

Marilda Luz de Andrade De Maria

**Avaliação dos Efeitos do Ativador da Enzima
Conversora de Angiotensina 2 (DIZE) na Pressão
Arterial de ratos**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Julho – 2011

Marilda Luz de Andrade De Maria

**Avaliação dos Efeitos do Ativador da Enzima
Conversora de Angiotensina 2 (DIZE) na Pressão
Arterial de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Julho - 2011

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG;
- Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG.

A execução deste trabalho contou com o auxílio financeiro das seguintes Agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

À Deus, que esteve ao meu lado todos os dias dessa jornada e aos meus pais, que com muito amor e compreensão, sempre me apoiaram ao longo dessa caminhada.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguimos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai-Lama

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele esta vitória não seria possível. Obrigada por me dar força nas horas difíceis, é como se diz: “É dele a vitória alcançada em minha vida”;

Aos meus pais, pelo carinho, amor, apoio e dedicação presente em todos os dias de minha vida. Obrigada pela compreensão, força e, principalmente, por acreditar em mim. Essa conquista também é de vocês. Amo vocês!;

Aos meus irmãos pelo incentivo e ajuda nos momentos difíceis. Cada um de uma maneira diferente me ajudou nesta vitória. Sempre soube que podia contar com vocês e hoje tenho certeza;

Aos meus sobrinhos pelas horas de diversão, brincadeiras e pelo carinho sincero;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por ter aceitado me orientar. Agradeço o convívio, a amizade, a disponibilidade e pela orientação sempre com muita sabedoria;

A Micena, pelos ensinamentos, amizade, conselhos e, principalmente, por me mostrar que sou capaz de alcançar meu sonho;

As minhas amigas Natália, Cecília, Priscila, Marina e Gabi, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim;

A todos os colegas do laboratório que me ajudaram muito, em especial ao Marcos, a Pat, a Ju e a Tati;

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial, aos colegas da turma 2010 da disciplina de Biologia Celular;

A Sylvia e ao Professor Gustavo Menezes por me ajudar com o Intravital;

A Sibeles Abreu, pelo carinho e atenção;

Ao CEBIO pela liberação de animais;

A CAPES, FAPEMIG E CNPq pelo apoio financeiro nesta pesquisa.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
I. INTRODUÇÃO	1
1. Sistema Renina-Angiotensina	1
2. O Eixo Enzima conversora de Angiotensina 2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas	5
3. Ativação da ECA2 endógena	8
II. JUSTIFICATIVA	11
III. OBJETIVOS	12
1. Objetivo Geral	12
2. Objetivos Específicos	12
IV. METODOLOGIA	13
1. Animais.....	13
2. Ensaio Enzimático.....	13
3. Procedimentos Cirúrgicos	14
4. Registro de Parâmetros Cardiovasculares.....	14
5. Microscopia Intravital.....	15
6. Protocolos Experimentais.....	17
7. Análise Estatística	19
V. RESULTADOS	20
1. Ativação <i>in vitro</i> da ECA2 pelo DIZE	20
2. Efeitos do DIZE na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca.....	21
3. Avaliação dos Mecanismos de ação do DIZE	24
4. Microscopia Intravital.....	31
VI. DISCUSSÃO	34
VII. CONCLUSÃO	37
VIII. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Aminopeptidases
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina II
Ang IV	Angiotensina IV
Ang-(1-5)	Angiotensina-(1-5)
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
AT ₁	Receptor tipo 1 de Angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo 2 de Angiotensina II
D-AMP	Dipeptidil - Aminopeptidase
DIZE	Aceturato de Diminazeno
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
FC	Freqüência Cardíaca
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl Ester
NEP	Endopeptidase Neutra
NO	Óxido Nítrico
NPS	Nitroprussiato de Sódio
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PGs	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PEP	Prolil-endopeptidase
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos

SRA	Sistema Renina-Angiotensina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XNT	1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil)sulfonyl]oxi]-9H-xantona-9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da formação da Ang II e seus efeitos em diferentes órgãos.....	3
Figura 2: Representação esquemática do SRA.	5
Figura 3: Estrutura química da Ang-(1-7)	6
Figura 4: Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) no sistema cardiovascular.....	8
Figura 5: Representação esquemática dos efeitos dos ativadores endógenos de ECA2 no SRA.....	10
Figura 6: Cânula utilizada em procedimento cirúrgico.....	14
Figura 7: Representação esquemática do BIOPAC	15
Figura 8: Equipamento para Microscopia Intravital	16
Figura 9: Esquema do protocolo experimental utilizando diferentes concentrações do DIZE.....	17
Figura 10: Esquema do protocolo experimental utilizando múltiplas doses do DIZE.	17
Figura 11: Esquema do protocolo experimental para avaliar os mecanismos de ação do DIZE.	18
Figura 12: Esquema do protocolo experimental utilizado na Microscopia Intravital para avaliar os efeitos do DIZE.....	19
Figura 13: Esquema do protocolo experimental utilizado na Microscopia Intravital para avaliar o papel do No nos efeitos do DIZE.	19
Figura 14: Atividade <i>in vitro</i> de ECA2 pelo DIZE.....	20
Figura 15: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações, na PAM de ratos acordados.....	21
Figura 16: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações, na FC de ratos acordados.....	21
Figura 17: Tempo de pico da resposta do DIZE quando administrado em diferentes concentrações	22
Figura 18: Efeitos do DIZE na PAM em duas injeções consecutivas	23
Figura 19: Efeitos do DIZE na FC em duas injeções consecutivas	23

Figura 20: Tempo total de resposta do DIZE quando administrado em duas injeções consecutivas	23
Figura 21: Papel do Mas no efeito do DIZE na PAM.....	24
Figura 22: Papel do Mas no efeito do DIZE na FC.....	24
Figura 23: Papel do Mas no efeito do DIZE no tempo total de resposta	25
Figura 24: Papel do NO no efeito do DIZE na PAM	25
Figura 25: Papel do NO no efeito do DIZE na FC	26
Figura 26: Papel do NO no efeito do DIZE no tempo total de resposta.....	26
Figura 27: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE na PAM.....	27
Figura 28: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE na FC.....	27
Figura 29: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE no tempo total de resposta	28
Figura 30: Papel da ECA no efeito do DIZE na PAM	28
Figura 31: Papel da ECA no efeito do DIZE na FC	29
Figura 32: Papel da ECA no efeito do DIZE no tempo total de resposta.....	29
Figura 33: Papel do AT ₁ no efeito do DIZE na PAM.....	30
Figura 34: Papel do AT ₁ no efeito do DIZE na FC.....	30
Figura 35: Papel do AT ₁ no efeito do DIZE no tempo total de resposta	31
Figura 36: Fluxo mesentérico arteriolar após injeção de salina, NPS e DIZE ..	31
Figura 37: Diâmetro de arteríolas do leito mesentérico após injeção de salina, NPS e DIZE.....	32
Figura 38: Fluxo mesentérico arteriolar após injeções de DIZE antes e após o tratamento com L-NAME	32
Figura 39: Diâmetro de arteríolas do leito mesentérico após injeções de DIZE antes e após o tratamento com L-NAME	33

RESUMO

Tradicionalmente, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é considerado um sistema endócrino formado por reações enzimáticas que exerce um papel importante no controle da função cardiovascular. Novos componentes como, por exemplo, a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], vêm sendo descobertos e adicionados a este sistema. A enzima conversora de Angiotensina (ECA) 2 é a principal enzima formadora de Ang-(1-7) e é importante na manutenção do equilíbrio do SRA. Estudos prévios demonstraram que a ativação da ECA2 endógena, usando o composto XNT, resulta em vários efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Recentemente, foi descrito um segundo ativador da ECA2, o aceturato de diminazeno (DIZE), que possui propriedades físico-químicas mais favoráveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do DIZE na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) de ratos, além de analisar os mecanismos de ação deste composto nas alterações destes parâmetros. Também foram analisados os efeitos do DIZE nas arteríolas no leito vascular mesentérico através da técnica de Microscopia Intravital. Ratos Wistar machos (200-300g) foram submetidos a cirurgias de implantação de cânulas na artéria femoral para o registro da PA e FC e na veia femoral para injeção de doses crescentes do DIZE (0,5; 5, 10, 20 mg/kg) e de inibidores e bloqueadores do SRA. Este experimento foi realizado em ratos acordados e 24h após as cirurgias. Os resultados mostraram que o DIZE causa uma redução na PA com conseqüente aumento na FC de maneira dose-dependente. Para avaliar seus mecanismos de ação, grupos adicionais de ratos foram pré-tratados com o bloqueador do receptor Mas A-779 (10nmol/kg i.v.), com o inibidor da síntese de óxido nítrico (NO) L-NAME (10mg/kg i.v.), com o inibidor da síntese de prostaglandinas Indometacina (10mg/kg i.v.), com o inibidor da ECA Captopril (10mg/kg i.v.) ou com o bloqueador do receptor AT₁ Losartan (1mg/kg i.v.) 15 minutos antes da administração do DIZE (5mg/kg). Os resultados obtidos mostraram que a utilização do A-779, L-NAME, Indometacina, Captopril e Losartan antes da injeção do DIZE não bloqueou a queda na PA e o aumento na FC. Finalmente, os resultados da Microscopia Intravital revelaram que o DIZE causa uma queda no fluxo nas arteríolas no leito vascular mesentérico sem alteração significativa no diâmetro arteriolar.

Assim, os resultados desse estudo indicam que o DIZE é um potente hipotensor e que este efeito é independente dos receptores Mas e AT₁, da ECA, da liberação de NO e da síntese de prostaglandinas.

Palavras chave: Angiotensina-(1-7); Enzima conversora de Angiotensina 2; Receptor Mas; Sistema Renina-Angiotensina; Aceturato de Diminazeno; Pressão arterial.

ABSTRACT

Traditionally, the Renin-Angiotensin System (RAS) is considered an endocrine system formed by enzymatic pathways and it plays an important role in the cardiovascular function. Nowadays, new components such as the heptapeptide angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] have been added to this system. Angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 is the main Ang-(1-7)-forming enzyme and it is important to maintain the balance of the RAS. Previous studies have shown that the activation of endogenous ACE2 using the compound XNT results in several beneficial effects in the cardiovascular system. Recently, a second ACE2 activator was described, the diminazene aceturate (DIZE), which has better physical and chemical properties. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of DIZE on blood pressure (BP) and heart rate (HR) of rats and to analyze the mechanisms of action by which this compound changes these parameters. Also, we analyzed the effects of DIZE on arterioles from the mesenteric vascular bed using the Intravital Microscopy technique. Male Wistar rats (200-300g) underwent surgeries for implantation of cannulas into the femoral artery for recording BP and HR and into the femoral vein for the injection of increasing doses of DIZE (0.5, 5, 10, 20mg/kg) and RAS inhibitors and blockers. This experiments were performed in awake rats 24 h after the surgery. The results showed that DIZE causes a dose-dependent reduction in BP accompanied by increase in HR. In order its mechanisms of action, additional groups of rats were pre-treated with the Mas receptor antagonist A-779 (10nmol/kg, i.v.), the nitric oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME (10mg/kg, i.v.), the prostaglandins inhibitor Indomethacin (10mg/kg, i.v.), the ACE inhibitor Captopril (10mg/kg, i.v.) or the AT₁ receptor antagonist Losartan (1mg/kg, i.v.) 15 min before the administration of DIZE (5mg/kg). The results showed that A-779, L-NAME, Indomethacin, Captopril and Losartan do not block the effects of DIZE on BP and HR. Finally, the Intravital Microscopy results revealed that DIZE causes a decrease in blood flow of arterioles of the mesenteric vascular bed without significant changes in the arteriolar diameters. Therefore, our results indicated that DIZE is a potent hypotensive compound and this effect is independent of Mas and AT₁ receptors, ACE, NO release and prostaglandin synthesis.

Key words: Angiotensin-(1-7); Angiotensin-converting Enzyme 2; Mas receptor; Renin-Angiotensin System; Diminazene Aceturate; Blood Pressure

I. INTRODUÇÃO

1. Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um dos principais reguladores da homeostase corporal, exercendo um papel importante no controle da função cardiovascular e renal (Dilauro *et al.* 2009; Harrison-Bernard *et al.* 2002; Keidar *et al.* 2007; Navar *et al.* 2000; Santos *et al.* 2004). Classicamente, este sistema é definido como uma cascata enzimática linear, onde a renina hidrolisa o angiotensinogênio produzido no fígado, formando o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I), que apresenta a seguinte cadeia de aminoácidos: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu. Através da enzima conversora de angiotensina (ECA), a Ang I é convertida no octapeptídeo Angiotensina II (Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Figura 1). O SRA participa da regulação da pressão arterial via controle do balanço de sódio, volume do fluido corporal e tônus vascular (Clayton *et al.* 1998), além de desempenhar um papel importante na modulação do crescimento e diferenciação das células. Podemos ainda citar, dentre as funções do SRA, a sua participação na inflamação, no stress oxidativo, na regulação do peso corporal e no crescimento vascular (Ferreira *et al.* 2011; Gwathmey *et al.* 2010; Savergnini *et al.* 2010; Tran *et al.* 1997). Assim, uma ativação anormal deste sistema está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. Componentes deste sistema estão localizados em vários órgãos, tais como, vasos, coração, cérebro, rim, testículo, músculo esquelético, tecido adiposo, pâncreas e olho (Santos *et al.* 2006; Santos *et al.* 2009). Estudos recentes têm mostrado que drogas envolvendo este sistema reduzem a pressão intraocular em animais e em humanos, além de confirmar a existência do receptor Mas na retina e no corpo ciliar, sendo que este receptor pode estar envolvido na regulação da pressão intraocular e na patogênese de doenças da retina e contra-regular as ações proliferativas da AngII. (Vaajanen *et al.* 2010).

Componentes do SRA são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Atualmente, sabe-se que há duas possibilidades deste sistema funcionar no cérebro. Na primeira, o angiotensinogênio pode ser

produzido e liberado pelas células da glia e enzimaticamente convertido no espaço extracelular para angiotensinas ativas que atuam em receptores específicos localizados em neurônios ou células gliais. Já no segundo modo, a Ang II é gerada dentro de neurônios, armazenada em vesículas e liberada nas terminações nervosas para atuar em receptores situados sobre as células pós-sinápticas (Bader, 2010). Estudos têm mostrado que os receptores AT1 e AT2 são abundantemente expressos no Sistema Nervoso Central e que Ang II também está envolvida em funções como a cognição, memória, percepção da dor, comportamento sexual e estresse (Bader, 2010; Culman *et al.* 2002).

Estudos têm evidenciado a presença de componentes do SRA em adipócitos de roedores e humanos. Segundo Goossens e colaboradores, os níveis de mRNA de angiotensinogênio no Tecido Adiposo (TA) é 68% maior do que no fígado, apoiando um papel fundamental do angiotensinogênio adiposo na produção de Ang II. Estudos envolvendo seres humanos obesos mostraram que a redução no fluxo sanguíneo do TA subcutâneo abdominal foi associado com aumento da liberação de Ang II, sugerindo que a atividade do sistema nervoso simpático reforçada com a obesidade pode contribuir para hipertensão, obesidade, aumentando a produção de tecido adiposo e liberação de Ang II (Goossens *et al.* 2006; 2007).

Estudos recentes têm mostrado que a Ang II estimula a proliferação de fibroblastos em gengivas de coelho, e em fibroblastos humanos, ela induz a liberação de prostaglandina E2, que está envolvida na patogênese da doença periodontal (Santos *et al.* 2009).

Um dos principais componentes deste sistema é a Ang II. Além de sua formação através da quebra da Ang I pela ECA e, menos freqüentemente pela quimase e catepsina A, ela também pode ser produzida pela hidrólise direta do angiotensinogênio pela catepsina G ou pela tonina. Uma vez formada, a Ang II pode ser hidrolisada por aminopeptidases (AMP), originando a Angiotensina III (Ang III) ou hidrolisada por D-AMP originando a Angiotensina IV (Ang IV) (Figura 2) (Ferreira, 2009). As ações da Ang II são mediadas por receptores específicos, o AT₁ e o AT₂, ambos localizados na membrana celular e acoplados a proteína G. Este peptídeo exerce vários efeitos em diferentes órgãos, como, por exemplo, vasoconstrição, hipertrofia cardíaca, estímulo a glândula adrenal para liberação de aldosterona e retenção de sódio (Figura 1)

(Ma *et al.* 2010; Vijayaraghavan *et al.* 2011; Bader, 2010).

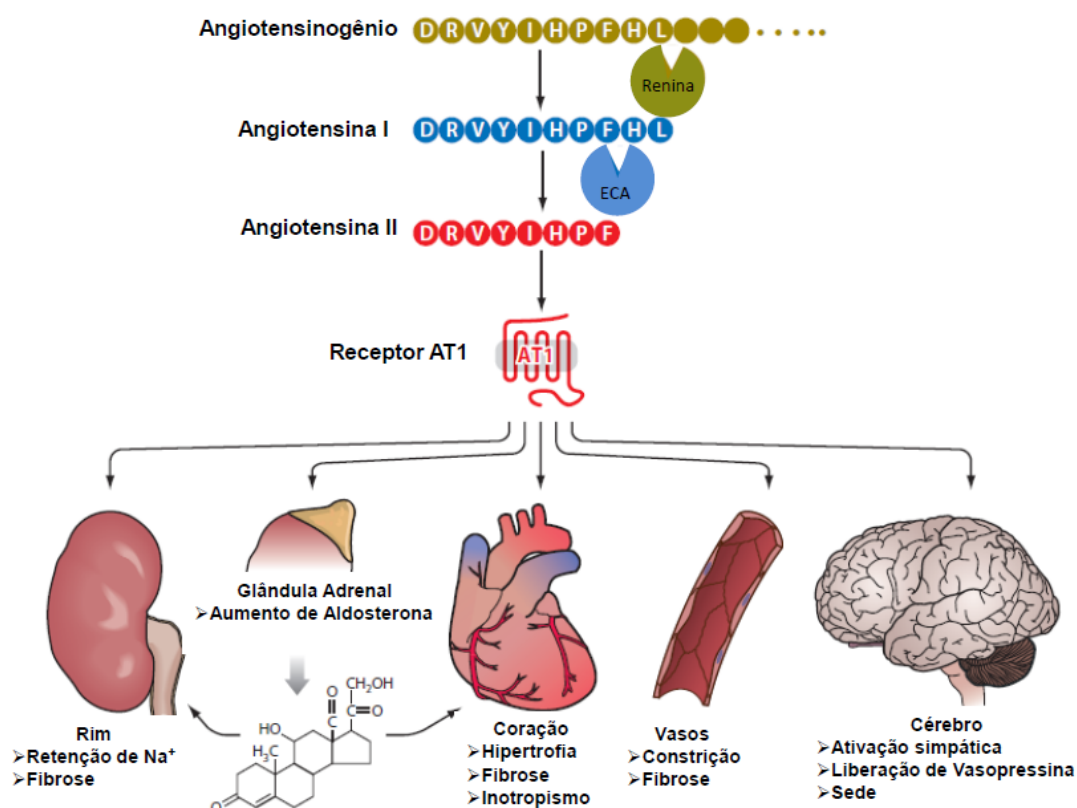


Figura 1: Representação esquemática da formação da Angiotensina II e seus efeitos em diferentes órgãos (Modificado de Bader, 2010).

A Ang II é um potente peptídeo vasoativo que induz remodelação vascular e disfunção endotelial associado ao aumento da pressão arterial. Essa lesão vascular causada pela Ang II pode ser explicada por suas propriedades pró-inflamatórias (Marchesi *et al.* 2008). Este peptídeo também influencia os estágios da resposta inflamatória e estimula a síntese de prostaglandinas (PGs), como o leucotrieno C4, PGE2 e PGI2, modulando a permeabilidade microvascular, além de estimular a expressão e secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em células vasculares da musculatura lisa e em células endoteliais, principalmente através do receptor AT₁ (Marchesi *et al.* 2008; Suzuki e Horiuchi, 2003). Este peptídeo também possui um papel fundamental na função e integridade estrutural da parede vascular e na patogênese de doenças cardiovasculares (Cousin *et al.* 2010). Estudos recentes têm mostrado um papel crucial do SRA, localizado na medula óssea

vermelha, na arterioesclerose (Sata e Fudaka, 2010; Zeng *et al.* 2009). Segundo estes estudos, a via Ang II/AT₁ existente neste local, contribui para o desenvolvimento da arterioesclerose em ratos com hipercolesterolemia e que em lesões arterioescleróticas, a Ang II estimula a expressão de metaloproteinases e inibidor 1 do ativador de plasminogênio, levando a desestabilização da placa arterioesclerótica e alteração no balanço fibrinolítico.

Atualmente, o conhecimento sobre o SRA vem sendo ampliado e sofrendo modificações importantes à medida que são descobertos e incorporados a este sistema novos componentes, como, por exemplo, a Ang III, Ang IV, Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7), Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro], ECA2 e receptor Mas. Entre estes componentes merece destaque a Ang-(1-7). Este peptídeo pode ser formado pela hidrólise da Ang I pela endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP) ou pela hidrólise direta da Ang II pela PEP ou pela prolil-carboxipeptidase (PCP). Além disso, a Ang-(1-7) pode ser formada por vias que envolvem a ECA2. Nestas vias, a Ang-(1-7) pode ser gerada pela hidrólise seqüencial da Ang I pela ECA2 formando a Ang-(1-9) que é, subseqüentemente, hidrolisada pela ECA ou NEP gerando a Ang-(1-7) ou pode ser formada diretamente através da hidrólise da Ang II. Esta última via aparentemente é mais importante bioquimicamente e fisiologicamente, uma vez que a afinidade catalítica da ECA2 é muito maior pela Ang II do que pela Ang I. Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada pela ECA formando a Ang-(1-5) (Figura 2) (Dilauro e Burms, 2009; Ferreira e Santos, 2005; Santos *et al.* 2008; Santos *et al.* 2003).

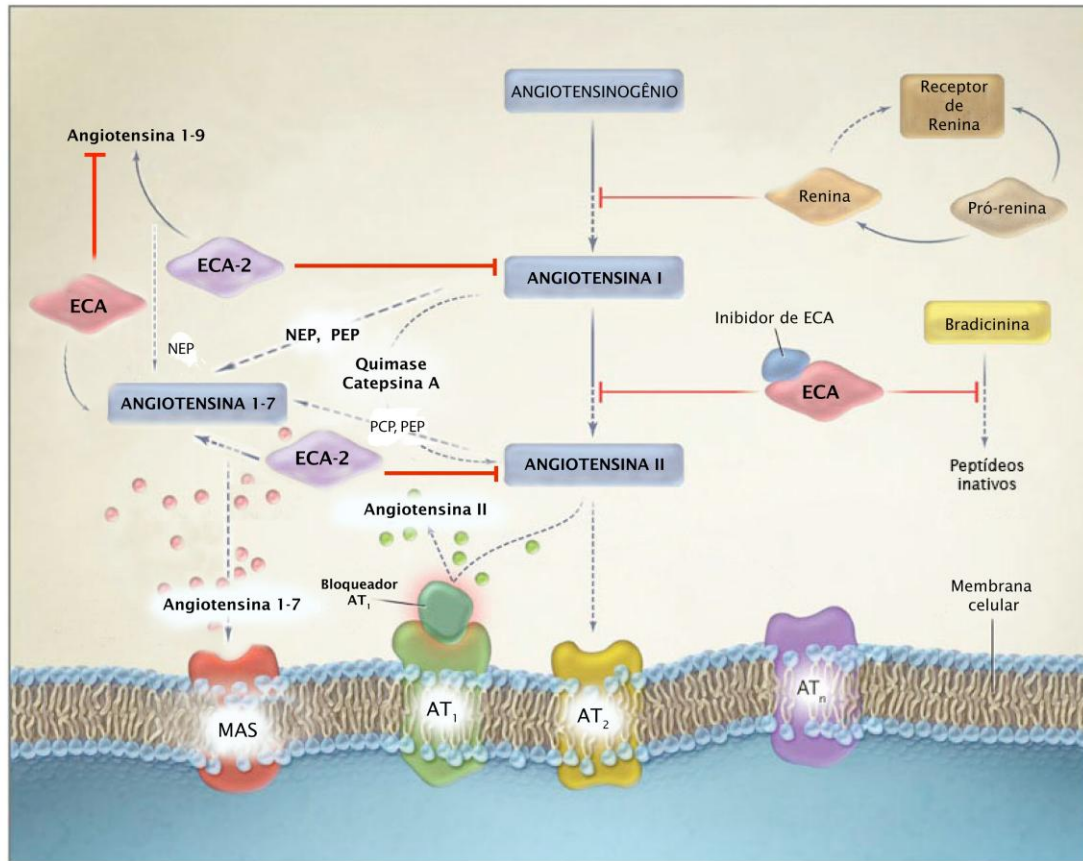


Figura 2: Representação esquemática do sistema renina-angiotensina (SRA). Abreviações: ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; AT₁, receptor tipo 1 de Ang II; AT₂, receptor tipo 2 de Ang II; AT_n, outros receptores para angiotensina; Mas, receptor de Ang-(1-7); NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; PCP, prolil-carboxipeptidase. (Modificado de Ferreira e Santos, 2005; Ingelfinger, 2008).

2. O Eixo Enzima conversora de Angiotensina 2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas

A Ang-(1-7) (Figura 3) é um dos peptídeos biologicamente ativos do SRA, podendo exercer ações similares, distintas ou até mesmo opostas a Ang II. Este peptídeo pode ser formado a partir da Ang I ou da Ang II, principalmente pela ação da ECA2, e exerce seus efeitos através da interação com o receptor Mas (Santos *et al.* 2003). Estudos mostram que a Ang-(1-7) exerce efeitos morfofuncionais diretos no sistema cardiovascular, incluindo vasodilatação e inibição da proliferação celular em diferentes espécies (Ferreira *et al.* 2011; Gurley *et al.* 2006; Yamamoto *et al.* 2006). Este peptídeo causa

vasodilatação em artérias coronárias de cães e porcos, aortas de ratos e arteríolas renais de coelhos e, aparentemente, estes efeitos são dependentes do endotélio (Clark *et al.* 2001; Zeng *et al.* 2009; Fernandes *et al.* 2001). Existem evidências de que a Ang-(1-7) interage com cininas e promove um aumento da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina, o que sugere um importante papel deste peptídeo no controle do tônus vascular. Uma importante interação entre esses sistemas (SRA e sistema caliceína-cininas) foi demonstrada por Paula *et al.* (1995). Estes autores mostraram que a infusão de Ang-(1-7) promove um efeito potencializador das ações da bradicinina, ou seja, aumenta a resposta hipotensora da bradicinina.

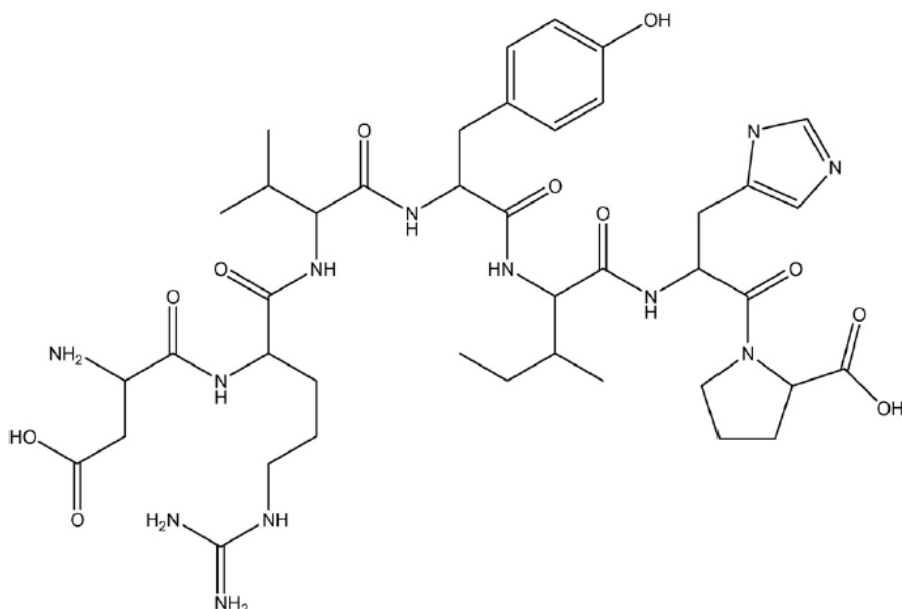


Figura 3: Estrutura química da Ang-(1-7) [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro] (Lula *et al.* 2007).

Em contraste com as ações da Ang II, a Ang-(1-7) exibe propriedades vasodilatadoras através da estimulação da liberação de óxido nítrico (NO) ou de prostaglandinas (PGs) (Gwathmey *et al.* 2010). Vários estudos mostram que a inibição da ECA pode aumentar os níveis plasmáticos de Ang-(1-7). Por exemplo, pacientes hipertensos tratados por 6 meses com o inibidor de ECA Captopril apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) logo após a ingestão oral deste inibidor. Este aumento pode ter sido causado pela

inibição da conversão da Ang-(1-7) em Angiotensina-(1-5) [Ang-(1-5)]. Os níveis plasmáticos da Ang-(1-7) se correlacionaram inversamente com os níveis da pressão arterial diastólica desses pacientes (Roks *et al.* 1999).

O composto A-779 é um potente e seletivo antagonista das ações da Ang-(1-7). Muitos estudos utilizando o A-779 demonstraram que ele antagoniza várias ações da Ang-(1-7), tais como seu efeito antidiurético e antihipertensivo (Santos *et al.* 2003). Estes dados indicam a existência de um sítio de ligação específico para esta angiotensina. De fato, em 2003, Santos e colaboradores descreveram o receptor Mas acoplado a proteína G como um receptor para a Ang-(1-7). Estes autores demonstraram que a deleção genética do Mas suprime a ligação da Ang-(1-7) em rins de camundongos e que estes animais não apresentam a ação antidiurética da Ang-(1-7) após uma carga aguda de água. Além disso, foi observado também que a ligação e sinalização de Ang II pelo receptor AT₁ em camundongos Mas deficientes permanecem inalteradas nos rins desses animais. Ainda neste estudo, observou-se que a Ang-(1-7) se liga a células transfectadas com Mas e provoca a liberação de ácido araquidônico. Além disso, aortas deficientes do receptor Mas perderam a sua capacidade de relaxamento induzida pela Ang-(1-7) (Santos *et al.* 2003). Estudos feitos em corações isolados de camundongos deficientes para o Mas demonstraram que estes animais apresentam uma significativa diminuição na frequência cardíaca e um aumento da resistência vascular coronariana (Ferreira e Santos, 2005; Castro *et al.* 2005). Em outro estudo utilizando o agonista da Ang-(1-7), AVE 0991, foi observado um aumento na liberação de NO em camundongos selvagens, mas não em animais deficientes para o Mas. Este efeito também foi bloqueado pelo antagonista do Mas, o A-779, em animais selvagens (Pinheiro *et al.* 2004). Em conjunto, estes dados indicam que o Mas é um receptor para Ang-(1-7).

A ECA2 contraregula as ações vasoconstritoras e proliferativas da Ang II através da estimulação dos efeitos vasodilatadores e anti-proliferativos da Ang-(1-7), uma vez que ela degrada a Ang II com conseqüente formação de Ang-(1-7). Alterações na expressão desta enzima causam disfunções cardíaca, renal e vascular. Deste modo, esta enzima é vista com grande interesse na manutenção do equilíbrio do SRA. Esta enzima está presente na célula endotelial que é um importante local para a formação e metabolismo da Ang-(1-

7) (Santos *et al.* 2008; Ferreira e Santos, 2005).

Atualmente, acredita-se que o SRA consiste de dois eixos contraregulatórios. O primeiro é formado pela ECA, Ang II e pelo receptor AT₁. Este eixo está associado à vasoconstrição, proliferação celular, hipertensão e fibrose (Ferreira *et al.* 2010). O outro eixo é composto pela ECA2, Ang-(1-7) e pelo receptor Mas e, uma vez ativado, induz mecanismos intrínsecos protetores (Figura 4).

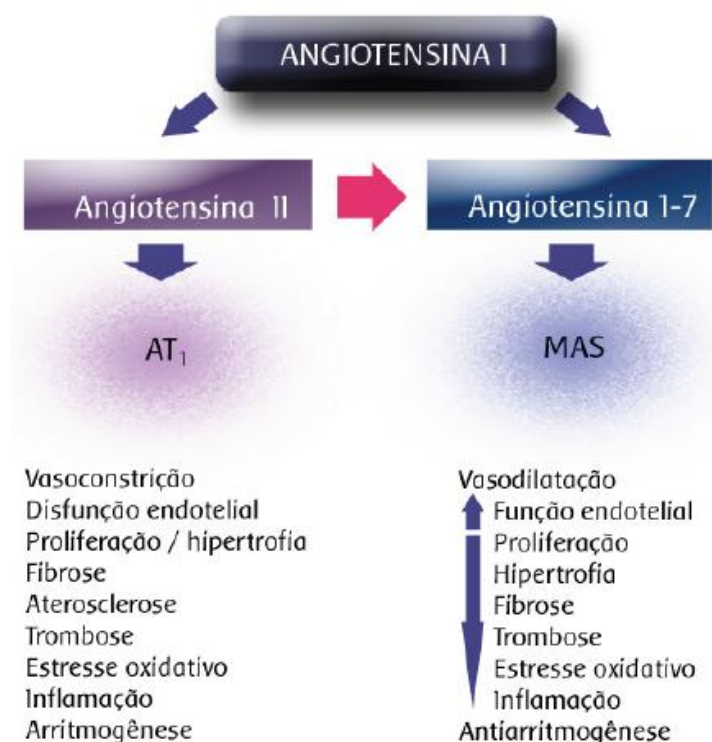


Figura 4: Efeitos contraditórios da Ang II e Ang-(1-7) no sistema cardiovascular (Modificado de Santos e Ferreira, 2007).

3. Ativação da ECA2 Endógena

O composto 1-[[2- (dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil)sulfonil]oxi]-9H-xantona-9 (XNT) é um ativador da ECA2 endógena que foi descoberto baseado no *screening* virtual de cristais desta enzima (Hérendez-Prada *et al.* 2008). O XNT aumenta a atividade da ECA2 várias vezes em ensaios *in vitro*. *In vivo*, este composto causa um rápido decréscimo da pressão arterial quando administrado na veia jugular de ratos normotensos

e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Este efeito hipotensivo é significativamente maior em ratos SHR quando comparado com os ratos normotensos. Além disso, o XNT reverte a fibrose cardíaca e renal induzida pela hipertensão (Hernandez-Prada *et al.* 2008). Em um estudo realizado por Fraga-Silva *et al.* (2010), a atividade da ECA e da ECA2, bem como os efeitos do XNT em trombos formados na veia cava de ratos normais e SHR foram avaliados. Foi observado que o trombo em SHR é 40% maior quando comparado ao controle e que esta característica estava associada a uma redução de 20% na atividade de ECA2 no grupo SHR. O tratamento com o XNT induziu uma redução do peso do trombo em ambos os grupos. Em outro estudo realizado por Ferreira *et al.* (2011), a expressão da ECA2 foi significativamente menor nos animais SHR quando comparado com animais normotensos e os níveis dessa enzima foram restaurados com o tratamento com o XNT. Além disso, os autores mostraram um aumento da atividade da ECA2 nos animais SHR cronicamente infundidos com este ativador quando comparado com animais SHR tratados com salina. Ainda neste estudo, a administração crônica de XNT causou uma diminuição no colágeno nos corações de ratos SHR, sugerindo um efeito antifibrótico para este composto. Foi demonstrado também um aumento de aproximadamente 16% da expressão de ECA2 e da Ang-(1-7) em fibroblastos intersticiais e perivasculares em ratos SHR tratados com XNT. Além disso, a fosforilação de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) foi maior em ratos SHR quando comparados com ratos normotensos e o tratamento com XNT dos animais SHR reduziu este efeito. Assim, evidências indicam que a ativação da ECA2 endógena pode prevenir o desenvolvimento de hipertensão arterial e de outras doenças cardiovasculares (Figura 5).

Os dados obtidos com o uso do XNT demonstram que a ativação da ECA2 é uma estratégia viável para o controle da hipertensão e das doenças cardiovasculares. Entretanto, o XNT é de difícil dissolução em meio aquoso e possui alto custo, o que dificulta o seu uso nos diversos protocolos experimentais. Diante disto, outro ativador da ECA2 endógena foi desenvolvido com o objetivo de obter um composto com características físico-químicas e financeiramente mais favoráveis. Desta forma, usando a mesma técnica utilizada para a identificação do XNT, o composto Aceturato de Diminazeno

(DIZE) foi descrito como ativador da ECA2 (Kulemina *et al.* 2011). Este composto é um antiparasitário, muito utilizado na clínica veterinária que possui atividade tripanocida e leishmanicida (Jean Moreno *et al.* 2006, Kroubi *et al.*, 2010).

A avaliação dos efeitos biológicos do DIZE é de extrema importância no sentido de caracterizar um composto com propriedades adequadas tanto do ponto de vista biológico quanto físico-químicas. Futuramente, este composto poderá ser usado como uma terapia alternativa no controle da hipertensão arterial e das doenças cardiovasculares.

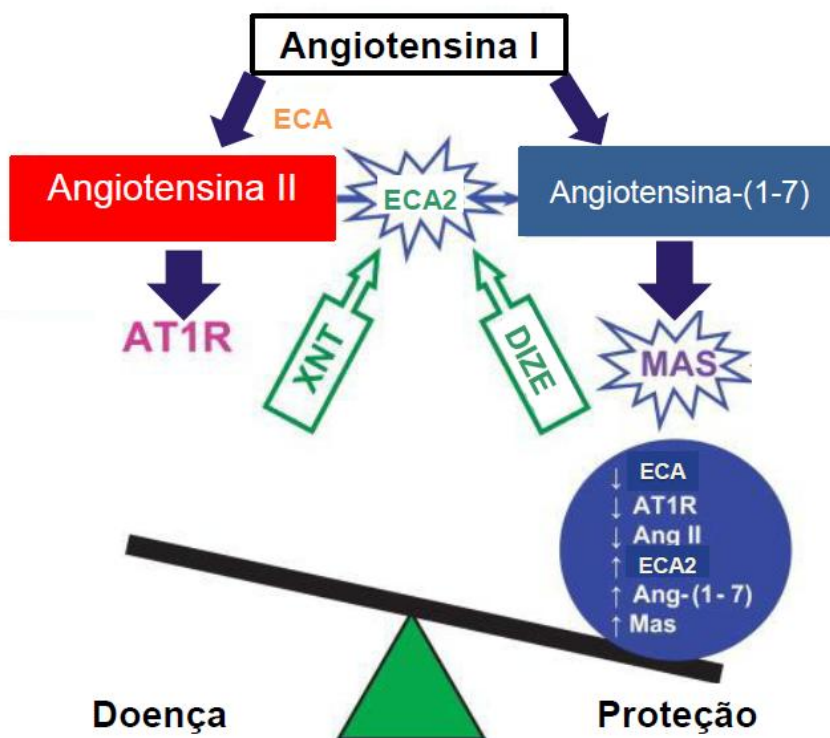


Figura 5: Representação esquemática dos efeitos dos ativadores da ECA2 endógena no SRA. A ativação da ECA2 resulta na estimulação de todo o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas do SRA. Abreviações: ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; DIZE: Aceturato de diminazeno; Mas: receptor de Angiotensina-(1-7); AT₁: receptor de Angiotensina II. (Modificado de Ferreira *et al.* 2010).

II. JUSTIFICATIVA

A ECA2 exerce um papel importante no controle da função cardiovascular e o ativador desta enzima, DIZE, possui características físico-químicas mais favoráveis quando comparado ao XNT. Assim, o estudo dos efeitos do DIZE em parâmetros cardiovasculares é importante para que este composto seja usado como ferramenta para auxiliar no entendimento do SRA e, futuramente, como uma estratégia terapêutica para o controle da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena, usando o composto sintético Aceturato de Diminazeno (DIZE), na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos. Além disso, analisaremos os possíveis mecanismos de ação deste composto utilizando ferramentas farmacológicas (bloqueadores e inibidores do SRA).

2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do DIZE na atividade da ECA2 *in vitro*.
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de DIZE (0,5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg) na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Verificar o papel do receptor Mas nos efeitos do DIZE na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Verificar o papel do óxido nítrico nos efeitos do DIZE na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Verificar o papel das prostaglandinas nos efeitos do DIZE na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Verificar o papel da ECA nos efeitos do DIZE na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Avaliar o papel do receptor AT₁ nos efeitos do DIZE na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.
- Avaliar, por meio da Microscopia Intravital, os efeitos do DIZE no fluxo sanguíneo e no diâmetro de arteríolas do leito mesentérico de ratos.
- Verificar o papel do óxido nítrico nos efeitos do DIZE no fluxo sanguíneo e no diâmetro de arteríolas do leito mesentérico de ratos.

IV. METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO). Os animais foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade (7-19h). Os ratos tiveram livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações para o uso humanitário de animais de laboratório e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo número 156/10 – anexo 1).

2. Ensaio Enzimático

Para avaliação da atividade enzimática da ECA2, um 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 de Tris-HCl 75mM pH 7,5; NaCl 1M e $ZnCl_2$ 0,5mM. Todos os ensaios foram realizados 4 vezes em pH 7,4 com um volume final de 100 μ L. A solução de reação continha: amostra (ECA2: 60 μ g; 50 μ M de substrato, NaCl 5M, Tris-HCl 75mM, $ZnCl_2$ 0,5 μ M e ativador de ECA2. No ensaio da ECA2 foi adicionado diferentes concentrações do DIZE (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M) foram adicionadas ao ensaio para avaliar a atividade enzimática da ECA2. Imediatamente após adicionado o substrato fluorogênico, o ensaio foi realizado em um leitor de Elisa (BioTek SynergyTM 2; BioTek, VT, EUA) durante 1h, a 37°C, com leitura de fluorescência a cada minuto. O controle de fluorescência foi realizado com reações sem a presença de amostra. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 320nm e 405nm, respectivamente.

3. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal (i.p.) com ketamina 10% (6mg por 100g de peso) e xilasina 2% (0,6mg por 100g de peso) e foram implantadas cânulas feitas a partir da fusão do tubo de polietileno PE-50 (CPL Produtos Médicos Ltda, Brasil), de aproximadamente 15cm, com o tubo de polietileno PE-10 (BD Intramedic, Clay Adams, EUA), de aproximadamente 2 ou 4cm, na artéria e veia femoral, respectivamente (Figura 6). As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e a extremidade livre do PE-50 foi ocluída com alfinete de metal. Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal e os pêlos da região inguinal direita foram retirados. Após a assepsia da pele com álcool iodado, uma incisão foi realizada e a musculatura divulsionada para visualização do feixe vasculo-nervoso femoral. A cânula foi introduzida na artéria femoral para o registro da pressão arterial média (PAM, mmHg), pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm). Já a cânula da veia femoral foi utilizada para a injeção da droga DIZE e dos inibidores e bloqueadores. Posteriormente, as cânulas foram fixadas aos vasos e dirigidas para a região dorsal do rato, com auxílio de um trocater, onde foram exteriorizadas e imobilizadas com linha de sutura. Estes procedimentos foram realizados 24 horas antes do registro.

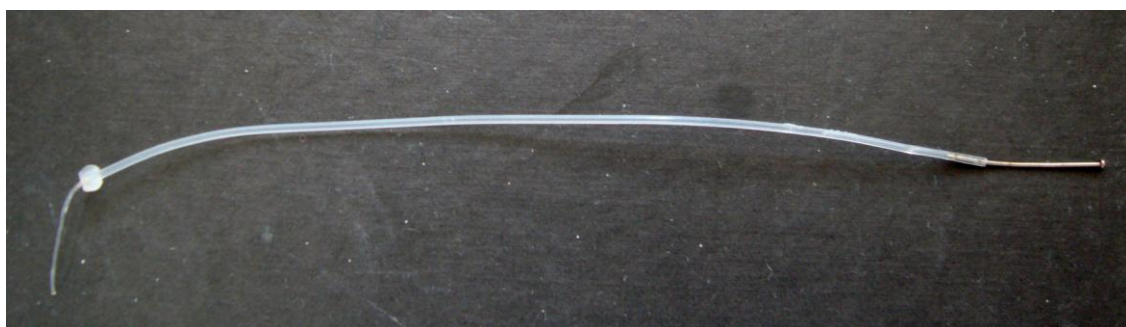


Figura 6: Cânula utilizada no procedimento cirúrgico para aferir a pressão arterial e injetar drogas.

4. Registro dos Parâmetros Cardiovasculares

Após prévia calibração do equipamento, a PAM, a PAP e a FC foram

registradas através do sistema de aquisição de dados da BIOPAC (MP100, Biopac System Inc., EUA) usando transdutores de pressão. Os registros foram feitos em animais acordados mantidos em caixas individuais, 24 horas após os procedimentos cirúrgicos. A PAM e a FC foram calculados via software (Acqknowledge III, Biopac System Inc., EUA) a partir dos valores de PAP (Figura 7).

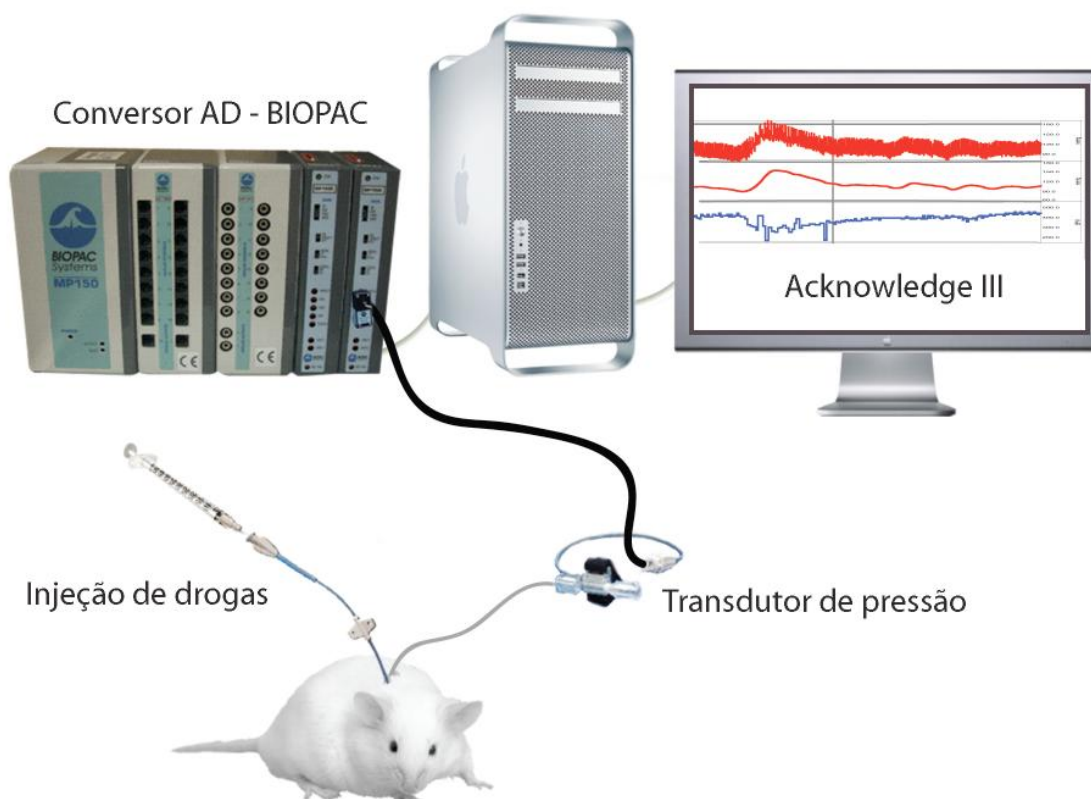


Figura 7: Representação esquemática do sistema de aquisição de registros de PAP, PAM e FC.

5. Microscopia Intravital

Os ratos foram anestesiados com uretana 12% (1mL por 100g de peso, i.p.) e, em seguida, foi realizada uma incisão na parede abdominal por onde o mesentério foi exteriorizado e estendido sobre uma placa que permitia a transiluminação do tecido (Baker e Wayland, 1974; House e Lipowsky, 1987; Gaboury *et al.* 1995;. Kubes *et al.* 1995, Kubes *et al.* 2003). Durante todo o experimento o mesentério foi irrigado com solução tampão (PBS, pH=7.4)

mantida a 37°C para evitar o ressecamento do tecido. Posteriormente, o animal foi levado ao microscópio (Olympus BX-40) com a objetiva de 10X. Este microscópio possuía uma câmera de vídeo (Sony, Japão) acoplada e as imagens eram projetadas em uma televisão. As imagens foram gravadas para posterior análise utilizando um gravador de DVD de cor (LG, Brasil) (Figura 8). A velocidade das células vermelhas (V_{rbc}) foi medida usando um velocímetro Doppler óptico (Microcirculação Research Institute) conectado a um microscópio de luz (Olympus BX-40) e a média de V_{rbc} (velocidade média) foi calculada pela fórmula $V_{rbc}/1.6$ (Xavier *et al.* 2009, Kubes *et al.* 2003). Desta forma, foi determinado o fluxo nas arteríolas mesentéricas (diâmetro de 10-20 μ m). As alterações nas medidas do diâmetro arteriolar foram determinadas utilizando o software Image J. Minutos antes de iniciar os protocolos, os ratos foram submetidos à implantação de uma cânula na veia femoral para a injeção de drogas.

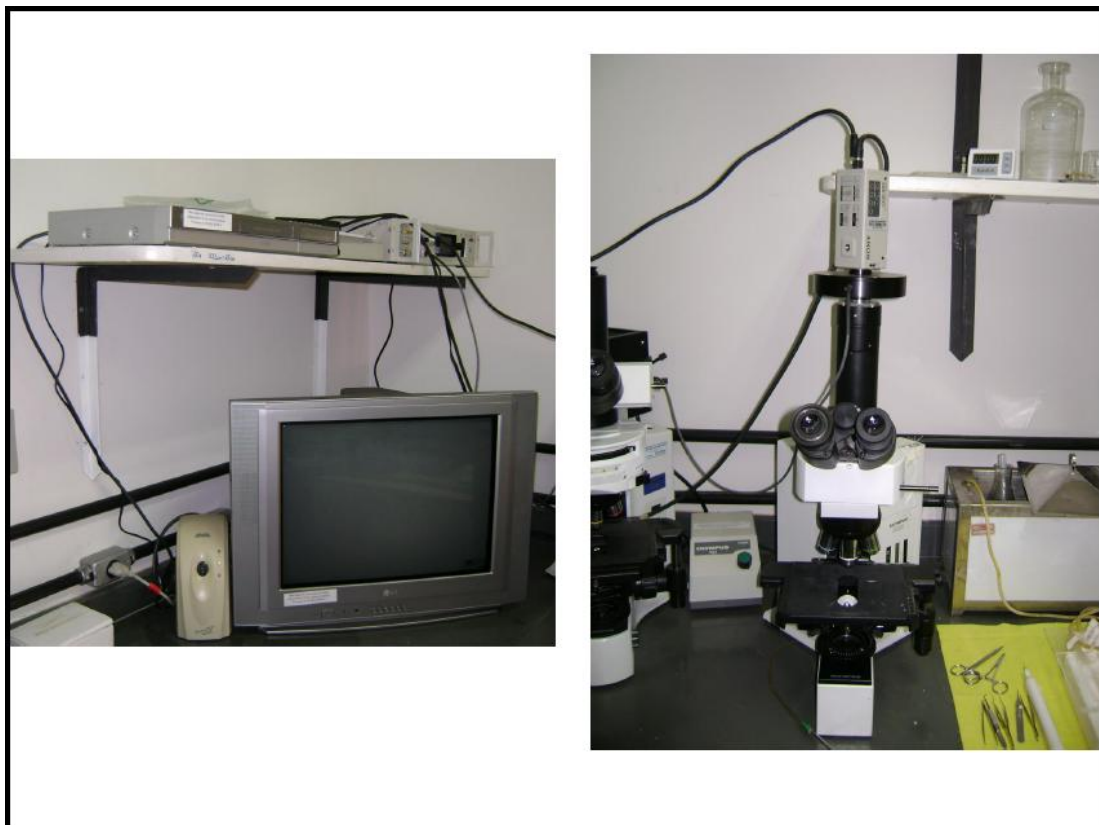


Figura 8: Fotografias ilustrativas do sistema utilizado para realizar a técnica de microscopia intravital.

6. Protocolos Experimentais

Com o objetivo de avaliar os efeitos do composto DIZE foi diluído em salina, em diferentes concentrações (0,5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg; n=4-6) na PA e na FC, esperou-se um período de aproximadamente 30 minutos para a estabilização desses parâmetros após a conexão da artéria femoral ao sistema de registro. Posteriormente, doses crescentes do DIZE foram injetadas através da cânula ligada à veia femoral. Após cada injeção, foi permitido tempo suficiente para que os parâmetros voltassem aos valores basais antes da aplicação da dose subsequente. As injeções começaram com a salina (controle) seguida das doses menos concentradas (Figura 9).

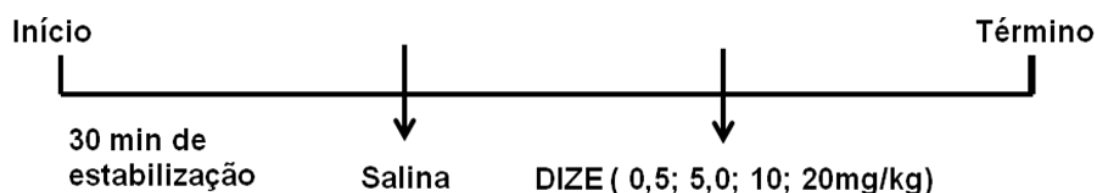


Figura 9: Esquema do protocolo experimental utilizando diferentes concentrações do DIZE.

Com o objetivo de determinar se administrações seguidas do DIZE altera a resposta a esta droga, duas injeções subsequentes de 5mg/kg i.v. de DIZE foram realizadas no mesmo animal (n=4) (Figura 10).

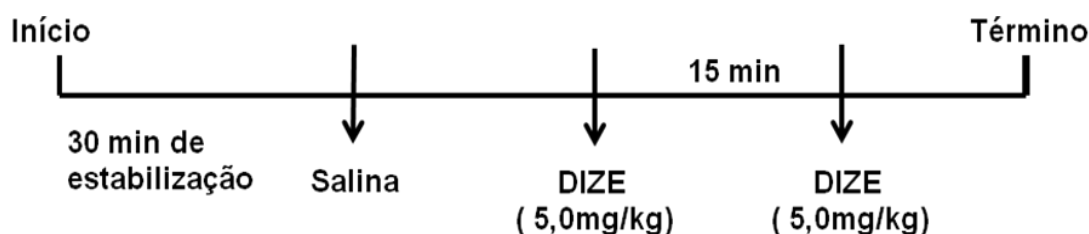


Figura 10: Esquema do protocolo experimental utilizando múltiplas doses do DIZE.

Para a avaliação dos mecanismos de ação do DIZE foram utilizados

inibidores e bloqueadores do SRA. Após 30 minutos de estabilização, foi injetado salina (controle) seguida da primeira dose do DIZE na concentração de 5mg/kg. Logo após o retorno dos parâmetros aos valores basais foi injetado um dos seguintes inibidores/bloqueadores: i) A-779 (bloqueador do receptor Mas, 10nmol/kg i.v., n=6); ii) N^G-nitro-L-arginine methyl Ester (L-NAME) (inibidor da óxido nítrico sintase, 10mg/kg i.v., n=4); iii) indometacina (inibidor da síntese de prostaglandinas, 10mg/kg i.v., n=4); iv) Captopril (inibidor da ECA, 1mg/kg i.v., n=5-8); e v) Losartan (bloqueador do receptor AT₁, 1mg/kg i.v., n=4). Após 15 minutos da injeção destes inibidores/bloqueadores foi aplicado uma segunda dose do DIZE na mesma concentração (5mg/kg i.v.) (Figura 11). As concentrações dos inibidores/bloqueadores foram baseadas em estudos da literatura e todos foram diluídos em salina, com exceção da Indometacina, que foi diluída em uma solução contendo 70% álcool e 30% salina (Clayton *et al.* 1998; Kubo-Inoue *et al.* 2002; Moura *et al.* 2005; Trask *et al.* 2007).

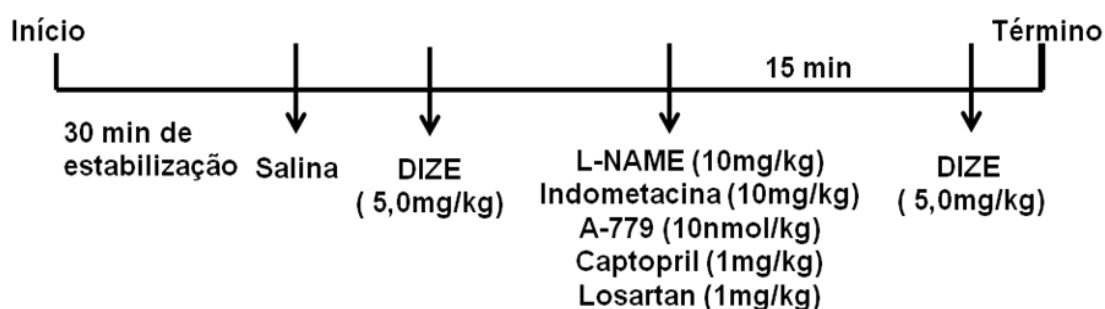


Figura 11: Esquema do protocolo experimental para avaliar os mecanismos de ação do DIZE.

Os efeitos do DIZE no fluxo sanguíneo e no diâmetro de arteríolas mesentéricas foram avaliados através da técnica de Microscopia Intravital. Inicialmente, foi injetado salina (controle) seguido do DIZE (5mg/kg i.v) e do Nitroprussiato de sódio (NPS, 10µg/ml i.v.), sempre esperando 15 minutos entre uma injeção e outra (Figura 12). Posteriormente, para verificar se os efeitos do DIZE são mediados pela liberação de NO, a seqüência de injeções foi repetida na presença do L-NAME (10mg/Kg i.v.), também esperando 15 minutos entre uma injeção e outra (n=5-8) (Figura 13).

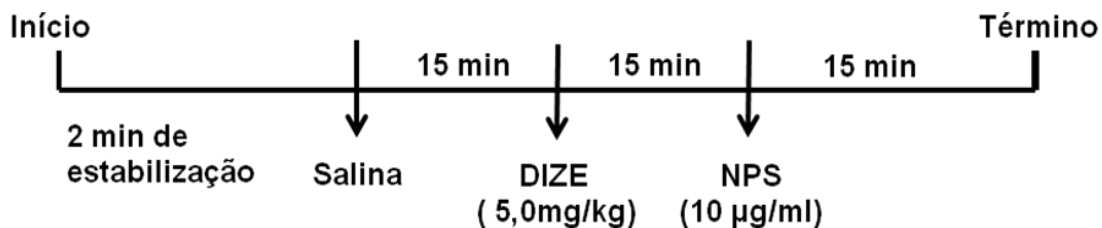


Figura 12: Esquema do protocolo experimental utilizado na Microscopia Intravital para avaliar os efeitos do DIZE.

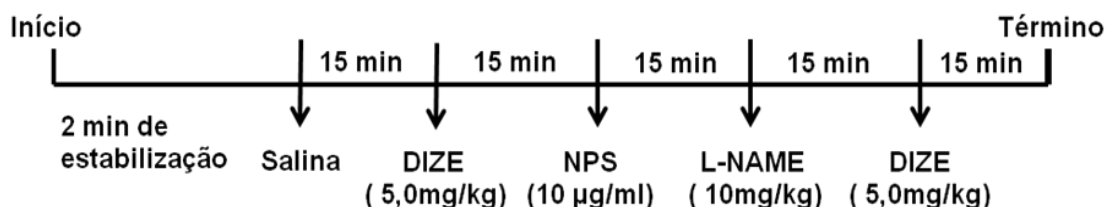


Figura 13: Esquema do protocolo experimental utilizado na Microscopia Intravital para avaliar o papel do No nos efeitos do DIZE.

7. Análise Estatística

Todos os dados foram expressos com média \pm EPM. Os resultados referentes aos efeitos do DIZE nos parâmetros cardiovasculares foram analisados utilizando os testes *t* de Student ou One-way ANOVA seguido do pós teste de Newman Keuls e os resultados da Microscopia Intravital foram analisados utilizando o teste Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Ativação *in vitro* da ECA2 pelo DIZE

Inicialmente, avaliamos a capacidade do DIZE de ativar a ECA2 em um sistema *in vitro*. Observamos que o DIZE aumenta a atividade desta enzima quando adicionado a solução de reação. Este aumento é progressivo e inicia logo após a mistura dos reagentes, durando todo o tempo do experimento, ou seja, 60 minutos. Todas as concentrações testadas aumentaram a atividade da ECA2, sendo que uma maior atividade foi verificada nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} do DIZE. Como esperado, o controle negativo não influenciou a atividade da enzima (Figura 14).

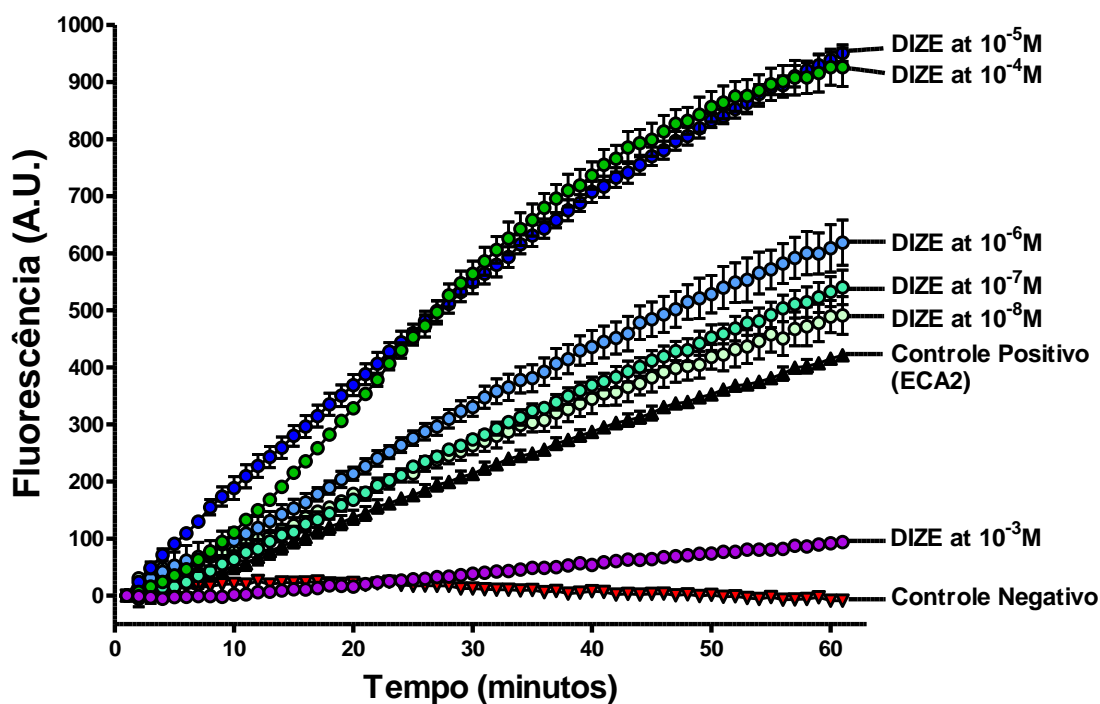


Figura 14: Atividade enzimática de ECA2 após adição do DIZE em diferentes concentrações. Todas as concentrações testadas aumentaram a atividade da enzima.

2. Efeitos do DIZE na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca

Após análise dos registros de PA e FC obtidos com injeções de doses crescentes do DIZE (0,5; 5,0; 10,0; e 20,0 mg/kg) em ratos acordados, foi observado uma redução significativa da PAM (valores basais de ± 100 mmHg) com um conseqüente aumento da FC quando comparado com o grupo salina, sendo esta resposta dose-dependente. Os maiores valores de queda da PAM foram observados na dose de 20,0 mg/kg (Figuras 15 e 16). Os dados obtidos na análise do tempo do pico de resposta das concentrações crescentes do DIZE mostraram um aumento dose-dependente deste tempo, tendo na concentração de 20,0 mg/kg o maior pico de resposta (Figura 17).

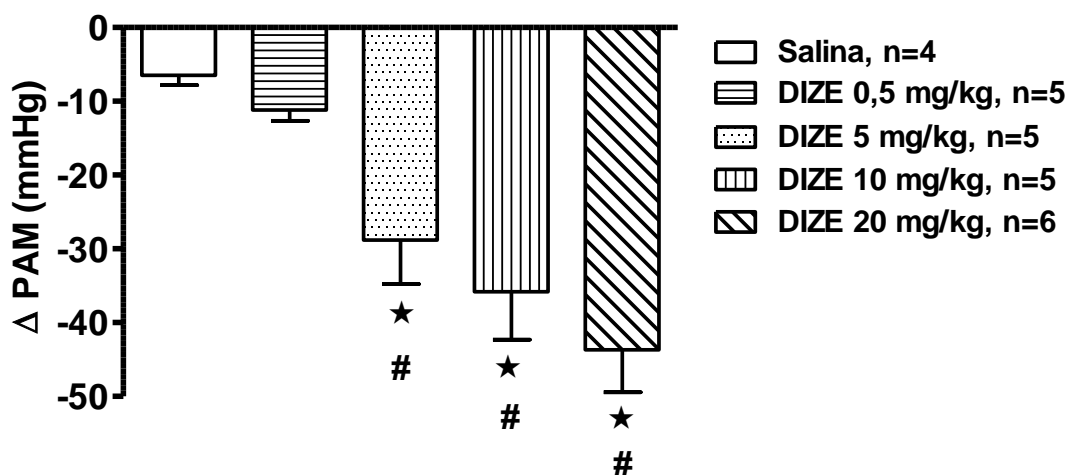


Figura 15: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações, na PAM de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. salina e # $P < 0,05$ vs. DIZE 0,5 mg/kg (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

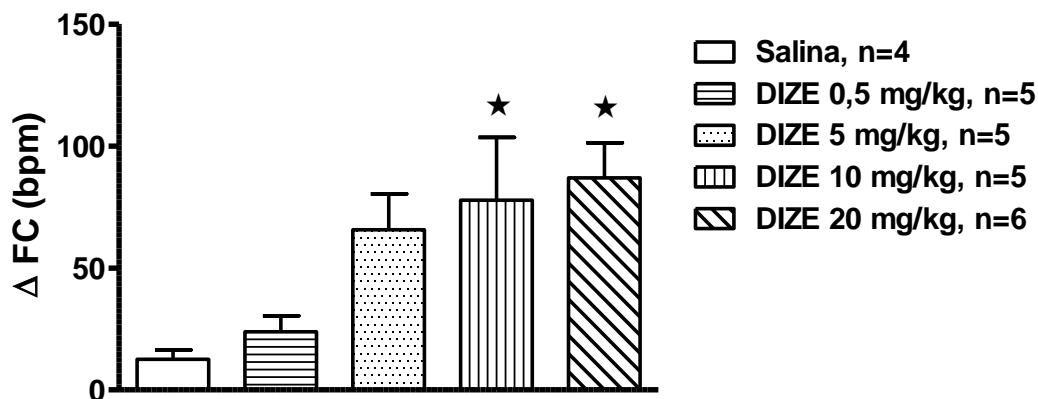


Figura 16: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações, na FC de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. salina (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

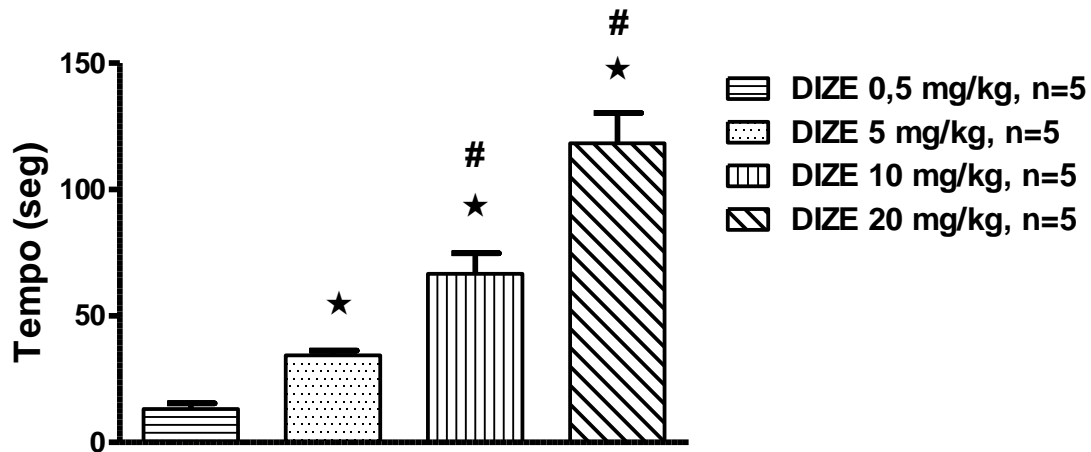


Figura 17: Tempo de pico da resposta do DIZE quando administrado em diferentes concentrações. * $P < 0,05$ vs. DIZE 0,5 mg/kg e # $P < 0,05$ vs. DIZE 5 mg/kg (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

A partir desses dados escolhemos a dose de 5 mg/kg para prosseguir com as etapas seguintes do estudo, pois esta foi a dose mínima necessária para o DIZE induzir uma significativa queda na PA quando comparado com a salina. Além disso, não houve diferença significativa entre as doses de 5,0; 10,0 e 20,0 mg/kg.

Posteriormente, analisamos os efeitos de aplicações de doses seguidas de DIZE (5 mg/kg). Observamos que as duas injeções causaram uma queda significativa da PAM quando comparado com a salina. Não houve diferença significativa entre os efeitos observados com as duas administrações (Figura 18). Já na análise da FC foi observado um aumento significativo deste parâmetro nas duas administrações do DIZE quando comparado com a salina. Novamente, não houve diferenças estatísticas entre as duas aplicações (Figura 19). Também analisamos o tempo de resposta do DIZE e não foi encontrada diferença significativa entre as duas doses de injeção do DIZE (Figura 20).

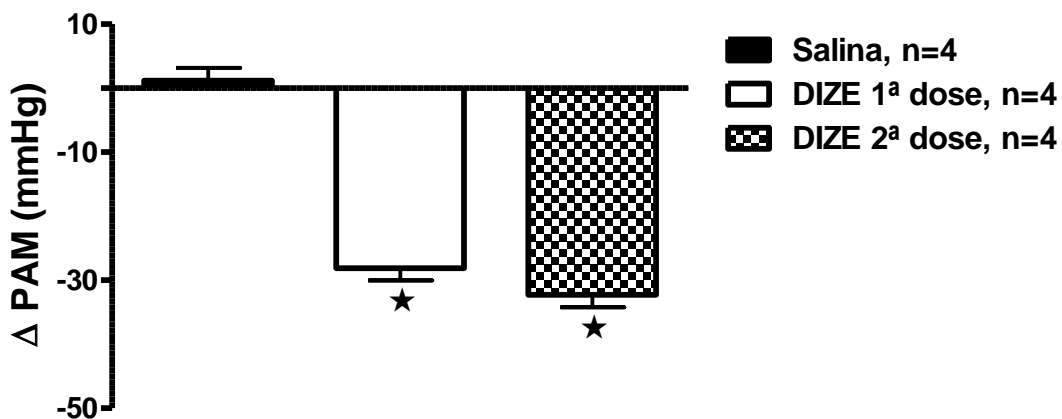


Figura 18: Efeitos do DIZE na PAM de ratos acordados quando administrado em duas injeções consecutivas de 5 mg/kg. *P<0,05 vs. salina (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

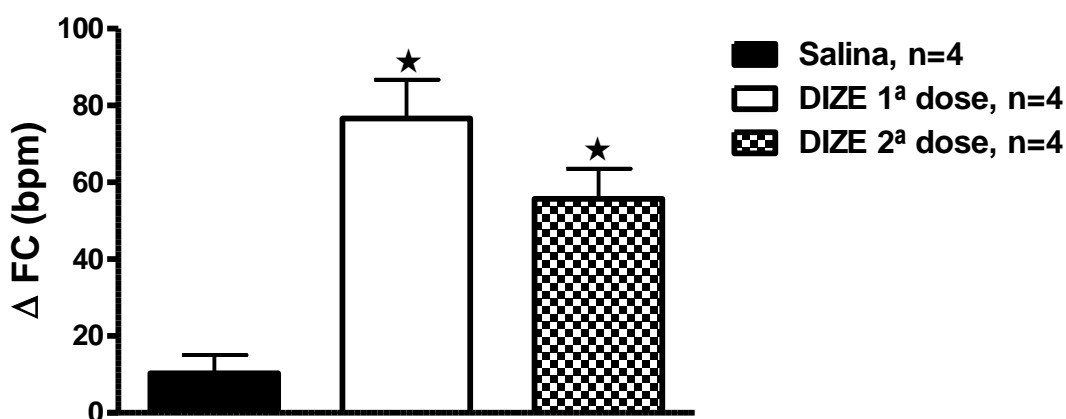


Figura 19: Efeitos do DIZE na FC de ratos acordados quando administrado em duas injeções consecutivas de 5 mg/kg. *P<0,05 vs. salina (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

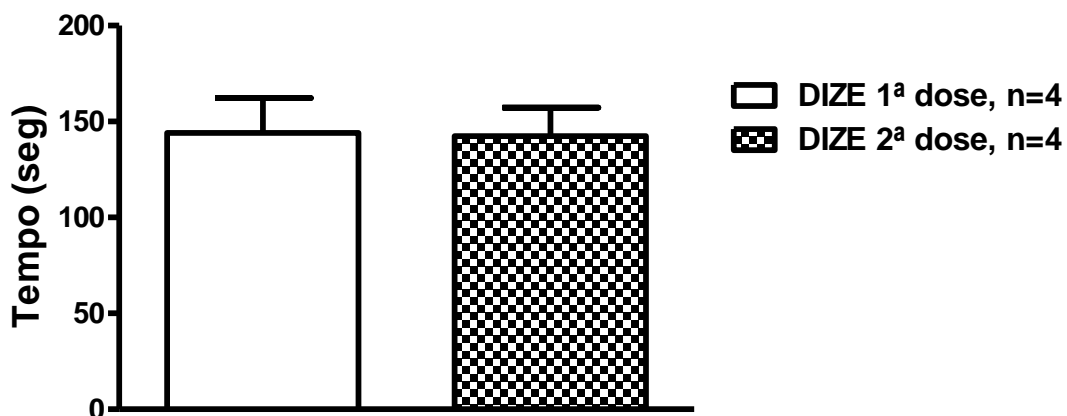


Figura 20: Tempo total de resposta do DIZE quando administrado em duas injeções consecutivas de 5 mg/kg (Teste t de Student pareado).

3. Avaliação dos Mecanismos de Ação do DIZE

Devido ao fato de que a ECA2 é a principal enzima formadora de Ang-(1-7), a primeira ferramenta farmacológica utilizada para avaliar os possíveis mecanismos de ação do DIZE foi o antagonista do receptor Mas, o A-779. Os resultados obtidos mostraram um aumento não significativo na PAM após administração de A-779 e que o DIZE continuou causando uma queda da PAM e conseqüente aumento da FC quando comparado com salina após o bloqueio do Mas (Figuras 21 e 22). Em relação ao tempo total de resposta não foi observado diferença estatística entre as duas injeções do DIZE (Figura 23).

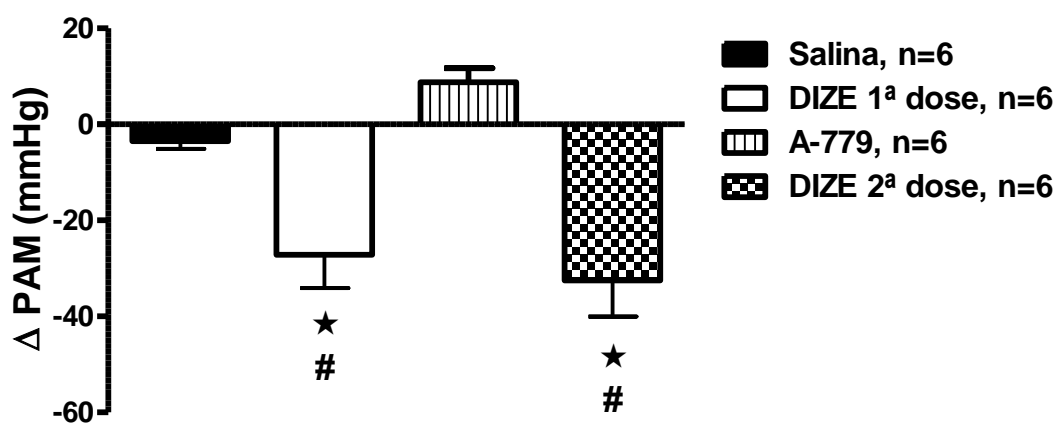


Figura 21: Papel do Mas no efeito do DIZE na PAM de ratos acordados. *P<0,05 vs. salina e #P<0,05 vs. A-779 (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

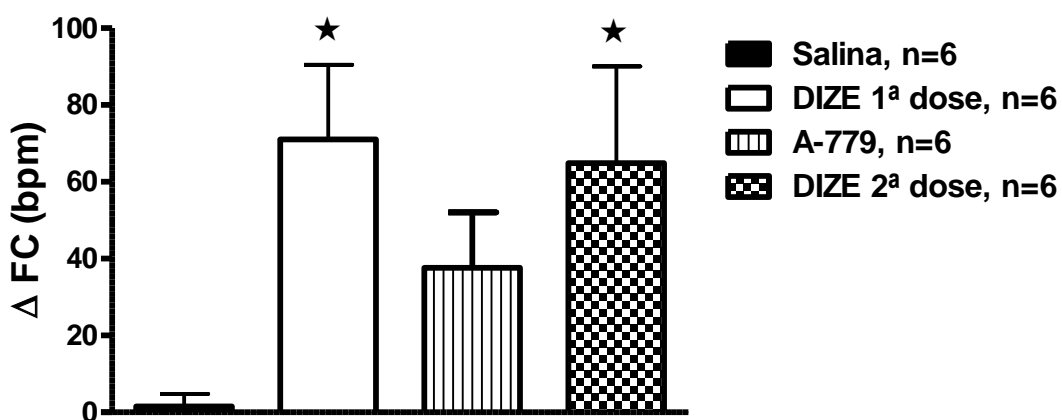


Figura 22: Papel do Mas no efeito do DIZE na FC de ratos acordados. *P,0,05 vs. salina (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

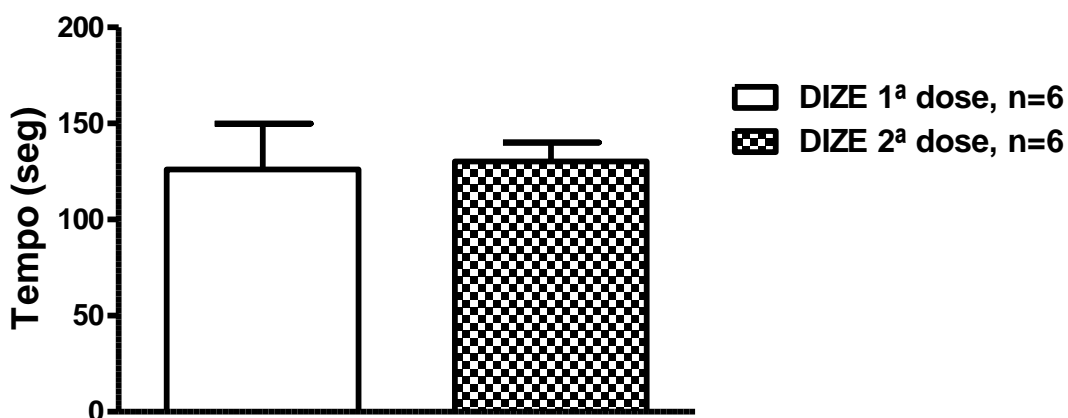


Figura 23: Papel do Mas no efeito do DIZE no tempo total de resposta de ratos acordados. (Teste t de Student pareado).

Em seguida, avaliamos o papel do NO nos efeitos do DIZE na PA e na FC através da administração do L-NAME, cuja ação é inibir a síntese de NO. Como esperado, observamos que o L-NAME causou um aumento na PAM. Além disso, o DIZE continuou causando uma queda significativa da PAM com conseqüente aumento da FC após a administração do L-NAME, (Figuras 24 e 25). Em relação ao tempo de resposta, foi observado que este tempo foi maior na primeira dose do DIZE quando comparado com a segunda dose, porém sem diferença significativa (Figura 26).

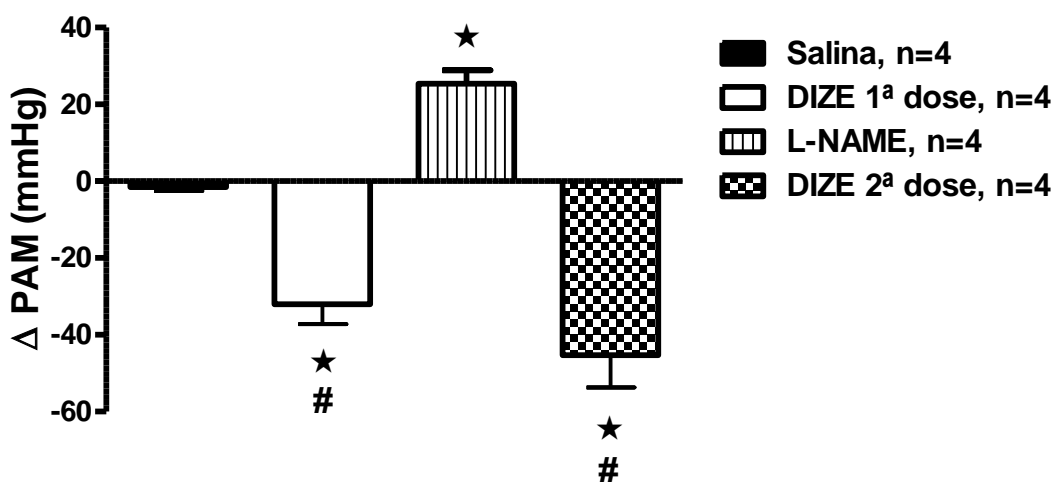


Figura 24: Papel do óxido nítrico no efeito do DIZE na PAM de ratos acordados * $P < 0,05$ vs. salina e # $P < 0,05$ vs. L-NAME (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

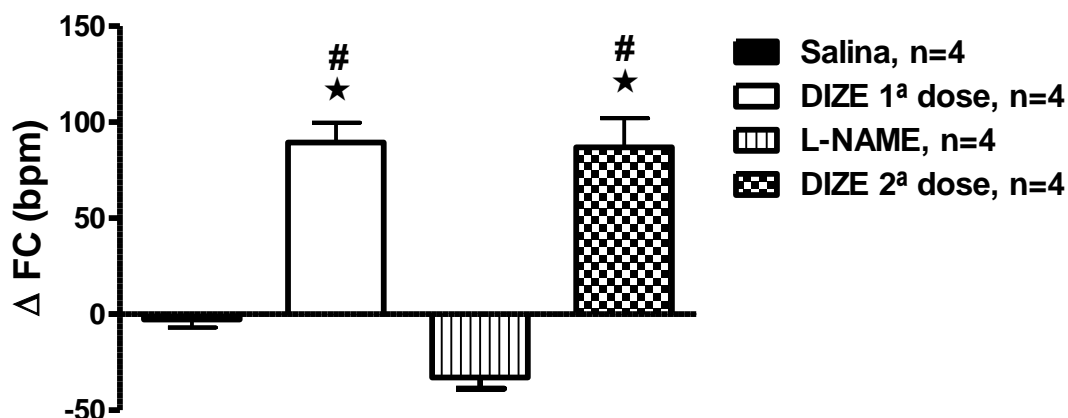


Figura 25: Papel do óxido nítrico no efeito do DIZE na FC de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. salina e # $P < 0,05$ vs. L-NAME (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

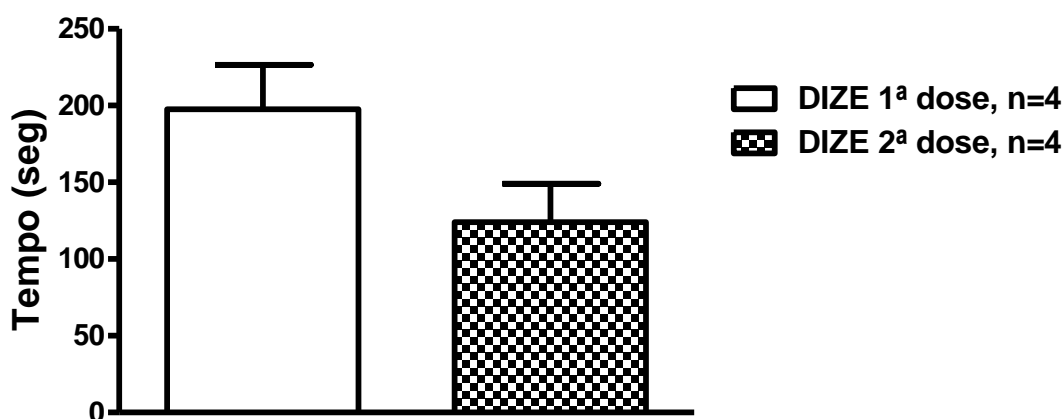


Figura 26: Papel do óxido nítrico no efeito do DIZE no tempo total de resposta de ratos acordados (Teste t de Student pareado).

Posteriormente, utilizamos o inibidor da síntese de prostaglandinas, a Indometacina, para avaliar o papel destes vasodilatadores nos efeitos do DIZE. Como a Indometacina é dissolvida em álcool, injetamos o veículo (70% de álcool e 30% de salina) nos animais para avaliar os seus efeitos. O veículo causou um pequeno aumento na PAM e uma leve queda na FC. Quando foi realizada a injeção de Indometacina sozinha observamos uma queda na PAM e na FC. Como já era esperado a partir dos resultados obtidos anteriormente, observamos uma diminuição significativa da PAM com um conseqüente aumento da FC depois da aplicação do DIZE quando comparado ao veículo ou a salina. Quando uma segunda injeção do DIZE foi realizada após o tratamento

com a Indometacina, observado resultados semelhantes à primeira dose, indicando que o inibidor de prostaglandinas não conseguiu bloquear os efeitos do DIZE na PAM e na FC (Figuras 27 e 28). Em relação ao tempo total de resposta, foi observado que o tempo da primeira dose foi semelhante ao tempo da segunda dose (Figura 29).

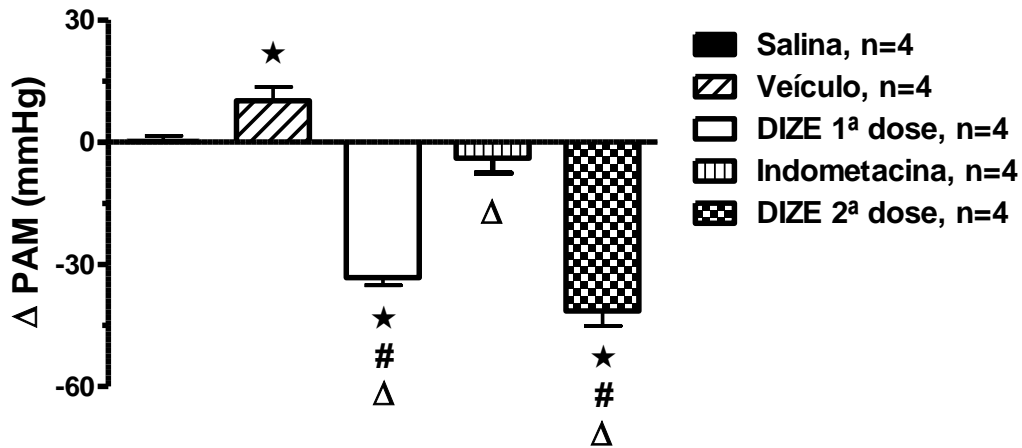


Figura 27: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE na PAM de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. Salina, # $P < 0,05$ vs. Indometacina e $\Delta P < 0,05$ vs. veículo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

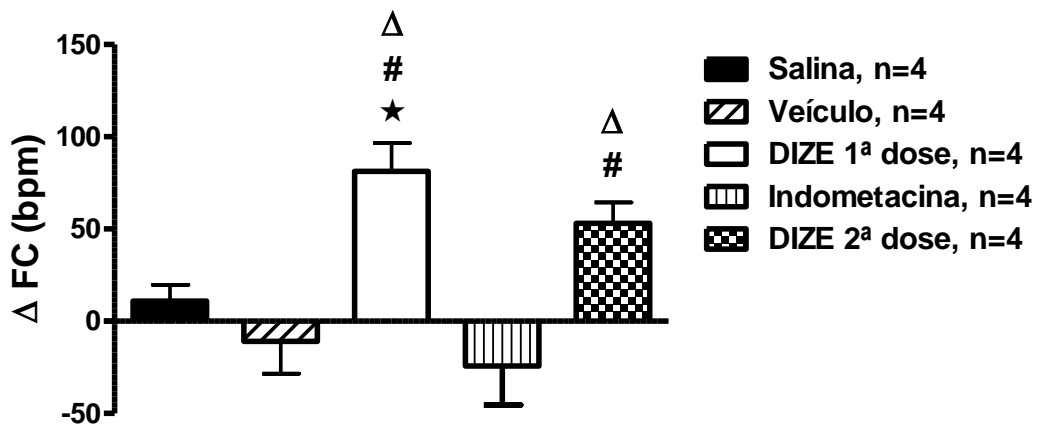


Figura 28: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE na FC de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. Salina, # $P < 0,05$ vs. Indometacina e $\Delta P < 0,05$ vs. veículo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

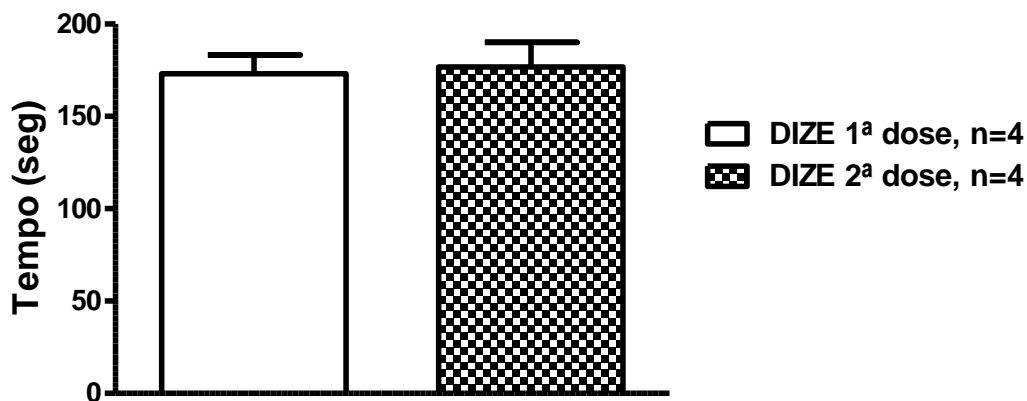


Figura 29: Papel das prostaglandinas no efeito do DIZE no tempo total de resposta de ratos acordados (Teste t de Student pareado).

Prosseguindo com a análise dos mecanismos de ação do DIZE, utilizamos o Captopril, um inibidor da ECA. Como já esperado, foi observado uma queda na PAM com conseqüente aumento na FC após aplicação do Captopril. Os dados obtidos mostraram também que este inibidor não bloqueou os efeitos do DIZE, pois a administração do ativador nos animais 15 minutos depois da aplicação intravenosa do Captopril causou os mesmos efeitos observados na primeira aplicação do DIZE (Figuras 30 e 31). Em relação ao tempo total de resposta foi observado um aumento significativo no tempo de resposta da segunda dose quando comparado com a primeira dose (Figura 32).

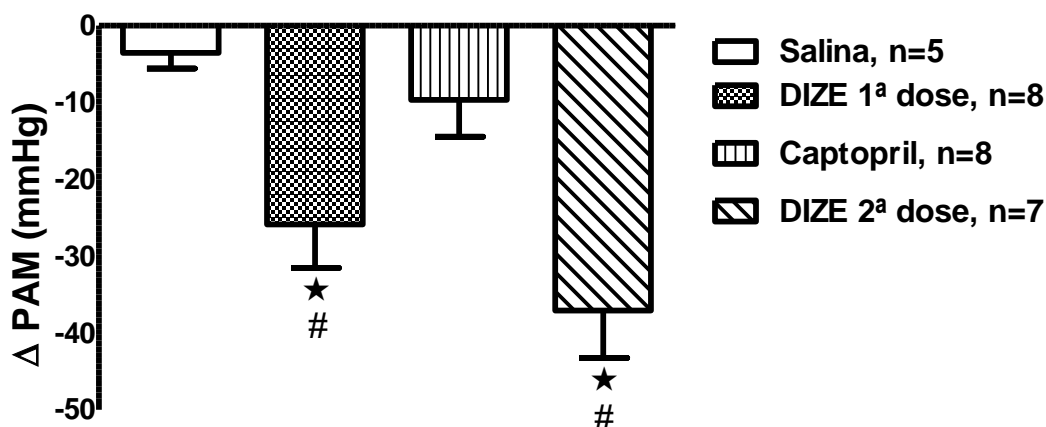


Figura 30: Papel da ECA no efeito do DIZE na PAM de ratos acordados (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

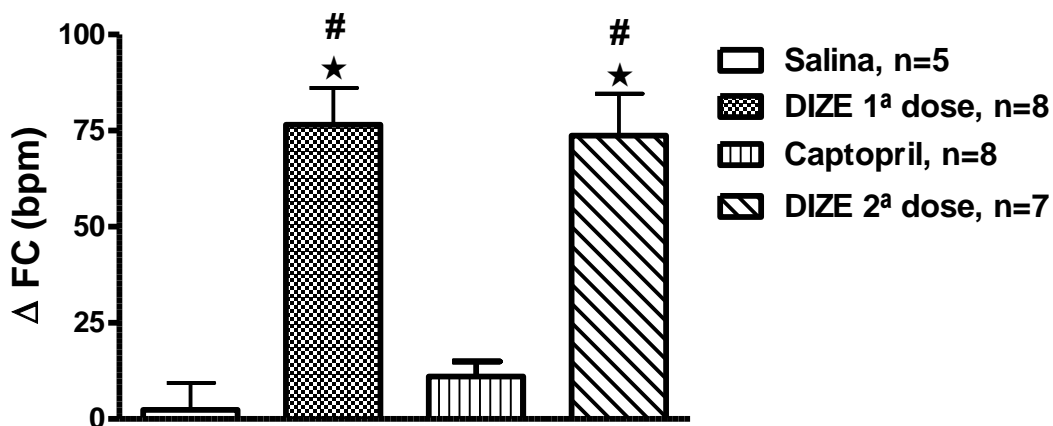


Figura 31: Papel da ECA no efeito do DIZE na FC de ratos acordados. * $P < 0,05$ vs. salina e # $P < 0,05$ vs. Captopril (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

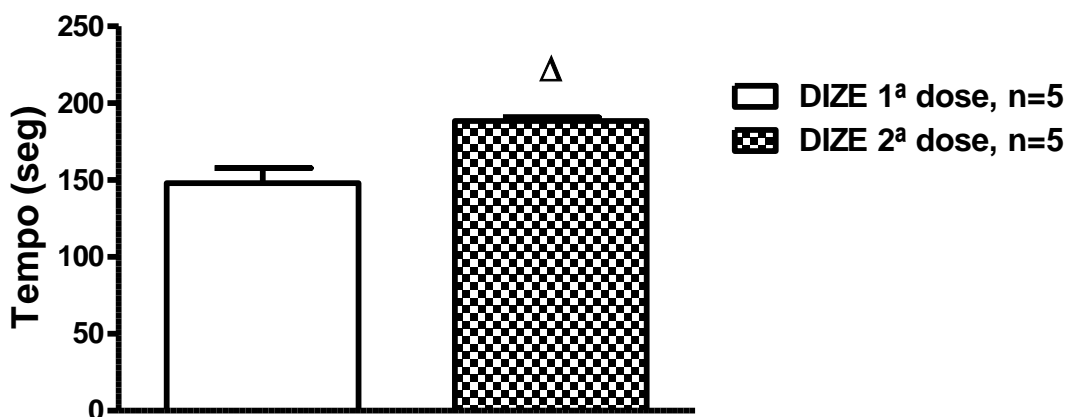


Figura 32: Papel da ECA no efeito do DIZE no tempo total de resposta de ratos acordados. $\Delta P < 0,05$ vs. DIZE 1ª dose do DIZE (Teste t de Student pareado)..

Finalmente, utilizamos o bloqueador do receptor AT_1 de Ang II, o Losartan, para avaliar os mecanismos de ação do DIZE. Na análise dos resultados obtidos, observamos que ambas as injeções do DIZE tiveram efeitos na PA e na FC (Figuras 33 e 34). Isto indica que o bloqueio do receptor AT_1 não interfere nos efeitos do DIZE. Em relação ao tempo total de resposta foi observado um aumento significativo neste tempo na segunda injeção quando comparado com a primeira administração (Figura 35).

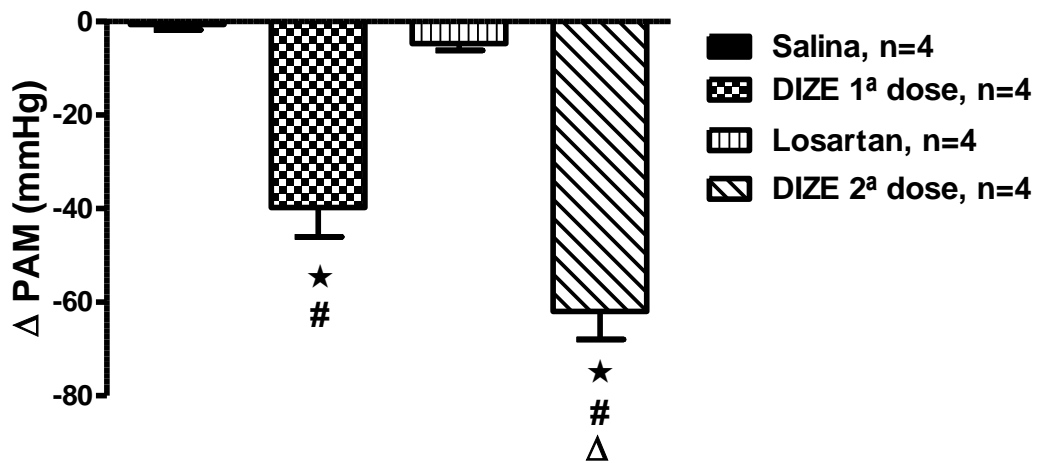


Figura 33: Papel do AT₁ no efeito do DIZE na PAM de ratos acordados. *P<0,05 vs. Salina, #P<0,05 vs. Losartan e ΔP<0,05 vs. DIZE 1ª dose (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

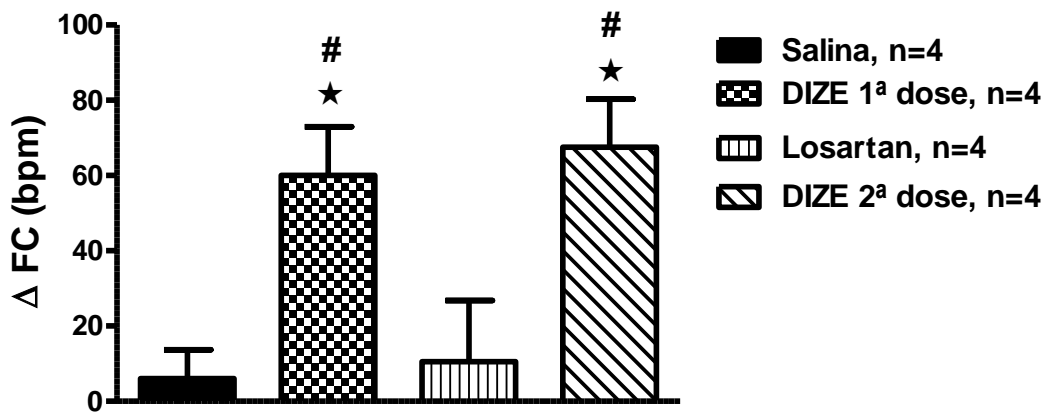


Figura 34: Papel do AT₁ no efeito do DIZE na FC de ratos acordados. *P<0,05 vs. salina e #P<0,05 vs. Losartan (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

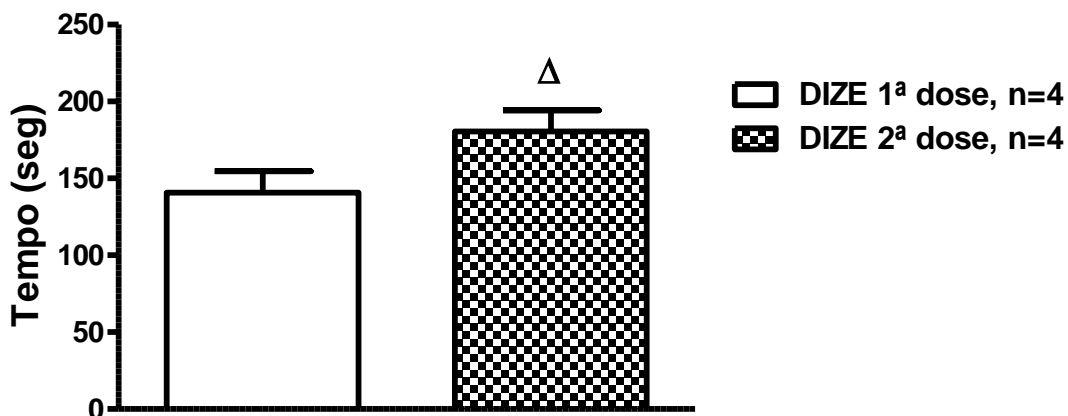


Figura 35: Papel do AT₁ no efeito do DIZE no tempo total de resposta de ratos acordados. $\Delta P < 0,05$ vs. DIZE 1ª dose (Teste t de Student pareado).

4. Microscopia Intravital

Os experimentos utilizando microscopia intravital revelaram que o DIZE causa uma diminuição significativa do fluxo sanguíneo de arteríolas do leito mesentérico de ratos quando comparado com os animais que receberam salina (Figura 36). Não foram observadas alterações significativas no diâmetro vascular de arteríolas do leito mesentérico de animais tratados ou não com DIZE (Figura 37).

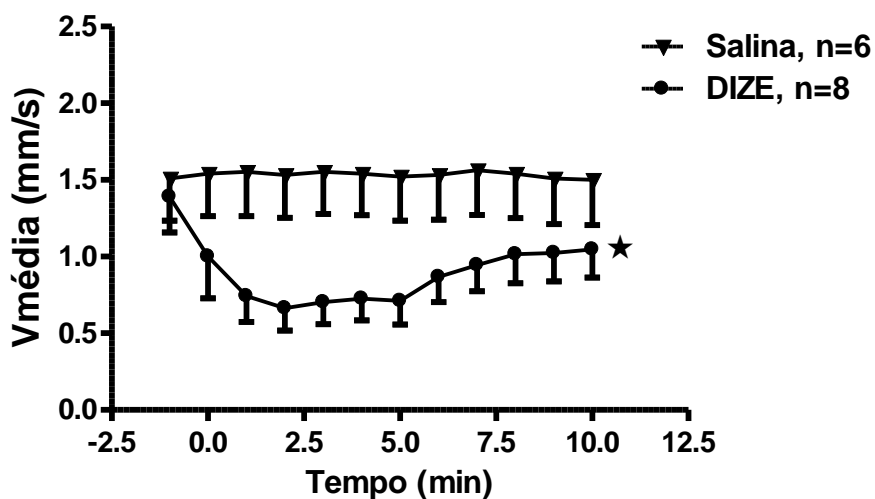


Figura 36: Fluxo mesentérico arteriolar após injeção de salina e DIZE. O leito mesentérico foi observado durante 10 minutos. * $P < 0,05$ vs. Salina (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

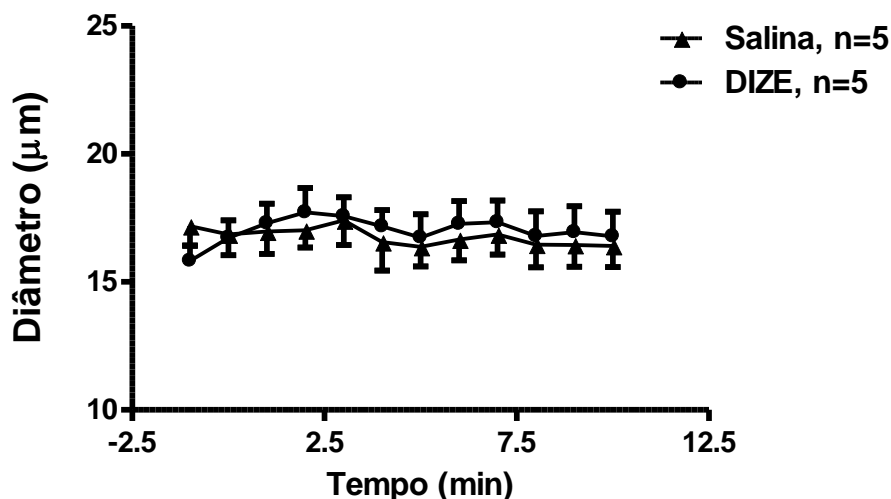


Figura 37: Diâmetro de arteríolas do leito mesentérico após injeção de salina e DIZE. O leito mesentérico foi observado durante 10 minutos. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Posteriormente, analisamos o papel do NO nos efeitos do DIZE no fluxo sanguíneo e no diâmetro de arteríolas do leito mesentérico utilizando o L-NAME. Observamos que, mesmo após o tratamento com o L-NAME, o DIZE continua exercendo os seus efeitos, isto é, diminui significativamente o fluxo sanguíneo sem alterar o diâmetro das arteríolas (Figura 38 e 39), indicando que o NO não participa dos efeitos do DIZE.

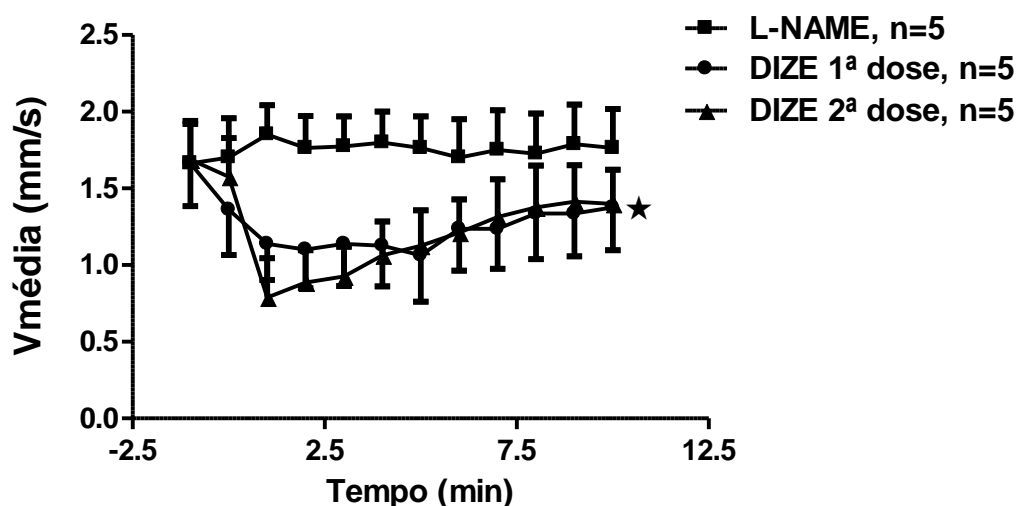


Figura 38: Fluxo mesentérico arteriolar após injeções de DIZE antes e após o tratamento com L-NAME. O leito mesentérico foi observado durante 10 minutos. * $P < 0,05$ L-NAME vs. 1ª dose de DIZE e L-NAME vs. 2ª dose de DIZE (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

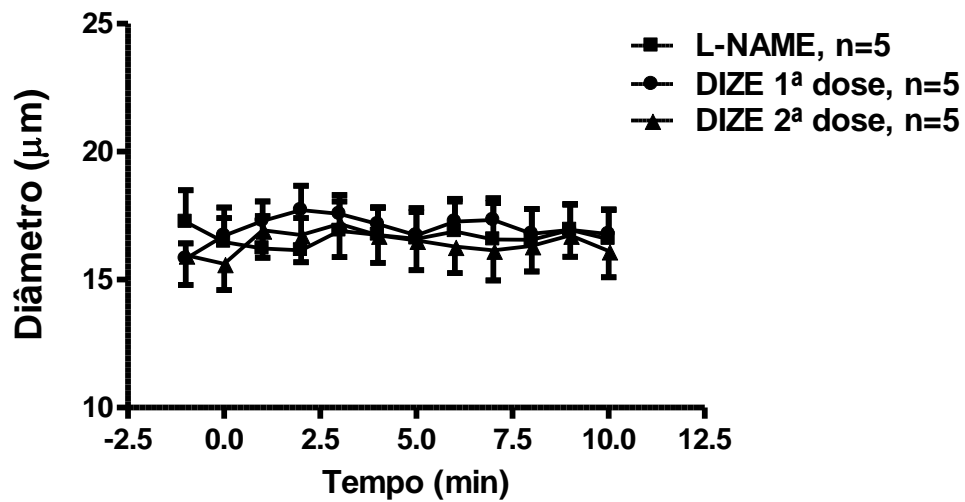


Figura 39: Diâmetro de arteríolas do leito mesentérico após injeções de DIZE antes e após o tratamento com L-NAME. O leito mesentérico foi observado durante 10 minutos. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

VI. DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos pela primeira vez o DIZE como um ativador da ECA2 *in vivo*. Assim como o XNT, o DIZE foi descrito empregando a técnica de *virtual screening* onde, a partir da estrutura cristalizada da enzima e usando dados de bibliotecas virtuais, é possível selecionar pequenas moléculas com potencial para ativar enzimas (Kulemina *et al.* 2011). Os nossos resultados mostraram que o DIZE causa uma queda dose-dependente da PA com um conseqüente aumento da FC em ratos acordados. Estes efeitos opostos na PA e FC estão de acordo com mecanismos reguladores da PA, onde alterações nos níveis pressóricos ativam mecanismos de manutenção com o objetivo de promover o retorno aos valores normais de PA, sendo um destes recursos o barorreflexo (Valenti *et al.* 2009). Estes dados também corroboram com estudos anteriores com o XNT, um outro ativador da ECA2 endógena, onde foi demonstrado que este composto causa um rápido decréscimo da PA quando administrado na veia jugular de ratos normotensos e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Hernandez-Prada *et al.* 2008). É importante ressaltar que o DIZE não é um composto novo, uma vez que ele já é utilizado na prática clínica veterinária, no tratamento da doença Babesiose Canina (Hwang *et al.* 2010). Além disso, estudos com Tripanossomíase e Leishmaniose têm demonstrado que o DIZE pode inibir a replicação do DNA e a atividade respiratória mitocondrial dos patógenos causadores dessas doenças (Hwang *et al.* 2010; Stewart *et al.* 2010; Witola *et al.* 2004).

Para verificar se existe taquifilaxia ou potencialização dos efeitos do DIZE após a administração de doses consecutivas deste composto, realizamos duas injeções do DIZE (5 mg/kg) com intervalo de quinze minutos entre elas. Embora o tempo total de resposta tenha sido maior após a segunda injeção nos grupos tratados com Captopril e Losartan, quando os experimentos foram realizados utilizando apenas o DIZE não houve diferenças estatísticas na PAM, FC e tempo de resposta entre as duas administrações. Assim, em conjunto estes dados sugerem que uma injeção de DIZE não interfere na próxima, não existindo, assim, qualquer efeito taquifilático ou de potencialização.

Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação do DIZE foi utilizado

bloqueadores e inibidores do SRA, uma vez que a ECA2 é a principal enzima formadora de Ang-(1-7) a partir da Ang II (Ferreira, 2009; Ferreira e Santos, 2005). Os resultados obtidos com o A-779, antagonista específico do receptor Mas da Ang-(1-7), mostraram que o bloqueio desse receptor não altera os efeitos do DIZE. De fato, observando a duração das ações do DIZE, é possível perceber que elas são muito rápidas o que não corrobora com o fato de que, para haver a participação da Ang-(1-7) nestes efeitos, o tempo para o início das ações do DIZE deveria ser maior, pois o composto precisa ativar a enzima para que o produto desta reação, a Ang-(1-7), possa se ligar ao receptor Mas. Entretanto, quando analisamos a duração total do efeito observamos que as ações do DIZE são duradouras o que pode sugerir a participação da síntese da Ang-(1-7) e não de um mecanismo do tipo doador de agente vasodilatador como, por exemplo, acontece com o NPS. Assim, estes dados em conjunto sugerem que o efeito do DIZE na PA pode ser dividido em duas fases distintas: a primeira onde há uma resposta imediata que pode ser causada pela ligação do DIZE em um receptor ainda não identificado e a segunda fase que seria mediada por um receptor da Ang-(1-7) insensível ao A-779. É importante ressaltar que ao produzir Ang-(1-7), a ECA2 utiliza a Ang II como substrato o que pode reduzir os seus níveis e, conseqüentemente, contribuir para os efeitos hipotensores do DIZE.

Demonstramos também que o L-NAME não alterou os efeitos do DIZE, indicando que o mecanismo de ação deste composto é independente da liberação NO. Com o objetivo de confirmar este resultado, utilizamos a preparação de Microscopia Intravital para avaliar os efeitos do DIZE e o papel do NO nestas ações. Nessa preparação analisamos o leito mesentérico que é um importante determinante da resistência periférica por ser composto por principalmente arteríolas. Os dados obtidos com a Microscopia Intravital também demonstraram que os efeitos do DIZE são independentes do NO. Estes resultados estão de acordo com o fato das ações do DIZE não terem sido bloqueados pelo A-779, uma vez que vários estudos têm demonstrado que a liberação NO é um dos principais efeitos da Ang-(1-7) quando esta se liga ao Mas (Clayton *et al.* 1998; Gomes *et al.* 2010; Gwathmey *et al.* 2010).

Outro inibidor utilizado foi a Indometacina e observamos que este inibidor não alterou significativamente os efeitos do DIZE na PA e na FC,

indicando que seu mecanismo de ação independe da síntese de prostaglandinas. Vários trabalhos mostram que a liberação de prostaglandinas vasodilatadoras pode estar envolvida nas ações vasculares da Ang-(1-7) dependendo do leito estudado (Castro *et al.* 2005; Benter *et al.* 2006; Lambert *et al.* 2009). Desta maneira, decidimos avaliar o papel destes vasodilatadores como um potencial mecanismo de ação do DIZE. Como relatado anteriormente, a Indometacina não interferiu nos efeitos desta droga, sugerindo mais uma vez que a Ang-(1-7) não está envolvida nas ações do DIZE.

Como o DIZE atua diretamente no SRA ativando a ECA2, avaliamos se drogas clássicas utilizadas para bloquear este sistema poderiam interferir nos efeitos do DIZE. Assim, testamos os papéis da ECA e do receptor AT₁ nas ações do DIZE utilizando o Captopril e o Losartan, respectivamente. Como já era esperado, nem o Captopril nem o Losartan influenciaram na resposta do DIZE na PA e na FC. De fato, partindo do pressuposto de que a formação de Ang-(1-7) a partir da Ang II medeia as ações do DIZE, inibindo a ECA e, conseqüentemente a formação de Ang II, ainda assim poderá haver a formação deste peptídeo diretamente a partir do angiotensinogênio com subsequente quebra da Ang II pela ECA2 formando a Ang-(1-7) que, por sua vez, exercerá seu papel vasodilatador. Finalmente, observamos que o Losartan não bloqueou os efeitos do DIZE nos parâmetros cardiovasculares analisados. Seguindo o raciocínio anterior, bloqueando o AT₁ a Ang II continuará a ser formada e quebrada em Ang-(1-7) pela ECA2, podendo assim, o DIZE exercer seus efeitos.

VII. CONCLUSÃO

O ativador da ECA2 endógena DIZE causa uma significativa diminuição na PA com conseqüente aumento na FC de ratos acordados quando administrado intravenosamente. Estes efeitos são imediatos e duradouros e são independentes dos receptores Mas e AT₁, da ECA e da síntese de NO e de prostaglandinas.

VIII. REFERÊNCIAS

Bader M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: targets for pharmacological therapy. *Annu. Rev. Toxicol*, 50, 439-465, 2010

Baker M, Wayland H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res*, 7, 131–143, 1974

Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. 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*, 209(2), 684-691, 2006

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, 46(4), 937-943, 2005

Clark MA, Debra ID, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) Downregulates the Angiotensin II Type 1 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, 37, 1141-1146, 2001

Clayton JS, Clark KL, Jonhs EJ, Drew GM. Effects of prostaglandins and nitric oxide on the renal effects of angiotensin II in the anaesthetized rat. *British Journal of Pharmacology*, 124, 1467-1464, 1998

Cousin M, Custaud MA, Baron-Menguy C, Toutain B, Dumont O, Guihot AL, Vessières E, Subra JF, Henrion D, Loufrani L. Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*, 55(1), 109-115, 2010

Culman J, Blume A, Gohlke P, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT1-receptor blockers. *Journal of human hypertension*, 16, 64-70, 2002

Dantas APV, Sandberg K. Regulation of ACE2 and Ang-(1-7) in the aorta: new

insights into rennin-angiotensin system in the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, 980-981, 2005

Dilauro M; Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *ScientificWorldJournal*, 9, 522-535, 2009

Diz, D.I. Future directions in cardiovascular pharmacology: examples from the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 8, 222-224, 2008

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*, 37, 703-709, 2001

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 38, 665-668, 2001

Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, 38(4), 499-507, 2005

Ferreira AJ. Novos aspectos do Sistema Renina-Angiotensina: inibidores de renina. *Hipertensão*, 12(4), 151-154, 2009

Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, Raizada MK. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension*, 55(2), 207-213, 2010

Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol*, 96(3), 287-294, 2011

Fraga-Silva R, Sorg BS, Wankhede M, Deugd C, Jun JY, Baker MB, Li Y, Castellano RK, Katovich MJ, Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol Med*, 16(5-6), 210-215, 2010

Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol*, 154, 804–813, 1995

Giestas A, Palma I, Ramos MH. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e sua modelação farmacológica. *Acta Med Port*, 23, 677-688, 2010

Gomes ERM, Lara AA, Almeida PWM, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RAS, Guatimosin S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. *Hypertension*, 55, 153-160, 2010

Goossens GH, McQuaid SE, Dennis AL, van Baak MA, Blaak EE, Frayn KN, Saris WH, Karpe F. Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *J Physiol*, 571, 451-460, 2006

Goossens GH, Johan WEJ, Black EE, Schiffers PM, Win HM. Endocrine role of Renin-angiotensin System in human adipose tissue and muscle: effect of B-adrenergic stimulation. *Hypertension*, 49, 542-547, 2007

Gurley SB, Alfred A, Le TH. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2218-2225, 2006

Gwathmey TYM, Pendergrass KD, Reid SD, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Angiotensin-(1-7)-Angiotensin-Converting Enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus. *Hypertension*, 55, 166-171, 2010

Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, Ohishi M, Navar LG. Intrarenal AT1 receptor and ACE binding in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiology*, 282, 19-25, 2002

Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, Castellano RK, Lampkins AJ, Gubala V, Ostrov DA, Raizada MK. Structure-Based Identification of Small-Molecule Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activators as Novel Antihypertensive Agents. *Hypertension*, 51, 1312-1317, 2008

Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernández Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, Ostrov DA. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. *Hypertension*, 44(6), 903-906, 2004

House SD, Lipowsky HH. Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res*, 34, 363–379, 1987

Hwang SJ, Yamasaki M, Nakamura K, Sasaki N, Murakami M, Wickramasekara Rajapakshage BK, Ohta H, Maede Y, Takiguchi M. Development and characterization of a strain of *Babesia gibsoni* resistant to diminazene aceturate in vitro. *J Vet Med Sci*, 72(6), 765-771, 2010

Ingelfinger JR. Aliskiren and dual therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 358(23), 2503-2505, 2008

Jean-Moreno RR, Goyeneche D, Coombs GH, Walker J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Experimental Parasitology*, 112, 21–30, 2006

Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: form angiotensin I to angiotensin-(1-7). *Cardiovascular Research*, 73, 463-469, 2007

Kroubi M, Daulouede S, Karembe H, Jallouli Y, Howsam M, Mossalayi D, Vincendeau P, Betbeder D. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology*, 21, 2010

Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*, 95, 2510–2519, 1995

Kubes P, Heit B, van Marle G, Johnston JB, Knight D, Khan A, Power C. In vivo

impairment of neutrophil recruitment during lentivirus infection. *J Immunol*, 171(9), 4801-4808, 2003

Kubo-Inoue M, Egashira K, Usui M, Takemoto M, Ohtani K, Katoh M, Shimokawa H, Takeshita A. Long-term inhibition of nitric oxide synthesis increases arterial thrombogenicity in rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(4), 478-484, 2002

Kulemia LV, Ostrove DA. Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *Journal of Biomolecular Screening*, 16(8), 878-885, 2011

Lambert, D.W.; Clarke, N.E.; Turner, A.J. Not just angiotensinases: new role for the angiotensin-converting enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.*67, 89-98, 2009

Lula I, Denadai AL, Resende JM, de Sousa FB, de Lima GF, Pilo-Veloso D, Heine T, Duarte HA, Santos RA, Sinisterra RD. Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. *Peptides*, 28(11), 2199-2210, 2007

Ma TKW, Kam KKH, Yan BP, Lam YY. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1273-1292, 2010

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the rennin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 367-374, 2008

Moura MM, Santos RAS, Fontes MAP. Evidence for a functional cardiac interaction between losartan and angiotensin-(1-7) receptors revealed by orthostatic tilting test in rats. *British Journal of Pharmacology*, 144, 755-760, 2005

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Mitchell KD. Renal actions of angiotensin II at AT1 receptor blockers. In: Epstein M, Brunner HR, eds.

Angiotensin II Receptor Antagonists. *Philadelphia, PA: Hanley & Belfus, Inc;*
189–214, 2000

Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, 26, 1154-1159, 1995

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, 44(4), 490-496, 2004

Roks AJM, Greel PPV, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, Zeeuw D, Gilst WHV. Angiotensin-(1-7) is a modular of the human Renin-Angiotensin System. *Hypertension*, 34, 296-301, 1999

Santos CF, Akashi AE, Dionísio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS, Oliveira SH, Pereira HJ, Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol*, 80(1), 130-139, 2009

Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, Leite MF, Lemos VS, Silva DMR, Guerra MT, Khosla MC. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-Pro⁷-Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 41, 737-743, 2003

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP. Expression of na angiotensin-(1-7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological Genomics*, 17, 292-299, 2004

Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, Dutra de Paula R, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension*, 47, 996-1002, 2006

Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 16(2): 122-8, 2007

Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, 93(5), 519-527, 2008

Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Med Invest*, 57(1-2), 12-25, 2010

Savergnini SQ, Beiman M, Lautner RQ. Vascular relaxation, antihypertensive effects, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the Mas receptor. *Hypertension*, 56, 112-120, 2010

Stewart ML, Burchmore RJ, Clucas C, Hertz-Fowler C, Brooks K, Tait A, Macleod A, Turner CM, De Koning HP, Wong PE, Barrett MP. Multiple genetic mechanisms lead to loss of functional TbAT1 expression in drug-resistant trypanosomes. *Eukaryot Cell*, 9(2), 336-343, 2010

Suzuki J, Horiuchi M. Renin-angiotensin system and heart failure. *Nippon Rinsho*, 61(5), 751-755, 2003

Tran Y Le, Foster C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 30(5), 676-682, 1997

Trask AJ, Averill DB, Ganten D, Chappell MC, Ferrario CM. Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(6), 3019-3024, 2007

Vaajanen A, Lakkisto P, Virtanen I, Kankuri E, Oksala O, Vapaatalo H, Tikkanen I. Angiotensin receptors in the eyes of arterial hypertensive rats. *Acta Ophthalmologica*, 88, 431-438, 2010

Valenti VE, Ferreira C, Meneghini A, Ferreira M, Filho CF, Murad N, Correa JA, Abreu LC, Colombar E. Avaliação da Função Barorreflexa em Ratos Jovens

Espontaneamente Hipertensos. *Arq Bras Cardiol*, 92(3), 216-221, 2009

Vijayaraghavan K, Deedwania P. Renin-angiotensin-aldosterone blockade for cardiovascular disease prevention. *Cardiology Clinics*, 29(1), 137-156, 2011

Witola WH, Inoue N, Ohashi K, Onuma M. RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. *Exp Parasitol*, 107, 47-57, 2004

Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA. Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience*, 164(13), 1360-1368, 2009

Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension*, 47(4), 718-726, 2006

Zeng W, Chen W, Leng X, He JG, Ma H. Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*, 389(1), 138-144, 2009

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 156/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos do ativador da enzima conversora de angiotensina 2 (dize) na pressão arterial de ratos**", que tem como responsável(is) **Anderson José Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 09/2010**.

Este certificado expira-se em **22/ 09/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 156/2010**, related to the project entitled "**Effects of the angiotensin-converting enzyme 2 activator (dize) in the arterial pressure of rats**", under the supervisors of **Anderson José Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 22, 2010**.

This certificate expires in **September 22, 2015**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2010.


Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)