

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**Participação da Enzima Conversora de Angiotensina 2
na Fisiopatologia do Sistema Cardiovascular: Papel
nos efeitos do Treinamento Físico e na Hipertensão
Arterial**

Marilda Luz de Andrade De Maria

Belo Horizonte – MG

2015

Marilda Luz de Andrade De Maria

**Participação da Enzima Conversora de Angiotensina 2
na Fisiopatologia do Sistema Cardiovascular: Papel
nos efeitos do Treinamento Físico e na Hipertensão
Arterial**

Tese 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 Doutora em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2015

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Fisiologia Renal do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

Contou com o auxílio 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 me fazendo seguir em frente, aos meus pais e ao meu amor, que com muito amor e compreensão, sempre me apoiaram ao longo dessa caminhada.

“A vida é feita de capítulos. Não é porque um foi ruim que
você vai desistir da história inteira.”

Autor Desconhecido

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha base nas horas boas e principalmente nas horas difíceis. Agradeço por dar-me forças e sabedoria para concluir mais essa etapa de minha vida;

Aos meus pais, meu exemplo de vida, pelo carinho, amor e dedicação presente em todos os dias de minha vida. Obrigada pela compreensão, força e apoio;

A minha família pelo incentivo e ajuda nos momentos difíceis. Cada um de uma maneira diferente contribuiu para esta vitória;

Aos meus sobrinhos que foram responsáveis pelos momentos de distração, alegrias e pelo carinho sincero;

Ao meu amor pela paciência, compreensão, carinho. Por estar ao meu lado durante esta jornada me dando força para prosseguir sempre e me mostrar o lado bom do amor;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, pela orientação e aprendizado. Obrigado pelas lições que levarei por toda minha vida profissional;

A minha amiga Micena, por tudo que ela me ensinou, amizade, e principalmente por me mostrar a Anatomia e sempre torcer por mim;

Aos amigos de laboratório pelo companheirismo e união. Esses anos de convívio foram formidáveis!!! Agradeço em especial a Letícia, a Pat, a Ju e a Tati que me auxiliaram nas horas que mais precisei;

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

Ao Professor Remo e seu aluno Lucas pela ajuda nos experimentos com hidroxiprolina;

A todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho;

A todas as secretárias que passaram pela secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelo carinho e atenção;

Ao CEBIO pelo fornecimento de animais;

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

RESUMO

Estudos clínicos e experimentais mostram que o sistema renina angiotensina desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase corporal e que a ativação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) endógena resulta em vários efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Recentemente, um novo ativador da ECA2, chamado Aceturato de Diminazeno (DIZE), foi descrito. Neste trabalho foi avaliada as ações desse composto em parâmetros cardiovasculares e renais de ratos submetidos ao treinamento físico ou a hipertensão renovascular, bem como os mecanismos de ações na vasodilatação de anéis aórticos. Para isso, ratos Wistar foram submetidos ao treinamento físico de natação ou foram submetidos à cirurgia de 2 rins 1 clipe para induzir hipertensão renovascular. Os animais foram tratados por 4 semanas com salina, DIZE ou captopril via gavagem. Os resultados mostraram que o DIZE não interferiu na hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo treinamento físico. Analisando os animais com hipertensão renovascular, foi observado que o DIZE causou uma diminuição na pressão arterial semelhante ao efeito hipotensor causado pelo captopril. Além disso, este composto também impediu o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, fibrose cardíaca e disfunção renal induzida pela hipertensão. A técnica de vasos isolados revelou que os efeitos vasodilatadores do DIZE são dependentes de ativação do receptor Mas e da liberação de óxido nítrico. Assim, esses dados sugerem que o DIZE desempenha um papel importante na homeostasia dos sistemas cardiovascular e renal, possivelmente por um mecanismo envolvendo Mas e óxido nítrico.

Palavras chave: Sistema renina angiotensina; Hipertensão renovascular; Enzima conversora de angiotensina 2; Aceturato de diminazeno; Treinamento físico; Vasodilatação arterial

ABSTRACT

Clinical and experimental studies have shown that the renin-angiotensin system plays a key role in maintaining the homeostasis and that activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) results in various beneficial effects in the cardiovascular system. Recently, a new ACE2 activator, named Diminazene Aceturate (DIZE), was discovered. This present study evaluated the actions of this compound in cardiovascular and renal parameters of rats submitted to physical training or renovascular hypertension, as well as the mechanisms of action underlying the vasodilation of isolated aortic rings. For this, Wistar rats were submitted to swimming training or to 2-kidney 1-clip surgery to induce renovascular hypertension. Animals were treated for 4 weeks with saline, captopril or DIZE by gavage. The results showed that DIZE did not interfere in the cardiac physiological hypertrophy induced by physical training. DIZE caused a significant decrease in blood pressure similar to the hypotensive effect induced by captopril in hypertensive rats. In addition, this compound also prevented the development of cardiac hypertrophy, cardiac fibrosis and renal dysfunction provoked by hypertension. The isolated vessels technique revealed that the vasodilatory effects of DIZE are dependent on Mas receptor and nitric oxide release. Thus, these data suggest that DIZE plays an important role in the homeostasis of the cardiovascular and renal systems, likely by a mechanism involving Mas and nitric oxide.

Key words: Renin-angiotensin system; Renovascular hypertension; Angiotensin-converting enzyme 2; Diminazene acetate; Physical training; Arterial vasodilation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do SRA.....	17
Figura 2: Representação esquemática da formação da Ang II e seus efeitos em diferentes órgãos.....	18
Figura 3: Representação esquemática da formação da Ang-(1-7) e seus efeitos em diferentes órgãos.....	19
Figura 4: Representação esquemática dos eixos contra regulatórios do SRA.....	21
Figura 5: Representação esquemática dos grupos experimentais.....	30
Figura 6: Representação esquemática do sistema de perfusão.....	35
Figura 7: Tempo total do TEM nos grupos experimentais.....	38
Figura 8: Variação do peso corporal durante o período de treinamento.....	39
Figura 9: Relação entre o peso corporal e o comprimento da tíbia nos grupos sedentários e treinados	39
Figura 10: Relação entre o peso do coração e peso corporal nos grupos sedentários e treinados	40
Figura 11: Efeitos do DIZE na PAM de ratos sedentários e treinados.....	40
Figura 12: Efeitos do DIZE na FC de ratos sedentários e treinados.....	41
Figura 13: Efeitos do DIZE na pressão diastólica de ratos sedentários e treinados.....	41
Figura 14: Efeitos do DIZE na pressão sistólica de ratos sedentários e treinados.....	41
Figura 15: Peso dos rins esquerdo e direito após cirurgia de 2R1C nos grupos experimentais	42
Figura 16: Efeitos do DIZE na PAM de ratos após cirurgia de 2R1C.....	43

Figura 17: Efeitos do DIZE na FC de ratos após cirurgia de 2R1C	43
Figura 18: Relação entre o peso corporal e o comprimento da tíbia de ratos após cirurgia de 2R1C	44
Figura 19: Diâmetro dos cardiomiócitos de ratos após cirurgia de 2R1C	44
Figura 20: Concentração de hidroxiprolina em corações de ratos após cirurgia de 2R1C	45
Figura 21: Efeitos do DIZE na tensão sistólica de ratos após cirurgia de 2R1C.....	46
Figura 22: Efeitos do DIZE na tensão diastólica de ratos após cirurgia de 2R1C.....	46
Figura 23: Efeitos do DIZE na +dT/dt de ratos após cirurgia de 2R1C.....	47
Figura 24: Efeitos do DIZE na -dT/dt de ratos após cirurgia de 2R1C.....	47
Figura 25: Efeitos do DIZE no fluxo coronariano de ratos após cirurgia de 2R1C.....	48
Figura 26: Efeitos do DIZE na FC de ratos após cirurgia de 2R1C.....	48
Figura 27: Efeitos do DIZE na ingesta hídrica de ratos após cirurgia de 2R1C.....	49
Figura 28: Efeitos do DIZE na excreção de urina de ratos após cirurgia de 2R1C.....	50
Figura 29: Efeitos do DIZE na excreção de proteínas de ratos após cirurgia de 2R1C.....	50
Figura 30: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações, no relaxamento de anéis aórticos	51
Figura 31: Papel do Mas no efeito do DIZE no relaxamento de anéis aórticos.....	52

Figura 32: Papel do NO no efeito do DIZE no relaxamento de anéis
aórticos.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
PA	Pressão Arterial
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
AT1	Receptor tipo 1 para Angiotensina II
AT2	Receptor tipo 2 para Angiotensina II
AMP	Aminopeptidases
NEP	Endopeptidase neutra
PEP	Prolilpeptidase
PCP	Prolilcarboxipeptidase
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
NO	Óxido nítrico
XNT	1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil)sulfonil]oxi]-9H-xantona-9
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
DIZE	Aceturato de Diminazeno
TNF- α	Fator de necrose tumoral
2R1C	2 rins e 1 clipe
FC	Frequência cardíaca
PAM	Pressão arterial média
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
TEM	Teste de esforço máximo
VE	Ventrículo esquerdo
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl Ester

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	15
1.1. Sistema Renina Angiotensina.....	15
1.2. Ativação da ECA2 endógena.....	22
1.3. Hipertensão renovascular	23
1.4. Treinamento Físico	25
II. JUSTIFICATIVA	27
III. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais.....	29
4.2. Tratamento Crônico com o Dize.....	29
4.3. Treinamento Físico - Natação.....	29
4.4. Registro de parâmetros cardiovasculares.....	31
4.5. Hipertensão Renovascular.....	31
4.6. Histologia.....	32
4.7. Quantificação de hidroxiprolina tecidual.....	33
4.8. Avaliação da função cardíaca.....	33
4.9. Avaliações da função renal.....	35
4.10. Experimentos de reatividade vascular.....	36
4.11. Análise Estatística.....	37
V. RESULTADOS	38
5.1. Parâmetros cardiovasculares após treinamento físico.....	38
5.2. Efeitos do DIZE na hipertensão renovascular.....	42
5.3. Efeitos do DIZE nos parâmetros renais.....	49
5.4. Efeitos do DIZE em vaso isolado.....	50
VI. DISCUSSÃO	53
VII. CONCLUSÕES	61
VIII. ANEXO	62
IX. REFERÊNCIAS	70

I. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema renina-angiotensina

Classicamente, o sistema renina-angiotensina (SRA) é descrito como uma cascata hormonal que controla principalmente as funções cardiovascular, renal e adrenal (Dilauro *et al.* 2009; Harrison-Bernard *et al.* 2002; Keidar *et al.* 2007; Navar *et al.* 2000; Peach, 1977; Santos *et al.* 2004). Este sistema é formado por uma sequência de eventos bioquímicos, sendo que os principais elementos constituintes são o angiotensinogênio, a renina, a Angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a Angiotensina II (Ang II). O SRA participa do controle da pressão arterial (PA) através do 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 estresse 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). A existência de vários componentes deste sistema distribuídos no organismo já está bem consolidada, pois diversos estudos evidenciaram a presença deste sistema em vários órgãos, tais como, vasos, coração, cérebro, rim, testículo, músculo esquelético, pulmão, fígado, tecido adiposo, pâncreas e olho (Santos *et al.* 2006; Santos *et al.* 2009). Assim, qualquer alteração neste sistema poderá ocasionar desenvolvimento de várias doenças, como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca.

A formação dos peptídeos do SRA (Figura 1) se inicia com a clivagem

do angiotensinogênio, secretado principalmente pelo fígado, apesar de poder ser sintetizado em baixas quantidades em outros tecidos, como coração, rins, vasos, tecido adiposo e cérebro, pela renina com a formação de Ang I. Essa etapa é um ponto limitante para o início da cascata do SRA (Atlas, 1998; Page e Helmer, 1940; Skeggs *et al.* 1956).

A Ang I é um decapeptídeo biologicamente inativo que, quando clivado pela ECA, dá origem ao octapeptídeo Ang II, principal peptídeo vasoativo do SRA (Ng e Vane, 1967). A geração de outro importante componente deste sistema, a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] ocorre através de vias enzimáticas diferentes daquelas observadas na formação da Ang II, sendo a mais importante e eficiente aquela mediada pela enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que converte a Ang II em Ang-(1-7) (Donoghue *et al.* 2003; Tipnis *et al.* 2000; Vickers *et al.* 2002; Rice *et al.* 2004).

Um dos principais componentes deste sistema é a Ang II. Além de sua formação através da quebra da Ang I pela ECA e, menos frequentemente pela quimase e captesina 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 1).

para liberação de aldosterona e consequente retenção de sódio (Ma *et al.* 2010; Vijayaraghavan *et al.* 2011; Bader, 2010). Além disso, estudos têm mostrado que os receptores AT1 e AT2 são abundantemente expressos no sistema nervoso central (SNC) e que a Ang II também está envolvida em funções como a cognição, memória, percepção da dor, comportamento sexual, ansiedade, depressão e estresse (Bader, 2010; Culman *et al.* 2002; Kangussu *et al.* 2013,2015) (Figura 2).

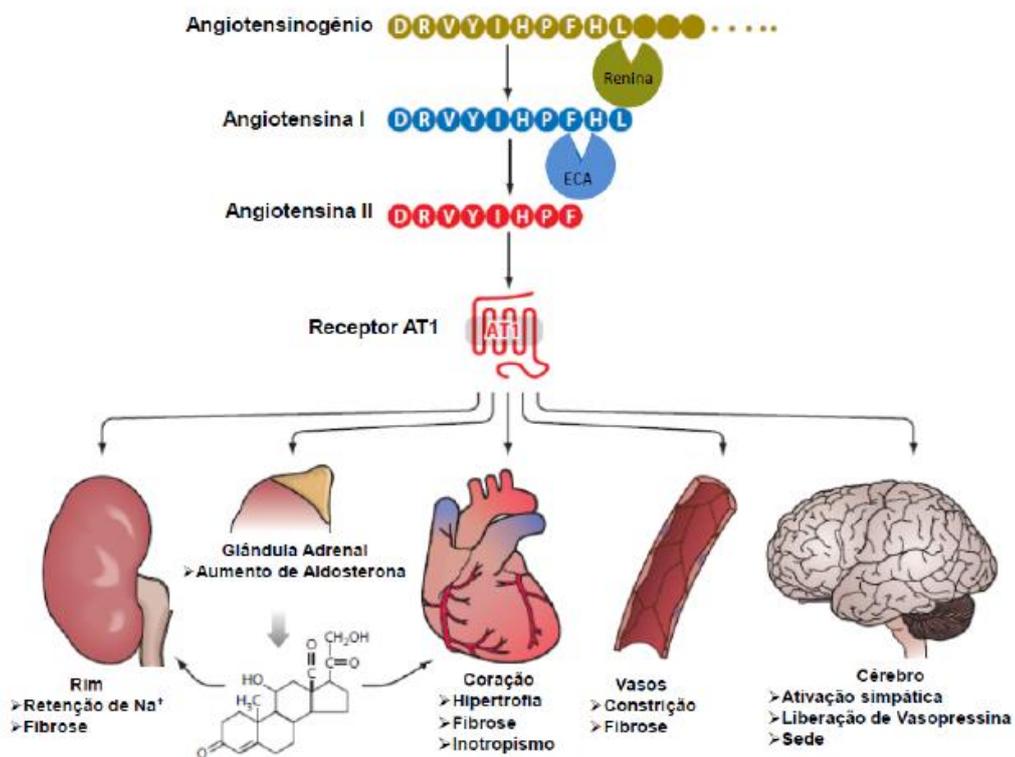


Figura 2: Representação esquemática da formação de Angiotensina II e seus efeitos em diferentes órgãos (Modificado de Bader, 2010).

Com o avanço de técnicas de bioquímica e biologia celular, o SRA vem sendo alterado principalmente pela descoberta de novos componentes biologicamente ativos, como a Ang-(1-7). As vias de formação deste peptídeo são a partir da Ang I ou da Ang II, principalmente pela ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), uma vez que a afinidade catalítica da

ECA2 é muito maior pela Ang II do que pela Ang I (Dilauro e Burms, 2009; Donoghue *et al.* 2000; Ferreira e Santos, 2005; Tipnis *et al.* 2000; Vickers *et al.* 2002) (Figura 3). Além disso, este peptídeo exerce seus efeitos através da interação com o receptor Mas, podendo exercer ações similares, distintas e na maior parte das vezes opostas às da Ang II (Santos *et al.* 2003). Estudos mostram que a Ang-(1-7) exerce efeitos morfofuncionais diretos no sistema cardiovascular, incluindo vasodilatação, inibição da proliferação celular em diferentes espécies, aumento do fluxo urinário e da excreção de sódio e estimula a liberação de bradicinina (Brosnihan *et al.* 1996; Handa *et al.* 1996; Faria-Silva *et al.* 2005; Fernandes *et al.* 2005)

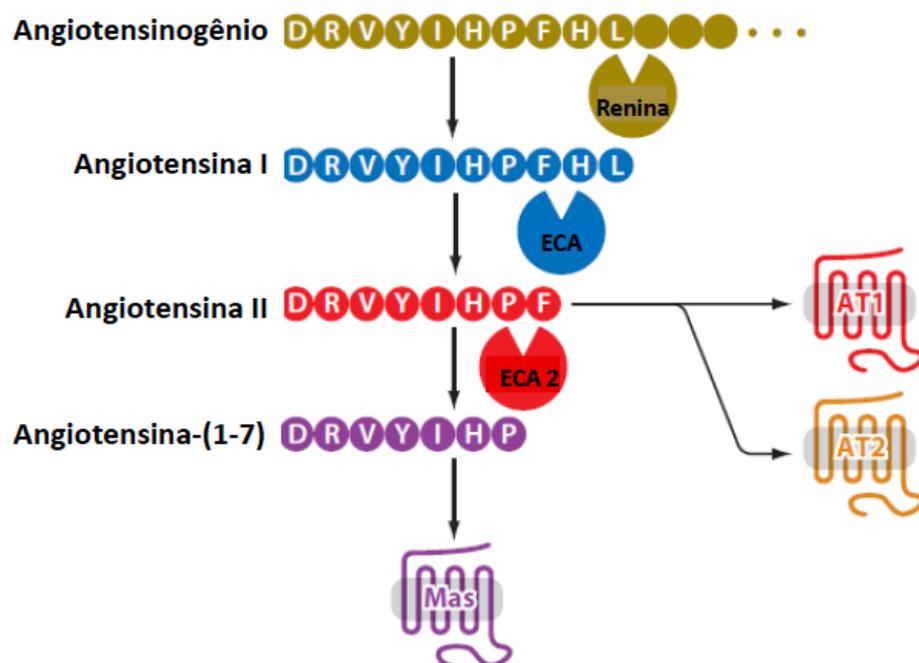


Figura 3: Representação esquemática da formação da Angiotensina-(1-7) (Modificado de Bader, 2010).

Um dos efeitos da Ang-(1-7) que merece destaque é a sua capacidade de regular a expressão de proteínas da matriz extracelular e o remodelamento

cardíaco. Estudo realizado por Iwata *et al.*, 2005, mostrou que este peptídeo liga-se a fibroblastos cardíacos de ratos adultos, exercendo um papel crítico na remodelação cardíaca. O tratamento destas células com Ang-(1-7) inibiu o aumento de síntese de colágeno induzidos por Ang II. Em ratos com deleção genética do receptor Mas foi observado um comprometimento da função cardíaca associada a um aumento significativo na expressão de colágeno do tipo I, III e fibronectina no coração (Santos *et al.* 2006, Gava *et al.* 2012).

O endotélio desempenha um importante papel na manutenção da homeostase vascular pela síntese e liberação de vários fatores vasoativos. Os vasos sanguíneos são locais potencialmente importantes para a formação e ação da Ang-(1-7) e os tecidos vasculares contêm todos os componentes do SRA (Raffai *et al.* 2014). Estudos mostraram que a Ang-(1-7) exerce efeitos diretos nos vasos, incluindo vasodilatação através da estimulação da liberação de óxido nítrico (NO) e de prostaciclina e inibição da proliferação celular em diferentes espécies (Ferreira *et al.* 2011; Gwathmey *et al.* 2010; Gurley *et al.* 2006; Yamamoto *et al.* 2006). As ações da Ang-(1-7) em vasos coronários incluem alterações bioquímicas e funcionais que conduzem à vasodilatação, quer diretamente em anéis de artéria ou indiretamente através da potencialização da bradicinina ou opondo às ações da Ang II (Santos *et al.* 2000).

Atualmente, o SRA vem sendo ampliado e se tornando mais complexo, destacando-se a presença de dois eixos nesse sistema (Figura 4). O primeiro, composto por ECA, Ang II e receptor AT1, induz principalmente efeitos vasoconstritores, proliferativos e fibróticos. O segundo, composto pela ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas, exerce ações contraregulatórias ao primeiro

eixo (Herath *et al.* 2013; Santos *et al.* 2000; Probstfield *et al.* 2010). O equilíbrio entre estes dois eixos é de extrema importância para a manutenção da homeostase corporal. Assim, nesse contexto, uma enzima de fundamental importância para o equilíbrio deste sistema é a ECA2, pois contrarregula 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. 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).

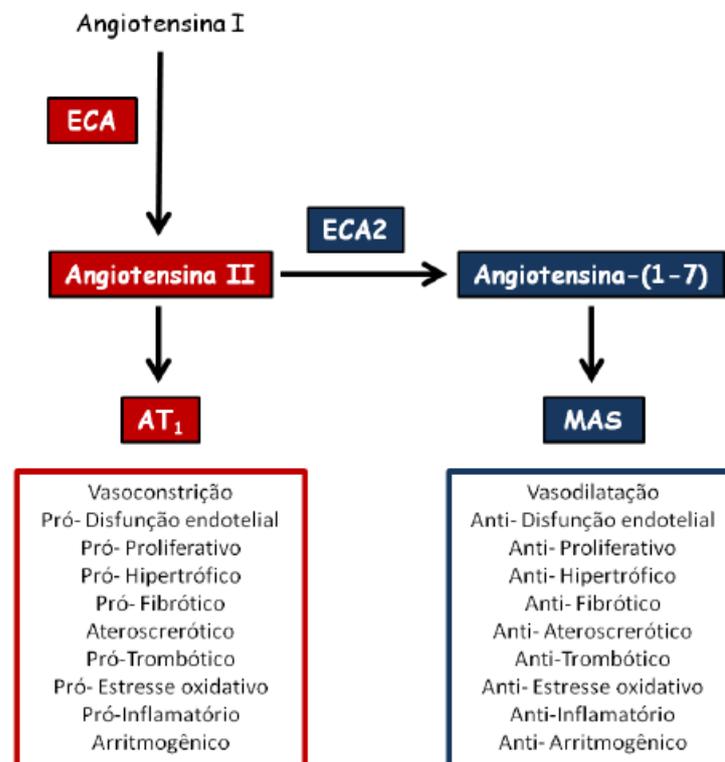


Figura 4: Eixos do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AT₁: receptor de Ang II do tipo 1; Mas: receptor de Ang-(1-7).

1.2. Ativação da ECA2 endógena

Como a ECA2 é importante para o equilíbrio do SRA, vários trabalhos têm avaliado os efeitos da ativação desta enzima em diversas patologias. Através da técnica de *screening* virtual da ECA2 cristalizada, o composto 1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil]sulfonyl]oxi]-9H-xantina-9 (XNT) foi identificado como um ativador da ECA2 (Hernandez-Prada *et al.* 2008). Esse composto aumenta em várias vezes a atividade dessa enzima em ensaios *in vitro*. Além disso, *in vivo* ele causa um rápido decréscimo da pressão arterial quando administrado na veia jugular de ratos normotensos e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e reverte a fibrose cardíaca e renal induzida pela hipertensão (Hernandez-Prada *et al.* 2008).

Usando a mesma técnica utilizada para a identificação do XNT, o composto aceturato de diminazeno (DIZE) foi descrito como um ativador da ECA2 (Kulemina *et al.* 2011). Este composto é utilizado usualmente como um antiparasitário em clínicas veterinárias, pois possui atividade tripanocida e leishmanicida (Jean Moreno *et al.* 2006, Kroubi *et al.*, 2010).

Atuando como um ativador da ECA2 endógena, estudos recentes demonstraram que o DIZE previne o desenvolvimento de hipertensão pulmonar por estimular o eixo vasoprotetor do SRA, diminuindo os níveis de citocinas inflamatórias e melhorando a função cardíaca (Shenoy *et al.* 2013; K. Rigatto *et al.* 2013). O tratamento crônico com o DIZE reduziu a pressão intraocular em ratos, sendo que esse efeito foi parcialmente mediado pelo receptor Mas (Foureaux *et al.* 2013). Além disso, o DIZE tem efeito protetor em várias condições patológicas, como isquemia cardíaca (Qi *et al.* 2013), cardiomiopatia diabética (Coutinho *et al.*, 2014) e na inflamação ocular em camundongos com

uveíte (Qiu *et al.* 2014).

Estudos recentes têm sugerido que o DIZE é um composto com ações anti-inflamatórias, pois afeta o sistema imune diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 6 e 12 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Kuriakose e Jude, 2014).

No sistema cardiovascular, o DIZE atenua o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, previne mudanças disfuncionais na dP/dt (medida direta derivada da pressão ventricular), diminui a área infartada e reduz o processo inflamatório e a apoptose em ratos infartados (Qi *et al.* 2013). Já em ratos diabéticos, foi demonstrado que a ativação da ECA2 com o DIZE provoca mudanças na repolarização ventricular, melhorando a função elétrica cardíaca (Coutinho *et al.* 2014). Além disso, esse composto também apresenta ação antiarrítmica independente do Mas e do NO (Joviano-Santos, 2015).

1.3. Hipertensão renovascular

A elevação da PA é um fator de risco poderoso, independente e o mais importante para doenças cardiovasculares. Além disso, a hipertensão se tornou a maior doença endêmica no mundo (Frang *et al.* 2005; Pescatello *et al.* 2004). De acordo com o Comitê de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão, esta patologia é definida por um valor da pressão arterial sistólica de 140 mmHg ou mais e pressão diastólica de no mínimo 90 mmHg. Atualmente, surgiu o termo pré-hipertenso, em que os valores da pressão arterial sistólica e diastólica são, respectivamente, de 130 a 139 mmHg e de 85 a 89 mmHg e requerem modificações que promovam melhora no estilo de vida para prevenir a progressão da hipertensão e o surgimento de doenças

cardiovasculares (Ministério da Saúde, 2010). Quando não tratada, a hipertensão pode causar sérios problemas, como doença coronariana, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, doença renal, doença vascular periférica e doenças cerebrais, contribuindo, assim, para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade no mundo inteiro (Frang *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2002). Por esta razão, modificações no estilo de vida, incluindo alimentação e exercício físico, são as primeiras linhas de intervenção para o controle de PA, mesmo quando terapia medicamentosa é implementada.

O SRA tecidual e circulante, central e periférico parecem estar envolvidos no desenvolvimento e manutenção das várias formas de hipertensão, tais como a hipertensão renal (Dzau *et al.* 1986; Ferrario *et al.* 1990; Brody *et al.* 1991). A hipertensão renovascular é definida como um aumento da PA causado por uma lesão estenótica ou obstrutiva na artéria renal e acomete entre 2% e 5% da população hipertensa (Voiculescu *et al.* 2001).

Em 1934, Goldblatt e colaboradores produziram um modelo de hipertensão renal através do clampeamento da artéria renal em cães. Este modelo conhecido como 2 rins e 1 clipe (2R1C) serviu como base para estudos subsequentes sobre hipertensão, pois ele se assemelha muito à hipertensão renovascular humana. Neste modelo, apenas uma artéria é submetida a estenose e, quando o fluxo sanguíneo renal diminui, eleva a liberação de renina pelas células justaglomerulares dos rins, induzindo a ativação excessiva do SRA e aumentando a Ang II circulante. Principalmente devido ao efeito vasoconstritor deste peptídeo, a constrição das arteríolas aumenta a resistência periférica total, levando a hipertensão. A segunda forma pela qual a Ang II eleva a PA é diminuindo a excreção de sal e água pelos rins, o que

aumenta o volume extracelular e, conseqüentemente, a volemia ao estimular a secreção de aldosterona e de hormônio antidiurético (Gynton & Hall, 2011). Em geral, o aumento da PA se inicia poucos minutos após a redução do fluxo renal, atingindo um platô em 2 a 3 semanas (Frazan Jr. *et al.* 2001).

Nos últimos anos, o papel do SRA na patogênese da hipertensão renovascular tem sido muito estudado e considerado um importante mediador da hipertensão e dos danos cardíaco e renal causados pela mesma. As lesões nos órgãos alvos no modelo de 2R1C são dependentes do grau de estenose e, usualmente, incluem disfunção endotelial, hipertrofia cardíaca (de 20 a 25% de aumento do coração) e hipertrofia do rim contralateral exposto à estenose (Ebrahimi *et al.* 2013; Franchi *et al.* 2013).

1.4. Treinamento físico

O treinamento físico produz diversas adaptações fisiológicas que permitem ao organismo executar uma quantidade maior de trabalho com uma maior eficácia. Estas adaptações variam de acordo com a intensidade, duração e o tipo do exercício (Silveira *et al.* 2007).

Existem vários estudos demonstrando que o exercício físico regular é capaz de beneficiar positivamente a saúde, aumentando a qualidade de vida e produzindo efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Dentre as adaptações mais bem conhecidas no sistema cardiovascular, pode-se destacar a bradicardia no repouso, melhora do controle da PA em indivíduos hipertensos, hipertrofia fisiológica ventricular esquerda, angiogênese capilar e diminuição da concentração de catecolaminas circulantes (Felix e Michelini, 2007; Medeiros *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011; Silveira *et al.* 2007; Zamo *et al.*

2010, 2011). O treinamento físico de baixa à moderada intensidade em humanos com insuficiência cardíaca diminuiu em 26% os níveis de Ang II no plasma (Braith, 1999), além de aumentar a concentração de Ang-(1-7) e a expressão do receptor Mas em ventrículo esquerdo de ratos treinados com natação (Gomes-Filho *et al.* 2008). Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2011), o treinamento com natação aumentou a expressão do receptor Mas em anéis aórticos de SHR e melhorou o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) através de um mecanismo dependente de endotélio e envolvendo a liberação de NO e de prostaciclina. Deste modo, estes estudos sugerem que a atividade física pode exercer seus efeitos benéficos no sistema cardiovascular através da modulação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas do SRA.

II. JUSTIFICATIVA

A ECA2 exerce um papel importante no equilíbrio do SRA. Estudos utilizando ativadores da ECA2 endógena, XNT e DIZE, demonstraram que estes compostos induzem vários efeitos benéficos em modelos experimentais de diversas patologias estimulando o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas e inibindo o eixo ECA/Ang II/AT1 do SRA. A hiperatividade deste último eixo está relacionada à patogênese de várias doenças cardiovasculares, uma vez que ele leva à proliferação celular, vasoconstrição, hipertrofia e fibrose cardíaca. Assim, considerando as funções cardioprotetoras da ECA2, investigamos a participação dessa enzima no remodelamento cardiovascular no exercício físico e na hipertensão arterial.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena, usando o composto sintético DIZE, em parâmetros cardiovasculares de ratos submetidos ao treinamento físico e a hipertensão renovascular. Além disso, os efeitos do DIZE na vasodilatação arterial foram analisados.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE na PA média, sistólica e diastólica e na frequência cardíaca (FC) de ratos submetidos ao treinamento físico.
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE na PA média, sistólica e diastólica e na FC de ratos sedentários.
- Avaliar os efeitos do DIZE na PA e na FC de ratos submetidos à cirurgia de hipertensão renovascular.
- Avaliar os efeitos do DIZE na estrutura cardíaca de ratos submetidos à cirurgia de hipertensão renovascular.
- Avaliar os efeitos do DIZE na função cardíaca de ratos submetidos à cirurgia de hipertensão renovascular.
- Avaliar os efeitos do DIZE em parâmetros renais de ratos submetidos à cirurgia de hipertensão renovascular.
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações do DIZE (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) em anéis aórticos de ratos normotensos.
- Verificar o papel do receptor Mas nos efeitos do DIZE na vasodilatação de anéis aórticos de ratos.
- Verificar o papel do NO nos efeitos do DIZE na vasodilatação de anéis aórticos de ratos.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. 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 (CEUA) da UFMG (protocolo número 226/2013).

4.2. Tratamento crônico com o DIZE

O composto ativador da ECA2 que foi utilizado nesse estudo foi o DIZE. Este composto foi administrado por via oral (1mg/kg via gavagem por 8 semanas no treinamento físico) diluído em salina. A gavagem controle foi com salina em volume equivalente ao do DIZE.

4.3. Treinamento físico - natação

A piscina utilizada era constituída de oito tanques individuais para natação, o que viabiliza um maior controle durante o treinamento. Os tanques foram confeccionados com vidros transparentes para permitir a completa visualização e acompanhamento do animal. Todos os oito tanques eram interconectados por espaçamentos inferiores entre suas divisórias, permitindo,

assim, uma completa homogeneidade da água do meio com uma temperatura de aproximadamente 32°C.

Inicialmente todos os animais foram pesados e adaptados ao meio líquido na mesma piscina onde foram treinados em uma temperatura de 32 ± 1 °C, sem sobrecarga, durante cinco dias consecutivos. Terminado o período de adaptação, todos os animais foram novamente pesados e divididos aleatoriamente em quatro grupos: i) grupo sedentário não tratado, ii) grupo sedentário tratado, iii) grupo treinado a 70 % não tratado e iv) grupo treinado a 70% tratado (Figura 5). No dia seguinte à adaptação ao meio líquido, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo (TEM).

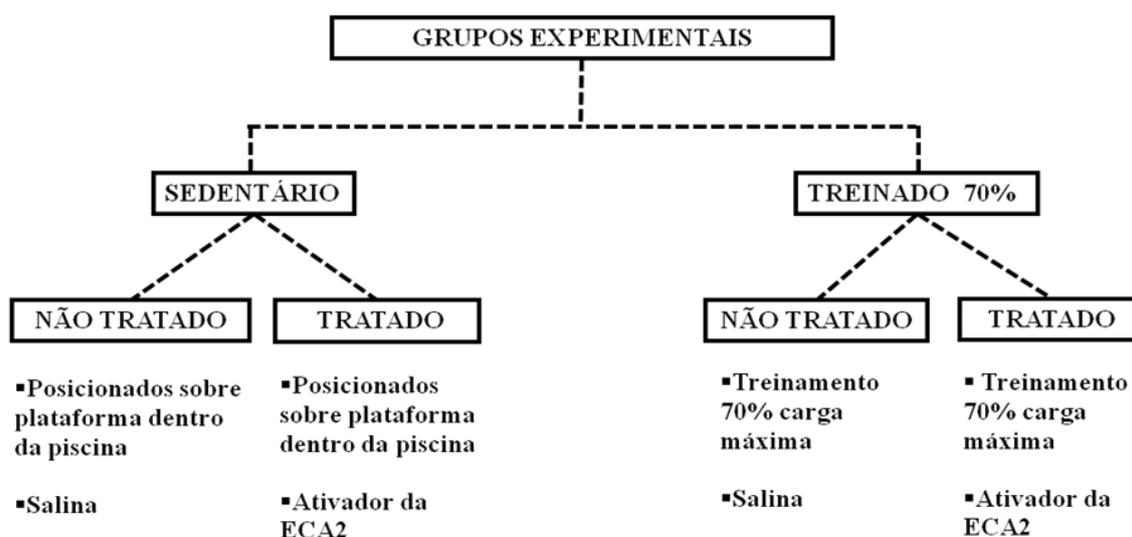


Figura 5: Representação esquemática dos grupos experimentais.

O TEM consistiu de um período de natação com incrementos de carga de 2% do peso corporal, a cada 3 minutos. As cargas foram presas na cauda do animal até o momento da exaustão, identificado quando o animal permaneceu abaixo da superfície por mais de 10 segundos (Almeida et al. 2009). A intensidade do treinamento físico subsequente foi definida por meio do

cálculo de 70% do peso máximo obtido no TEM. O peso máximo suportado pelos animais no TEM foi convertido em porcentagem do peso corporal do animal. Assim, a cada semana, os ratos foram pesados e, usando a porcentagem do valor calculado, uma nova carga de trabalho foi obtida e a sobrecarga de 70% determinada (Almeida et al. 2009). Os ratos foram treinados no decorrer de 8 semanas, 5 vezes por semana, durante 60 minutos. Os animais sedentários foram colocados dentro da piscina sobre uma plataforma de isopor para permitir o contato dos animais com o mesmo ambiente do grupo treinado no período do treinamento físico, mas sem realizar esforço.

4.4. Registro de parâmetros cardiovasculares

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas semanalmente através de um sistema não invasivo de mensuração de pressão arterial (CODA). Neste sistema, os ratos são mantidos em compartimentos individuais sobre uma plataforma a uma temperatura de 32-35°C e um manguito na cauda do rato é introduzido e inflado. Assim, o registro da pressão arterial é realizado utilizando a artéria caudal.

4.5. Hipertensão renovascular

A cirurgia para indução da hipertensão arterial sistêmica foi realizada seguindo o modelo experimental de hipertensão renovascular, segundo a técnica de Goldblatt (Goldblatt *et al.* 1934). Os animais foram anestesiados com quetamina 10% (6mg por 100g de peso) e xilasina 2% (0,6mg por 100g de

peso) por via intraperitoneal, colocados em decúbito dorsal e retirados os pelos na região do flanco esquerdo. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm de comprimento na pele do abdome, abrindo a cavidade peritoneal. Foi colocado um clipe de prata na artéria renal esquerda, deixando o rim direito intacto. Nos animais controle (Sham) foi realizada a mesma cirurgia, porém não houve a colocação do clipe. Após cirurgia, os animais foram tratados diariamente durante 4 semanas via gavagem com captopril (30mg/kg), DIZE (1mg/kg) ou salina.

4.6. Histologia

Após os protocolos experimentais, os animais foram sacrificados, seus corações e os ventrículos esquerdos (VE) dissecados e pesados e os valores corrigidos pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia. Fragmentos do VE foram fixados em Bouin 4% por 24h, submetidos a desidratação com gradiente crescente de álcool (70, 80, 90 e 100%) e posterior infiltração e inclusão em parafina. Após a montagem dos blocos, as amostras foram cortadas em secções de 6 µm com intervalos de 20 cortes. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia de campo claro para avaliar a presença de hipertrofia cardíaca através da medida do diâmetro do cardiomiócito. O diâmetro do cardiomiócito (~100 cardiomiócitos por animal) foi medido na região correspondente ao núcleo celular. Somente cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram considerados para análise.

4.7. Quantificação de hidroxiprolina tecidual

A quantificação da hidroxiprolina é uma medida indireta do conteúdo de colágeno dos tecidos (Reddy *et al.* 1996). Foram homogeneizados 100mg do VE em 5mL de solução salina 0,2%, sendo estes homogenatos subsequentemente congelados e liofilizados. Dez miligramas (10mg) de tecido liofilizado foram submetidos a uma hidrólise alcalina em 375 μ L de NaOH 2N por 25 minutos a 125°C. A uma alíquota de 50 μ L do hidrolisado foram adicionados 450 μ L do reagente oxidante cloramina T (cloramina T 0.056 M em tampão acetato/citrato com 10% de n-propanol, pH 6.5) e incubados por 20 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 500 μ L de p-dimetilaminobenzaldeído diluídos em n-propanol/ácido perclórico (2:1 v/v) seguido de incubação por 20 minutos a 65°C. As placas de 96 poços contendo as amostras foram lidas em leitor de ELISA (Emax, Molecular Devices) a 540 nm.

4.8. Avaliação da função cardíaca

Após o fim do tratamento, os ratos foram decapitados e seus corações retirados para avaliar a função cardíaca. Para isso, utilizou-se um sistema de perfusão de Langendorff com pressão constante (Figura 6). A preparação de Langendorff era constituída por um tubo de vidro, conectado a um reservatório de solução nutritora de Krebs-Ringer (mM): NaCl 118,41; KCl 4,69; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ x 7 H₂O 1,17; CaCl₂ x 2 H₂O 2,51; dextrose anidra 1,65; NaHCO₃ 26,24. A pressão de perfusão era mantida em 75 mmHg. A solução nutritora era oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a

37 ± 1°C com circulação de água aquecida. Os animais foram heparinizados (400 U.I. i.p.) 10 minutos antes do sacrifício. O coração foi retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva oxigenada e gelada (± 4°C). Em seguida, os restos de tecido que acompanhavam o coração foram removidos. A aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquicefálico) e seu coto foi fixado com linha na ponta da cânula de aço inoxidável acoplada ao sistema de perfusão, visando sempre a integridade da valva aórtica. Para registro da força contrátil, um pequeno gancho de aço inoxidável foi fixado ao ápice do VE e conectado a um transdutor de força. Tensão de aproximadamente 1,0 ± 0,2 g foi aplicada ao coração (tensão diastólica) e mantida constante durante o experimento. A FC e a dT/dt (máxima e mínima) foram calculadas a partir das medidas diretas de tensão. Os sinais foram amplificados (1000x) e registrados por meio de um sistema de aquisição e análise de dados analógico-digital (MP100 - AcqKnowledge III, Biopac System Inc., EUA).

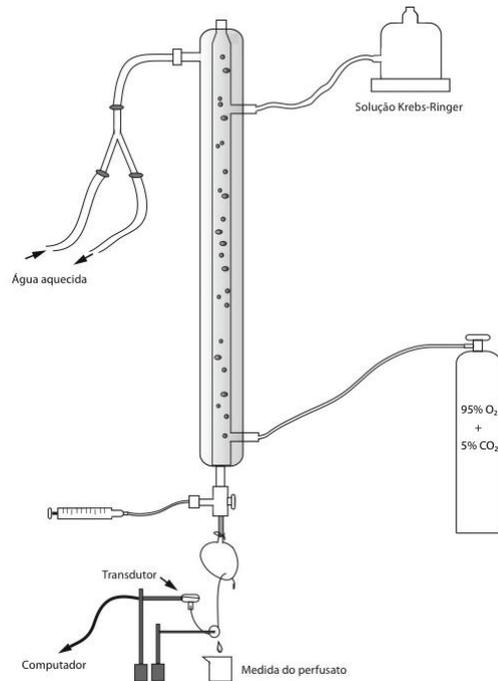


Figura 6: Figura esquemática do sistema de perfusão de Langerdoff (Murça, 2012).

4.9. Avaliação da função renal

Para análise dos parâmetros renais, os animais foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas com temperatura ambiente controlada e com ciclo de luz claro/escuro de 14/10h com livre acesso à ração e água durante 3 dias para aclimatação. Logo em seguida foi coletada a urina e mensurada a quantidade de água ingerida durante 24h. Essas medidas foram realizadas em três tempos distintos: antes da cirurgia de hipertensão renovascular, três semanas após a cirurgia e ao final do tratamento.

A dosagem de proteína urinária (proteinúria) foi realizada por colorimetria utilizando o kit Sensiprot (Labtest Diagnóstica S/A, Brasil) disponível comercialmente. A proteína excretada na urina foi expressa em mg/24h.

4.10. Experimentos de reatividade vascular

Os animais foram sacrificados por decapitação e sua aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecidos adiposo e conjuntivo. O material foi transferido para uma placa de Petri sobre gelo contendo solução nutritora de Krebs (110,8 mM NaCl; 5,9 mM KCl; 25,0 mM NaHCO₃; 1,1 mM MgSO₄; 2,5 mM CaCl₂; 2,3 mM NaH₂PO₄ e 11,5 mM glicose). Logo após, a aorta foi dividida em anéis de aproximadamente 4mm de comprimento e cada anel foi colocado em cubas de 15mL contendo a solução nutritora de Krebs oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37 ± 1°C com circulação de água aquecida. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso, sendo que uma foi fixada à parede da cuba e a outra foi conectada verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritora foi trocada a cada 20 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos e a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Os registros experimentais foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador. Os sinais foram amplificados (1000x) e registrados por meio de um sistema de aquisição e análise de dados analógico-digital (MP100 - AcqKnowledge III, Biopac System Inc., EUA).

Após o período de estabilização, os anéis foram contraídos com fenilefrina (3×10^{-7} M; Sigma, USA) e, após observar um platô no registro de

contração, a presença de endotélio funcional vascular foi verificada pela administração de acetilcolina (10^{-5} M; Sigma, USA). Após atingir o relaxamento máximo, a solução nutritiva de Krebs foi trocada por três vezes. Os anéis de aorta que apresentaram um relaxamento superior a 70% após contração com fenilefrina foram considerados com endotélio funcional e os anéis que não apresentaram relaxamento diante do estímulo com acetilcolina foram considerados desprovidos de endotélio funcional. Os efeitos do DIZE em diferentes concentrações (10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) foram testados incubando esse composto com os anéis isolados de aorta. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas com a ausência da droga citada, apenas com o veículo (salina).

Com a finalidade de avaliar o mecanismo de ação do DIZE, antagonista do receptor Mas (A-779) e inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (L-NAME) foram utilizados. Após os anéis aórticos serem pré-contraídos com fenilefrina, as cubas foram lavadas e, após 30 minutos, os anéis de aorta foram incubados com A-779 ou L-NAME associado ao DIZE.

4.11. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. Os resultados foram analisados utilizando o teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Tukey ou Two-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni, sempre com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5*. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

5.1 Parâmetros cardiovasculares após treinamento físico

Inicialmente, foi avaliada a resposta dos animais ao exercício físico (natação) através da duração do Teste de Esforço Máximo (TEM). O tratamento com o DIZE não alterou o TEM dos animais sedentários. Embora o grupo treinado à 70% da carga máxima tenha apresentado um discreto aumento do TEM, apenas quando o treinamento foi associado ao tratamento crônico com o DIZE observou-se um aumento significativo desse parâmetro (Figura 7).

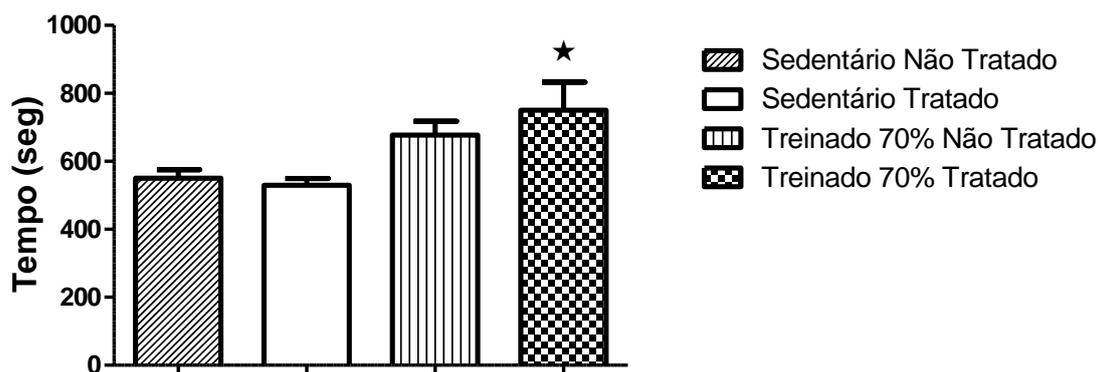


Figura 7: Tempo total do Teste de Esforço Máximo (TEM) em ratos sedentários e treinados tratados ou não com DIZE. * $P < 0,05$ vs. Sedentário tratado (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); $n = 6$.

Em seguida, o ganho de peso dos animais ao longo do desenvolvimento dos protocolos foi analisado. Todos os grupos tiveram um ganho do peso corporal ao final do tratamento/treinamento, entretanto não houve diferenças significativas entre eles (Figura 8).

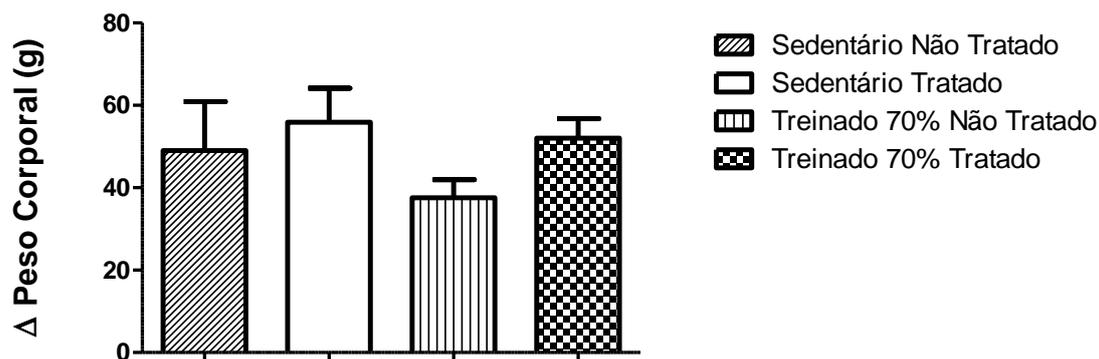


Figura 8: Ganho de peso corporal ao longo do desenvolvimento dos protocolos experimentais. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

No que se refere à relação entre o peso do coração e o comprimento da tíbia, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, indicando que nem o treinamento físico nem o tratamento com o DIZE alterou a massa cardíaca dos animais (Figura 9). Resultado similar foi visto quando a relação entre o peso do coração e o peso corporal foi avaliada (Figura 10).

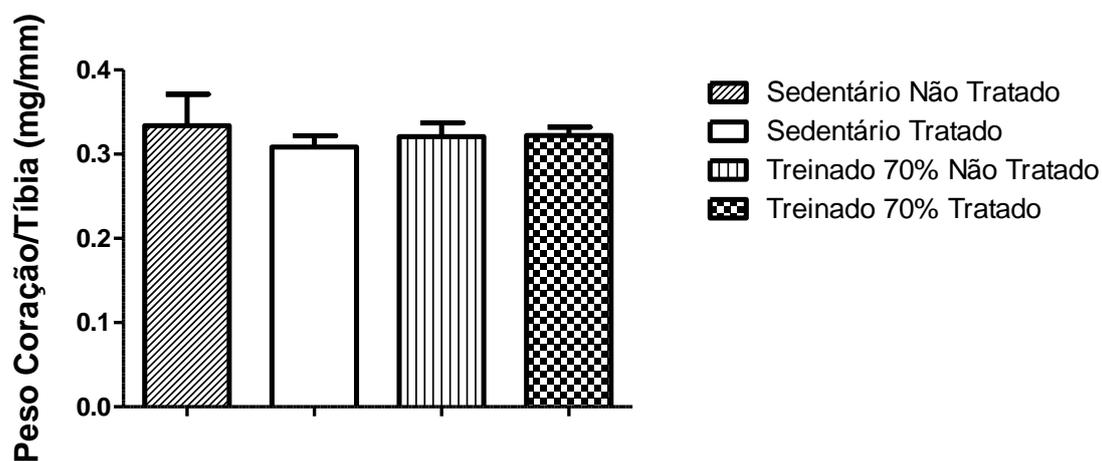


Figura 9: Relação entre o peso do coração e o comprimento da tíbia nos grupos sedentário não tratado e tratado com o DIZE e treinado 70% não tratado e tratado com o DIZE. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=6.

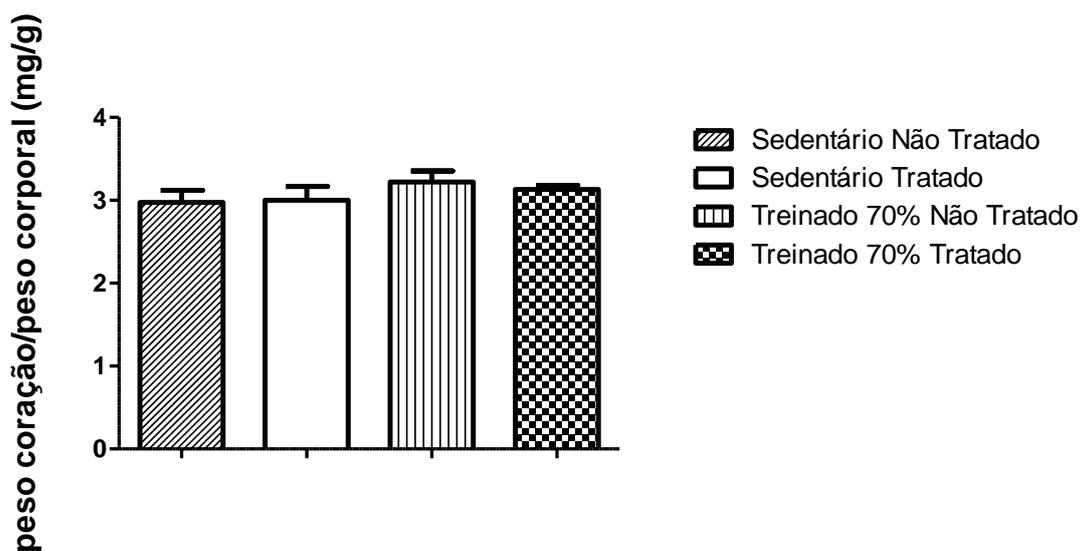


Figura 10: Relação entre o peso do coração e o peso corporal nos grupos sedentário não tratado e tratado com o DIZE e treinado 70% não tratado e tratado com o DIZE. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=6.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares de PAM (Figura 11), FC (Figura 12), pressão arterial diastólica (PAD) (Figura 13) e pressão arterial sistólica (PAS) (Figura 14) obtidos ao final do período experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados.

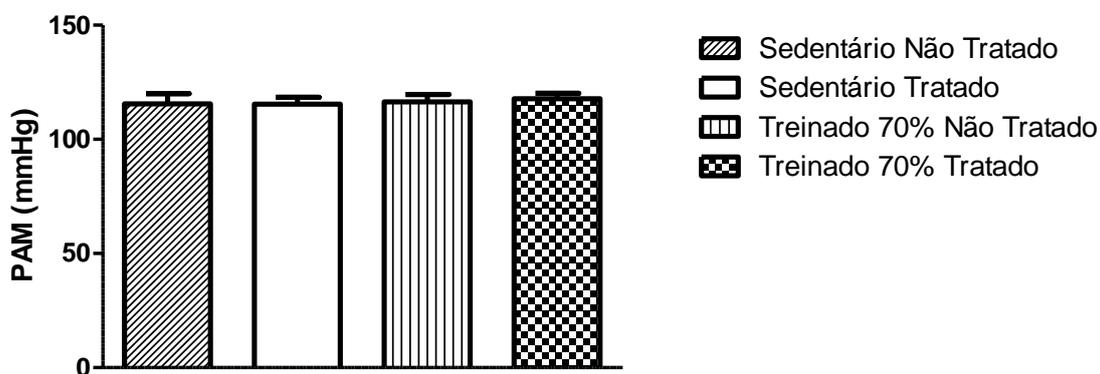


Figura 11: Pressão arterial média (PAM) de ratos sedentários não tratados e tratados com o DIZE e de ratos treinados não tratados e tratados com o DIZE ao final do período experimental. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

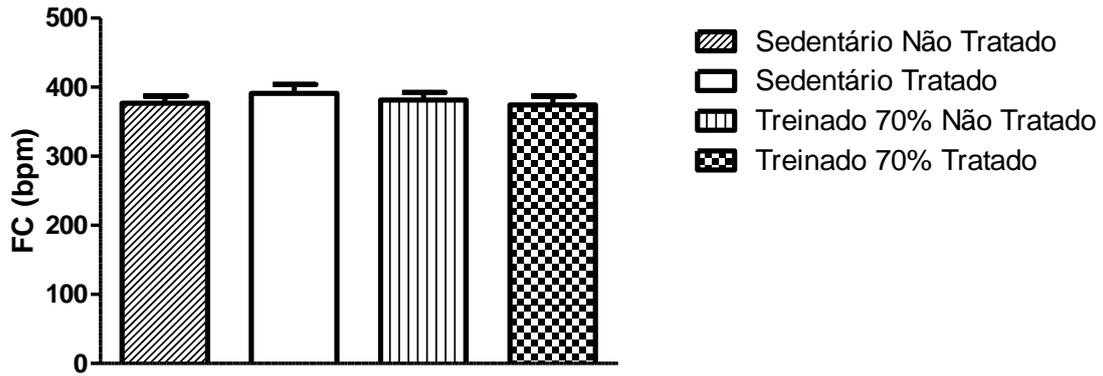


Figura 12: Frequência cardíaca (FC) de ratos sedentários não tratados e tratados com o DIZE e de ratos treinados não tratados e tratados com o DIZE ao final do período experimental. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

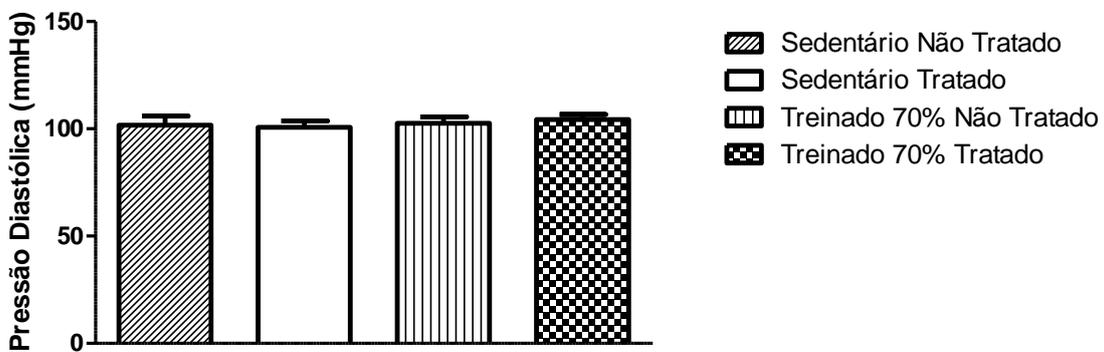


Figura 13: Pressão arterial diastólica de ratos sedentários não tratados e tratados com o DIZE e de ratos treinados não tratados e tratados com o DIZE ao final do período experimental. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

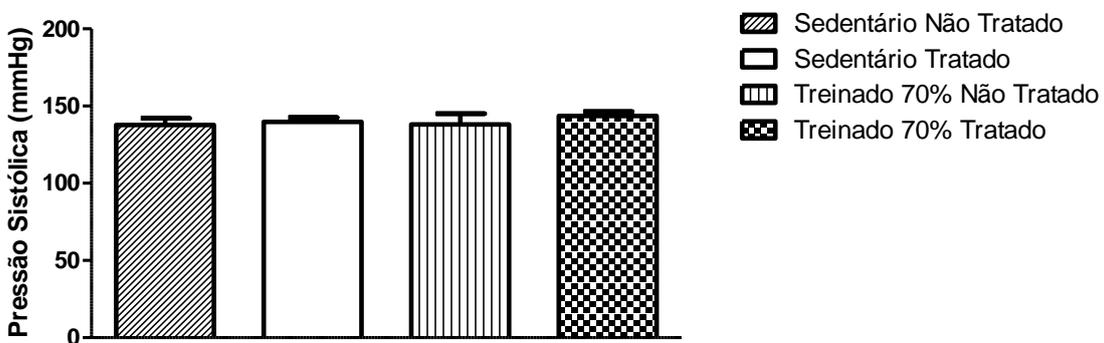


Figura 14: Pressão arterial sistólica de ratos sedentários não tratados e tratados com o DIZE e de ratos treinados não tratados e tratados com o DIZE ao final do período experimental. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

5.2. Efeitos do DIZE na hipertensão renovascular

Foi utilizado o modelo de hipertensão renovascular induzida pela técnica do 2R1C para avaliar os efeitos cardiovasculares do DIZE em uma situação de patologia cardiovascular. Os resultados mostraram que a técnica do 2R1C foi realizada de maneira correta, pois o peso do rim direito em comparação com o rim esquerdo foi significativamente maior em todos os grupos 2R1C em relação ao grupo sham (Figura 15).

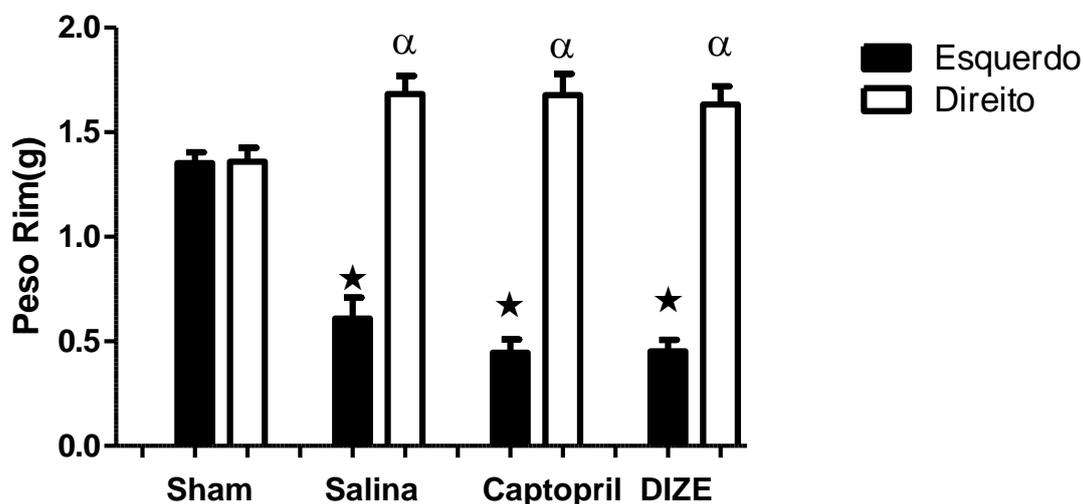


Figura 15: Peso dos rins esquerdo e direito dos diversos grupos experimentais após a cirurgia de 2R1C. * $P < 0,05$ vs. o rim esquerdo do grupo sham e ^α $P < 0,05$ vs. o rim direito do grupo sham (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

A análise semanal da pressão arterial dos grupos experimentais durante as quatro semanas de tratamento com o ativador de ECA2 ou com o inibidor de ECA mostrou que ambos os tratamentos reduziram a pressão arterial (Figura 16). Em relação à FC, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 17).

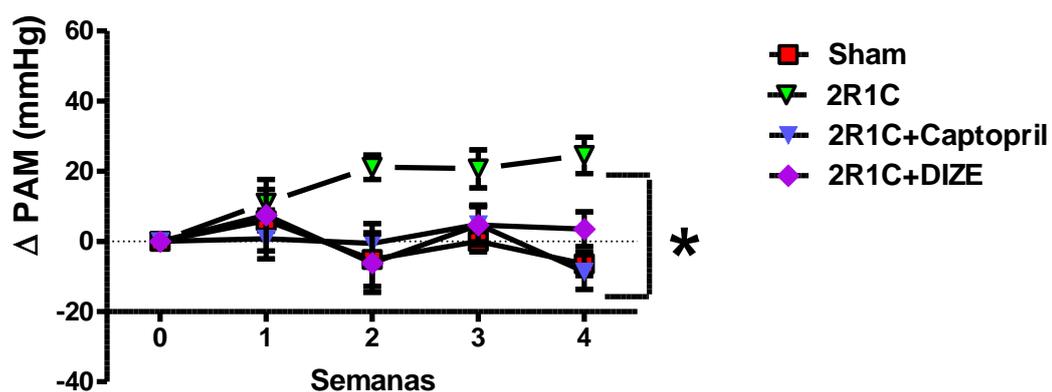


Figura 16: Pressão arterial média (PAM) dos diversos grupos experimentais durante as 4 semanas de tratamento. * $P < 0,05$ vs. 2R1C (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); $n=5$.

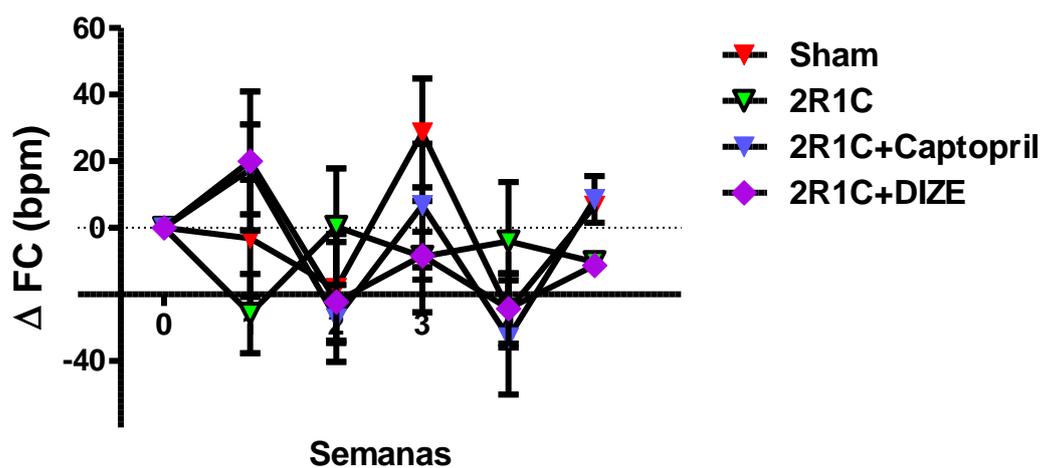


Figura 17: Frequência cardíaca (FC) dos diversos grupos experimentais durante as 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); $n=5$.

Além disso, foi observado que o DIZE e o Captopril foram capazes de prevenir o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão. Esse dado foi evidenciado tanto pela análise da relação entre o peso do coração e o comprimento da tibia (Figura 18) quanto pelo diâmetro dos cardiomiócitos (Figura 19).

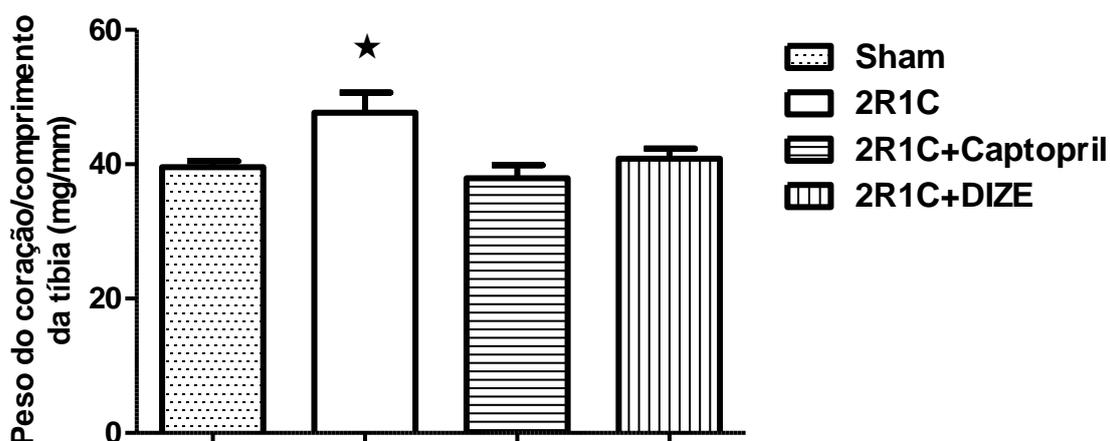


Figura 18: Relação entre o peso do coração e comprimento da tibia (mg/mm) dos diversos grupos experimentais. * $P < 0,05$ vs. sham (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); $n = 5$.

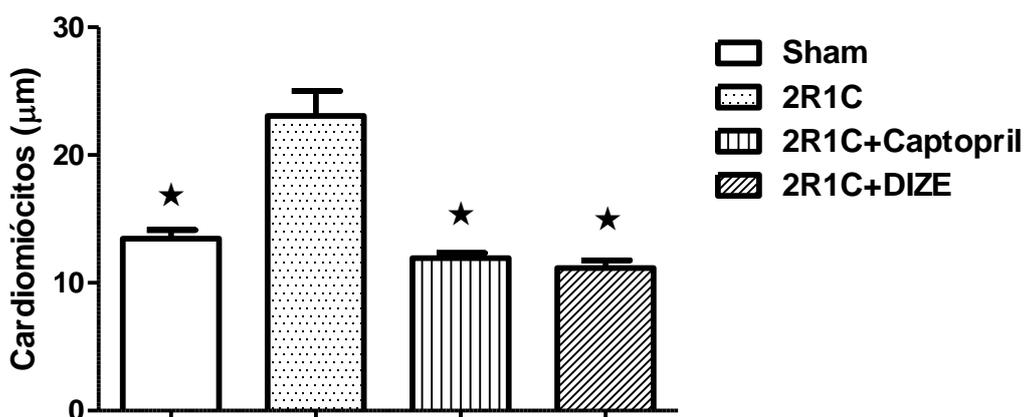


Figura 19: Diâmetro dos cardiomiócitos dos diversos grupos experimentais. * $P < 0,05$ vs. 2R1C (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); $n = 5$.

Para estimar a quantidade de colágeno presente nos corações (fibrose cardíaca) foi mensurado a concentração de hidroxiprolina nos corações dos animais dos diversos grupos experimentais. Os resultados mostraram que a concentração de hidroxiprolina foi significativamente maior apenas no grupo 2R1C em relação ao grupo Sham (Figura 20).

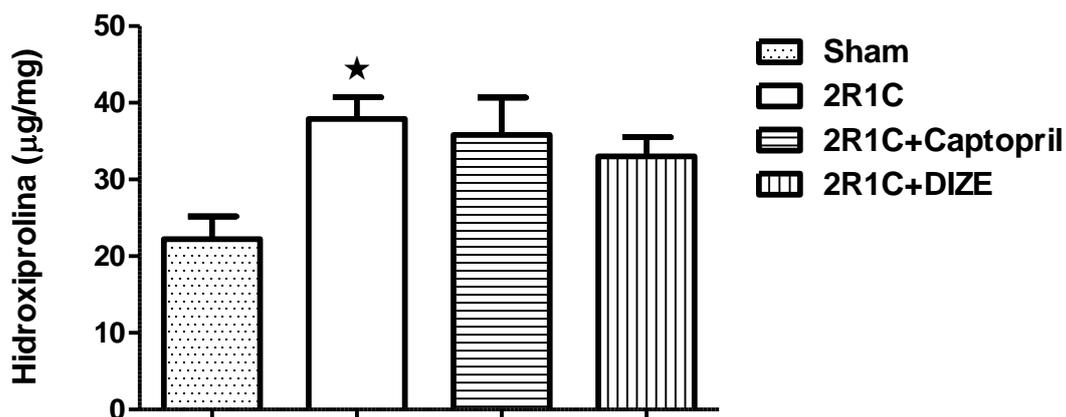


Figura 20: Concentração de hidroxiprolina em corações de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. *P,0,05 vs. Sham (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=5.

Com o objetivo de avaliar a função cardíaca dos animais do protocolo de hipertensão renovascular, foi utilizada a técnica de coração isolado. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos em termos de tensão sistólica (Figura 21), tensão diastólica (Figura 22), dT/dt máxima (Figura 23), dT/dt mínima (Figura 24), fluxo coronariano (Figura 25) e de FC (Figura 26).

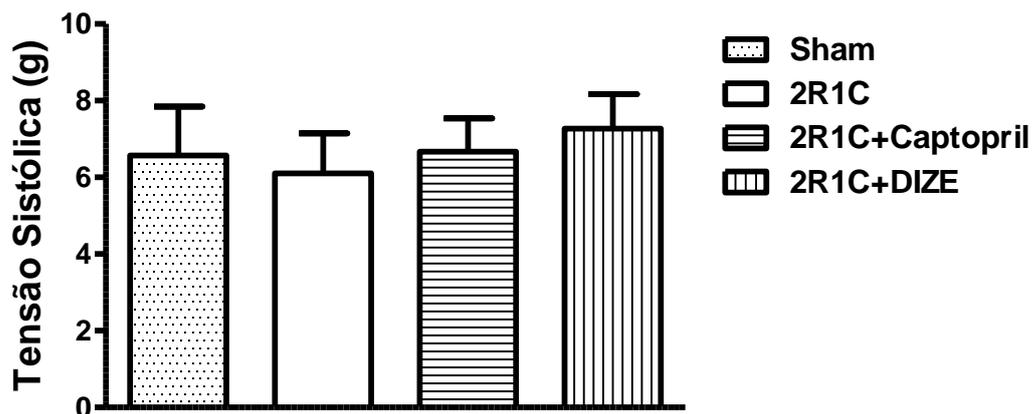


Figura 21: Tensão sistólica de corações de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

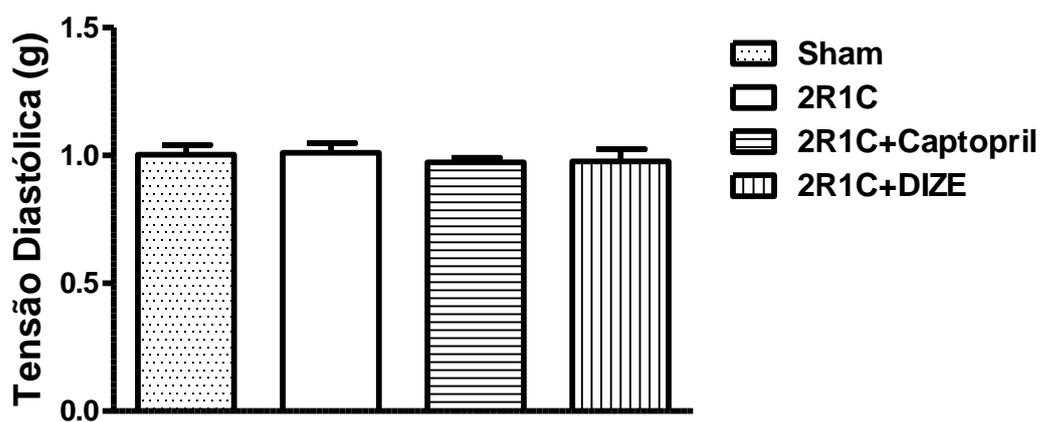


Figura 22: Tensão diastólica de corações de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

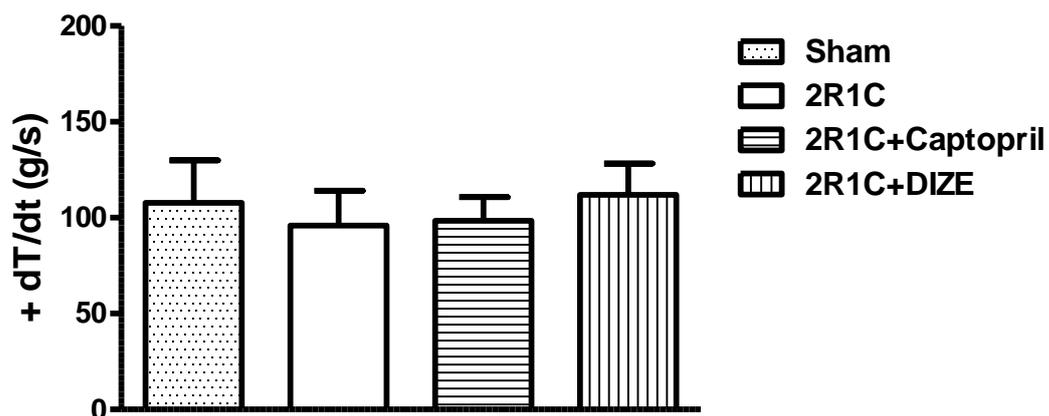


Figura 23: dT/dt máxima (+dT/dt) de corações isolados de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

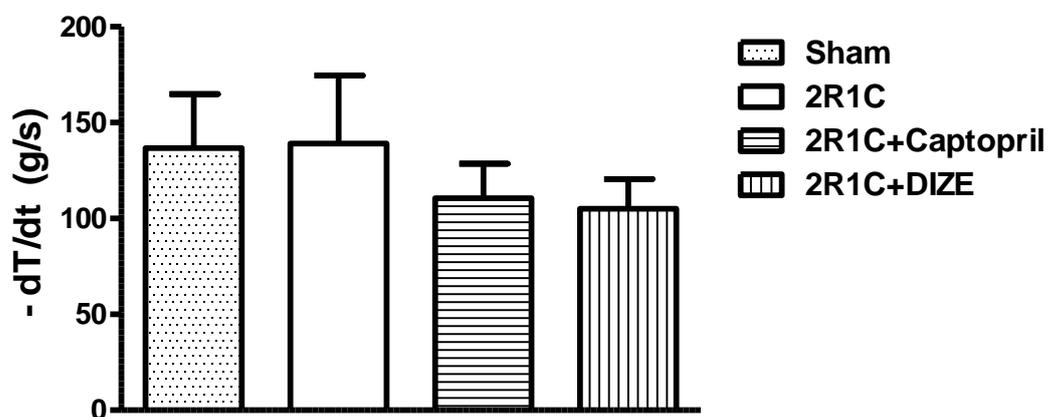


Figura 24: dT/dt mínima (-dT/dt) de corações isolados de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

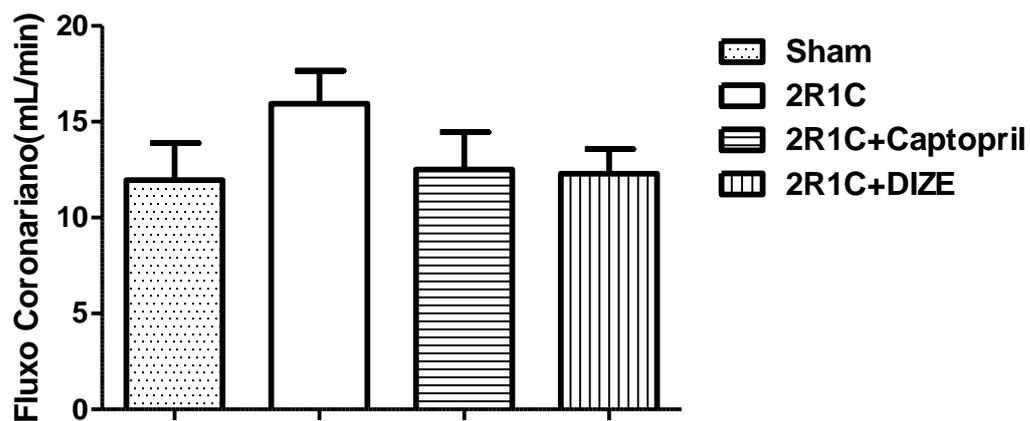


Figura 25: Fluxo coronariano de corações isolados de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

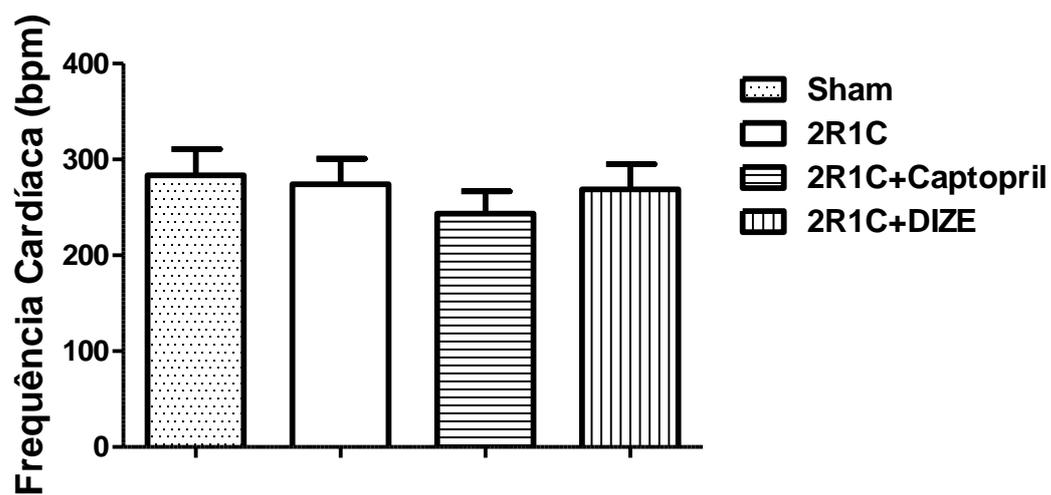


Figura 26: Frequência cardíaca de corações isolados de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C após 4 semanas de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os grupos (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey); n=8.

5.3. Efeitos do DIZE nos parâmetros renais

Após análise dos efeitos cardiovasculares do DIZE, foi avaliado parâmetros renais em três diferentes tempos do tratamento: basal, três semanas e ao término do tratamento, com o objetivo de avaliar os efeitos renais do DIZE no modelo de hipertensão renovascular.

A análise da ingestão de água (mL/dia) durante o período de tratamento mostrou que não houve diferenças significativas na ingesta hídrica entre os grupos experimentais (Figura 27). Entretanto, nas análises da excreção de urina diária (mL/dia) foi observado que, ao final do tratamento, o grupo 2R1C+Captopril apresentou um aumento significativo na excreção urinária em relação ao grupo Sham e que houve uma redução significativa deste parâmetro no grupo 2R1C+DIZE em relação ao grupo 2R1C (Figura 28). Em termos de proteinúria, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 29).

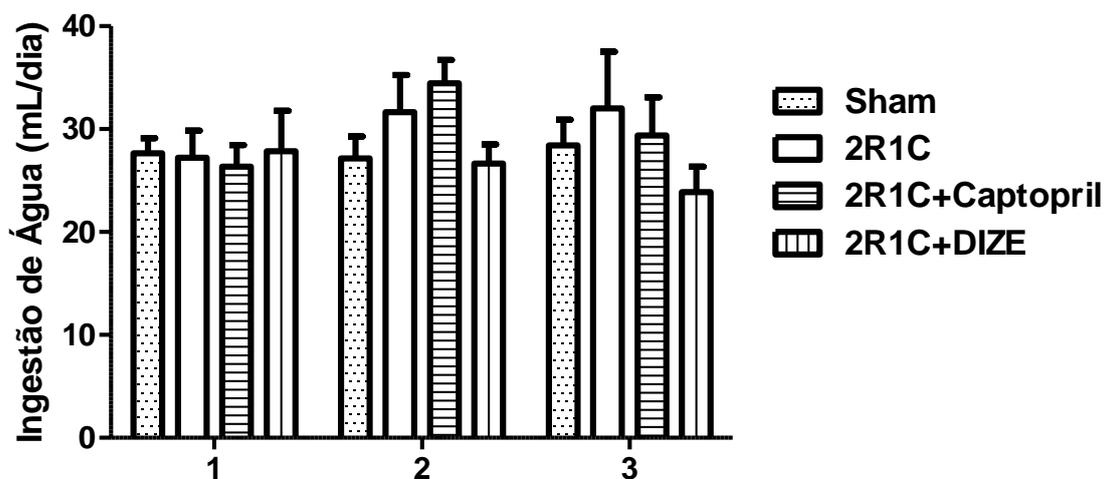


Figura 27: Ingestão hídrica (mL/dia) de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C no início (1), após três semanas (2) e ao final do tratamento (3) (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni), n=5.

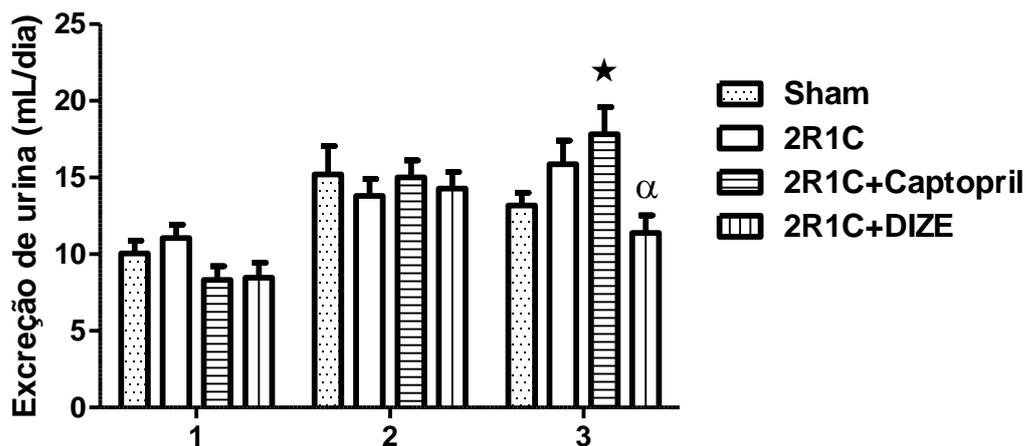


Figura 28: Excreção de urina (mL/dia) de ratos submetidos a cirurgia de 2R1C no início (1), após três semanas (2) e ao final do tratamento (3). *P<0,05 vs. Sham no final do tratamento e ^αP<0,05 vs. 2R1C final do tratamento (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); n=5.

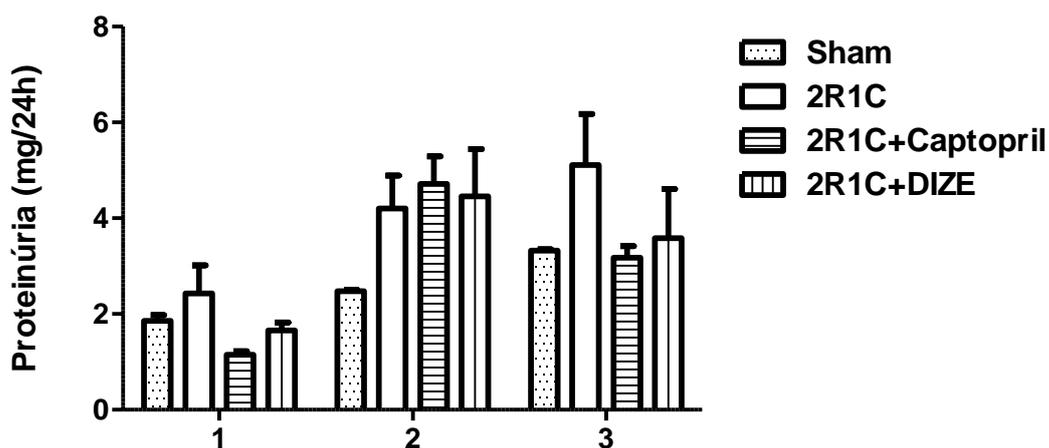


Figura 29: Excreção de proteína (mg/24h) em ratos submetidos a cirurgia de 2R1C no início (1), após três semanas (2) e ao final do tratamento (3). Não houve diferenças significativas entre os grupos (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); n=5.

5.4. Efeitos do DIZE em vasos isolados

Para avaliar os efeitos da ativação da ECA2 endógena pelo DIZE na vasodilatação arterial, foram analisados registros de tensão contrátil de anéis aórticos de ratos utilizando doses crescentes do DIZE (10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). Foi observado um aumento gradativo na porcentagem de relaxamento dos anéis

aórticos, evidenciando, assim, uma vasodilatação dose-dependente. As concentrações de 10^{-5} e 10^{-4} M causaram as maiores respostas (Figura 30).

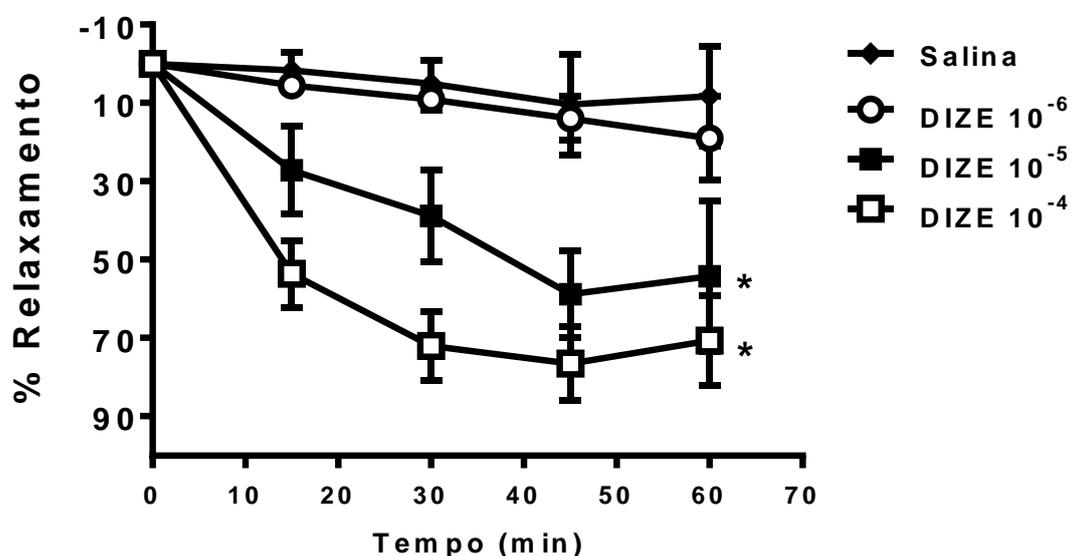


Figura 30: Efeitos do DIZE, em diferentes concentrações (10^{-6} ; 10^{-5} e 10^{-4} M), no relaxamento de anéis aórticos de ratos. * $P < 0,001$ vs. salina (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); $n=5$.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar os mecanismos de ação do DIZE na vasodilatação de anéis aórticos, foi utilizado bloqueadores e inibidores de componentes do SRA. 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 que o efeito vasodilatador do DIZE foi completamente bloqueado pela dose de 10^{-4} M de A-779 (Figura 31). Em seguida, avaliamos o papel do óxido nítrico (NO) nos efeitos do DIZE na vasodilatação aórtica através da administração do L-NAME, cuja ação é inibir a NO sintase. Observamos que as ações do DIZE foram inibidas de forma significativa pelo composto L-NAME (Figura 32).

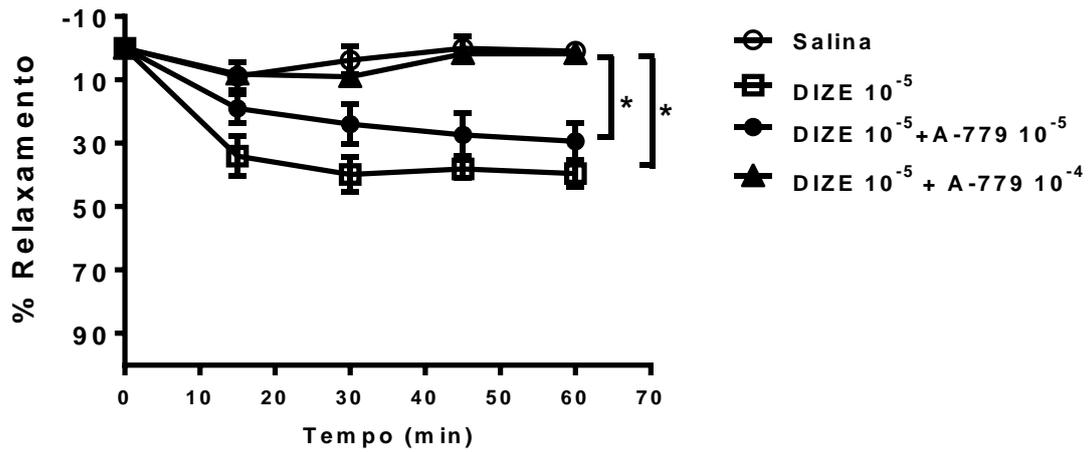


Figura 31: Papel do receptor Mas no efeito do DIZE no relaxamento de anéis aórticos. *P<0,0001 vs. salina (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); n=5.

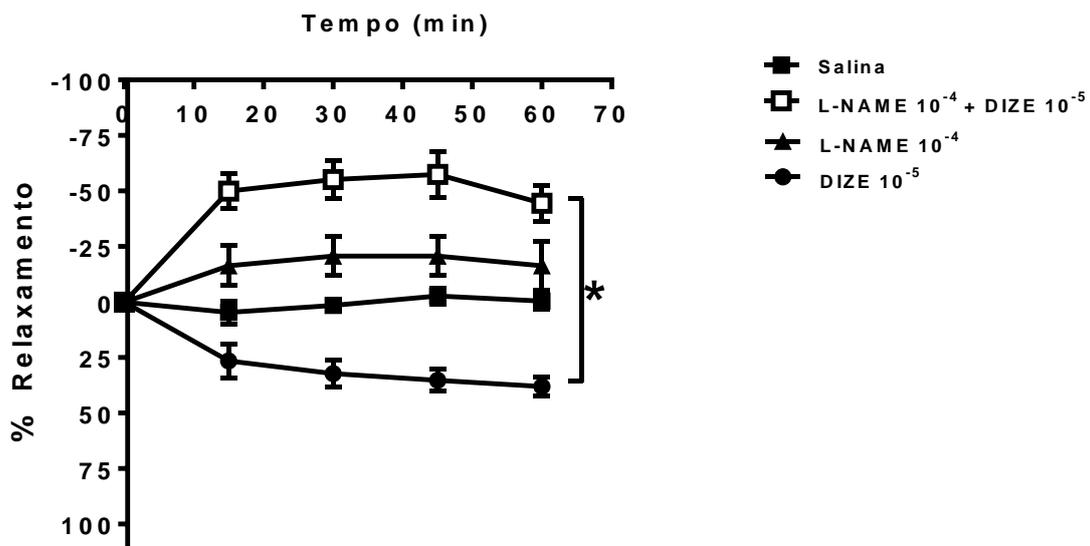


Figura 32: Papel do óxido nítrico no efeito do DIZE no relaxamento de anéis aórticos. *P<0,0001 vs. DIZE 10⁻⁵ M (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni); n=5.

VI. DISCUSSÃO

O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas do SRA tem chamado atenção de vários pesquisadores devido, entre outros fatores, ao seu papel na melhora da função cardíaca. Desde a sua descoberta, a Ang-(1-7) se tornou o centro de diversos estudos nas áreas de fisiologia e fisiopatologia cardiovascular por agir diretamente através do seu receptor Mas no processo contrátil e em hipertrofia dos cardiomiócitos melhorando a performance cardíaca (Ferrario *et al.* 1998; Santos & Campagnole-Santos, 2000; Silveira *et al.* 2010).

Estudos têm mostrado que existe uma relação entre o SRA e o exercício físico. Este último pode acarretar importantes benefícios para a função cognitiva, estabilidade do humor e sono, além de acelerar a liberação do hormônio melatonina, demonstrando, assim, uma relação direta com marcadores relacionados ao ciclo sono-vigília (Atkinson *et al.* 1996; Callard *et al.* 2001; Edwards *et al.* 2002). Vários estudos mostram que o treinamento físico aeróbio está associado com uma redução na incidência de doenças cardiovasculares (Azevedo *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2000; Negão *et al.* 1993). Esses benefícios têm sido amplamente estudados em modelos experimentais animais, sendo observados tanto em ratos normotensos como hipertensos (Carneiro-Júnior *et al.* 2014; Gomes Santos *et al.* 2014). Dessa forma, o exercício físico pode produzir diversos benefícios tanto na esfera física quanto mental do ser humano, proporcionando uma melhor qualidade de vida. Por esta razão, modificações no estilo de vida, incluindo alimentação e exercício físico, são as primeiras linhas de intervenção para o controle de PA.

Neste trabalho, avaliamos os efeitos de um ativador de ECA2 endógena (DIZE) no treinamento físico e foi observado que o composto melhorou a

capacidade física dos animais, avaliada através do teste de esforço máximo. Especificamente, o tempo total do teste foi significativamente maior no grupo treinado a 70% e tratado com o DIZE. Porém, quando avaliamos os dados da relação peso do coração/comprimento da tíbia e peso do coração/peso corporal, não foram encontradas diferenças significativas. Assim, esses dados em conjunto sugerem que o DIZE não interfere de maneira significativa na hipertrofia fisiológica causada pelo exercício físico. A hipertrofia cardíaca é uma das principais adaptações fisiológicas do treinamento aeróbio, sendo a intensidade do exercício fator determinante do seu desenvolvimento. Estudos mostraram que o exercício de baixa intensidade (50%) não gera hipertrofia cardíaca e alteração de contratilidade. Entretanto, o treinamento físico de alta intensidade (70-85%) leva ao aumento do tamanho das câmaras cardíacas, gerando, assim, a hipertrofia cardíaca excêntrica (Benter *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 2002). Além disso, há estudos demonstrando que o treinamento físico é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de Ang II, e aumentar a atividade da ECA2 e conseqüentemente os níveis de Ang-(1-7), o que pode contribuir para a redução da hipertrofia e deposição de colágeno em ratos com infarto do miocárdio (Gomes-Santos *et al.* 2014; Hayashi *et al.* 2000; Kar *et al.* 2010; Medeiros *et al.* 2004).

Com o exercício aeróbico regular as pressões sistólica e diastólica podem ser reduzidas em aproximadamente 6 a 10mmHg. Esses resultados foram observados em indivíduos normotensos e hipertensos, tanto em repouso quanto durante a realização de um exercício (Brito *et al.* 2014a; De Souza *et al.* 2010). A prática de exercícios físicos regulares contribui, com o passar do tempo, com o controle da PA nos indivíduos com risco de hipertensão (Brito *et*

al. 2014b). Vários mecanismos podem contribuir para o declínio da PA após atividade física. Tem sido demonstrado que as alterações na PA induzida por exercícios crônicos são baseadas em respostas anatômicas e/ou funcionais, tais como redução de resistência vascular e do débito cardíaco e melhora na resistência à insulina e atividade simpática (De Mello *et al.* 2006; Mousa *et al.* 2008; Negrão *et al.* 2008; Roveda *et al.* 2003; Xu *et al.* 2008). Nos nossos resultados dos parâmetros cardiovasculares de pressão arterial média, frequência cardíaca, pressão diastólica e pressão sistólica obtidos ao final do período experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados. Isso indica que a intensidade do treinamento físico foi insuficiente para causar alterações nesses parâmetros. Além disso, podemos concluir que o DIZE não induziu efeitos prejudiciais ao coração.

Sabe-se que em certas situações patológicas o SRA está hiperativado produzindo respostas claras. Assim, decidimos induzir uma situação patológica (hipertensão renovascular) para analisar os efeitos do DIZE no sistema cardiovascular. Após a indução da hipertensão renovascular pela cirurgia de 2R1C, foi observado um aumento significativo do peso do rim direito (não clipado) e diminuição do peso do rim esquerdo (clipado) nos grupos submetidos a cirurgia, indicando que o clipe obstruiu mais de 70% do fluxo sanguíneo renal levando à hipertensão renovascular, confirmando o sucesso da cirurgia (Gava *et al.* 2008; Peotta *et al.* 2007).

É bem descrito na literatura que no modelo de hipertensão renovascular ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo elevando os níveis plasmáticos de Ang II e resultando em um aumento na PA (Ferrario *et al.* 2005; Martinez-Maldonado *et al.* 1991; Melaragno *et al.* 1995; Morishita *et al.* 1993;

Wiesel *et al.* 1997). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que houve um aumento na PA nos grupos que sofreram a cirurgia e que após 1 semana de tratamento com o DIZE ou com o captopril houve uma diminuição da pressão, a qual se manteve normalizada até o final de 4 semanas. Estes dados estão de acordo com resultados anteriores observados tanto em ratos (Melaragno *et al.* 1995) como em camundongos (Hilgers *et al.* 2000; Peotta *et al.* 2007; Gava *et al.* 2008).

Com o aumento de Ang II circulante nos animais hipertensos, é observado uma hipertrofia ventricular caracterizada pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos juntamente com a fibrose cardíaca (Alzamora *et al.* 2003; Cervenka *et al.* 2002; Frohlich *et al.* 1992; Sadoshima *et al.* 1993; Peotta *et al.* 2007). Em concordância com a literatura, nossos dados da relação entre o peso do coração e o comprimento da tíbia e o diâmetro dos cardiomiócitos mostraram o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca no grupo 2R1C. O tratamento com o DIZE e o Captopril foram capazes de prevenir o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão.

A Ang-(1-7) produz um aumento significativo no volume de ejeção em ratos Wistar, parcialmente atenuado pelo A-779 (Santos *et al.* 2007; Sampaio *et al.* 2003). Esse efeito também é observado em ratos transgênicos que superexpressam a Ang-(1-7). Além disso, esses animais apresentam um pequeno, mas significativo, aumento na dP/dt , maior resistência à hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol, redução na duração de arritmias de reperfusão e melhora na função pós-isquêmica em corações isolados perfundidos (Santos *et al.* 2004). Em corações isolados de ratos, observa-se uma redução na pressão de perfusão que é um reflexo da atividade

vasodilatadora direta da Ang-(1-7) no leito coronariano. Somado a isso, a infusão crônica de Ang-(1-7) melhora a perfusão coronariana e a função cardíaca em um modelo experimental de insuficiência cardíaca (Granado *et al.* 2013; Loot *et al.* 2002). Diante dessas evidências, os animais do protocolo de hipertensão renovascular foram submetidos à técnica de coração isolado para avaliar sua função cardíaca. Foi visto que nos parâmetros de tensão sistólica, tensão diastólica, dT/dt máxima e mínima e fluxo coronariano não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Após avaliar a função cardíaca dos animais do modelo de hipertensão renovascular, o próximo passo foi avaliar a função renal, visto que o SRA é de fundamental importância no controle dessa função. A primeira análise foi da ingestão hídrica, uma vez que ela é um mecanismo regulatório do volume e da osmolaridade corporal (Jordan *et al.* 2000). Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais, porém é notável um aumento na ingestão de água após três semanas e ao final do tratamento nos grupos 2R1C e 2R1C+captopril. Esses dados sugerem que esse aumento tenha sido causado pela elevação dos níveis de Ang II circulante em decorrência da hipertensão renovascular e que não houve esse aumento no grupo 2R1C+DIZE devido ao fato da Ang II ser o principal substrato para ECA2.

Analisando a excreção de urina diária, foi observado que ao final do tratamento o grupo 2R1C+captopril aumentou significativamente a excreção em relação ao grupo Sham e que houve uma redução significativa deste parâmetro no grupo 2R1C+DIZE em relação ao grupo 2R1C. Isto pode ser explicado parcialmente pelo fato do grupo 2R1C+captopril ter ingerido mais

água durante mesmo período em relação aos outros grupos.

Não foram observadas diferenças significativas em relação a excreção urinária de proteínas, porém pode-se notar que ao longo do experimento os valores de proteinúria aumentaram em todos os grupos com hipertensão renovascular. Além disso, ao término observou-se que o tratamento com o captopril ou com o DIZE foram eficazes na diminuição da excreção de proteína pela urina quando comparado ao grupo 2R1C.

Os vasos sanguíneos são um local importante para a formação e ações da ECA2/Ang-(1-7) e as células endoteliais não estão apenas envolvidas na produção, mas também no metabolismo deste heptapeptídeo (Fraga-Silva *et al.* 2010; Velez *et al.* 2012). O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas induz a liberação de vasodilatadores, incluindo prostaglandinas, NO e fatores derivados do endotélio, provocando o relaxamento de vários leitos vasculares (Brosnihan *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 2005; Heitsch *et al.* 2001; Iyer *et al.* 2000; Li *et al.* 1997; Muthalif *et al.* 1998; Porsti *et al.* 1994; Santos *et al.* 2000). Dessa forma, a ativação da ECA2 endógena provoca reduções na PA de ratos normais e hipertensos (Hernandez Prada *et al.* 2008). Além disso, foi visto que a disfunção endotelial vascular observada em anéis de aorta de ratos com infarto do miocárdio também foi revertida por infusão crônica de Ang-(1-7) (Loot *et al.* 2002).

A partir disso, foi analisado os efeitos do DIZE em anéis isolados de aorta por meio da técnica de reatividade vascular. Os resultados obtidos mostraram que o DIZE causou uma vasodilatação de forma dose-dependente. Estes efeitos estão de acordo com as ação da ECA2, uma vez que esta enzima contrarregula as ações vasoconstritoras da Ang II através da estimulação dos

efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) (Santos *et al.* 2008; Ferreira e Santos, 2005). Estes dados também corroboram com estudos anteriores utilizando o XNT, um outro ativador da ECA2 endógena, o qual induz uma melhora na função cardíaca e na fibrose perivascular de SHR e reduz a disfunção endotelial por meio da atenuação do estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Ferreira *et al.* 2011; Fraga-Silva *et al.* 2013).

Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação do DIZE, bloqueamos o receptor Mas através do seu antagonista específico, o A-779. Os resultados obtidos mostraram que o bloqueio desse receptor alterou os efeitos do DIZE bloqueando completamente a vasodilatação dos anéis aórticos. O receptor Mas está envolvido na maior parte dos efeitos vasculares conhecidos de Ang-(1-7). Estudo realizado em camundongos que sofreram deleção genética deste receptor mostrou que as aortas deficientes do Mas perderam sua capacidade de relaxamento induzida pela Ang-(1-7) (Santos *et al.* 2003). Além disso, 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 (Castro *et al.* 2005; Sampaio *et al.* 2007).

Em seguida, avaliamos o papel do NO na vasodilatação aórtica através do composto L-NAME, que tem como ação inibir a NO sintase. Os resultados mostraram que os efeitos do DIZE foram inibidos significativamente pelo composto L-NAME. Estes resultados estão de acordo com o fato das ações do DIZE terem sido bloqueadas pelo A-779, uma vez vários estudos têm demonstrado que a liberação de NO é um dos principais efeitos da Ang-(1-7) quando esta interage com o receptor Mas, além deste aumento da liberação de

NO ser ausente em camundongos com deleção genética do receptor Mas-KO (Clayton *et al.* 1998; Dias-Peixoto *et al.* 2008; Gomes *et al.* 2010; Gwathmey *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2004; Sampaio *et al.* 2007).

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o DIZE melhorou a capacidade física de animais normotensos, reduziu a pressão arterial, hipertrofia cardíaca nos animais com hipertensão renovascular e induziu uma vasodilatação dose-dependente de anéis isolados de aorta através do receptor Mas e da liberação de NO. Assim, a ativação da ECA2 pode ser uma estratégia terapêutica inovadora e eficiente para o tratamento de doenças cardiovasculares.

VIII. ANEXO

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Protein & Peptide Letters, 2016, 23, 9-16

9

Anti-hypertensive Effects of Diminazene Aceturate: An Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator in Rats

Marilda L.A. De Maria^a, Liliane D. Araújo^a, Rodrigo A. Fraga-Silva^a, Letícia A.S. Pereira^a, Heder J. Ribeiro^a, Gustavo B. Menezes^a, Vinayak Shenoy^b, Mohan K. Raizada^b and Anderson J. Ferreira^a

^aDepartment of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^bDepartment of Physiology and Functional Genomics, University of Florida, Gainesville, FL, USA



Anderson J. Ferreira

Abstract: Previous studies have shown that activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) results in various beneficial effects in the cardiovascular system. Recently, a new ACE2 activator, named diminazene aceturate (DIZE), was described. Here, we evaluated the actions of this compound in blood pressure (BP) and heart rate (HR) of conscious normotensive and hypertensive rats, as well as explored its mechanism of actions using isolated vessels. The renovascular model of hypertension was utilized. The participation of the Angiotensin-(1-7) receptor Mas and nitric oxide (NO) in the effects of DIZE was evaluated using A-779 and L-NAME, respectively. It was observed that DIZE caused a marked decrease in BP with a compensatory increase in HR in normotensive rats. Accordingly, a significant reduction in the blood flow of the mesenteric bed was evidenced using intravital microscopy. Moreover, in rats with renovascular hypertension, DIZE caused a decrease in BP similar to the hypotensive effect induced by captopril. Importantly, this compound also prevented the development of cardiac hypertrophy induced by hypertension. The isolated vessels technique revealed that the vasodilator effects of DIZE were dependent on Mas activation and NO release. Thus, our findings demonstrated that DIZE reduces the BP of normotensive and hypertensive rats possibly by a mechanism involving Mas and NO.

Keywords: Angiotensin-(1-7), angiotensin-converting enzyme 2, aortic vessels, Mas receptor, renin-angiotensin system, renovascular hypertension, intravital microscopy.

1. INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) plays a key role in controlling the cardiovascular function [1]. An important component of this system is the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) [2,3]. This enzyme is crucial for the homeostasis of the RAS, since it balances the vasoconstrictive and proliferative actions of Angiotensin (Ang) II and the vasodilatory and anti-proliferative effects of the heptapeptide Ang-(1-7). This is possible because ACE2 degrades Ang II generating Ang-(1-7) [4,5]. This latter peptide has cardioprotective effects and dilates blood vessels of many species, both *in vitro* and *in vivo* [6-9].

Changes in expression or activity of ACE2 are associated with cardiac, renal and vascular dysfunction [10-12]. Hernández Prada et al [13], using a virtual screening technique, identified the first compound able to activate ACE2. This compound is named 1-[(2-dimethylamino) ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[(4-methylphenyl) sulfonyl oxy]-9H-xanthene-9-one (XNT) and it caused a significant decrease in blood pressure (BP) when administered in jugular veins of

normotensive and spontaneously hypertensive rats (SHR). In addition, XNT reversed the cardiac and renal fibrosis induced by high BP [13]. This anti-fibrotic effect of XNT in hearts is mediated by inhibition of phosphorylation of extracellular signal regulated kinases (ERK1/2) and by increases in the expression of Ang-(1-7) [14]. Chronic administration of XNT in diabetic rats improved the chemoreflex sensitivity and cardiac function [10].

Recently, the molecule diminazene aceturate (DIZE) was identified as an ACE2 activator [15]. DIZE is an aromatic diamidine used for the treatment of babesiosis in dogs [16], horse and cows [17,18]. Also, it is clinically used as an antileishmanial and antitrypanosomal agent [19,20]. Acting as an activator of ACE2, it has been reported that DIZE induces beneficial effects in several pathological conditions, such as preventing the development of pulmonary hypertension by stimulating the vasoprotective axis of the RAS, lowering the levels of inflammatory cytokines and improving cardiac function [21,22]. Furthermore, DIZE attenuated the rise of left ventricular end diastolic pressure, prevented dysfunctional changes in dP/dt and decreased infarct size, inflammation and apoptosis in infarcted mice [23]. In diabetic rats, DIZE ameliorated cardiac electrical function [24]. Also, chronic treatment with DIZE reduced intraocular pressure [25], improved uveitis [26] and ameliorated the metabolic

*Address correspondence to this author at the Department of Morphology - Av. Antônio Carlos, 6627 - ICB - UFMG, 31.270-901 - Belo Horizonte, MG, Brazil; Tel: (55-31) 3409-2811; Fax: (55-31) 3409-2810; E-mail: anderson@icb.ufmg.br

profile and reduced fat deposition in mice [27]. Thus, in order to expand the knowledge regarding the cardiovascular actions of this molecule, the aim of this current study was to investigate the effects of activation of endogenous ACE2 on BP of normotensive and hypertensive rats, as well as to explore its mechanism of actions using isolated vessels.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 200-300g (12-16 weeks of age) were obtained from the CEBIO - Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brazil). They were housed in a temperature-controlled room (22-23°C) with a 12:12h light-dark cycle. Experimental procedures used in this study were conducted in accordance with the Federal University of Minas Gerais Institutional Animal Care and Use Committee, which complies with the National Institutes of Health (NIH) guidelines (protocol #156/10).

2.2. Measurement of ACE2 Activity

ACE2 activity was evaluated using a fluorogenic peptide substrate [ACE2 substrate, fluorogenic peptide VI (FPS VI), Mca-YVADAPK(Dnp)-OH, where Mca is 7-(methoxycoumarin-4-yl) acetyl and Dnp is 2,4-dinitrophenyl, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA]. The assay was performed in triplicate in a reaction mixture containing 10 nM recombinant human ACE2 (rhACE2), 1 M NaCl, 75 mM Tris-HCl and 0.5 μ M ZnCl₂, at pH 7.4. Different concentrations of DIZE (10⁻⁸ M to 10⁻³ M) were tested against 50 μ M substrate. The samples were read every minute for approximately 60 minutes immediately after the addition of the fluorogenic peptide substrate at 37 °C. The enzyme removes the C terminal dinitrophenyl moiety that quenches the inherent fluorescence of the 7-methoxycoumarin group, resulting in increased fluorescence at excitation and emission spectra of 320 and 405 nm, respectively. The positive control reaction contained all components excluding the DIZE, while in the negative control the rhACE2 was omitted.

2.3. Blood Pressure and Heart Rate Measurements

The rats (n=5 in each group) were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (60:6 mg/kg, i.p.) and a polyethylene catheter PE-10 (CPL Medical Products Ltda, Brazil) connected to PE-50 (BD Intramedic, Clay Adams, EUA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for BP measurements. For intravenous injections, a polyethylene cannula (PE-10 connected to PE-50) was implanted into the femoral vein, where increasing doses of DIZE (0.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mg/kg) were injected. The animals were maintained in individual boxes and, 24 hours after, the arterial catheter was connected to a strain-gauge transducer coupled to a computer-based data acquisition system (MP100A, Biopac System, CA, USA) in order to record pulsate arterial pressure (PAP). The mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were continuously and simultaneously calculated by the software Acqknowledge (Biopac System, CA, USA). An interval of 15 minutes was allowed between subsequent injections of DIZE when the tachyphylactic effect was evaluated.

2.4. Intravital Microscopy

The rats (n=6 control group and n=8 DIZE group) were anesthetized with 12% urethane (1 mL per 100 g weight i.p.), an incision was made in the abdominal wall and the mesentery draped over a plate allowing the transillumination of the tissue. Throughout the protocol, the mesentery bed was irrigated with a buffer solution (PBS, pH 7.4) maintained at 37 °C to prevent drying of the tissue. Subsequently, the animal was taken under a microscope (Olympus BX40) with 10x objective. This microscope had a video camera (Sony, Japan) attached and the images were projected on a television. The images were recorded for subsequent analysis using a DVD recorder color (LG, Brazil). The velocity of the red cells (Vrbc) was measured using a speedometer Doppler optical (Microcirculation Research Institute) connected to a light microscope (Olympus BX40) [28,29]. The flow was determined in mesenteric arterioles (diameter of 10-20 μ m). Before starting the protocol, the rats were implanted with a cannula in the femoral vein for injection the DIZE (5mg/kg).

2.5. Renovascular Hypertension

The surgery for induction of hypertension was performed according to the experimental model of renovascular hypertension (2-kidney-1-clip model; 2K1C) described by Goldblatt and cols [30]. The rats were anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (60:6 mg/kg, i.p.). Subsequently, a longitudinal incision of approximately 2 cm length in the skin of the abdomen was performed to open the peritoneal cavity. A silver clip was placed around the left renal artery and the right kidney was kept intact. The same surgical procedure was performed in sham animals, but there was no implantation of the clip. After surgery, the animals were treated daily by gavage for 4 weeks with saline (control), captopril (30 mg/kg) and DIZE (1 mg/kg).

The MAP and HR were evaluated by the tail-cuff method, which is a noninvasive computerized system for measuring the BP (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT). The tail-cuff blood pressure system utilizes volume-pressure recording technology to measure the BP in the tail of the rats. The animals (n=12 in each group) were acclimated to the restraint and tail-cuff inflation for 1 day before the beginning of the experiments. The restraint platform was maintained at approximately 32 °C to 34 °C. For each session, the rat was placed in an acrylic box restraint and the tail was inserted into a compression cuff that measured the BP 15 times. The average of these values was calculated during the four weeks of the treatment.

2.6. Histological Analysis

The hearts (n=12 in each group) were fixed in 4% Bouin and stained with Hematoxylin & Eosin for cell morphometry. Three sections (5 μ m) from each animal were visualized in a light microscope (BX41, Olympus, Center Valley, PA, USA), photographed (Q-Color3, Olympus, Center Valley, PA, USA) under x400 magnification and analyzed using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The diameter of cardiomyocytes from the left ventricular chamber (~100 cardiomyocytes for each animal) was measured across the region corresponding to the nucleus. Only cardiomyocytes cut

longitudinally with nuclei and cellular limits visible were considered for analysis. All analyses were performed in a blinded way by the same researcher.

2.7. Isolated Aortic Rings Preparation

The thoracic aorta was dissected and cleaned of adhering connective tissue in an ice-cold and oxygenated Krebs-Henseleit solution containing 110.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 1.1 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 2.3 mM NaH₂PO₄ and 11.5 mM glucose. Each aorta was cut into several ring segments (4 mm) and each ring was suspended between two stainless steel hooks in a 15 mL organ bath filled with Krebs-Henseleit solution, which was bubbled with 95% O₂ plus 5% CO₂ and maintained at 37 °C. One hook was fixed to the bottom of the bath while the other was connected to a force displacement transducer (MP100 A, Biopac Systems, CA, USA). A baseline weight of 0.5 g was applied to all rings. Rings were exposed to vasoconstrictors or vasodilators after 1 hour of stabilization. The effects of DIZE were evaluated in aortic rings pre-constricted with phenylephrine (0.1 μM). DIZE (10⁻⁶ to 10⁻⁴, n=5) or saline (vehicle, n=5) was added into the bath after the stabilization of the response to phenylephrine. To evaluate the role of Mas and nitric oxide (NO) in DIZE effects, A-779 (10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M, n=5) or N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ M, n=5), respectively, was added into the bath associated to DIZE (10⁻⁵ M). In addition, the acetylcholine (ACh, at 1 nM to 1 μM) vasorelaxant response was used to evaluate the integrity of the endothelium. Aortic rings that presented a vasorelaxant response to ACh corresponding to more than 70% of the maximal contraction to phenylephrine were considered with intact endothelium.

2.8. Statistical Analysis

All data were reported as mean ± S.E.M. Statistical analyses were performed using Student *t*-test, One-way ANOVA followed by the Newman Keuls post-test or Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. *P*<0.05 was considered statistically significant. Statistical tests were performed utilizing the software GraphPad Prims 5.0.

3. RESULTS

Initially, we evaluated the ability of DIZE activating ACE2 using an *in vitro* assay. DIZE increased the activity of this enzyme when it was added to the reaction in a dose-dependent manner (Fig. 1). This increase was progressive and started shortly after the mixture of the reagents, lasting for up to 60 minutes. Greater ACE2 activities were observed when the concentrations of 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M of DIZE were used. Of note, high concentration of DIZE (10⁻³ M) produced an inhibitory effect on ACE2 activity as compared to the positive control (rhACE2), probably due to unspecific actions. As expected, the negative control did not influence the activity of the enzyme (Fig. 1).

The effects of DIZE on BP and HR were evaluated injecting increasing doses of DIZE (0.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mg/kg) in conscious normotensive rats. It was observed that DIZE dose-dependently reduced the MAP with a concomitant increase in the HR when compared to the saline group

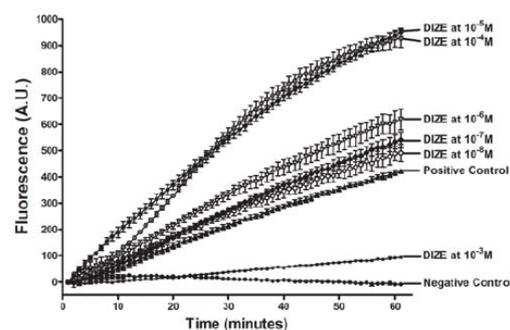


Figure 1. DIZE, at concentrations of 10⁻⁸ to 10⁻⁴ M, increases the activity of ACE2 when it is added to the reaction in a dose-dependent manner. This increase is progressive and started shortly after the mixture of the reagents, lasting for up to 60 minutes.

(Fig. 2). The highest effect on MAP and HR was observed when the dose of 20.0 mg/kg was administered (Δ MAP: -43.7 ± 5.8 mmHg vs. -6.0 ± 1.3 mmHg in saline group; Δ HR: 87.0 ± 14.3 bpm vs. 5.0 ± 3.9 bpm in saline group; Fig. 2). Importantly, no significant differences between the effects of two successive doses of 5.0 mg/kg of DIZE on MAP (Fig. 3A) and HR (Fig. 3B) were found, indicating that DIZE did not cause any considerable tachyphylactic effect. Also, the duration of the hypotensive response of these two successive doses of DIZE was similar (Fig. 3C).

To further confirm the vasodilatory and hypotensive effects of DIZE in normotensive rats, we utilized the intravital microscopy technique. In accordance with our previous data, administration of DIZE reduced the velocity of the blood flow, indicating that this compound increased the diameters of the vessels, which might lead to a reduction in blood pressure (Fig. 4 and Supplemental video).

Next, the anti-hypertensive effects of DIZE and captopril was compared employing the renovascular model of hypertension. The four-week analysis of the BP revealed that the treatments with DIZE and captopril prevented increases in BP induced by the surgery (Fig. 5A). No significant differences among the groups were observed when the HR was evaluated (Fig. 5B). Furthermore, the histological analysis showed that the treatment with DIZE and captopril was also able to prevent the development of cardiac hypertrophy induced hypertension (Fig. 6A and Fig. 6B).

To investigate the mechanism of actions by which activation of endogenous ACE2 reduces BP, the isolated aortic rings technique was used. Increasing concentrations of DIZE (10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M) caused relaxation of aortic rings in a dose-dependent manner. A significant vasodilation was observed at the concentrations of 10⁻⁵ M and 10⁻⁴ M of DIZE (10⁻⁵ M: 58.8% vs. 8.3% in saline group; 10⁻⁴ M: 76.5% vs. 8.3% in saline group, Fig. 7). This vasodilatory action of DIZE was mediated by Mas since A-779, a Mas antagonist, at 10⁻⁴ M completely blocked this effect (4.16% vs. 2.73% in saline group, Fig. 8A). Subsequently, to evaluate the role of NO in the vasodilatory effect of DIZE, isolated aortic rings were pre-incubated with L-NAME, whose action is inhibi-

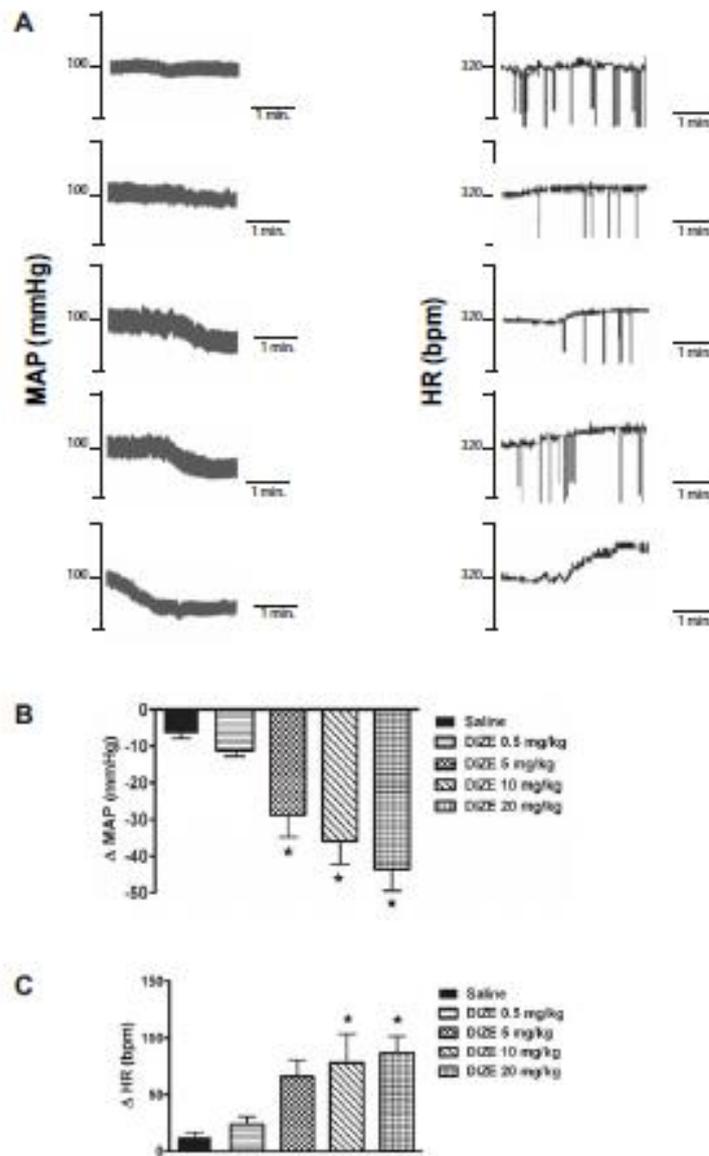


Figure 2. Effects of DIZE at different concentrations on blood pressure and heart rate of rats *in vivo*. DIZE (A, B) decreased the mean arterial pressure (MAP; mmHg) and (A, C) increased the heart rate (HR; bpm) in a dose-dependent manner. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ compared to saline group (One-way ANOVA followed by the Newman-Kuls post-test).

tion of NO synthase. As expected, L-NAME alone caused a vasoconstriction when added to the bath (Fig. 8B). Furthermore, the vasodilatory effect of DIZE was blunted by L-NAME (Fig. 8B), thereby indicating that NO participates of the effect of DIZE in this vascular bed.

4. DISCUSSION

ACE2 is an important regulator of the cardiovascular function and in this current study we tested the actions of DIZE, an ACE2 activator described using virtual screening

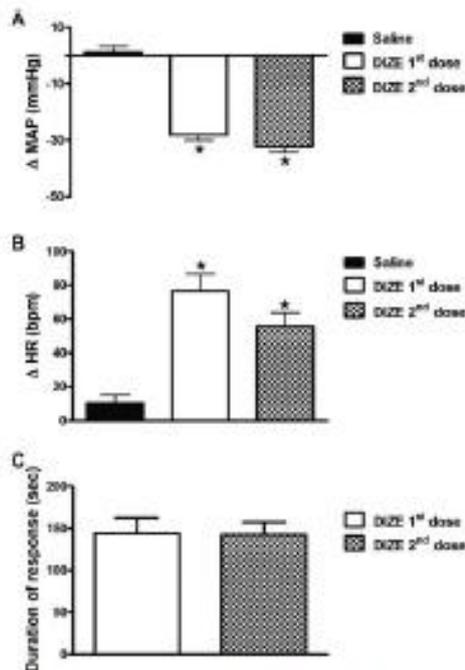


Figure 3. Effects of successive doses of DIZE (5 mg/kg) on blood pressure and heart rate of rats *in vivo*. No significant tachycardiac effect was observed in the (A) mean arterial pressure (MAP; mmHg) and (B) heart rate (HR; bpm). Also, the duration of the effects (C) was similar. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ in compared with saline group (One-way ANOVA followed by the Newman-Kuls post test and Student's *t*-test).

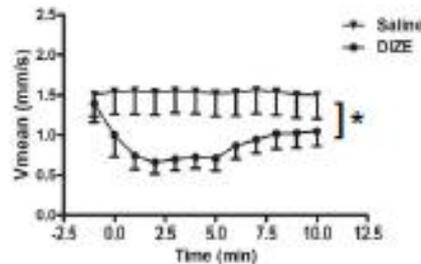


Figure 4. Effects of DIZE on mesenteric blood flow using the intravital microscopy technique. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ compared with saline group (Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post test).

of the crystal structure of this enzyme and database from libraries [11,15], in BP. In fact, DIZE at 10^{-6} M to 10^{-4} M increased the activity of ACE2 in an *in vitro* assay. However, at the concentration of 10^{-3} M, DIZE produced an inhibitory effect on the activity of this enzyme. Likely, this was a result of unspecific actions of DIZE due to the excess of the compound in the reaction.

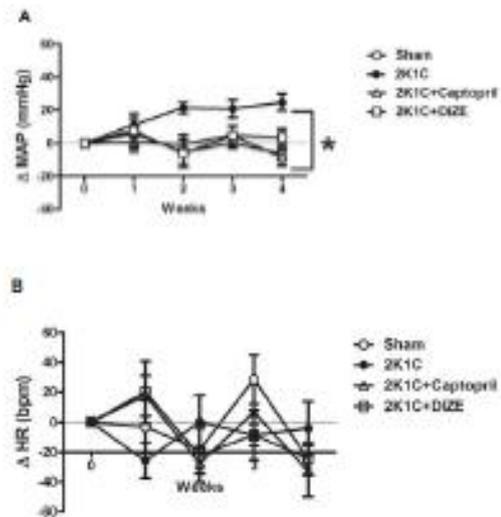


Figure 5. Effects of DIZE and captopril on blood pressure and heart rate of hypertensive rats. Both treatments (A) reduced the mean arterial pressure (MAP; mmHg) and (B) had no significant effects on heart rate (HR; bpm). Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ sham vs. 2K1C (Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post test).

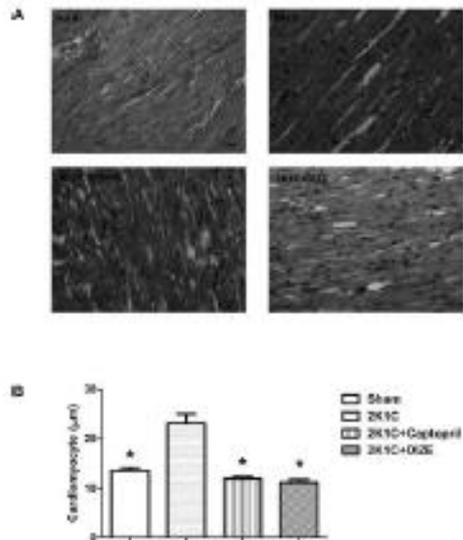


Figure 6. Effects of DIZE and captopril on cardiac hypertrophy induced by hypertension. (A) Representative photomicrographs of cardiomyocytes from control, 2K1C, 2K1C+captopril and 2K1C+DIZE groups. Green trichrome staining (scale bar 50μm). The transversal black lines show the point when the cardiomyocyte diameter was measured. (B) Cardiomyocyte diameter quantification. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ compared to 2K1C group (One-way ANOVA followed by the Newman-Kuls post test).

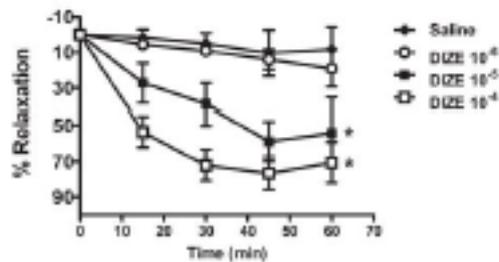


Figure 7. Effects of DIZE at different concentrations in isolated aortic rings of rats. Increasing concentrations of DIZE (10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) caused relaxation of aortic rings in a dose-dependent manner. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ compared to saline group (Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post test).

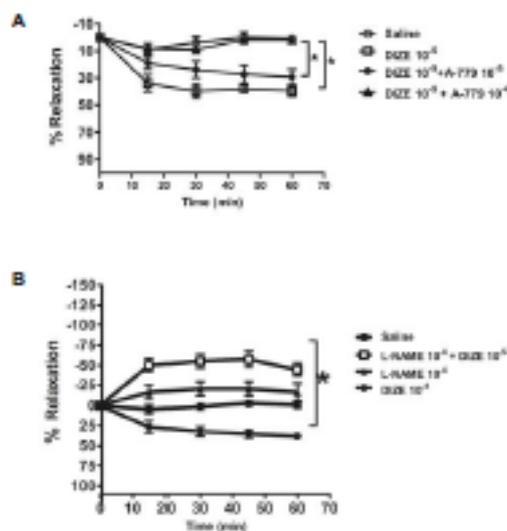


Figure 8. The role of Mas and nitric oxide in the effect of DIZE in isolated aortic rings of rats. (A) A-779, a Mas antagonist, and (B) L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, completely blocked the vasodilatory effect of DIZE. Data are shown as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ (Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post test).

We observed that increasing doses of DIZE in conscious rats caused a dose-dependent decrease in BP with a subsequent increase in HR. These opposite effects on BP and HR are in accordance with regulatory mechanisms, where changes in BP activate physiological mechanisms to maintain the normal BP values [31]. Importantly, these data suggest that DIZE did not interfere in the baroreflex response of normotensive rats. The hypotensive effect of DIZE was confirmed by intravital microscopy as a significant reduction in the blood flow of the mesenteric bed was viewed. Overall, these results corroborate a previous study using XNT, another activator of endogenous ACE2, where it was demonstrated that this compound caused a rapid decrease of BP

when administered into the jugular vein of normotensive rats and of SHR [13]. Also, successive doses of DIZE did not induce tachyphylaxis or potentiation since the effects of two consecutive injections of this compound with a fifteen minute interval were similar.

In addition, animals with renovascular hypertension treated with captopril or DIZE presented a lower BP, thereby evidencing the efficacy of DIZE in combating hypertension. ACE2 activation has been proved to be an innovative and efficient therapeutic strategy to treat cardiovascular and related diseases. Indeed, XNT rapidly caused a reduction in BP when administered into the jugular vein of normotensive rats and of SHR. Also, it improved cardiac function, reversed myocardial and perivascular fibrosis in SHR and ameliorated endothelial dysfunction by attenuating oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. These effects were dependent on activation of the Ang-(1-7)/Mas axis [14,32]. Interestingly, it has been shown that DIZE is effective in preventing pulmonary hypertension by a mechanism involving decreases in inflammatory cytokines and improvements in pulmonary vasoactivity and cardiac function [33]. Other beneficial actions of DIZE include attenuation of the cerebral infarct size and neurological deficits caused by cerebral ischemia [22,34] and decreases in intraocular pressure of glaucomatous rats [25].

In an attempt to elucidate the mechanisms by which DIZE caused vasodilation, we used the isolated vessels technique. It was observed that this compound induced a dose-dependent vasorelaxation in isolated aortic vessels. Moreover, because ACE2 is the main Ang-(1-7)-forming enzyme from Ang II [35,36], the blockade of Mas was tested. It was found that A-779, an antagonist of Mas, completely blunted the effects of DIZE in aortic rings. This result is in agreement with previous data showing that activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis induces vasodilation in many vascular beds [7,8,9,13,37,38]. Furthermore, we demonstrated that L-NAME, an NO synthase inhibitor, abolished the vasodilator effect of DIZE, thereby indicating that the action of this compound is dependent on NO release. Indeed, in keeping with the fact that the effect of DIZE was blocked by A-779, it has been shown that NO release is one of the main mechanisms of action of Ang-(1-7) when it binds to Mas [39,40]. Of note, literature data have reported that the BP-lowering effect of XNT in an Ang II-induced model of hypertension was not dependent on activation of ACE2, suggesting that degradation of Ang II and generation of Ang-(1-7) by ACE2 is not a mechanism of action of this compound [41]. This finding is in obvious contradiction with the majority of the data available in the literature [13,14,15,25,42]. It is possible that both XNT and DIZE hold additional mechanisms of action beyond activating ACE2, but certainly its capacity of activating this enzyme and degrading Ang II is unquestionable. Thus, this apparent contradiction warrants further investigations.

In summary, this study showed that activation of endogenous ACE2 reduced the BP of normotensive and hypertensive rats. Furthermore, DIZE caused a dose-dependent vasodilatation in aortic rings through a mechanism of action involving Mas and release of NO.

LIST OF ABBREVIATIONS

RAS	=	Renin-angiotensin system
ACE2	=	Angiotensin-converting enzyme 2
Ang	=	Angiotensin
Ang-(1-7)	=	Angiotensin-(1-7)
XNT	=	1-[(2-dimethylamino) ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[[4-methylphenyl] sulfonyl oxy]-9H-xanthene-9-one
BP	=	Blood pressure
SHR	=	Spontaneously hypertensive rats
ERK1/2	=	Extracellular signal regulated kinases
DIZE	=	Diminazene aceturate
NIH	=	National Institute of Health
rhACE2	=	Recombinant human ACE2
PAP	=	Pulsate arterial pressure
MAP	=	Mean arterial pressure
HR	=	Heart rate
Vrbc	=	Velocity of the red blood cells
NO	=	Nitric oxide
Ach	=	Acetylcholine
L-NAME	=	N(G)-nitro-L-arginine methyl ester

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to disclose. This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ACKNOWLEDGEMENTS

De Maria M.L.A.; Antújo L.D.; Pereira L.A.S.; Ribeiro H.J. and Fraga-Silva R.A. contributed to conduct the work, data collection, analysis and interpretation. De Maria M.L.A.; Menezes G.B.; Shenoy V.; Raizada M.K. and Pereira A.J. contributed to the drafting, conception and design of the work and critical revision for important intellectual content. De Maria M.L.A. and Ferreira A.J. wrote the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Dikuro, M.; Burns, K.D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Sci. World J.*, 2009, 9, 522-533.
- [2] Donoghue, M.; Hsieh, F.; Barnas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Saglamo, N. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.*, 2000, 87, E1-E9.
- [3] Tipria, S.R.; Hooper, N.M.; Hyde, R.; Karnan, E.; Christis, G.; Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 33218-33243.
- [4] Santos, R.A.; Ferreira, A.J.; Simões e Silva, A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol.*, 2008, 93(5), 519-527.
- [5] Navaz, L.G.; Harrison-Bernard, L.M.; Imig, J.D.; Mitchell, K.D. Renal actions of angiotensin II at AT1 receptor blockers. In: Epstein, M.; Brenner, H.R.; eds. *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Philadelphia, PA: Hanley & Belfus, 2000, Inc. 189-214.
- [6] Durand, M.J.; Raffai, G.; Wainberg, B.D.; Lorbardi, J.H. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010, 299, 1024-1033.
- [7] Fernandes, L.; Fortes, Z.B.; Nogueira, D.; Tostes, R.C.; Santos, R.A.; Castelli de Carvalho, M.H. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied *in vivo*. *Hypertension*, 2001, 37(2 part 2), 703-709.
- [8] Oliveira, M.A.; Fortes, Z.B.; Santos, R.A.; Koski, M.C.; De Carvalho, M.H. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriole dilatation *in vivo*. *Peptides*, 1999, 20, 1195-1201.
- [9] Trank, A.J.; Ferrario, C.M. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspective in cardiovascular treatment. *Cardiovasc. Drug Rev.*, 2007, 25, 162-174.
- [10] Marça, T.M.; Almeida, T.C.S.; Raizada, M.K.; Ferreira, A.J. Chronic activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 protects diabetic rats from cardiovascular autonomic dysfunction. *Exp. Physiology*, 2012, 97(6), 699-709.
- [11] Crackower, M.A.; Sarao, R.; Oudit, G.Y.; Yagci, C.; Konevski, I.; Scarsie, S.E. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002, 417, 822-828.
- [12] Oudit, G.Y.; Liu, G.C.; Zhong, J.; Bhan, R.; Chow, F.L.; Zhou, J. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2010, 59, 529-538.
- [13] Hernández Prado, J.A.; Ferreira, A.J.; Katovich, M.J.; Shenoy, V.; Qi, Y.; Santos, R.A.; Castellano, R.K.; Lampkin, A.J.; Gurbuz, V.; Ostrov, D.A.; Raizada, M.K. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*, 2008, 51, 1312-1317.
- [14] Ferreira, A.J.; Shenoy, V.; Qi, Y.; Fraga-Silva, R.A.; Santos, R.A.; Katovich, M.J.; Raizada, M.K. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp. Physiol.*, 2011, 96(3), 287-294.
- [15] Kulemina, L.V.; Ostrov, D.A. Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biomol. Screen.*, 2011, 16, 878-885.
- [16] Hwang, S.J.; Yamazaki, M.; Nakamura, K.; Suzuki, N.; Murakami, M.; Wicakmasoleka Rajapakse B.K.; Ohta, H.; Muro, Y.; Takiguchi, M. Development and characterization of a strain of *Isospora gibsoni* resistant to diminazene aceturate *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.*, 2010, 72(6), 765-771.
- [17] Tunpasud, S.B.; Clark, S.B.; Anderson, W.C.; Karbiwsky, C.M.; Miller, K.E.; Hurlbut, J.A. Confirmation of diminazene diaceturate in bovine plasma using electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 2006, 844, 127-133.
- [18] Rashid, H.B.; Chaudhry, M.; Rashid, H.; Pervez, K.; Khan, M.A.; Mahmood, A.K. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2007, 40, 463-467.
- [19] Juan-Munoz, R.R.; Goyenchea, D.; Coimbra, G.H.; 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. *Exper. Parasitol.*, 2006, 12, 21-30.
- [20] Koshi, M.; Dairuade, S.; Karamba, H.; Jalilali, Y.; Howari, M.; Mowafiq, D.; Vinandana, P.; Beshder, D. Development of a nanoparticle formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. *Nanotechnology*, 2010, 21(50), 505102.
- [21] Rigatto, K.; Casak, K.R.; Shenoy, V.; Katovich, M.J.; Raizada, M.K. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *Eur. J. Pharmacol.*, 2013, 713, 89-93.
- [22] Shenoy, V.; Gynathika, A.; Janyapa, Y.P.; Qi, Y.; Afzal, A.; Rigatto, K.; Ferreira, A.J.; Fraga-Silva, R.A.; Kanana, P.; Douglas,

- J.Y.; Agarwal, D.; Mubarak, K.K.; Bradford, C.; Kennedy, W.R.; Jun, J.Y.; Rabinasabapathy, A.; Bruce, E.; Gupta, D.; Cardounal, A.J.; Mocco, J.; Patel, J.M.; Francis, J.; Grant, M.B.; Katovich, M.J.; Rainada, M.K. Diminacrine attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013, 187, 648-657.
- [23] Qi, Y.; Zhang, J.; Cole-Jeffrey, C.T.; Shenoy, V.; Espino, A.; Hanna, M.; Song, C.; Pepine, C.J.; Katovich, M.J.; Rainada, M.K. Diminacrine acetate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension*, 2013, 62, 746-752.
- [24] Coutinho, D.C.; Monnem-Cabli, G.; Ferreira, A.J.; Medel, E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. *Euro pace*, 2014, 16(11), 1689-1696.
- [25] Fonseca, G.; Nogueira, I.C.; Nogueira, B.S.; Fulgencio, G.O.; Meneses, G.B.; Fernandes, S.O.; Cardoso, V.N.; Fernandes, R.S.; Oliveira, G.P.; Franca, J.R.; Franca, A.A.; Rainada, M.K.; Ferreira, A.J. Antigliacomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. *Invert. Ophthalmol. Hr. Sci.*, 2013, 54(6), 4296-4306.
- [26] Qin, Y.; Shi, P.K.; Zhu, P.; Yang, H.; Verma, A.; Lei, B.; Li, Q. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activator diminacrine acetate ameliorates endotoxin-induced urethritis in mice. *Invert. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2014, 55(6), 3809-3818.
- [27] Macêdo, S.M.; Antunes, T.; Oliveira Andrade, J.M.; Guimarães, A.L.; Batista de Paula, A.M.; Ferreira, A.J.; Santos, S.H.S. Angiotensin Converting Enzyme 2 Activator DIZE Modulates Metabolic Profile in Mice Decreasing Lipogenesis. *Protein Pept Lett*, 2015, 22(4), 332-40.
- [28] Kubo, P.; Heit, B.; van Marle, G.; Johnston, J.B.; Knight, D.; Khau, A.; Power, C. *In vivo* impairment of neutrophil recruitment during leptin infection. *J. Immunol.*, 2003, 171(9), 4801-4808.
- [29] Xavier, C.H.; Nalivaiko, E.; Hoig, M.J.; Meneses, G.B.; Carr, D.C.; Campagnolo-Santos, M.J.; Fortes, M.A. Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience*, 2009, 164(13), 1360-1368.
- [30] Goldblatt, H.; Lynch, J.; Hanzal, R.F.; Szreniville, W.W. Studies on experimental hypertension: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med. Sci.*, 1934, 9, 347-378.
- [31] Valenti, V.E.; Irazuami, C.; de Abreu, L.C.; Colimbari, E.; Sato, M.A.; Ferreira, C. Intra-strain variations of baroreflex sensitivity in young Wistar-Kyoto rats. *Clin. Invert. Med.*, 2009, 32(6), E251.
- [32] Fraga-Silva, R.A.; Costa-Fraga, F.P.; Mirza, T.M.; Moraes, P.L.; Martins Lima, A.; Lautner, R.Q.; Castro, C.H.; Soares, C.M.; Borges, C.L.; Nade, A.P.; Oliveira, M.L.; Shenoy, V.; Katovich, M.J.; Santos, R.A.; Rainada, M.K.; Ferreira, A.J. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*, 2013, 61, 1233-8.
- [33] Yuan, L.; Castellano, R.K.; Ostrov, D.A.; Oh, S.P.; Katovich, M.J.; Rainada, M.K. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009, 179, 1048-54.
- [34] Moura, A.P.; Regenhardt, R.W.; O'Connor, T.E.; Joseph, J.P.; Rainada, M.K.; Katovich, M.J.; Samson, C. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischemic stroke. *Exp. Physiol.*, 2011, 96, 1084-96.
- [35] Ferreira, A.J.; Santos, R.A.S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2008, 38(4), 499-507.
- [36] Keidar, S.; Kaplan, M.; Gurevich-Lazarovich, A. ACE2 of the heart: form angiotensin I to angiotensin-(1-7). *Cardiovasc. Res.*, 2007, 73, 463-469.
- [37] Almeida, A.P.; Fribergas, B.C.; Madureira, M.M.; Santos, R.I.; Campagnolo-Santos, M.J.; Santos, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2000, 33(6), 709-713.
- [38] Severgnini, S.Q.; Beirao, M.; Lautner, R.Q. Vascular relaxation, antihypertensive effects, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the Mas receptor. *Hypertension*, 2010, 56, 112-120.
- [39] Gomes, E.R.M.; Lara, A.A.; Almeida, P.W.M.; Guimarães, D.; Rosende, R.R.; Campagnolo-Santos, M.J.; Bader, M.; Santos, R.A.S.; Guadimosin, S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanylate 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. *Hypertension*, 2010, 55, 153-160.
- [40] Goodfellow, T.Y.M.; Pendzgraw, K.D.; Reid, S.D.; Ross, J.C.; Dix, D.I.; Chappell, M.C. Angiotensin-(1-7)-Angiotensin-Converting Enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus. *Hypertension*, 2010, 55, 166-171.
- [41] Haber, P.K.; Ye, M.; Wynsocki, I.; Maier, C.; Haque, S.K.; Battle, D. Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of pro-angiotensin-converting enzyme 2 activation: studies *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. *Hypertension*, 2014, 63(4), 774-782.
- [42] Fraga-Silva, R.; Song, B.S.; Wardhade, M.; Dougl, C.; Jun, J.Y.; Baker, M.B.; Li, Y.; Castellano, R.K.; Katovich, M.J.; Rainada, M.K.; Ferreira, A.J. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol. Med.*, 2010, 16(5-6), 210-215.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida PW, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CE, Dias-Peixoto MF, Russo RC, Teixeira MM, Cassali GD, Ferreira E, Santos IC, Garcia AM, Silami-Garcia E, Wisloff U, Pussieldi GA. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol.*107(1), 261-265, 2009

Atkinson G, Reilly T. Circadian variation in sports performance. *Sports Med*, 292-312, 1996

Alzamora A.C, Santos M.J, Campagnole–Santos M.J. Hypotensive effects of Ang II and Ang-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *Am.J. Regul. Integr. Comp. Physiol*, 283, 1187-1195, 2003

Atlas, S. A. The Renin-Angiotensin System Revisited: Classical and Nonclassical Pathway of Angiotensin Formation. *Mt Sinai J Med.* 65(2): 87-96, 1998

Azevedo L, Brum P, Mattos K, Junqueira C, Rondon M, Barreto A, Negrão C. Effects of losartan combined with exercise training in spontaneously hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*, (36): 1595-1603, 2003

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

Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 269(1 Pt 2):H313-9, 1995.

Braith RW, Welch MA, Feigenbaum, MS Kluess HK, Pepine CJ. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. *J. Amer. Coll. Cardiol* 34:1170-1175, 1999

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. <http://tabnet.datasus.gov.br>. 2010

Brito Ade F, de Oliveira CV, Santos Mdo S, Santos Ada C. High-intensity exercise promotes postexercise hypotension greater than moderate intensity in elderly hypertensive individuals. *Clin Physiol Funct Imaging*, 34(2):126-32, 2014 a

Brito Ade F, de Oliveira CV, Brasileiro-Santos Mdo S, Santos Ada C. Resistance exercise with different volumes: blood pressure response and forearm blood flow in the hypertensive elderly. *Clin Interv Aging*, 12;9:2151-8, 2014 b

Brody MJ, Varner KJ, Vasquez EC, Lewis SJ. Central nervous system and the pathogenesis of hypertension. *Hypertension*, 18:7-12, 1991

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 27(3):523-528, 1996

Callard D, Davenne D, Lagarde D, Meney I, Gentil C, Van Hoecke J. Nycthemeral variations in core temperature and heart rate: continuous cycling exercise versus continuous rest. *Int J Sports Med*, 22:553-7, 2001

Carneiro-Junior MA, J.F. Quintão Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Amadeu MA, Oliveira EM, Felix LB, Cruz JS, Mill JG, Natali AG, Prímola-Gomes TN. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(11): 960-965, 2014

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), 937-942, 2005

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

Cervenka L, Horáček V, Vanecková I, Hubacék J.A, Oliverio M.I, Coffman T.M, Navar L.G. Essential role of AT1A receptor in the development of 2k1c hypertension. *Hypertension*, 40, 735-741, 2002

Coutinho DC, Monnerat-Cahli G, Ferreira AJ, Medei E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. *Europace*. Apr 15, 2014

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

De Mello Franco FG, Santos AC, Rondon MUP, Trombetta IC, Strunz C. Effects of home-based exercise training on neurovascular control in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*, 8: 851–855, 2006

De Souza NS, Gomides RS, da Silva GV, de Moraes FCL, Mion D Jr, Tinucci T. Intra-arterial blood pressure response in hypertensive subjects during low- and high-intensity resistance exercise. *Clinics*, 65(3):271-7, 2010

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L. Molecular Mechanisms Involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Pathway in Cardiomyocytes. *Hypertension*, 52(3), 542-548, 2008

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

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (Ace2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87(5): E1-9, 2000

Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol.* 35:1043-1053, 2003

Dzau VJ and Pratt RE. Renin angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. *The heart and cardiovascular system.* New York: Raven Press, 1631-1662, 1986

Ebrahimi B, Crane JA, Knudsen BE, Macura SI, Grande JP, Lerman LO. Evolution of cardiac and renal impairment detected by high-field cardiovascular magnetic resonance in mice with renal artery stenosis. *J Cardiovasc Magn Reson.* Oct 26;15:98, 2013.

Edwards B, Waterhouse J, Atkinson G, Reilly T. Exercise does not necessarily influence the phase of the circadian rhythm in temperature in healthy humans. *J Sports Sci,* 20:725-32, 2002

Fang J, Wylie-Rosett J, Alderman MH. Exercise and cardiovascular outcomes by hypertensive status: NHANES 1 epidemiologic follow-up study. *Am J Hypertens.* 18, 751-758, 2005

Fazan RJ, da Silva VJA, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Ver Bras Hipertens.* vol 8(1), 2001

Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin-(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension.* 46:948-952, 2005

Felix JV, Michelini LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension,* 50, 780-785, 2007

Fernandes L, Loiola R. A, Tostes R. C, Nigro D, Fortes Z. B. and de Carvalho, M. H. Angiotensin II-Induced Venoconstriction Involves Both At1 and

At2Receptors and Is Counterbalanced by Nitric Oxide. *Peptides*, 26(12): 2458-2463, 2005

Ferrario CM. Importance of rennin angiotensin aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. *Drugs*, 39:1-8, 1998

Ferrario C.M, Jessup J, Gallagher P.E, Averill D.B, Brosnihan K.B, Ann Tallant E, Smith R.D, Chappell M.C. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney International*. 68(5):2189-96, 2005.

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

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

Ferreira AJ, Moraes PL, Foureaux G, Andrade AB, Santos RAS, Almeida AP. The Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis Is Expressed in Sinoatrial Node Cells of Rats. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(8) 761–768, 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

Fraga-Silva, RA; Costa-Fraga, FP; Murça, TM; Moraes, PL; Martins Lima, A; Lautner, RQ; Castro, CH; Soares, CM; Borges, CL; Nadu, AP; Oliveira, ML; Shenoy, V; Katovich, MJ; Santos, RA; Raizada, MK; Ferreira, AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*, 61:1233–8, 2013

Franchi F, Knudsen BE, Oehler E, Textor SC, Lerman LO, Grande JP, Rodriguez-Porcel M. Non-invasive assessment of cardiac function in a mouse model of renovascular hypertension. *Hypertens Res.* 36(9):770-5, 2013

Frohlich ED, Apsrein C, Chobanian AV. The heart in hypertension. *New Engl J Med*, 327:998-1007, 1992

Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgêncio GO, Menezes GB, Fernandes SO, Cardoso VN, Fernandes RS, Oliveira GP, Franca JR, Faraco AA, Raizada MK, Ferreira AJ. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(6):4296-306, 2013

Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, Bader M, Oliveira LA, Santos RA & Kitten GT. Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regulatory Peptides.* 175 30-42, 2012

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 86(7): 458-464, 2008

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med. Sci.*, 9:347-378, 1934

Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Santos SH, Neves SR, Silva Camargos ER, Becker LK, Belchior HA, Dias-Peixoto MF, Pinheiro SV, Santos RA. Selective increase of Angiotensin-(1-7) and its receptor in spontaneously hypertensive rat hearts subjected to physical training. *Exp Physiol.*, 15, 589-598, 2008

Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimaraes D, Resende RR, Campagnole-

Santos MJ, Bader M, Santos RA & Guatimosim S. Angiotensin-(1–7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension*, 55, 153–160, 2010

Gomes-Santos IL, Fernandes T, Couto GK, Ferreira-Filho JCA, Salemi VMC, Fernandes FB, Casarini DE, Brum PC, Rossoni LV, Oliveira EM, Negrao CE. Effects of Exercise Training on Circulating and Skeletal Muscle Renin-Angiotensin System in Chronic Heart Failure Rats. *Journal Plus One*, 9(5), 2014

Granado M, Fernandez N, Monge L, Figueras JC, Carrenõ-Tarragona G, Amor S, García-Villalo AL. Effects of Coronary Ischemia-Reperfusion in a Rat Model of Early Overnutrition. Role of Angiotensin Receptors. *Plus One*, 8(2):e54984, 2013

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

Guynton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 12^a ed. 2011

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

Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 270(1), 141-147, 1996

Hayashi A, Kobayashi A, Takahashi R, Suzuki F, Nakagawa T, Kimoto K. Effects of voluntary running exercise on blood pressure and renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 46:165-170, 2000

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

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*, 37, 72-76, 2001

Herath CB, Grace JA, Angus PW. Therapeutic potential of targeting the renin angiotensin system in portal hypertension. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 4(1), 2013

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

Hilgers KF, Hartner A, Porst M. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage Infiltration in hypertensive kidney injury. *Kidney Int*, 58:2408-2419, 2000

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) Contributes to the Antihypertensive Effects of Blockade of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension*, 31, 356-361, 1998

Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX & Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289 H2356-H2363, 2005

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

Jordan J, Shannon J.R, Black B. K, Ali Y, Farley M, Costa F, Diedrich A, Robertson R.M, Biaggioni I, Robertson D. The Pressor Response to Water Drinking in Humans : A Sympathetic Reflex? *Circulation*, 101, 504-509, 2000

Joviano-Santos JV. Efeitos antiarritmogênicos da angiotensina-(1-7) em um modelo de arritmias cardíacas in vivo, 2015

Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Bader M, Alenina N, Fontes MA, Santos RA, Aguiar DC, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Brain Res.* 15;257:25-30; 2013

Kangussu LM, Guimaraes PS, Nadu AP, Melo MB, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*. 2015

Kar S, Gao L, Zucker IH. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol*, 108:923–932, 2010

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

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

Kuriakose S and Uzonna JE. Diminazene aceturate (Berenil), a new use for an old compound? *Int Immunopharmacology*, 21:342-345, 2014

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) Augments Bradykinin-Induced Vasodilation by Competing with Ace and Releasing Nitric Oxide. *Hypertension*, 29, 394-400, 1997

Loot AE, Roks AJ, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, Van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, 105, 1548-1550, 2002

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

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*.17(5):707-19, 1991

Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*.37(12), 1909-1926, 2004

Melaragno MG, Fink GD. Enhanced Slow Pressor Effect of Angiotensin II in Two-Kidney, One Clip Rats. *Hypertension*. 25:288-293, 1995.

Morishita R, Higaki J, Okunishi H, Nakamura F, Nagano M, Mikami H, Ishii K, Miyazaki M, Ogihara T. Role of tissue renin angiotensin system in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol*, 264, 510-4, 1993

Morton JJ, Wallace EC. The importance of the renin-angiotensin system in the development and maintenance of hypertension in the two-kidney one-clip hypertensive rat. *Clin sci.*, 64(4):359-70, 1983

Mousa TM, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J Appl Physiol*, 5850: 616–624, 2008

Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1–7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 388–398, 1998

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Mitchell KD. Renal actions of angiotensin II at AT1 receptor blockers. In: Epstein M, Brunner HR, eds. *73 Angiotensin II Receptor Antagonists*. Philadelphia, PA: Hanley & Belfus, Inc; 189 –214, 2000

Negrão CE, Irigoyen MC, Moreira ED, Brum PC, Freire PM, Krieger EM. Effect of exercise training on the renal sympathetic nerve activity, baroreflex control and blood pressure responsiveness. *American Journal Of Physiology Regulatory Integrative And Comparative Physiology*, 265:365-370, 1993.

Negrão CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Fail Rev*, 13: 51–60, 2008

Ng, K. K. and Vane, J. R. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. *Nature*. 216(5117), 762-766, 1967

Oliveira E, Krieger J. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico. Aspectos moleculares. *Hipertensão*. 2(5): 73-78. 2002.

Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local rennin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming

training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 10(1), 15-23, 2009

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med.* 71(1):29-42, 1940

Peach, M. J. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiol Rev*, 57(2): 313-370, 1977

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*, 36 (3):533-53, 2004

Peotta VA, Gava AL, Vasquez EC, Meyrelles SS. Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(8): 761-766, 2007

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

Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of Nitric Oxide by Angiotensin-(1-7) from Porcine Coronary Endothelium: Implications for a Novel Angiotensin Receptor. *Br J Pharmacol*, 111(3), 652-654, 1993

Probstfield, J. L. and O'Brien, K. D. Progression of Cardiovascular Damage: The Role of Renin-Angiotensin System Blockade. *Am J Cardiol*, 105(1 Suppl): 10A-20, 2010

Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M, Song C, et al. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension*, 62:746 - 752, 2013.

Qiu Y, Shil PK, Zhu P, Yang H, Verma A, Lei B, Li Q. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activator diminazene aceturate ameliorates endotoxin-induced uveitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55(6):3809-18, 2014

Raffai G, Khang G, Vanhoutte PM. Angiotensin-(1-7) augments endothelium-dependent relaxations of porcine coronary arteries to bradykinin by inhibiting angiotensin-converting enzyme 1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63(5):453-60, 2014

Reddy, G.K., Enwemeka, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 29(3):225-9, 1996

Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J. and Hooper, N. M. Evaluation of Angiotensin-Converting Enzyme (Ace), Its Homologue Ace2 and Neprilysin in Angiotensin Peptide Metabolism. *Biochem J*, 383(Pt 1), 45-51, 75 2004

Rigatto K, Casali KR, Shenoy V, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol*, 713(1-3):89-93, 2013.

Roveda F, Middlekauff HR, Rondon MU, Reis SF, Souza M. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol*, 42: 854–860, 2003

Sadoshima JI, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*, 73:413-423, 1993

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1–7): an update. *Regul Pept.* 91:45-62, 2000

Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16, 122–128, 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

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

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284,1985–1994, 2003

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*, 49(1), 185-192, 2007

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

Skeggs LT, Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin II. *J exp med.* 104(2):193-197, 1956

Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, Ferreira AJ, Fraga-Silva RA, Kearns P, Douglas JY, et al. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med* , 187:648–657, 2013

Silva DM, Gomes-Filho A, Olivon VC, Santos TM, Becker LK, Santos RAS, Lemos VS. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol*, 8, 2011

Silveira RF, Leme JACA, Manchado FB, Lopes AG, Hirayama MS, Garcia DR, Zaros PR, Godoy SA, Silva CC, Luciano E. Utilização de substrates energéticos após exercício agudo de ratos treinandos aerobicamente por natação. *Motriz* , 13(1), 7-13, 2007

Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O, de Sousa LP, TeixeiraMM, Santos RA, Simoes e Silva AC. ACE2-angiotensin-(1–7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clinical Science*, 119,385–394, 2010

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G & Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33238–33243, 2000

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

Tsai JC, Liu JC, Kao CC, Tomlinson B, Kao PF, Chen JW, et al. Beneficial effects on blood pressure and lipid profile of programmed exercise training in subjects with white coat hypertension. *Am J Hypertens*. 15(6):571-6, 2002

Velez JCQ, Lerardi JL, Bland AM, Morinelli TA, Arthur JM, Raymond JR. Enzymatic Processing of Angiotensin Peptides by Human Glomerular Endothelial Cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(12), 1583-1594, 2012

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., et al. 2002. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 277(17), 14838-14843, 2002

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

Voiculescu A, Hofer M, Hetzel GR, Malms J, Mödder U, Grabensee B, Hollenbeck M. Noninvasive investigation for renal artery stenosis: contrast-enhanced magnetic resonance angiography and color Doppler sonography as compared to digital subtraction angiography. *Clin Exp Hypertens*. Oct;23(7):521-31, 2001

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-Kidney, One Clip and One-Kidney, One Clip Hypertension in Mice. *Hypertension*, 29: 1025-1030, 1997

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

Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodeling in rats. *Cardiovasc Res*, 78: 523–532, 2008

Zamo FS, Barauna VG, Chiavegatto S, Irigoyen MC, Oliveira EM. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 89(3-4), 93-99, 2011

Zamo FS, Lacchini S, Mostarda C, Chiavegatto S, Silva IC, Oliveira EM, Irigoyen MC. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats - Renin-Angiotensin system modulation. *Clinics*, 65(1), 85-92, 2010