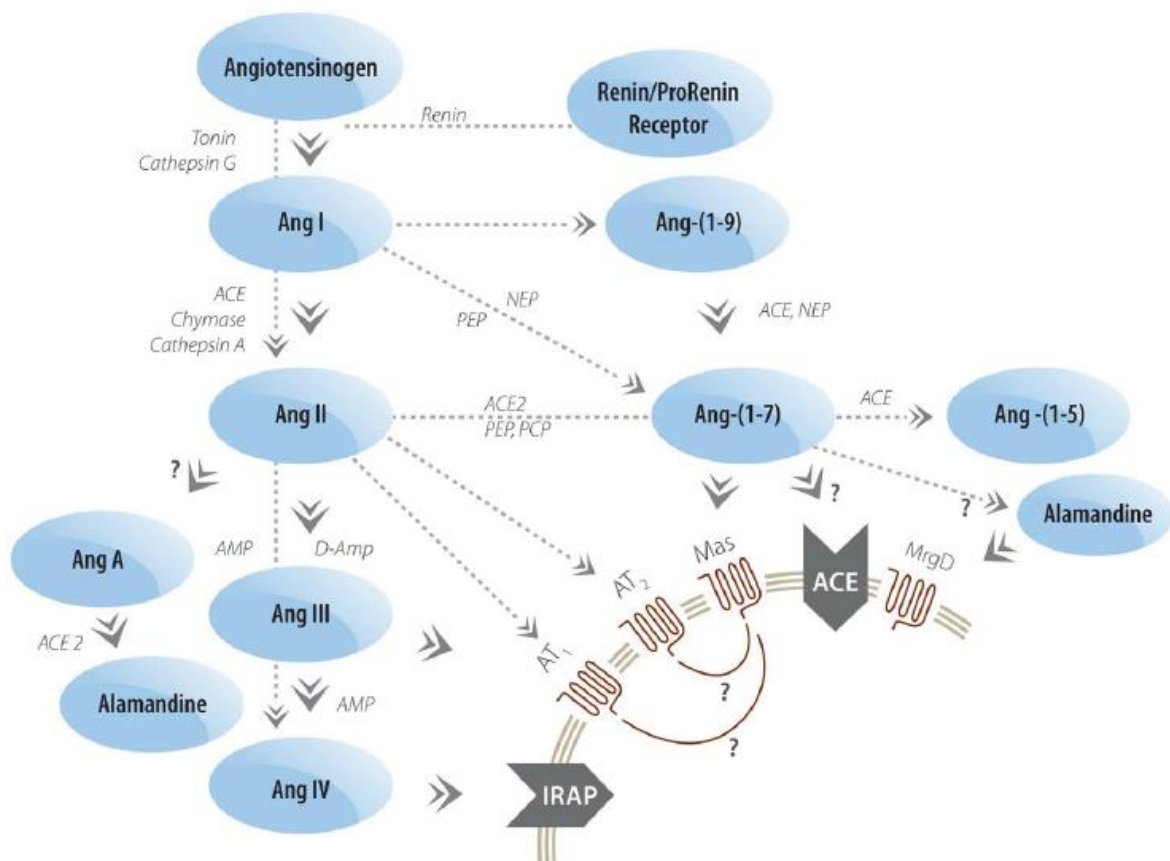


Figura 2: Visão atualizada simplificada e do sistema renina-angiotensina. ACE indica a enzima conversora da angiotensina; AMP, aminopeptidase; Ang, angiotensina; AT1, o de receptor de angiotensina tipo 1; AT2, receptor de angiotensina tipo 2; D-Amp, dipeptidilaminopeptidase I-III; IRAP, aminopeptidase regulada pela insulina; Mas, receptor Mas; MrgD receptor relacionado ao Mas, do tipo D acoplado à proteína G; NEP, endopeptidase neutra; PCP, carboxipeptidase prolilo; e PEP, prolyl endopeptidase. (Santos, 2014).

1.3 Angiotensina-(1-9)

Antes mesmo da descoberta da ECA2, em 1985 Snyder & Wintroub descreveram a ang-(1-9) como angiotensina I Des-leu¹⁰, um peptídeo formado nas plaquetas via carboxipeptidase, oriunda da ação des-leu de um tipo específico de plaqueta que ainda não havia sido identificada (Snyder *et al.*, 1985). Já em 1986 Snyder & Wintroub propuseram a Angiotensina I Des-leu¹⁰ como um componente contra regulatório da Ang II, agindo como antagonista da

ECA, e compara a magnitude de seus efeitos vasoativos aos da bradicinina (Snyder and Wintroub, 1986). Em 1989, John H. buscando uma forma de quantificar concentrações da Ang-(1-9), registra pela primeira vez através de radioimunoensaio a presença de ang-(1-9) no plasma de ratos, atribuindo sua formação a uma ação de carboxipeptidase (Johnson *et al.*, 1989).

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

Estudos recentes sugerem que a Ang-(1-9) atua via receptores AT₂, desempenhando importante papel no sistema cardiovascular, como: vasodilatação, ação anti-hipertrofica em cardiomiócitos, ação anti-hipertensiva e anti-proliferativa (Flores-Muñoz *et al.*, 2011, 2012; Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza and Jalil, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014a, 2014b). Contudo a ferramenta farmacológica que vem sendo utilizada para avaliar a interação Ang-(1-9)/AT₂, é o antagonista do receptor AT₂, PD123319, o qual recentemente foi demonstrado que esse antagonista pode também antagonizar o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Levando-nos a hipótese de que a Ang-(1-9), pode desencadear suas ações por meio de um receptor diferente do que vem sendo descrito na literatura.

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

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a participação dos receptores AT₂, Mas e MrgD; nos efeitos cardiovasculares da angiotensina-(1-9).

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar os mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos e camundongos.

2.2.2 Avaliar os efeitos do peptídeo Ang-(1-9) sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos acordados.

2.2.3 Avaliar os efeitos do peptídeo Ang-(1-9) nos receptores Mas, AT₂, MrgD.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Para realização do presente estudo foram utilizados camundongos machos FVBN/WT (tipo selvagem). FVBN com deleção genética do receptor Mas (Mas Ko) e Camundongos FVBN com deleção genética do receptor AT₂ (AT₂ Ko); com idade entre 10 a 12 semanas.

Também utilizamos Ratos Sprague-Dawley (SD) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR-SP), machos com peso entre 250-300 gramas.

Os animais foram provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - UFMG

3.2 Montagem e preparação dos vasos

Os animais foram eutanasiados por decapitação, subsequente retirada de um segmento da artéria aorta descendente torácica de 2 a 3 cm isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e retirados anéis de 3 mm de comprimento. Os anéis foram montados entre duas hastes de metal inseridas no lúmen da artéria para produzir tensão. Uma das hastes conecta-se a um suporte fixo ajustável e a outra a um transdutor para registro de força. A tensão isométrica foi registrada através de transdutor acoplado a um sistema computadorizado. O sistema foi montado em cuba para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs, com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH₂PO₄ 1,17; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,4; NaHCO₃

20; glicose 11,0; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), e temperatura controlada a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos, sob tensão basal constante de 0,5 g em camundongos e 1g pra ratos, durante este período foram lavadas com a solução de Krebs em intervalos de 15 minutos.

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

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

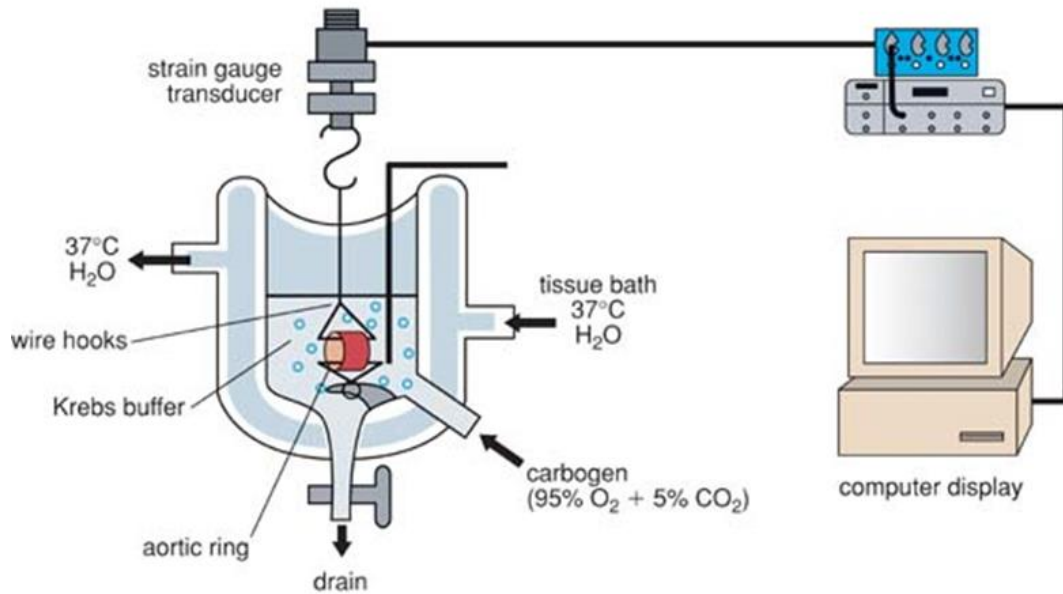


Figura 3: Esquema representativo da conexão dos vasos às hastes metálicas e sistema de aquisição de dados da reatividade vascular de vasos isolados.

3.3 Protocolos experimentais:

Avaliação da participação da Ang-(1-9) na resposta relaxante na artéria aorta.

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

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

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

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

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

Avaliação da participação do receptor AT₂ na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) na artéria aorta.

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

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

Avaliação da interação entre os receptores Mas, AT₂, MrgD na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) na artéria aorta.

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

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

3.4 Avaliação da liberação de óxido nítrico (NO) em células CHO transfectadas de forma estável.

Células de ovário de Hamster chinês (CHO) que expressam estavelmente os receptores Mas, AT₂ ou MrgD foram obtidas usando o método de transfecção estável por seleção via resistência à neomicina (Sambrook & Russell). As células foram cultivadas em meio D-MEM-F12 e cresceram em lamínulas de vidro até 80-90% de confluência. Para a quantificação da liberação de óxido nítrico (NO), foi usado o reagente 4-amino-5-metilamino-2,7-diacetato de difluorofluoresceína (DAF-FM). O DAF-FM, após reagir com o NO, forma um benzotriazol fluorescente com excitação/emissão máxima de 495/515nm. Imagens fluorescentes foram obtidas utilizando um microscópio confocal, laser Zeiss LSM 510 META com frequência de excitação de 488 nm, utilizando o laser de íon argônio (lente da objetiva de imersão em óleo: x63). O nível de fluorescência emitido pela célula foi avaliado através do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java; NIH-USA).

3.5 Canulação de veias e artérias.

Os ratos SHR-SP foram anestesiados com tribromoetanol 2,5%, via intraperitoneal (1mL/100g). Para a canulação da artéria femoral, utilizamos cânulas confeccionadas a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 a 4 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e heparina (100 U.I./ 0,1mL).

Após o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, realizamos a tricotomia da região inguinal direita do animal. Uma pequena incisão na pele foi realizada, o feixe vaso-nervoso femoral localizado e a artéria femoral cuidadosamente isolada. A cânula foi introduzida

na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares. Uma segunda cânula, confeccionada a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 à 2 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%), foi introduzida na veia femoral para a administração de Ang-(1-9). Em outro experimento a segunda cânula foi confeccionada a partir da conexão de 7 cm de PE50 e 2cm de PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%), foi introduzida na artéria carótida para administração de Ang-(1-9). Após a canulação, as cânulas foram fixadas e exteriorizadas subcutaneamente, em direção ao dorso do animal, na região cervical. As incisões foram suturadas cuidadosamente, ao final de cada cirurgia, então realizamos a injeção intramuscular do antiinflamatório e analgésico veterinário Flunixin Meglumine (Banamine Schering-Plough, 1,0 mg/ Kg). Os animais colocados em caixas individuais, com livre acesso à água e ração.

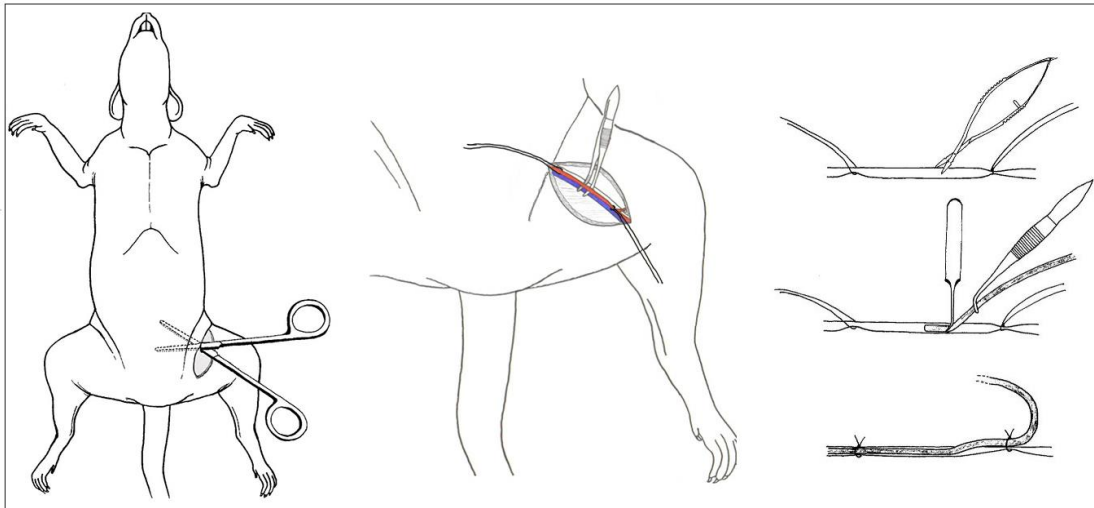
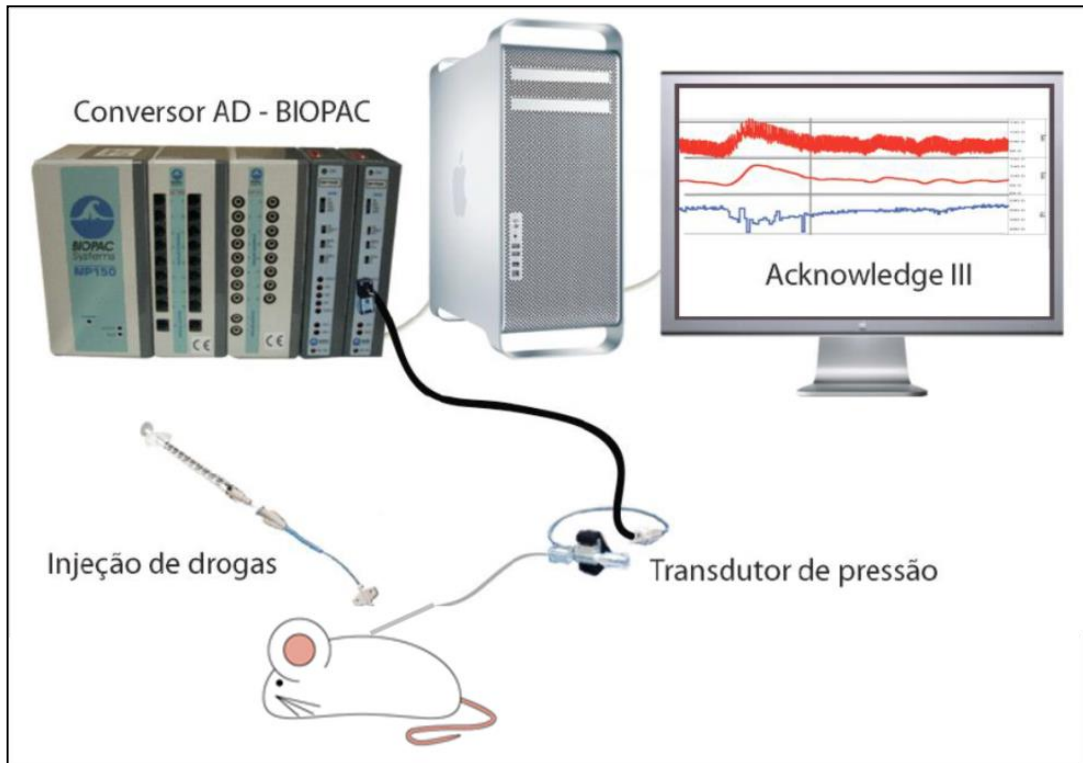


Figura 4: Passos da cirurgia de implante das cânulas em artérias e veia femorais.

3.6 Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes.

Vinte e quatro horas após o procedimento de implantação das cânulas foi realizado o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordados. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por um sinal enviado a um transdutor conectado à cânula inserida na aorta abdominal pela artéria femoral, através do sistema de aquisição de dados (Biopac System, modelo MP150). As oscilações de pressão captadas são amplificadas e convertidas através de placa de conversão analógico/digital em sinais que alimentam a placa de aquisição de dados. Através do *software* de leitura da placa, *Acqknowledgev.3.5.7* (Biopac System), a PAP foi registrada continuamente com uma frequência de amostragem de 2000-4000 Hz. Os valores de PAM e FC foram calculados a partir de pulsos de PA e registrados pelo sistema.

Fig 5: Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes



Assim, no momento do experimento, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão para início do registro. Após o período de uma hora de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, doses crescentes de Ang-(1-9) (2,5; 5,0; 7,5 nmol), ou salina foram injetadas por via intravenosa ou pela artéria carótida. Após a injeção de cada dose do peptídeo ou salina, os parâmetros cardiovasculares foram monitorados por 20, seguida de doses maiores até atingir 7,5nmol .

3.7 Análise estatística

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

IV. RESULTADOS

4.1 Efeito do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N WT e *Knockout* para o receptor MAS ou para o receptor AT₂.

4.1.1 Ação do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de camundongos FVB/N WT.

A Figura 6 mostra o efeito relaxante concentração-dependente induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N WT contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe).

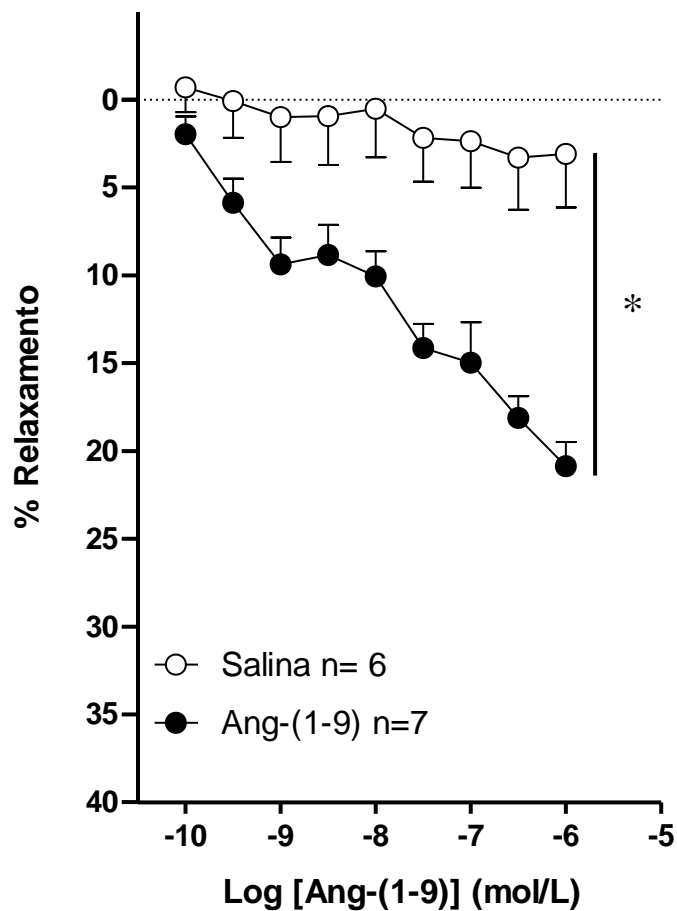


Figura 6: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N WT. * $p < 0,05$ (T test).

4.1.2 Avaliação do receptor Mas na Resposta Relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N Mas *Knockout*.

A Figura 2 (A e B) mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe). Na Figura (A) é avaliado o efeito relaxante do peptídeo em anéis de aorta de camundongos FVB/N com deleção genética do receptor Mas. Na Figura (B) comparamos a ação da Ang-(1-9) em camundongos com e sem a deleção genética do receptor Mas, sendo que o grupo *Knockout* apresentou um relaxamento mais tênue, mas não aboliu o efeito do peptídeo.

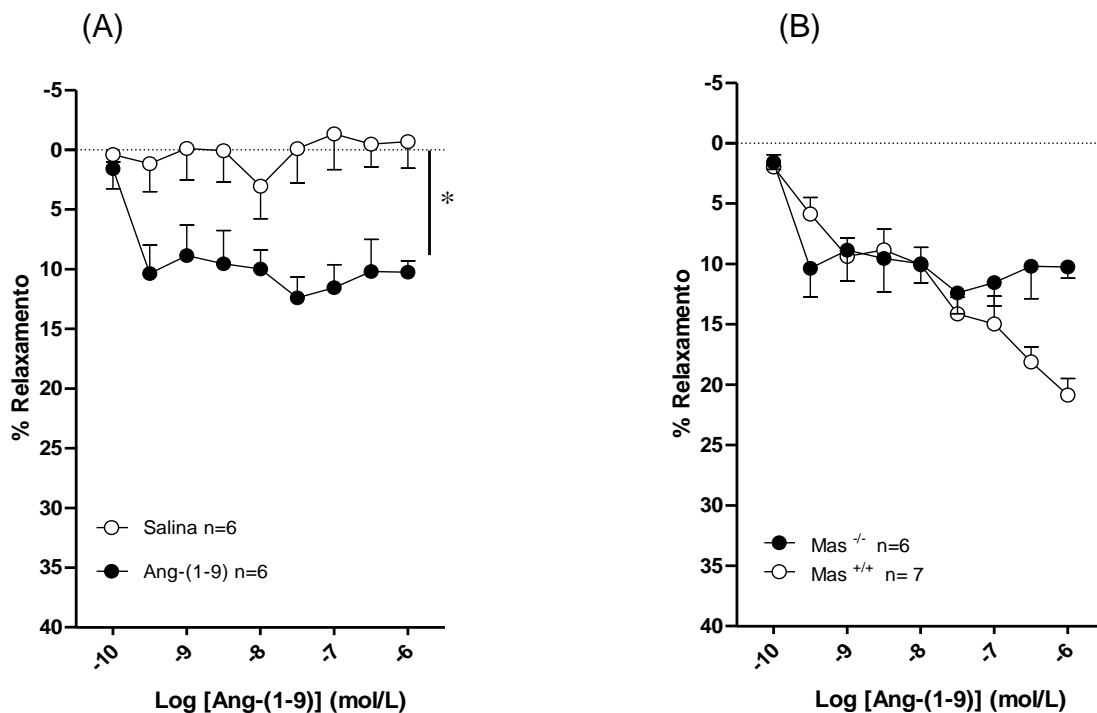


Figura 7: Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N *Knockout* pro receptor Mas (A). * $p < 0,05$ (T test). Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas *Knockout* (Mas^{-/-}) e FVB/N *wildtype* (Mas^{+/+}) pro receptor Mas. (B) (T test).

4.1.3 Avaliação do receptor AT_2 na Resposta Relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de camundongos FVB/N AT_2 *Knockout*.

A Figura 8 (A e B) mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (Phe)

Na Figura (A) é avaliado o efeito relaxante do peptídeo em anéis de aorta de camundongos FVB/N com deleção genética do receptor AT_2 .

Na Figura (B) comparamos a ação da Ang-(1-9) em camundongos com e sem a deleção genética do receptor AT_2 , sendo que não houve diferença entre os grupos. Sugerindo que a ação do peptídeo ocorre independente da presença do receptor AT_2 .

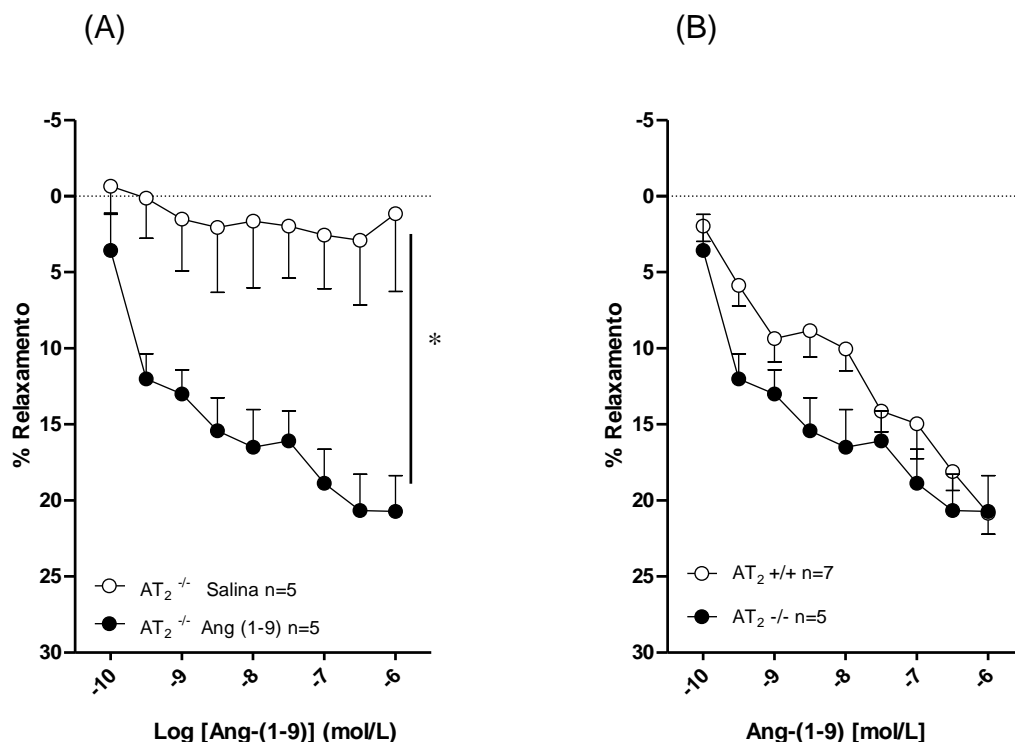


Figura 8: Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N *Knockout* pro receptor AT_2 (A). * $p < 0,05$ (T test). Efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de camundongos FVB/N Mas *Knockout* ($AT_2^{-/-}$) e FVB/N *wildtype* ($AT_2^{+/+}$) pro receptor Mas (B). (T test).

4.2. Efeitos do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de ratos Sprague-Dawley com e sem antagonismo farmacológico dos receptores Mas, AT₂ e Mrgd.

4.2.1 Ação do peptídeo Angiotensina – (1-9) em aorta isolada de ratos Sprague-Dawley.

A Figura 8 mostra o efeito relaxante concentração-dependente induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe). Demonstrando que a Ang-(1-9) apresenta efeito vasodilatador também em ratos.

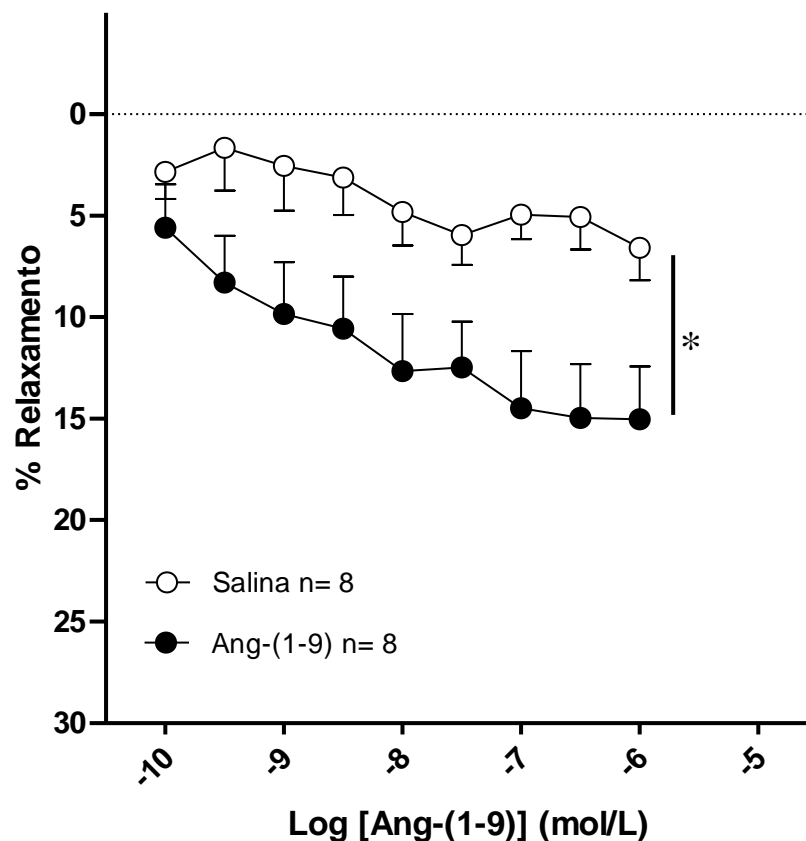


Figura 9: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley. *p<0,05 (T test).

4.2.2 Efeito do bloqueio do receptor Mas pelo antagonista A-779, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.

A Figura 10 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O bloqueio farmacológico com o antagonista do receptor Mas, A-779 (10 μ mol/L), não bloqueia o efeito vascular induzido pela Ang-(1-9).

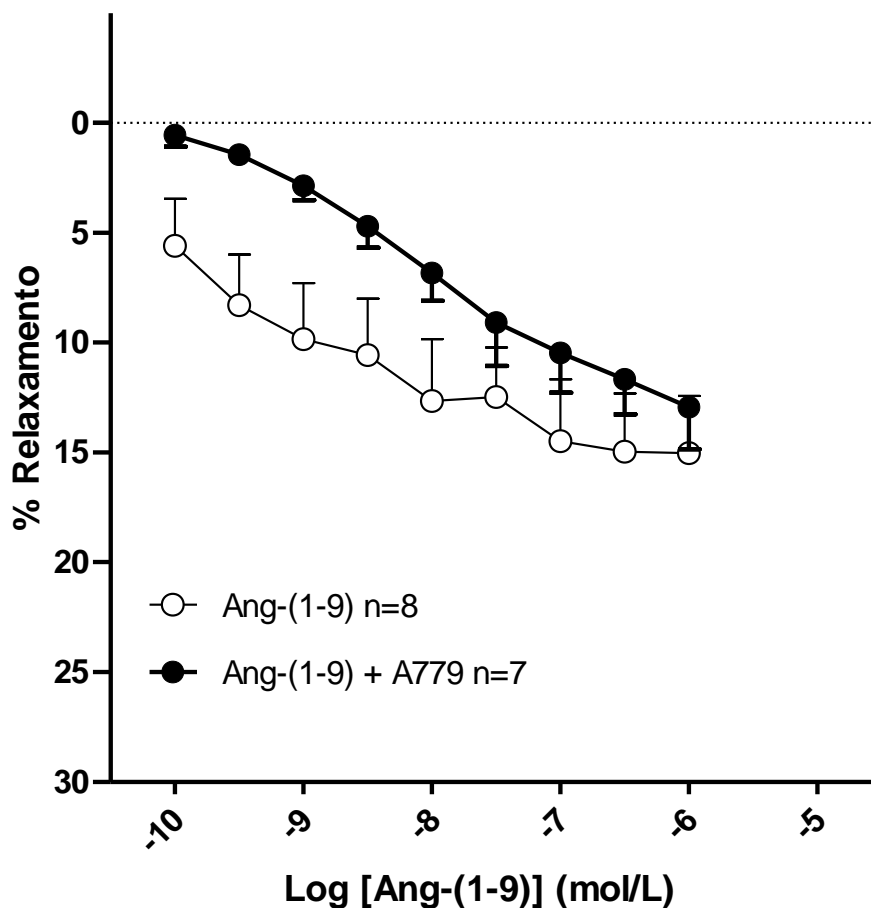


Figura 10: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de A-779 (10 μ mol/L).

4.2.3 Efeito do bloqueio do receptor Mas e MrgD pelo antagonista D-Pro7, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.

A Figura 11 mostra o efeito induzido pelo peptídeo Ang-(1-9) em anéis de aorta de ratos contendo endotélio funcional, pré-contraídos com Fenilefrina (phe).

O Bloqueio farmacológico com o antagonista dos receptores Mas e MrgD, o D-Pro7 (10 μ mol/L), não atenuou o efeito vascular induzido pela Ang-(1-9).

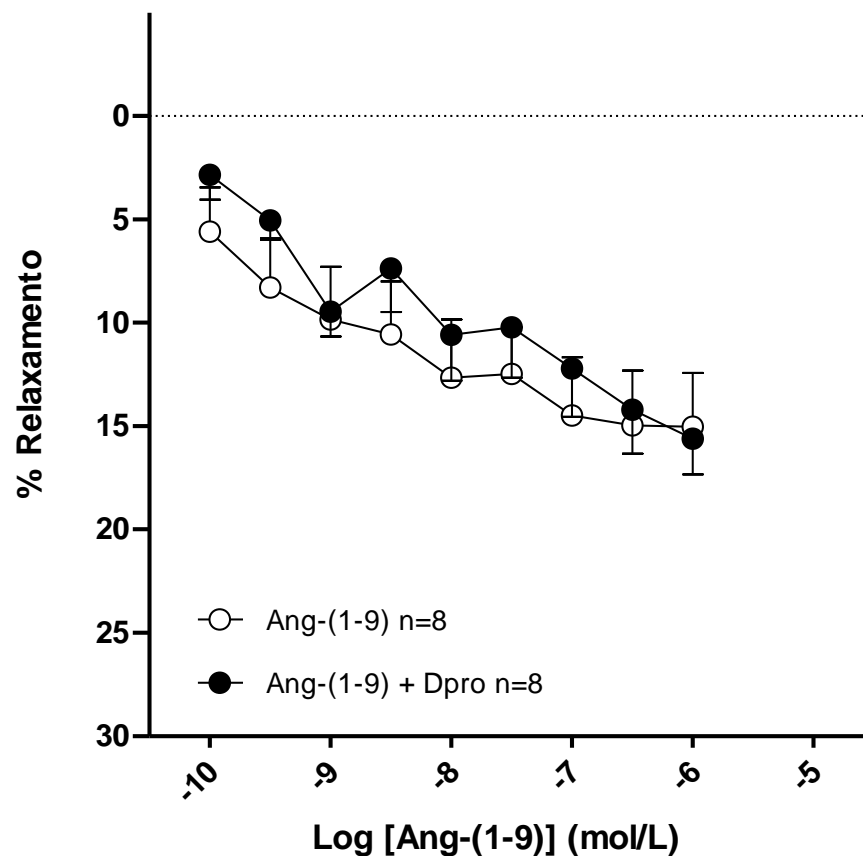


Figura 11: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de D-Pro7 (10 μ mol/L).

4.2.4 Efeito do bloqueio do receptor AT_2 pelo antagonista PD123319, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.

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

O bloqueio farmacológico com o antagonista do receptor AT_2 , PD123319 ($10\mu\text{mol/L}$), não atenuou o efeito vascular induzido pela Ang-(1-9).

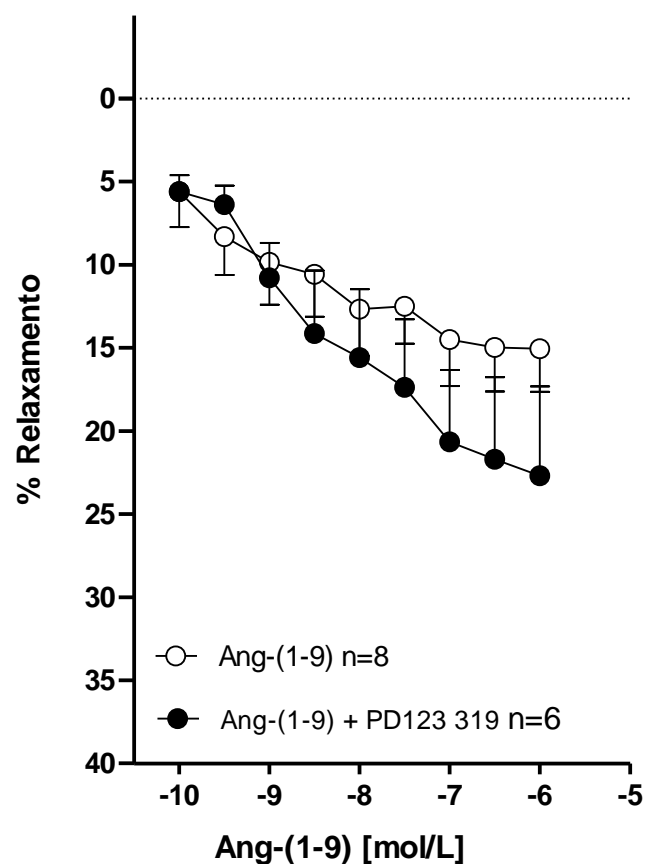


Figura 12: Efeito induzido pelo peptídeo Angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de PD123319 ($10\mu\text{mol/L}$).

4.2.5 Efeito do bloqueio dos receptores Mas, AT₂ e MrgD pelos antagonistas D-Pro7 e PD123139, sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo Ang-(1-9) em aorta de ratos Sprague-Dawley.

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

O Bloqueio farmacológico com os antagonistas dos receptores Mas, AT₂ e MrgD. Não bloqueia os efeitos vasculares induzidos pela Ang-(1-9).

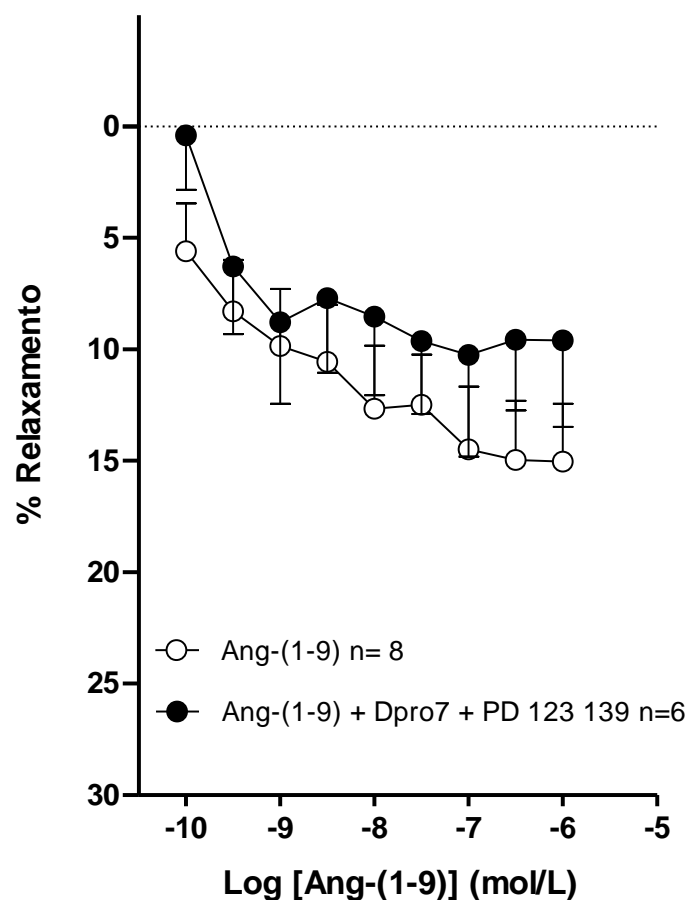


Figura 13: Efeito induzido pelo peptídeo angiotensina-(1-9) em anéis de aorta de ratos Sprague-Dawley na presença de A-779 e D-Pro7 (ambos 10 μ mol/L).

4.3 Análise da Liberação de Óxido Nítrico em células CHO transfectadas

Mensurações de NO foram realizadas através do método, 4-amino-5-metilamino-2, 7-diacetato de difluorofluorescein (DAF-FM). A Ang-(1-9) (0,01µmol) não estimulou a liberação de NO em células CHO que expressam estavelmente o receptor MrgD quando comparado com o controle positivo, no qual as células foram incubadas com veículo, enquanto que o controle positivo via Alamandina como esperado apresentou liberação de NO. A Ang-(1-9) não estimulou a liberação de NO em células CHO que expressam estavelmente o receptor AT₂, quando comparado ao grupo controle, no qual as células foram incubadas com veículo, já o controle positivo assim como esperado apresentou liberação de NO via composto 21 (C21). Em celular CHO transfectadas com receptor Mas também não foi observado liberação de NO via Ang-(1-9) quando comprado com seu controle positivo, a Ang-(1-7).

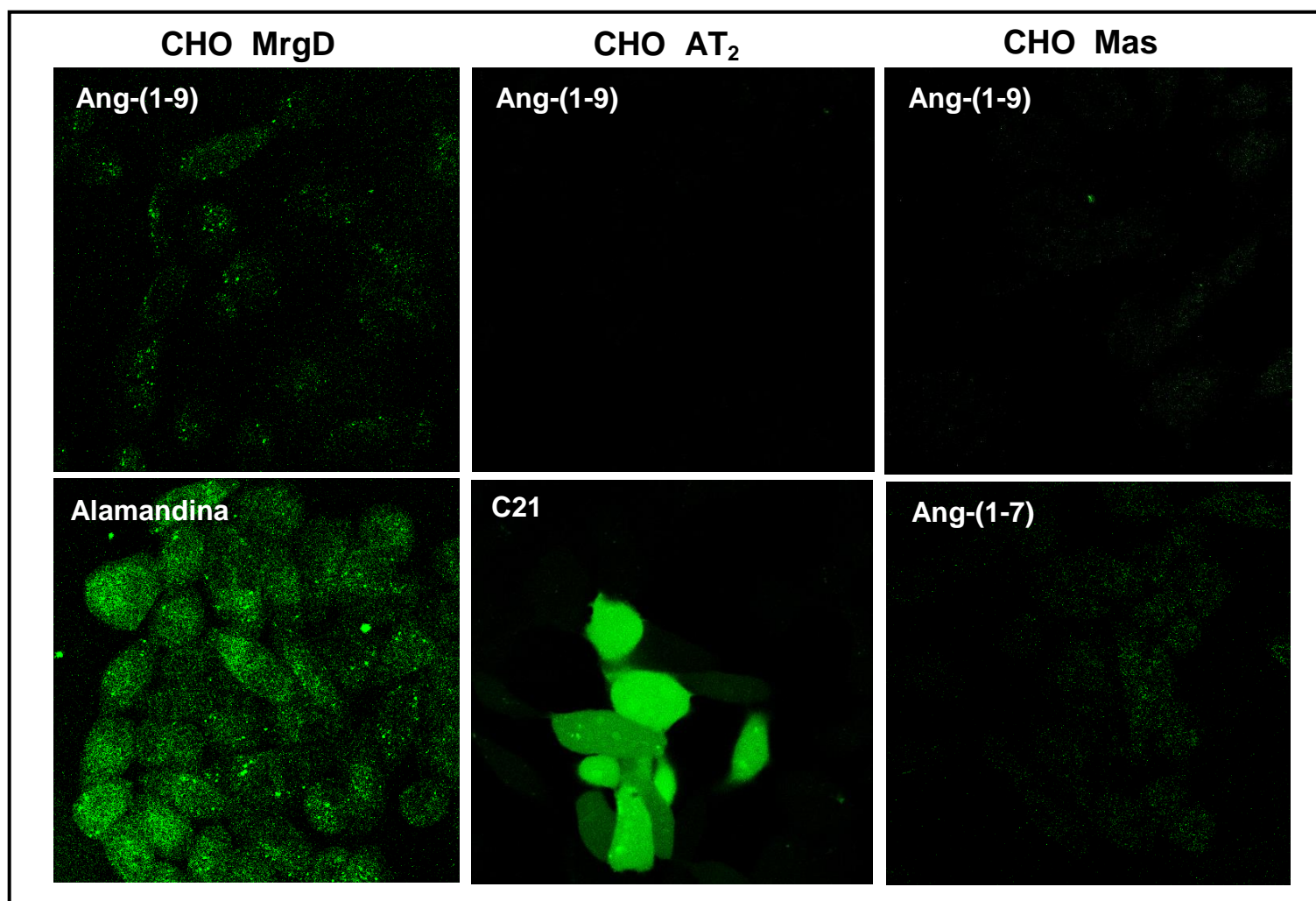


Figura 14: Representação da fluorescência relativa em microscopia com focal usando DAF-FM em células CHO-MrgD incubadas com Ang-(1-9) (0,01 μ mol) ou Alamandina (0,01 μ mol). Células CHO-AT₂ incubadas com Ang-(1-9) (0,01 μ mol) ou C21 (0,01 μ mol). Células CHO-Mas incubadas com Ang-(1-9) (0,01 μ mol) ou Ang-(1-7)(0,01 μ mol).

4.4 Efeito da administração de doses crescentes do peptídeo angiotensina-(1-9) via artéria aorta descendente, sobre os níveis pressóricos de ratos espontaneamente hipertensos após 20 min de cada dose.

A injeção em bolos de angiotensina-(1-9) em ratos espontaneamente hipertensos conscientes não produziu efeitos significativos da pressão arterial média (PAM).

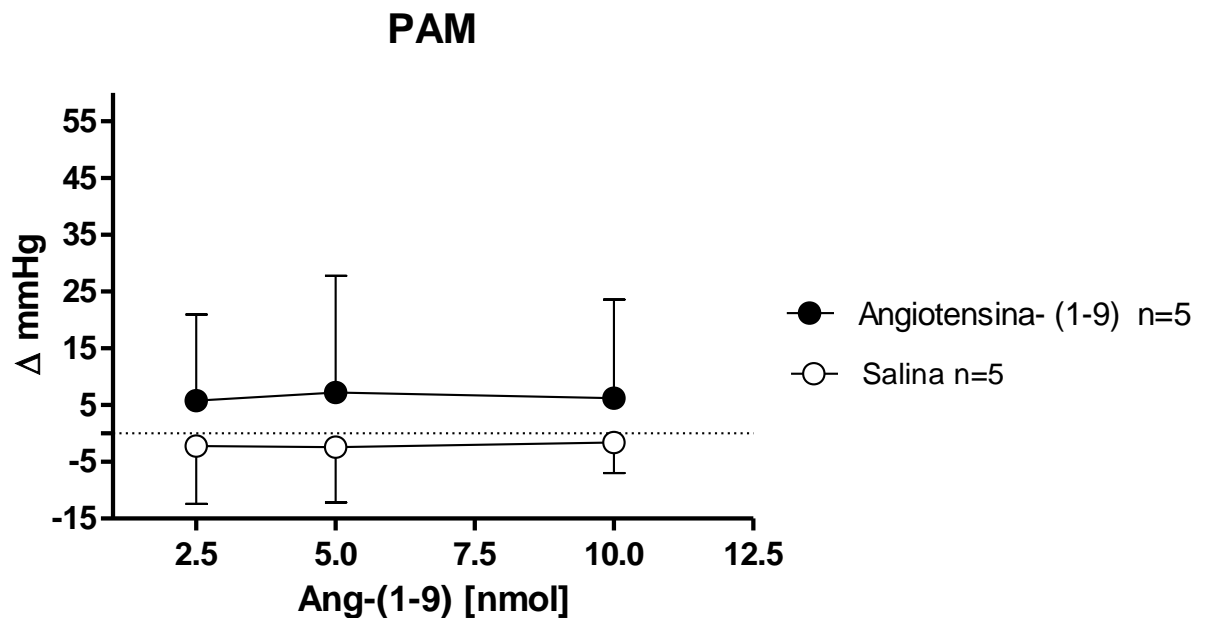


Figura 15: Média da variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 20min da injeção em bolos de doses crescentes angiotensina-(1-9) ou salina.

4.5 Efeito da administração do peptídeo angiotensina-(1-9) e angiotensina-(1-7) via veia femoral, sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos após 6 hrs.

A injeção em bolos de angiotensina-(1-9) ou angiotensina-(1-7) em ratos espontaneamente hipertensos conscientes produziu uma diminuição significativa da pressão arterial média (PAM) Fig 16. Em relação à frequência cardíaca, os grupos que foram tratados com peptídeo apresentaram redução da variação da FC. Fig 17

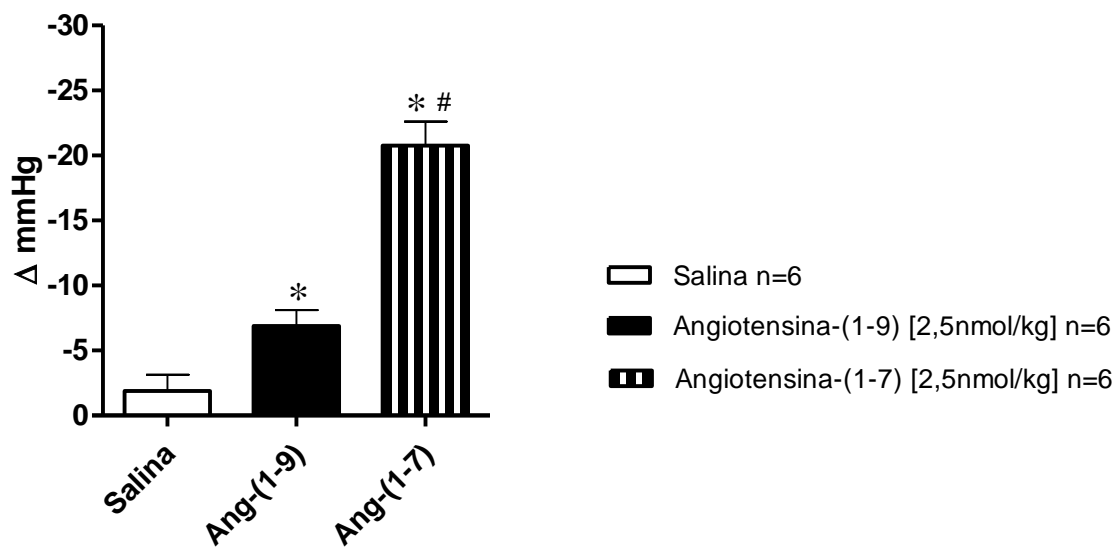


Figura 16: Variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 6 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7) ou salina. * $p < 0,05$ vs Salina; # $p < 0,05$ vs SHR-SP+ Ang-(1-9) (One-way ANOVA).

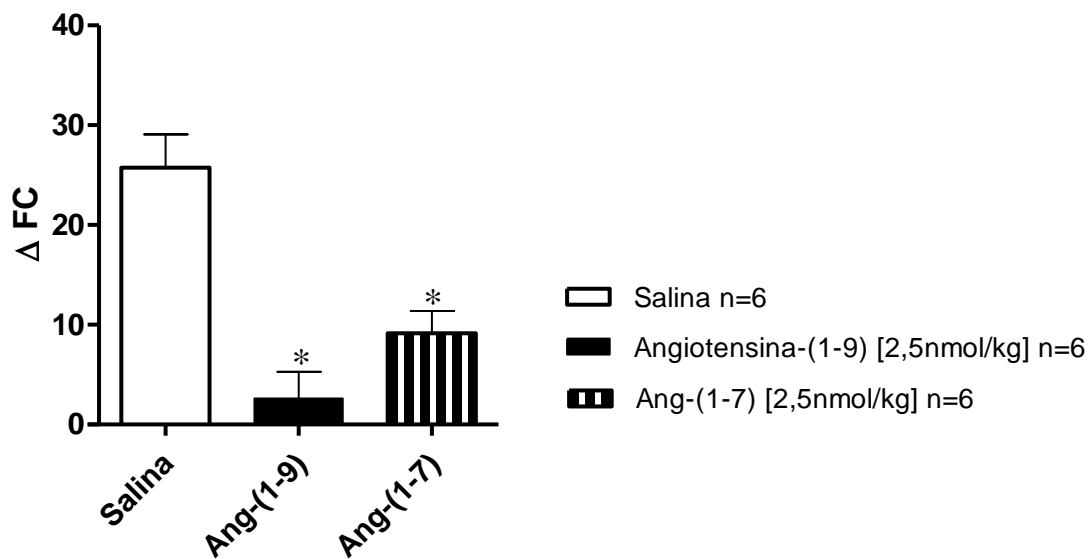


Figura 17: Média da variação da FC (bpm) de ratos SHR-SP conscientes após 6 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7) ou salina. * $p < 0,05$ vs Salina (One-way ANOVA).

4.6 Efeito da administração de angiotensina-(1-9) e angiotensina-(1-7) sobre os níveis pressóricos e frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos 3 hrs após a injeção *in bolos*.

A injeção em bolos de angiotensina-(1-9) ou angiotensina-(1-7) em ratos espontaneamente hipertensos conscientes produziu uma diminuição significativa da pressão arterial média (PAM) (Fig 18). Em relação à frequência cardíaca, os grupos que foram tratados com peptídeo apresentaram redução da variação da FC (Fig 19).

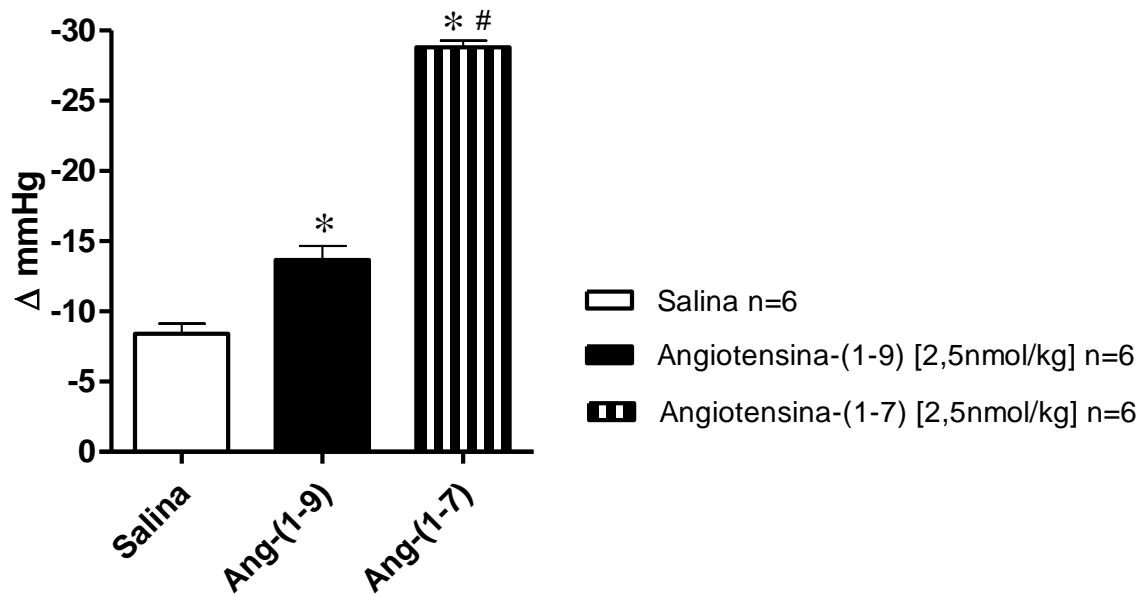


Figura 18: Média da variação da PAM de ratos SHR-SP conscientes após 3 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7) ou salina. * $p < 0,05$ vs Salina; # $p < 0,05$ vs Ang-(1-9) (One-way ANOVA).

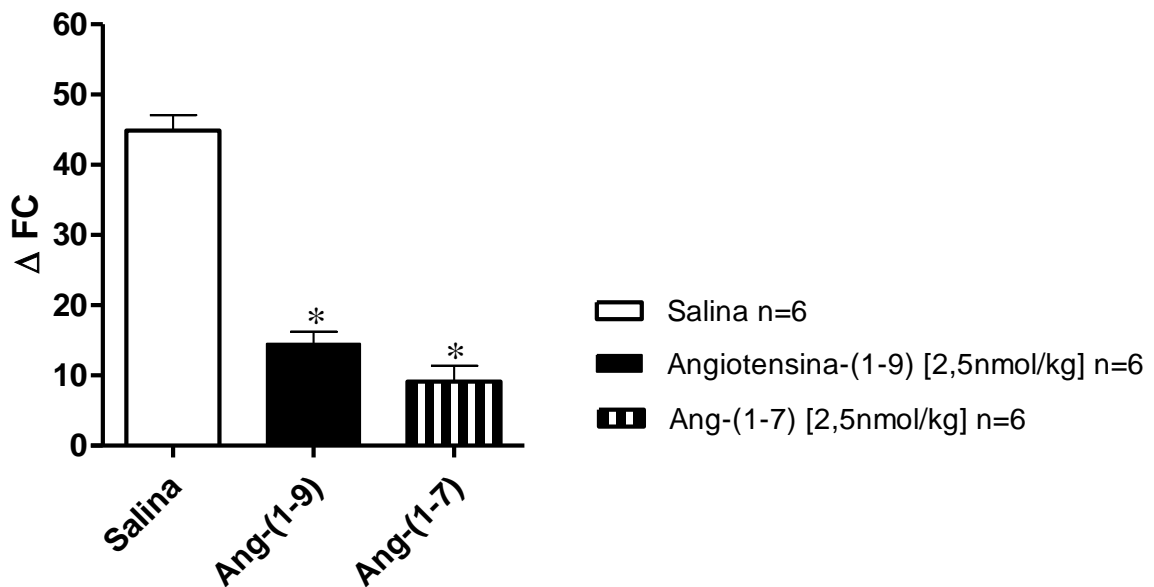


Figura 19. Média da variação da FC de ratos SHR-SP conscientes após 3 horas da injeção em bolos de angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-7) ou salina. * $p < 0,05$ vs Salina (One-way ANOVA).

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos ações cardiovasculares da angiotensina-(1-9), um peptídeo biologicamente ativo do SRA, formado a partir do decapeptídeo Ang I, através de peptidases, incluindo a carboxipeptidase A (CxA), catepsina A (CpA) e ECA2, (Ocaranza *et al.*, 2014a). Esse peptídeo possui nove resíduos de aminoácidos e tem como importante característica sua atividade vasodilatadora e anti-hipertrófica. (Ocaranza *et al.*, 2014a). Diferentemente do que vem sendo mostrado na literatura, os resultados deste estudo sugerem que parte dos efeitos cardiovasculares induzidos pela Ang-(1-9) são independentes dos receptores angiotensinérgicos AT₂, Mas e MrgD.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão do mecanismo de ação da angiotensina-(1-9). Por outro lado, nosso estudo é contrário a alguns trabalhos que atribuem suas ações exclusivamente via receptor AT₂. (Flores-Muñoz *et al.*, 2011, 2012; Ocaranza and Jalil, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b).

Recentemente nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho na Circulation Research mostrando que o PD123319, extensamente utilizado como antagonista seletivo do receptor AT₂, não é totalmente seletivo para esse receptor, podendo, por exemplo, interagir com o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Esses resultados nos levaram a investigar a participação de outros receptores na modulação dos efeitos biológicos induzidos pela Ang-(1-9). Sendo assim, foi investigada a participação dos receptores angiotensinérgicos Mas e MrgD que, similarmente ao receptor AT₂, quando ativados apresentam efeitos benéficos no sistema cardiovascular, como vasodilatação, efeitos anti-hipertróficos, anti-fibróticos, e anti-arritmogênicos, sendo portanto possíveis

candidatos a receptor da Ang-(1-9) (Carey *et al.*, 2001; Ferreira and Santos, 2005; Lautner *et al.*, 2013).

Em 2012, Flores-Muñoz *et al.*, através de experimentos utilizando a técnica de reatividade vascular em anéis de aorta de ratos SHR-SP, demonstrou o efeito da Ang-(1-9) sobre a biodisponibilidade de NO. Foram realizadas curvas cumulativas concentração resposta com fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) e, interessante, o grupo de animais previamente tratados com Ang-(1-9) apresentou uma atenuação da vasoconstricção. (Flores-Munoz *et al.*, 2012). Mais recentemente, Ocaranza *et al.* (2014), observaram uma resposta vasodilatadora em outro experimento de reatividade vascular, através de curvas cumulativas concentração resposta com Ang-(1-9), em anéis de ratos SD pré contraídos com epinefrina (Ocaranza *et al.*, 2014b).

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

A vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) é endotélio dependente. No protocolo experimental em que os anéis de aorta foram previamente tratados com o L-NAME ou tiveram seu endotélio mecanicamente removido, a Ang-(1-9) teve seu efeito abolido, sugerindo importante participação do NO como resposta ao estímulo do peptídeo (Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b).

Com o intuito de verificar a participação do receptor Mas no relaxamento vascular induzido pela Ang-(1-9), realizamos o antagonismo farmacológico desse receptor utilizando o D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A-779) (Santos *et al.*, 1994).

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

Em seguida, foi testado o protocolo experimental com D-Pro⁷-Ang-(1-7), antagonista dos receptores Mas e MrgD (Lautner *et al.*, 2013). De forma interessante, não foi observada nenhuma alteração no efeito da Ang-(1-9), diferente do que foi observado com a atenuação da vasodilatação induzida pelo antagonismo específico do receptor Mas.

De forma surpreendente, ao avaliar a participação do receptor AT₂ na vasodilatação induzida pela Ang-(1-9) utilizando o PD123319 que é comumente utilizado como antagonista seletivo desse receptor (Flores-Muñoz *et al.*, 2011; McKinney *et al.*, 2014; Ocaranza *et al.*, 2014b) foi observado que esse composto não foi capaz de bloquear o efeito vasodilatador da Ang-(1-9). Sendo assim, esse resultado reforça o trabalho anterior do nosso grupo, sugerindo que o PD123319 não é antagonista seletivo para o receptor AT₂ (Lautner *et al.*, 2013). Porém, é contrário a outros dois trabalhos, nos quais o PD123319 reverteu a resposta induzida pela Ang-(1-9) em experimento de reatividade vascular (Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b).

Com o intuito de confirmar os resultados anteriores foi realizado um protocolo experimental para avaliar a participação dos receptores AT₂, Mas e MrgD nos efeitos da Ang-(1-9), e surpreendentemente, considerando os dados

existentes na literatura atual, observamos que a associação dos antagonistas D-Pro⁷-Ang-(1-7) e PD123319 resultou em modesta atenuação da vasodilatação em anéis de aorta de ratos (Fig. 13).

Com objetivo de ratificar os resultados anteriores de antagonismo farmacológico, foram realizados experimentos utilizando animais geneticamente modificados, com deleção genética de receptores angiotensinérgicos. Interessantemente, o efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-9) foi significativamente reduzido nos anéis de aorta provenientes dos animais com deleção genética do receptor Mas, sugerindo mais uma vez a possível participação do receptor Mas nos efeitos vasculares induzidos pela Ang-(1-9) (Fig. 7b). Em contrapartida, em anéis de aorta de animais com deleção genética do receptor AT₂ não houve inibição do efeito da Ang-(1-9), o que confirmou nossos dados com PD123319 e nos leva a sugerir que o receptor AT₂ não participa da vasodilatação promovida pela Ang-(1-9) (Fig. 8). Esta observação foi, de forma mais direta, reiterada no ensaio em células CHO que expressam por transfecção estável o receptor AT₂. Observamos através de microscopia confocal, que não houve liberação de NO, após o tratamento com Ang-(1-9) (Fig. 14). O mesmo ocorreu em células que expressam o MrgD e também em células que expressam o receptor Mas, ambas de forma estável. Esses achados corroboram as observações feitas nos ensaios de reatividade vascular.

Existem poucos dados na literatura acerca dos possíveis efeitos anti-hipertensivos do peptídeo Ang-(1-9) (Flores-Munoz *et al.*, 2012; Ocaranza *et al.*, 2014b). Na verdade apenas dois estudos avaliaram o efeito desse peptídeo na pressão arterial de animais hipertensos, sendo que o primeiro não detectou

efeitos importantes na PA de ratos SHR-SP (Flores-Munoz *et al.*, 2012). Já Ocaranza *et al.* (2014) utilizando os modelos de hipertensão renovascular e o induzido por Ang II, em ratos SD, obteve resultados significativos do controle da PA utilizando Ang-(1-9). Nesse mesmo estudo, os autores descreveram que o efeito anti-hipertensivo foi abolido em animais tratados com PD123319 em ambos os modelos experimentais. Em contrapartida, no grupo dos animais tratados com Ang-(1-9) associado ao A-779 não foram observadas diferenças significativas quando comparado com o grupo tratado apenas com Ang-(1-9). É importante ressaltar que estes dados foram obtidos por meio de pletismografia de cauda, uma metodologia não invasiva de medida indireta da PA (Ocaranza *et al.*, 2014b).

Considerando que a Ang-(1-9) apresenta efeito vasodilatador tanto em ratos, como em camundongos em estudo *ex-vivo*, decidimos reavaliar sua ação vasodilatadora e anti-hipertensiva em ratos. Para isso, primeiramente testamos o efeito vasodilatador agudo do peptídeo. Foram feitas injeções com doses crescentes *in bolus* de Ang-(1-9) via artéria aorta descendente em ratos SHR-SP, sendo que para cada dose os efeitos foram avaliados por 20 min. Os resultados mostraram que não houve efeitos pressóricos significativos. Porém, em outro experimento com o mesmo modelo animal, injetamos via veia femoral *in bolus* Ang-(1-9) (2,5 nmol/kg) e avaliamos os parâmetros cardiovasculares por 6 horas. Observamos que houve diminuição significativa da pressão arterial média, sendo que os efeitos hemodinâmicos do peptídeo sobre a PAM iniciam-se após 3 horas e permaneceram até o final do registro. Não observamos diferenças significativas na frequência cardíaca dos animais após a injeção de Ang-(1-9) quando comparado com veículo. O mesmo também foi observado

com nosso controle positivo, Ang-(1-7), sendo que este já possui importantes evidências mostrando seus efeitos anti-hipertensivos (Guimaraes *et al.*, 2012; Iyer *et al.*, 2000; Santos, 2014).

Em outro experimento, ainda em andamento em nosso laboratório, estamos avaliando o efeito da Ang-(1-9) em camundongos FVB/N-WT, no qual induzimos a hipertensão pela infusão crônica subcutânea de Ang II durante 28 dias, sendo que no 14º dia a partir do início da infusão de Ang II, implantamos em um grupo bombas osmóticas com Ang-(1-9). Nossos resultados preliminares vão de encontro com os obtidos em experimento descrito anteriormente, sugerindo ação anti-hipertensiva da Ang-(1-9) ministrada de forma crônica.

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

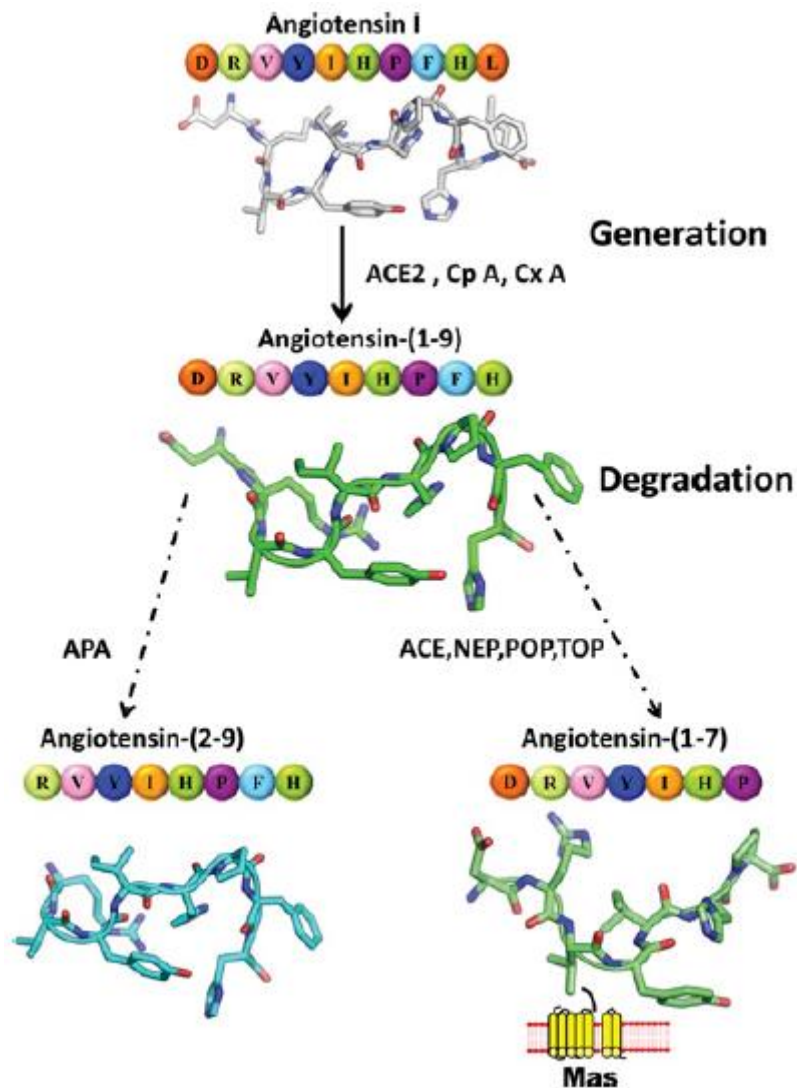


Fig 2: Cascata simplificada de formação da Ang- (1-9). Cascata simplificada de formação da Ang- (1-9). A seta contínua indica a formação da Ang- (1-9) a partir da Ang I via CxA, CPA ou através da atividade ECA2. A seta tracejada indica degradação, conversão de Ang- (1 9) em Ang- (2-9) pela APA ou em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

Sumarizando, os resultados obtidos neste estudo confirmam, reforçam e estendem as evidências de ação da Ang-(1-9) no sistema cardiovascular. Porém, diferente do que vem sendo descrito na literatura, mostramos através de métodos *ex vivo* e *in vitro* que esse peptídeo não induz seus efeitos biológicos por interagir com o receptor AT_2 . Além disso, também por meio desses experimentos excluímos sua ação via os outros dois receptores com

mecanismo de ação cardiovascular similar, Mas e MrgD. Sendo assim podemos sugerir que a Ang-(1-9) realiza suas ações através de outro receptor, ainda não identificado, que em algumas situações pode ser sensível ao bloqueio pelo PD12319.

VI. REFERÊNCIAS

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

- Esler, M. (2000). The sympathetic system and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 13, 99S–105S.
- Ferrario, C.M. (1990). Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. *Drugs* 39 Suppl 2, 1–8.
- Ferreira, A.J., and Santos, R.A.S. (2005). Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 38, 499–507.
- Flores-Munoz, M., Work, L.M., Douglas, K., Denby, L., Dominiczak, A.F., Graham, D., and Nicklin, S.A. (2012). Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension* 59, 300–307.
- Flores-Muñoz, M., Smith, N.J., Haggerty, C., Milligan, G., and Nicklin, S.A. (2011). Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J. Physiol.* 589, 939–951.
- Flores-Muñoz, M., Godinho, B.M.D.C., Almalik, A., and Nicklin, S.A. (2012). Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor. *PLoS One* 7, e45564.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., and Summerville, W.W. (1934). STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *J. Exp. Med.* 59, 347–379.
- Guimaraes, P.S., Santiago, N.M., Xavier, C.H., Velloso, E.P.P., Fontes, M.A.P., Santos, R.A.S., and Campagnole-Santos, M.J. (2012). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H393–400.
- Hein, L. (1998). Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 76, 756–763.
- Iyer, S.N., Averill, D.B., Chappell, M.C., Yamada, K., Allred, A.J., and Ferrario, C.M. (2000). Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. *Hypertension* 36, 417–422.
- Johnson, H., Kourtis, S., Waters, J., and Drummer, O.H. (1989). Radioimmunoassay for immunoreactive [des-Leu¹⁰]-angiotensin I. *Peptides* 10, 489–492.

- Keidar, S., Kaplan, M., and Gamliel-Lazarovich, A. (2007). ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7). *Cardiovasc. Res.* *73*, 463–469.
- Kim, S., and Iwao, H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* *52*, 11–34.
- Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., et al. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* *112*, 1104–1111.
- LENTZ, K.E., SKEGGS, L.T., Jr, WOODS, K.R., KAHN, J.R., and SHUMWAY, N.P. (1956). The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. *J. Exp. Med.* *104*, 183–191.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., et al. (2010). Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* *121*, 948–954.
- Matrougui, K., Loufrani, L., Heymes, C., Lévy, B.I., and Henrion, D. (1999). Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension* *34*, 659–665.
- McKinney, C.A., Fattah, C., Loughrey, C.M., Milligan, G., and Nicklin, S.A. (2014). Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *126*, 815–827.
- Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., Berberich, C., Bunnemann, B., and Ganten, D. (1995). Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* *357*, 27–32.
- Ocaranza, M.P., and Jalil, J.E. (2012). Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int. J. Hypertens.* *2012*, 594361.
- Ocaranza, M.P., Michea, L., Chiong, M., Lagos, C.F., Lavandero, S., and Jalil, J.E. (2014a). Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1-9) in the cardiovascular system. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *127*, 549–557.
- Ocaranza, M.P., Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., Pinto, M., Escudero, N., García, L., Novoa, U., et al. (2014b). Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J. Hypertens.* *32*, 771–783.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Snyder, R.A., and Wintroub, B.U. (1986). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu10-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 871, 1–5.
- Snyder, R.A., Watt, K.W., and Wintroub, B.U. (1985). A human platelet angiotensin I-processing system. Identification of components and inhibition of angiotensin-converting enzyme by product. *J. Biol. Chem.* 260, 7857–7860.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., et al. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.* 104, 925–935.
- Turner, A.J., Tipnis, S.R., Guy, J.L., Rice, G., and Hooper, N.M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallo-carboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 346–353.
- Veerasingham, S.J., and Raizada, M.K. (2003). Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br. J. Pharmacol.* 139, 191–202.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843.
- Walther, T., Wessel, N., Kang, N., Sander, A., Tschöpe, C., Malberg, H., Bader, M., and Voss, A. (2000). Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 33, 1–9.
- Ye, M., Wysocki, J., Naaz, P., Salabat, M.R., LaPointe, M.S., and Batlle, D. (2004). Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension* 43, 1120–1125.