

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**EFEITO VASODILATADOR DE FRAGMENTOS  
ANGIOTENSINÉRGICOS NO LEITO CORONARIANO  
DE RATOS**

PATRÍCIA LANZA DE MORAES

BELO HORIZONTE  
2013

PATRÍCIA LANZA DE MORAES

# **EFEITO VASODILATADOR DE FRAGMENTOS ANGIOTENSINÉRGICOS NO LEITO CORONARIANO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira.

BELO HORIZONTE

2013



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**PATRÍCIA LANZA DE MORAES**

245/2013/18  
entrada  
2º/2011  
07850416643

Às **quatorze horas** do dia **19 de julho de 2013**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITO VASODILATADOR DE FRAGMENTOS ANGIOTENSINÉRGICOS NO LEITO CORONARIANO EM RATOS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADA
Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto	UFVJM	APROVADA
Dra. Walkyria N. Oliveira Sampaio	UI	aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

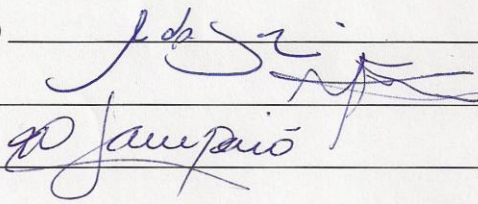
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de julho de 2013.**

Dr. Anderson José Ferreira (Orientador) \_\_\_\_\_

Dr. Marco Fabrício Dias Peixoto \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Walkyria N. Oliveira Sampaio \_\_\_\_\_

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

  
Prof. Anderson José Ferreira  
Subcoordenador do Programa  
de Pós-Graduação  
em Biologia Celular (CB) UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson José Ferreira, pelas oportunidades que tive durante a realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim desde o início da iniciação científica. Foram 5 anos muito produtivos, de muito trabalho e aprendizados.

Agradeço também a todos os envolvidos neste trabalho (Prof. Dr. Alvaír Pinto de Almeida, Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Dr. Luis Gonzaga da Silva Júnior, e Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos) que disponibilizaram tempo para a execução de experimentos e para discussões e se disponibilizaram a me ensinar.

Gostaria também de agradecer a todos os amigos feitos durante este período, nos laboratórios vizinhos, na Biologia Celular e, principalmente, no laboratório de Biologia Cardíaca. Tati Murça, Tati Almeida, Marildinha, Dani, Jú, Vanessa, Gisele, Marcos, Paulo, Renato, Gonzaga, Heder, Grazi, Letícia e todos que passaram por lá ou estão chegando: muito obrigada pelo apoio, ajuda, pelos almoços e pela amizade. Vocês, que cuidaram dos meus ratos, trocaram ratos comigo e me aguentaram em dias de chique, têm muita participação neste trabalho!

Agradeço também aos meus amigos da graduação, em especial a Mari, Paulinha, Mika, ao Zazu, Davi e Gira, que estiveram presentes e me incentivaram no início desta caminhada. As minhas queridas amigas da vida Fabi, Fê, Nú, Quel, Mixa, Maria, Baby, Rê e Renata agradeço por tantos momentos de descanso e divertimento e também de conselhos e discussões sobre a vida. Com certeza vocês foram imprescindíveis para que na segunda todo o trabalho recomeçasse com mais motivação. Agradeço ao Lucas, meu amor, por ser para mim um modelo de dedicação, comprometimento e persistência, e por alegrar meus dias e estar sempre presente me apoiando.

Por último, gostaria de agradecer a toda minha família, que sempre me apoiou e acreditou em mim. A minha mãe, que sempre me motivou, demonstrando empolgação por meus projetos e me mostrando que as coisas podem ser mais simples que parecem. Também por me lembrar de que nada é definitivo e por me tranquilizar nos momentos de incerteza e desânimo. Ao meu pai, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de esforço e trabalho e por fazer tudo que está ao seu alcance por mim. Aos meus irmãos, Let e Silvinho, pelo apoio e amizade. A todos os outros membros desta família tão grande pela convivência, pelas comemorações e torcidas. Muito obrigada a todos!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\mu\text{m}$  - micrômetro  
 $\mu\text{M}$  - micromolar  
A779 - bloqueador do receptor Mas [(D-Ala<sup>7</sup>)-Angiotensina I/II (1-7)]  
AD - enzima aspartato-descarboxilase  
Akt - proteína quinase B  
Ala - alanina  
Ang - angiotensina  
ANOVA - análise de variância  
AP - enzima aminopeptidase  
APA - enzima aminopeptidase A  
APD - enzima aminopeptidase D  
APN - enzima aminopeptidase N  
Arg - arginina  
Asp - aspartato  
AT<sub>1</sub> - receptor da Ang II do subtipo 1  
AT<sub>2</sub> - receptor da Ang II do subtipo 2  
B<sub>2</sub> - receptor de bradicinina  
bpm - batimentos por minuto  
BSA - *bovine serum albumine* - albumina de soro bovino  
Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio  
CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio  
CEBIO - Centro de Bioterismo  
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal  
cm - centímetros  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
CP - enzima carboxipeptidase  
CTL - grupo controle  
DAB - diaminobenzidina  
DCV - doenças cardiovasculares  
DIZE - *diminazene aceturate* - aceturato de diminazeno  
dT/dt negativo - índice de relaxamento  
dT/dt positivo - índice de contração  
ECA - enzima conversora de angiotensina  
ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2



eNOS - *endothelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial  
EPM - erro padrão da media  
FC - frequência cardíaca  
g - gramas  
H<sub>2</sub>O - água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
His - histidina  
i.p. - intraperitoneal  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
Ile - isoleucina  
IRAP - *insulin-regulated membrane aminopeptidase* - aminopeptidase de membrana regulada por insulina (receptor da Ang IV)  
K<sup>+</sup> - íon potássio  
KCl - cloreto de potássio  
Kg - quilogramas  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio monobásico  
Leu - leucina  
M6P - manose 6-fosfato  
Mas - receptor da angiotensina-(1-7)  
MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio  
min - minutos  
mL - mililitros  
mM - milimolar  
mmHg - milímetros de mercúrio  
MrgD - *Mas related G-protein coupled receptor* - receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas  
n - número de repetições ou animais  
NaCl - cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio  
NEP - enzima endopeptidase neutra  
ng - nanogramas  
nM - nanomolar  
NO - *nitric oxide* - óxido nítrico

NOS - *nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase  
O<sub>2</sub> - oxigênio  
°C - graus Celsius  
p/v - peso por volume  
PAM - pressão arterial média  
PAP - pressão arterial pulsátil  
PBS - *bovine serum albumin* - albumina de soro bovino  
PCP - enzima prolilcarboxipeptidase  
PE10 - tubo de polietileno número 10  
PE50 - tubo de polietileno número 50  
PEP - enzima prolilendopeptidase  
Phe - fenilalanina  
PI3K - fosfatidilinositol 3-fosfato  
pM - picomolar  
Pro - prolina  
RNA - *ribonucleic acid* - ácido ribonucléico  
ROS - *reactive oxygen species* - espécies reativas de oxigênio  
RT-PCR - *reverse transcription-polymerase chain reaction* - reação da transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase  
RVLM - *rostromedullary lateral medulla* - medula ventrolateral rostral do bulbo  
SARS - *severe acute respiratory syndrome* - síndrome respiratória aguda grave  
SHR - *spontaneous hypertensive rats* - ratos espontaneamente hipertensos  
SKR - solução de Krebs-Ringer  
SRA - sistema renina-angiotensina  
β<sub>1</sub> - receptor de integrina  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TD - tensão diastólica  
TS - tensão sistólica  
Tyr - tirosina  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
UI - unidade internacional  
Val - valina  
XNT - 1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-etilfenil]sulfonil]oxi] - 9H-Xantona-9-um

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina.....	28
<b>Figura 2</b> - Eixos do sistema renina-angiotensina.....	30
<b>Figura 3</b> - Esquema ilustrativo do sistema de perfusão de coração isolado (Langendorff) com fluxo constante.....	46
<b>Figura 4</b> - Protocolo experimental dos corações isolados com a utilização de inibidores e bloqueadores específicos do SRA .....	48
<b>Figura 5</b> - Protocolo experimental dos corações isolados com a utilização do L-NAME .....	48
<b>Figura 6</b> - Esquema ilustrativo do sistema de registro dos parâmetros cardiovasculares .....	49
<b>Figura 7</b> - Protocolo experimental do procedimentos cirúrgicos e registro dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados.....	50
<b>Figura 8</b> - Efeitos vasculares da Ang II no leito coronariano .....	54
<b>Figura 9</b> - Curva concentração-resposta para Ang-(1-7) no leito coronariano...55	
<b>Figura 10</b> - Papel do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) .....	56
<b>Figura 11</b> - Papel do receptor AT <sub>1</sub> no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) .....	57
<b>Figura 12</b> - Papel da ECA no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).....	58
<b>Figura 13</b> - Papel da ECA2 no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).....	59
<b>Figura 14</b> - Efeito vascular da Ang-(1-5) no leito coronariano .....	60
<b>Figura 15</b> - Efeito vasodilatador da Ang-(1-4) no leito coronariano .....	60
<b>Figura 16</b> - Efeito vasodilatador da Ang-(1-3) no leito coronariano .....	61
<b>Figura 17</b> - Efeito vasodilatador da Ang-(1-2) no leito coronariano .....	62
<b>Figura 18</b> - Efeito vascular da L-Arginina no leito coronariano .....	63
<b>Figura 19</b> - Papel do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-2) .....	63
<b>Figura 20</b> - Papel da ECA no efeito vasodilatador da Ang-(1-2).....	64
<b>Figura 21</b> - Papel da NOS no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) .....	65
<b>Figura 22</b> - Efeito da infusão de Ang-(1-2) na pressão arterial média de ratos Wistar acordados .....	70
<b>Figura 23</b> - Efeito da infusão de Ang-(1-2) na frequência cardíaca de ratos Wistar acordados .....	71
<b>Figura 24</b> - Efeito hipotensor da infusão de Ang-(1-2) em ratos espontaneamente hipertensos acordados .....	71

<b>Figura 25</b> - Efeito da infusão de Ang(1-2) na frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos acordados .....	72
<b>Figura 26</b> - Expressão de Ang-(1-7) e Mas em coronárias de ratos .....	73
<b>Figura 27</b> - Expressão de ECA e ECA2 em coronárias de ratos .....	73
<b>Figura 28</b> - Representação da cascata de formação dos peptídeos angiotensinérgicos com possíveis vias de formação dos novos peptídeos propostos.....	82

## **LISTA DE TABELAS**



<b>Tabela 1</b> - Alterações nos parâmetros cardíacos decorrentes da perfusão de peptídeos no coração isolado .....	66
<b>Tabela 2</b> - Efeitos do bloqueio do receptor Mas e da inibição de ECA e ECA2 nas alterações provocadas pela perfusão de Ang-(1-7) na função cardíaca .....	68
<b>Tabela 3</b> - Efeitos do bloqueio do receptor Mas e da inibição de ECA e NOS nas alterações provocadas pela perfusão de Ang-(1-2) na função cardíaca .....	69
<b>Tabela 4</b> - Valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos Wistar e espontaneamente hipertensos .....	72



# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	XIX
<b>ABSTRACT</b> .....	XXII
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1 Sistema Renina-Angiotensina .....	26
1.2 Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco.....	30
1.3 Ações dos Peptídeos Angiotensinérgicos no Sistema Cardiovascular.....	32
<u>1.3.1 Angiotensina II</u> .....	32
<u>1.3.2 Angiotensina-(1-7)</u> .....	34
<u>1.3.3 Outros peptídeos do SRA</u> .....	36
1.4 Enzimas Conversoras de Angiotensina.....	37
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	41
3.1 Objetivo geral .....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Animais.....	44
4.2 Peptídeos .....	44
4.3 Drogas.....	44
4.4 Coração Isolado (Técnica de Langendorff) com Fluxo Constante.....	45
<u>4.4.1 O sistema de perfusão de Langendorff com fluxo constante</u> .....	45
<u>4.4.2 Preparo da solução de perfusão de Krebs-Ringer</u> .....	46
<u>4.4.3 Protocolo de isolamento dos corações</u> .....	47
<u>4.4.4 Protocolos experimentais</u> .....	47
4.5 Infusão Venosa de Ang-(1-2) e Registro dos Parâmetros Cardiovasculares em Ratos Wistar e Espontaneamente Hipertensos Acordados.....	48
<u>4.5.1 Confeccção das cânulas</u> .....	49
<u>4.5.2 Procedimento cirúrgico</u> .....	49
<u>4.5.3 Protocolo experimental</u> .....	50
4.6 Imunohistoquímica .....	51
4.7 Análises Estatísticas .....	52
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	53
5.1 Efeitos Vasculares da Angiotensina II no leito coronariano.....	54
5.2 Efeitos Vasculares da Angiotensina-(1-7) no leito coronariano .....	55
<u>5.2.1 Papel de receptores e enzimas no efeito vascular da Ang-(1-7)</u> .....	55

5.3 Efeitos Vasculares de Fragmentos Angiotensinérgicos Menores no Leito Coroariano.....	59
<u>5.3.1 Efeito vascular da Angiotensina-(1-5)</u> .....	59
<u>5.3.2 Efeito vascular da Angiotensina-(1-4)</u> .....	60
<u>5.3.3 Efeito vascular da Angiotensina-(1-3)</u> .....	61
<u>5.3.4 Efeito vascular da Angiotensina-(1-2)</u> .....	61
5.3.4.1 Papel de receptores e enzimas no efeito vascular da Ang-(1-2) .....	62
5.4 Efeitos dos Peptídeos Angiotensinérgicos na Função Cardíaca .....	65
<u>5.4.1 Efeitos de Ang-(1-7), Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) na função cardíaca</u> .....	65
<u>5.4.2 Participação de Mas, ECA e ECA2 nas alterações promovidas pela Ang-(1-7) na função cardíaca</u> .....	67
<u>5.4.3 Participação de Mas, ECA e NOS nas alterações promovidas pela Ang-(1-2) na função cardíaca</u> .....	67
5.5 Efeitos da Infusão de Ang-(1-2) na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Ratos Wistar e SHR Acordados .....	70
<u>5.5.1 Ratos Wistar</u> .....	70
<u>5.5.2 Ratos Espontaneamente Hipertensos</u> .....	71
5.6 Imunohistoquímica .....	72
<b>VI. DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>VII. CONCLUSÃO</b> .....	83
<b>VIII. REFERÊNCIAS</b> .....	85

**RESUMO**

O sistema renina-angiotensina é um sistema hormonal composto por várias enzimas, peptídeos e receptores. Entre os peptídeos recentemente descritos como biologicamente ativos está o heptapeptídeo Angiotensina(Ang)-(1-7). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Ang-(1-7) no leito coronariano de ratos, bem como avaliar a atividade biológica de outros peptídeos que podem ser derivados da metabolização da Ang-(1-7). Primeiramente, corações de ratos Wistar machos foram perfundidos através da técnica de Langendorff (fluxo constante) com solução de Krebs-Ringer (SKR) ou com SKR contendo Ang-(1-7). Ang II foi utilizada como controle da preparação. A Ang-(1-7) a 42 pM induziu uma redução na pressão de perfusão ( $-20,15 \pm 5,14$  mmHg), indicando um efeito vasodilatador. Este efeito foi dependente do receptor Mas, ECA e ECA2. Além disso, a perfusão de Ang-(1-7) induziu uma redução da atividade cardíaca, a qual foi também bloqueada pelo antagonista do Mas. A participação das enzimas ECA e ECA2 no efeito vascular da Ang-(1-7) sugeriu que a sua metabolização, formando peptídeos menores, poderia contribuir para os efeitos observados. Diante disto, testamos os efeitos da Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) no coração isolado. Todos os peptídeos testados, com exceção da Ang-(1-5), induziram uma redução na pressão de perfusão a 42 pM, indicando um efeito vasodilatador, além de redução da função cardíaca. Como a Ang-(1-2) é o menor peptídeo e o que apresentou o maior efeito, investigamos seus mecanismos de ação. O A-779, um antagonista do receptor Mas, e o Captopril, um inibidor da ECA, foram capazes de inibir parcialmente o efeito da Ang-(1-2), enquanto o L-NAME, um inibidor não seletivo da óxido-nítrico sintase, inibiu totalmente este efeito. Para comprovar que o efeito da Ang-(1-2) era realmente devido ao peptídeo e não ao aminoácido arginina, que faz parte da sua composição, a L-Arginina foi testada nas mesmas condições experimentais e não apresentou efeito biológico. A fim de investigar se a Ang-(1-2) possui efeito hipotensor *in vivo*, ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tiveram veia e artéria femoral cateterizados para o registro da pressão arterial após administração venosa em dose única de Ang-(1-2) a 20 nM. Em ratos Wistar acordados, a Ang-(1-2) não provocou nenhum efeito significativo. Já em SHR, a Ang-(1-2) foi capaz de induzir uma queda duradoura na pressão arterial média, sem alterar a frequência cardíaca. Nossos resultados indicam que a Ang-(1-7) induz um

efeito vasodilatador direto no leito coronariano de ratos. Este efeito é causado pela ativação do receptor Mas bem como por metabólitos derivados da hidrólise deste peptídeo pela ação de ECA e ECA2, já que os peptídeos Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) também causaram vasodilatação no leito coronariano de ratos. Além disso, a Ang-(1-2) induz redução da pressão arterial média em ratos SHR acordados.

**Palavras-chave:** Angiotensina-(1-7), Peptídeos angiotensinérgicos, Angiotensina-(1-2), Vasodilatação, Hipertensão.

**ABSTRACT**

The renin-angiotensin system is a hormonal system composed by several enzymes, peptides and receptors. Angiotensin(Ang)-(1-7) is one of the recently described peptides of this system, which holds biological activity. The aim of this study was to evaluate the vasodilatory effect of Ang-(1-7) in coronary bed of rats, as well as to investigate biological activities of small peptides that can be derived from Ang-(1-7). Hearts of Wistar rats were perfused according to the Langendorff technique (constant flow) with Krebs-Ringer solution (KRS) or KRS containing Ang-(1-7). Ang II was utilized as a positive control. Ang-(1-7) presented a vasodilatory effect in coronary bed of rats ( $-20.15 \pm 5.14$  mmHg), which involved the participation of Mas, angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2. Furthermore, Ang-(1-7) reduced the cardiac activity. The participation of ACE and ACE2 in the Ang-(1-7) effects suggested that the formation of small peptides might be involved in these effects. Thus, we evaluated the actions of Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) and Ang-(1-2) (42 pM) in isolated hearts. Ang-(1-4), Ang-(1-3) and Ang-(1-2) induced a reduction in the perfusion pressure, indicating vasodilation. Because Ang-(1-2) is the smallest peptide tested and presented the major effect, we decided to investigate its mechanisms of action. A-779, a Mas antagonist, partially blunted the Ang-(1-2) effects, as well as captopril, an ACE inhibitor, while L-NAME completely inhibited its vasodilatory effect. L-arginine was tested in the same experimental conditions to exam whether the Ang-(1-2) effects were due to the presence of arginine in its composition. We found that L-arginine did not cause any significant effect in the coronary bed. In order to investigate if Ang-(1-2) is also able to produce changes in blood pressure, awake Wistar and spontaneously hypertensive rats (SHR) were submitted to intravenous injection of Ang-(1-2) at 20 nM. In SHR, but not in Wistar rats, Ang-(1-2) was capable to produce a significant reduction in the mean arterial pressure without changes in heart rate. Our results indicate that Ang-(1-7) is able to induce a direct vasodilatory effect in coronary bed of rats by a mechanism involving Mas, ACE and ACE2. Also, small peptides [Ang-(1-4), Ang-(1-3) and Ang-(1-2)] likely formed due to ACE and ACE2 actions participated of this effect. Furthermore, Ang-(1-2) reduced the arterial pressure of awake SHR.



**Keywords:** Angiotensin-(1-7), Angiotensinergic peptides, Angiotensin-(1-2), Vasodilation, Hypertension.

# **I. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Sistema Renina-Angiotensina**

O primeiro estudo relacionado ao Sistema Renina-Angiotensina (SRA) foi feito em 1898 com a descoberta de que extratos não purificados do córtex renal causavam um aumento prolongado na pressão arterial de coelhos anestesiados. A substância responsável por este aumento da pressão foi denominada de renina (Tiegerstedt & Bergman, 1898), mas por várias décadas, pouco interesse foi atribuído a esta descoberta. Em 1934, Goldblatt e cols. descreveram um modelo de hipertensão por isquemia renal. Embora já se soubesse que o aumento da pressão arterial poderia ser causado por uma substância presente no sangue, os autores não associaram este efeito à renina (Goldblatt e cols., 1934).

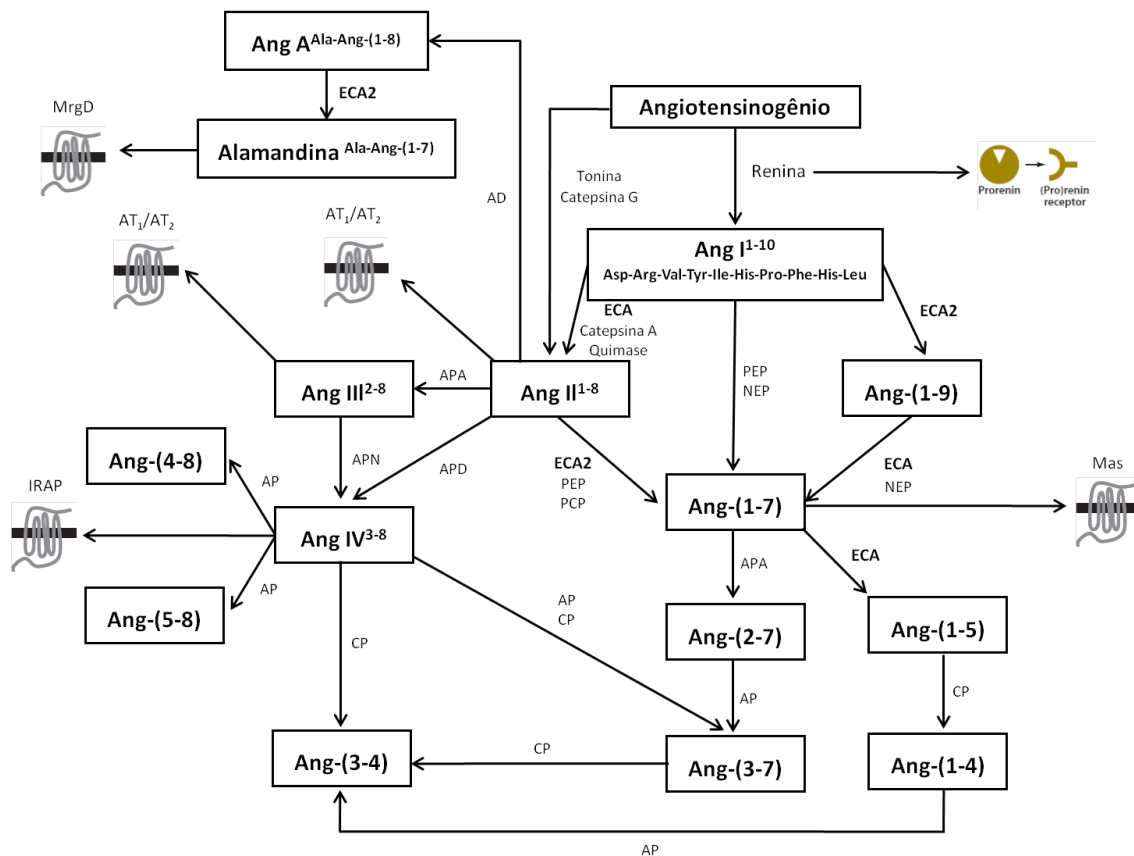
Foi somente em 1940 que dois grupos, trabalhando de forma independente (Braun-Mendes e cols., na Argentina, e Page e Helmer, nos Estados Unidos), ao utilizarem o modelo experimental de hipertensão descrito por Goldblat, descreveram que o peptídeo pressórico não era a renina, e sim um produto da ação enzimática desta substância sobre uma proteína plasmática (Braun-Menendez e cols., 1940; Page & Helmer, 1940b). O primeiro grupo denominou esse produto de hipertensina, e o segundo, de angiotonina. Posteriormente, o termo angiotensina, resultado da agregação entre os termos “hipertensina” e “angiotonina”, passou a ser utilizado na tentativa de padronizar a terminologia (Braun-Menendez & Page, 1958). Aproximadamente dez anos após os trabalhos desses dois grupos, duas formas de angiotensina foram identificadas: angiotensina (Ang) I e Ang II, sendo a primeira resultado da hidrólise do angiotensinogênio e a segunda resultado da quebra enzimática da primeira (Skeggs e cols., 1954a). A partir daí, o SRA começou a ser amplamente estudado.

Classicamente, o SRA é descrito como uma cascata hormonal que controla principalmente as funções cardiovascular, renal e adrenal (Peach, 1977). Atualmente, além de sua função endócrina, considera-se que o SRA possui funções parácrina e autócrina (Kumar e cols., 2007). Além de atuar no controle da pressão arterial, na homeostase hidroeletrolítica e na função celular, exerce papel importante em diversas condições patológicas, como

diabetes, hipertensão arterial, hipertensão pulmonar e fibrose cardíaca (Bojestig e cols., 2000; Kobori e cols., 2007; Ferreira e cols., 2009; Ferreira e cols., 2011b). Comprovando sua importância biológica, já foram identificados sistemas renina-angiotensina locais no coração, no pulmão, no fígado, nos rins, sistemas vascular e nervoso, dentre outros (Paul e cols., 2006).

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

A Ang I, formada a partir do angiotensinogênio, é um decapeptídeo biologicamente inativo que, quando clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), dá origem ao octapeptídeo Ang II (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), principal peptídeo vasoativo do SRA (Ng & Vane, 1967). A geração de outro importante componente deste sistema, a Ang-(1-7) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), ocorre através de vias enzimáticas diferentes daquelas observadas na formação da Ang II, sendo a mais importante e eficiente, sob os pontos de vista fisiológico e catalítico, por meio de uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que converte a Ang II em Ang-(1-7) (Donoghue e cols., 2000a; Tipnis e cols., 2000; Vickers e cols., 2002; Rice e cols., 2004).



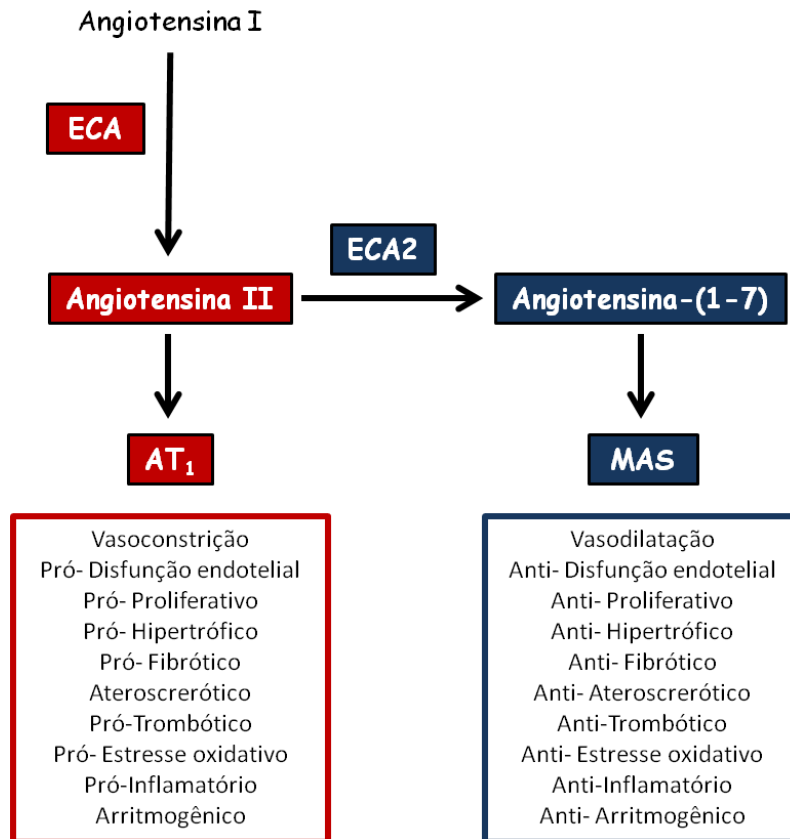
**Figura 1 – Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina.** Ang: angiotensina; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AP: aminopeptidase; AD: aspartato-descarboxilase; APA: aminopeptidase A; APD: aminopeptidase D; APN: aminopeptidase N; CP: carboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolilendopeptidase; AT<sub>1</sub>: receptor de Ang II do tipo 1; AT<sub>2</sub>: receptor de Ang II do tipo 2; Mas: receptor de Ang-(1-7); IRAP: receptor de Ang IV; MrgD: receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas; Asp: aspartato; Arg: arginina; Val: valina; Tyr: tirosina; Ile: isoleucina; His: histidina; Pro: prolina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina

Como observado na **Figura 1**, várias outras vias alternativas podem dar origem a peptídeos do SRA. A Ang I, por exemplo, pode ser clivada diretamente em Ang-(1-7) por endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP). Além disso, Ang I pode ser clivada pela ECA2, com a formação de Ang-(1-9), que por sua vez também pode formar a Ang-(1-7) ao ser clivada por ECA ou NEP (Brosnihan e cols., 1998; Tschöpe e cols., 2002), e a Ang II também pode ser formada independentemente da ECA através da ação da catepsina A e da quimase sobre a Ang I (Ferreira & Santos, 2005).

Outros estudos indicam ainda a possibilidade de formação de Ang II independentemente da renina, com a participação de catepsina G, tonina, tripsina ou quimiotripsina (Kokkonen e cols., 1998; Belova, 2000; Hu e cols., 2003). Tanto a formação desses peptídeos quanto as vias utilizadas são tecido-dependentes, e só ocorrem se os precursores e as enzimas necessárias estiverem presentes.

Nos últimos anos, novos peptídeos, biologicamente ativos ou não, vem sendo descobertos e adicionados ao complexo SRA. Com a retirada de um aminoácido da extremidade amino-terminal da Ang II por aminopeptidase A, por exemplo, forma-se a Ang III (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), que por sua vez pode ser clivada pela aminopeptidase N e formar Ang IV (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). Mais recentemente foram identificados ainda a Ang A (Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> - formada pela descarboxilação do aspartato da Ang II por uma aspartato descarboxilase) e Alamandina (Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> - formada pela ECA2 a partir da Ang A) (Jankowski e cols., 2007; Lautner e cols., 2013). Fragmentos ainda menores, como Ang-(5-8) (Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(4-8) (Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(2-7) (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(3-7) (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(1-5) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>), Ang-(1-4) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>), Ang-(3-4) (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>), bem como as enzimas envolvidas na sua formação, são conhecidos, mas pouco estudados até o momento (Welches e cols., 1991; Matsufuji e cols., 1995; Neves e cols., 1995; Ardaillou, 1997; Axelband e cols., 2009).

Atualmente é postulada a existência de dois eixos no SRA (**Figura 2**). O primeiro, composto por ECA, Ang II e receptor AT<sub>1</sub>, induz principalmente efeitos vasoconstritores, proliferativos e fibróticos. O segundo, composto por ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas, exerce ações contra-regulatórias ao primeiro eixo (Santos e cols., 2000; Probstfield & O'Brien, 2010). O equilíbrio entre estes dois eixos é de extrema importância para a manutenção da homeostase.



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

## 1.2 Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco

Apesar da redução da incidência das doenças cardiovasculares (DCV) no Brasil, elas continuam sendo as principais causas de morte e as maiores geradoras de custos de internação para o Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2007 essas doenças foram responsáveis por 28,6% de todas as mortes no país (terceira maior taxa da América Latina, somente atrás da Guiana e do Suriname, e mais alta que as taxas dos países desenvolvidos) (WHO, 2009). A hipertensão arterial sistêmica, apesar de controlável, é o principal fator de risco para DCV, e dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2008 revelaram que aproximadamente 50% da população acima de 60 anos já havia sido diagnosticada com a doença (Schmidt e cols., 2011). Assim, o controle da pressão arterial é medida essencial para a redução da ocorrência

de eventos cardiovasculares que podem levar a morte, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Mosterd e cols., 1999).

A demonstração de que a atividade da renina prediz eventos cardiovasculares indicou a participação de componentes do SRA nestes eventos (Alderman e cols., 1991; Campbell e cols., 2005). Com isto, drogas que atuam no SRA vêm sendo largamente estudadas e utilizadas no controle e tratamento das DCV. As principais classes de drogas que modulam o SRA já utilizadas são os inibidores da ECA (ex.: Captopril), que reduzem a formação de Ang II a partir de Ang I, e os antagonistas de receptores de Ang II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) (ex.: Losartan), que bloqueiam a interação da Ang II com o seu receptor AT<sub>1</sub> (Campbell e cols., 2001). Drogas capazes de ativar a ECA2, como DIZE (acetato de diminazeno) e XNT (1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil]sulfonil]oxi]-9H-xantona-9) também têm demonstrado bons resultados no tratamento de DCV, como hipertensão, hipertrofia e fibrose cardíaca em modelos experimentais (Gjymishka e cols., 2010; Ferreira e cols., 2011b; Murca e cols., 2012).

Um importante passo para o embasamento das ações dessas drogas nas DCV foi a demonstração da presença dos componentes do SRA no sistema cardiovascular. A síntese de renina não é bem caracterizada no coração, mas o seu RNA mensageiro já foi detectado por *Northern blotting* e RT-PCR (Dzau e cols., 1987; Paul e cols., 1993). Alguns autores sugerem que a expressão gênica de renina no coração só ocorra em condições patológicas (De Mello & Danser, 2000). De toda forma, a renina pode estar presente no tecido cardíaco em condições fisiológicas através da sua captação via circulação sanguínea, já que o receptor manose-6-fosfato (M6P) está presente em cardiomiócitos e células endoteliais (Admiraal e cols., 1999; Saris e cols., 2001) e é capaz de se ligar à renina e internalizá-la (Nguyen e cols., 2004).

Assim como a renina, o angiotensinogênio teve seu RNA mensageiro detectado no coração (Paul e cols., 1993), mas a maior parte dessa proteína presente no tecido cardíaco é proveniente do fígado e transportada pelo plasma (de Lannoy e cols., 1997). As expressões de ECA e ECA2 foram observadas em cardiomiócitos e em células endoteliais, assim como a expressão da enzima quimase, que aumenta em situações patológicas (Paul e



cols., 1993; Burrell e cols., 2005; Kohlstedt e cols., 2013). Dessa forma, 90% da Ang I e 75% da Ang II cardíaca são sintetizadas localmente, sendo que a maior parte da síntese de Ang II no coração ocorre via quimase (Urata e cols., 1990; van Kats e cols., 1998). A síntese de Ang-(1-7) no coração também foi demonstrada por diversos estudos (Santos e cols., 1990; Danser e cols., 1994; Neves e cols., 1995; Trask e cols., 2007). A presença dos receptores de Ang II, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, assim como o receptor Mas de Ang-(1-7) também já foi demonstrada no tecido cardíaco e em células endoteliais do coração (Dostal & Baker, 1999; Bader e cols., 2001; Burns e cols., 2004; Burrell e cols., 2005; Santos e cols., 2006; Sampaio e cols., 2007b; Alenina e cols., 2008).

A detecção de todos estes componentes do SRA no coração e no sistema cardiovascular embasa a importância do sistema e de drogas capazes de modulá-lo para o desenvolvimento e tratamento das DCV. Além disso, apesar dos estudos focarem principalmente na participação da Ang II, as estratégias farmacológicas utilizadas no tratamento de DCV resultam em uma alteração simultânea na expressão e atividade de diversos peptídeos, enzimas e receptores do SRA, e as respostas do organismo são resultantes dessas mudanças em conjunto.

### **1.3 Ações dos Peptídeos Angiotensinérgicos no Sistema Cardiovascular**

#### **1.3.1 Angiotensina II**

A Ang II, um octapeptídeo, é considerado o principal efector do SRA (Hall, 2003). Este peptídeo está diretamente relacionado à hipertensão, já que promove o aumento da pressão arterial por induzir aumento na resistência vascular periférica, além de promover o aumento do volume sanguíneo ao estimular o sistema nervoso simpático, a produção e liberação de aldosterona e, conseqüentemente, o aumento da sede e da retenção de sódio (Thomas e cols., 2008).

A Ang II age em receptores metabotrópicos acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana, denominados AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (de Gasparo e cols., 2000). A maioria das ações conhecidas da Ang II é mediada pelo receptor AT<sub>1</sub>, e as ações mediadas por AT<sub>2</sub> são, em sua maioria, opostas as mediadas por

AT<sub>1</sub> (Steckelings e cols., 2005). Ações diretas da Ang II via receptor AT<sub>1</sub> foram relatadas no coração e foram correlacionadas com mudanças no influxo de cálcio intracelular e mudanças na fase de platô do potencial de ação cardíaco (Dempsey e cols., 1971; Hoffmann e cols., 2001). Além disso, a Ang II também foi correlacionada com o comprometimento da função contrátil em cardiomiócitos isolados e hipertrofia cardíaca (Ichihara e cols., 2001; Domenighetti e cols., 2005).

Em vasos de condutância, a Ang II, assim como a Ang I, promove vasoconstrição concentração-dependente quando utilizada em concentrações de 100 pM a 1 µM, apesar da Ang II ser mais potente que Ang I. Entretanto, inibidores de ECA são capazes de bloquear os efeitos da Ang I, indicando que a sua ação vasoconstritora está diretamente relacionada com a formação de Ang II (Schiffers e cols., 1991). Este efeito vasoconstritor da Ang II em vasos de condutância é mediado pelo receptor AT<sub>1</sub>, enquanto em vasos de resistência foi demonstrada a participação tanto de AT<sub>1</sub> quanto de AT<sub>2</sub> (Boulanger e cols., 1995; Fernandes e cols., 2005). Agonistas de AT<sub>1</sub> promovem, além de influxo de Ca<sup>2+</sup> extracelular, mobilização do Ca<sup>2+</sup> intracelular, liberação de tromboxanos (envolvidos na vasoconstrição) e liberação de óxido nítrico (NO) endotelial, que atenua a vasoconstrição mediada por Ang II, quando este peptídeo se liga a receptores AT<sub>1</sub> presentes na musculatura lisa dos vasos (Boulanger e cols., 1995; Fukada e cols., 2004; Accorsi-Mendonca e cols., 2006).

A Ang II também é capaz de promover vasodilatação via AT<sub>2</sub> em alguns leitos vasculares em concentrações acima de 1 µM, tanto em vasos de resistência quanto em vasos de condutância (Toda & Miyazaki, 1981; Katada & Majima, 2002; Fukada e cols., 2004; Fukada e cols., 2005). Esta vasodilatação é principalmente mediada por prostaglandinas, NO e abertura de canais de K<sup>+</sup>, que resulta em hiperpolarização celular (Israel e cols., 2000; Fukada e cols., 2005). Entretanto, evidências experimentais sugerem que peptídeos derivados da metabolização da Ang II podem estar envolvidos no seu efeito vasodilatador, já que este efeito pode ser bloqueado por D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (A-779), antagonista do receptor Mas de Ang-(1-7) (Tirapelli e cols., 2006).

### 1.3.2 Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo que há algum tempo passou a ser considerado um importante peptídeo vasoativo do SRA (Santos & Campagnole-Santos, 1994; Ferrario e cols., 1998). Com a utilização de um antagonista específico da Ang-(1-7), o A-779, foi identificado um receptor específico desta Angiotensina, denominado receptor Mas que, como o receptor AT<sub>1</sub>, também contém sete domínios transmembrana e é ligado a uma proteína G (Santos e cols., 2003). Em condições fisiológicas, a concentração de Ang-(1-7) presente no plasma sanguíneo é da ordem de picomolar (Joyner e cols., 2007; Pendergrass e cols., 2008) e, apesar de parecer pequena, a manutenção desta concentração é extremamente importante e trás muitos efeitos benéficos ao sistema cardiovascular (Ferrario, 2010).

A Ang-(1-7) possui diversos efeitos contrários aos da Ang II. Um desses efeitos é o aumento do fluxo urinário e da excreção de sódio, o que contribui para a redução do volume sanguíneo, além deste peptídeo ser antioxidante, antitrombótico e antiproliferativo (Handa e cols., 1996; Kucharewicz e cols., 2002; Tallant & Clark, 2003; Langeveld e cols., 2005; Sampaio e cols., 2007a; Fraga-Silva e cols., 2011; Mordwinkin e cols., 2012). A interação da Ang-(1-7) com o receptor Mas resulta também em efeitos anti-hipertensivos (Ferrario, 1998; Iyer e cols., 1998), melhora da função endotelial (Ferrario, 2002; Faria-Silva e cols., 2005) e estimula a liberação de bradicinina (Brosnihan e cols., 1996)

No coração, Ang-(1-7) em baixas concentrações (230 pM) é capaz de reduzir a duração e a severidade de arritmias de reperfusão e melhorar a função contrátil após isquemia (Ferreira e cols., 2001; Santos e cols., 2004), além de prevenir taquiarritmias e fibrilação atriais em ratos e cães (Ferreira e cols., 2011a; Liu e cols., 2011). A Ang-(1-7) ainda é capaz de aumentar o débito cardíaco, melhorar a perfusão coronariana e a função cardíaca e reduzir a área de infarto em ratos (Loot e cols., 2002; Sampaio e cols., 2003; Santos e cols., 2003; Marques e cols., 2011). Além disso, este peptídeo é capaz de atenuar a hipertrofia e fibrose cardíaca induzida por isoproterenol ou pela infusão de Ang II, sem alteração da pressão arterial (Grobe e cols., 2007; Mercure e cols., 2008), provavelmente com a regulação de genes envolvidos

na fibrose cardíaca (Dias-Peixoto e cols., 2008; Gava e cols., 2012; Patel e cols., 2012).

Por outro lado, em concentrações maiores (27 nM), a Ang-(1-7) é capaz de facilitar as arritmias de reperfusão (Neves e cols., 1997), informação corroborada pelo fato de que camundongos transgênicos que superexpressam ECA2 no coração morrem em decorrência de arritmias cardíacas (Donoghue e cols., 2003). Entretanto, confirmando o papel cardioprotetor da Ang-(1-7) em concentrações fisiológicas, estudos mostram que camundongos deficientes para o receptor Mas apresentam disfunção cardíaca, com diminuição da tensão sistólica, da velocidade tanto de contração quanto de relaxamento do miocárdio, da pressão no ventrículo esquerdo e da frequência cardíaca e ainda aumento da resistência vascular (Gembardt e cols., 2003; Castro e cols., 2006). A atividade cardioprotetora da Ang-(1-7) pode ser tanto direta quanto indireta, por meio da potenciação dos efeitos da bradicinina ou por antagonizar os efeitos da Ang II (Santos e cols., 2000).

O efeito vascular da Ang-(1-7), assim como o da Ang II, depende do leito estudado, da espécie e da concentração utilizada. Geralmente, a Ang-(1-7) em pequenas concentrações (1 nM a 100  $\mu$ M) causa vasodilatação, tanto em leitos vasculares de resistência quanto em vasos de condutância (Benter e cols., 1993; Porsti e cols., 1994; Brosnihan e cols., 1996; Brosnihan e cols., 1998; Lemos e cols., 2005; Raffai e cols., 2011), principalmente por mudanças no balanço redox na parede vascular das células endoteliais desencadeada pela ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas, causando liberação de ácido araquidônico, fosforilação da Akt e ativação da óxido-nítrico sintase (NOS) endotelial, com consequente liberação de NO (Osei e cols., 1993; Abbas e cols., 1997; Li e cols., 1997; Verano-Braga e cols., 2012). Confirmando estes fatos, vasos de camundongos deficientes para o receptor Mas produzem mais espécies reativas de oxigênio (ROS) e menos NO, apresentando disfunção endotelial e aumento da pressão sanguínea (Rabelo e cols., 2008; Xu e cols., 2008).

Além da sua interação com o receptor Mas, a Ang-(1-7) também pode levar a efeitos vasculares ao interagir direta ou indiretamente com receptores B<sub>2</sub> de bradicinina, AT<sub>2</sub> e AT<sub>1</sub> de Ang II, este último quando em concentrações

suprafisiológicas (Li e cols., 1997; Soares de Moura e cols., 2004; Walters e cols., 2005; Bosnyak e cols., 2012). Sabe-se também que a Ang-(1-7) é capaz de ativar a via de sinalização da bradicinina, além de potencializar o efeito deste peptídeo (Li e cols., 1997; Almeida e cols., 2000). Já foi demonstrado que a Ang-(1-7) não afeta a circulação coronariana em concentrações nanomolar e micromolar (van Esch e cols., 2008). Entretanto, resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstram que, em concentração menor (da ordem de picomolar), a Ang-(1-7) é capaz de reduzir a pressão de perfusão em corações isolados de camundongos (Castro e cols., 2005).

### 1.3.3 Outros peptídeos do SRA

Apesar de ainda haver muito o que se investigar, muitos estudos já mostram que outros peptídeos do SRA também são biologicamente ativos e possuem efeitos diversos, que são observados de várias formas. A pró-Angiotensina 12, por exemplo, é capaz de causar potente constrição das artérias coronárias, observada na técnica de coração isolado, e ainda piorar a recuperação da função cardíaca após isquemia global (Prosser e cols., 2009). Os efeitos da Ang III e da Ang IV também foram avaliados em corações isolados de ratos, onde causaram diminuição dose-dependente do fluxo coronariano. Entretanto, seus efeitos foram menos potentes que o da Ang II. A Ang III foi capaz de causar vasodilatação via  $AT_2$  em concentrações menores que 1 nM (van Esch e cols., 2008). De acordo com este último achado, tanto Ang III quanto Ang-(3-4) apresentaram efeito hipotensor em ratos espontaneamente hipertensos quando administrados intravenosamente (Matsufuji e cols., 1995). Em contrapartida, foi observado que a Ang III, quando administrada intravenosamente por cinco dias em concentração suprafisiológica, causou hipertensão sustentada (Fink & Bruner, 1985). Yang e colaboradores relataram sobre a Ang IV, que este peptídeo induz resposta vasoconstritora dose-dependente pressórica e renal (Yang e cols., 2010).

A Ang-(1-9), que pensava-se ser um peptídeo inativo, foi descrita como capaz de potencializar o efeito da bradicinina (Chen e cols., 2005) e, mais recentemente, como um peptídeo capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca em um modelo de infarto (Ocaranza e cols., 2010). Paula e colaboradores,

estudando fragmentos da Ang-(1-7), observaram que assim como este peptídeo, Ang-(2-7) e Ang-(3-7) também potenciam o efeito hipotensor da bradicinina (Paula e cols., 1999). Além disso, microinjeções de Ang-(3-7) na medula ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) de ratos anestesiados produzem aumento da pressão arterial média (Ferreira e cols., 2007b). Estudos com a Ang A mostraram que ela é capaz de induzir vasoconstrição dose-dependente pressórica e renal em ratos normotensos e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Yang e cols., 2011; Coutinho e cols., 2013). Mais recentemente, a Alamandina foi também descrita como sendo um peptídeo ativo, capaz de causar vasodilatação em anéis de aorta de ratos e camundongos, aumento da pressão arterial quando injetada na RVLM e redução da pressão quando injetada na medula ventrolateral caudal do bulbo, além de uma única dose de sua formulação oral produzir efeito anti-hipertensivo duradouro em SHR.

#### **1.4 Enzimas Conversoras de Angiotensina**

A ECA e ECA2 são glicoproteínas transmembrana do tipo 1, que possuem um domínio amino-terminal extracelular e uma cauda intracelular curta (Lambert e cols., 2010). A ECA está presente em diversas espécies, localizada principalmente em células endoteliais, e age como uma zinco-metaloprotease (Skeggs e cols., 1954a; Bader e cols., 2001). Esta enzima apresenta atividade dipeptidil carboxipeptidase, sendo responsável pela retirada de dois aminoácidos da extremidade carboxi-terminal dos seus substratos (Skeggs e cols., 1954b). Ela possui dois domínios catalíticos independentes, provavelmente resultantes de uma duplicação gênica (Soubrier e cols., 1988; Bernstein e cols., 2013).

Camundongos deficientes em ECA, assim como animais deficientes em angiotensinogênio, renina e AT<sub>1</sub>, apresentam hipertensão, má formação dos rins e dificuldade em concentrar urina. Entretanto, além destes efeitos atribuídos a falta de Ang II, estes animais também apresentam infertilidade masculina e anemia, evidenciando que esta proteína pode ser importante por mais motivos que somente por sua atividade enzimática (Tanimoto e cols., 1994; Kim e cols., 1995; Krege e cols., 1995; Niimura e cols., 1995; Esther e

cols., 1996; Tsuchida e cols., 1998; Takahashi e cols., 2005). A inibição dessa enzima e a dimerização de duas cadeias desta proteína desencadeiam uma cascata de sinalização, que podem causar com a fosforilação de uma cadeia pesada de miosina não muscular ou de uma serina em seu domínio citoplasmático, evidenciando que ela possui atividade não catalítica (Kohlstedt e cols., 2006a; Kohlstedt e cols., 2006b).

A ECA2 também é uma zinco-metaloprotease associada à membrana. Entretanto, sua presença é predominante em células endoteliais do coração, dos rins e dos testículos (pode estar presente em outros locais, mais em pequenas quantidades). Sua atividade, também diferente da ECA, é de carboximonopeptidase, e só retira um aminoácido da extremidade carboxi-terminal de seus substratos, além de esta enzima só possuir um sítio catalítico (Donoghue e cols., 2000a; Lambert e cols., 2010). Além da sua atividade enzimática, ECA2 pode interagir com receptores  $\beta$ 1 de integrina, estar, juntamente com colectrina, envolvida no transporte de aminoácidos nos rins e intestino e agir como receptor do vírus da SARS (Li e cols., 2003; Lin e cols., 2004; Kuba e cols., 2010).

A ECA2 possui aproximadamente 42% de homologia com o sítio catalítico da ECA, entretanto suas atividades e afinidades são bem diferentes. A ECA hidrolisa principalmente Ang I, com a decorrente formação de Ang II (Skeggs e cols., 1954b). Outro importante substrato da ECA é a bradicinina (Rieger e cols., 1993). Já a ECA2 é capaz de hidrolisar a Ang I com a formação de Ang-(1-9) e Ang II com a formação de Ang-(1-7), apesar da afinidade da ECA2 por Ang I ser baixa (Vickers e cols., 2002). Ang-(1-9), Ang-(1-7) e Ang-(1-5) aparentemente não são substratos da ECA2. A Ang-(1-9) pode ser hidrolisada por ECA e formar Ang-(1-7) (Vickers e cols., 2002), apesar de esta não ser a principal via de formação deste peptídeo, e a Ang-(1-7) pode ainda ser clivada por ECA e dar origem a Ang-(1-5) (Velez e cols., 2012). As evidências experimentais apontam para uma complementaridade das funções da ECA e ECA2, em que o produto da hidrólise por uma enzima pode ser metabolizado pela outra.

## **II. JUSTIFICATIVA**



A importância e a complexidade do SRA têm sido cada vez mais reconhecidas. Assim, avaliar a função e os mecanismos envolvidos na atividade de peptídeos menores e pouco estudados no sistema cardiovascular, bem como a formação desses peptídeos, é um importante passo para o melhor entendimento deste sistema. Descrever novos peptídeos biologicamente ativos do SRA pode mudar o paradigma de que peptídeos derivados da metabolização de peptídeos maiores como Ang II e Ang-(1-7) não são simples fragmentos inativos, mas sim podem ter grande importância na fisiopatologia do sistema cardiovascular e serem importantes alvos farmacológicos para futuras intervenções neste sistema.

### **III. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade biológica de peptídeos angiotensinérgicos que podem ser derivados da Ang-(1-7) no coração isolado de ratos, bem como investigar seus mecanismos de ação.

### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Verificar a ação vascular direta da Ang-(1-7) e de peptídeos angiotensinérgicos menores [Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2)] utilizando a técnica de coração isolado (Langendorff) com fluxo constante;

3.2.2 Verificar o papel dos receptores AT<sub>1</sub> e Mas e das enzimas ECA e ECA2 nas ações da Ang-(1-7) em corações isolados de ratos com a utilização de bloqueadores e inibidores;

3.2.3 Verificar o papel do receptor Mas e das enzimas ECA e NOS nas ações da Ang-(1-2) em corações isolados de ratos com a utilização de bloqueadores e inibidores;

3.2.4 Verificar os efeitos dos peptídeos testados na função cardíaca de ratos utilizando a técnica de coração isolado;

3.2.5 Verificar os efeitos da Ang-(1-2), menor peptídeo angiotensinérgico que mantém a extremidade amino-terminal conservada, na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos e de ratos Wistar;

3.2.6 Verificar a presença de componentes do SRA [Ang-(1-7), Mas, ECA e ECA2] em coronária de ratos pela técnica de imunohistoquímica.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso corporal entre 200 e 300g provenientes do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO) e ratos da linhagem SHR com 16 semanas de idade provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas antes dos experimentos e receberam ração e água *ad libitum*. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o protocolo de número 051/10.

#### 4.2 Peptídeos

Ang II e Ang-(1-7) foram adquiridas da Bachem, Inc.. Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) foram sintetizados pelo método Fmoc/t-butila de síntese manual em suporte sólido (Chan & White, 2000) no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, ICB/UFMG. Uma curva concentração-resposta para a Ang-(1-7) foi feita e a concentração em que se obteve a maior resposta foi utilizada para os demais experimentos.

#### 4.3 Drogas

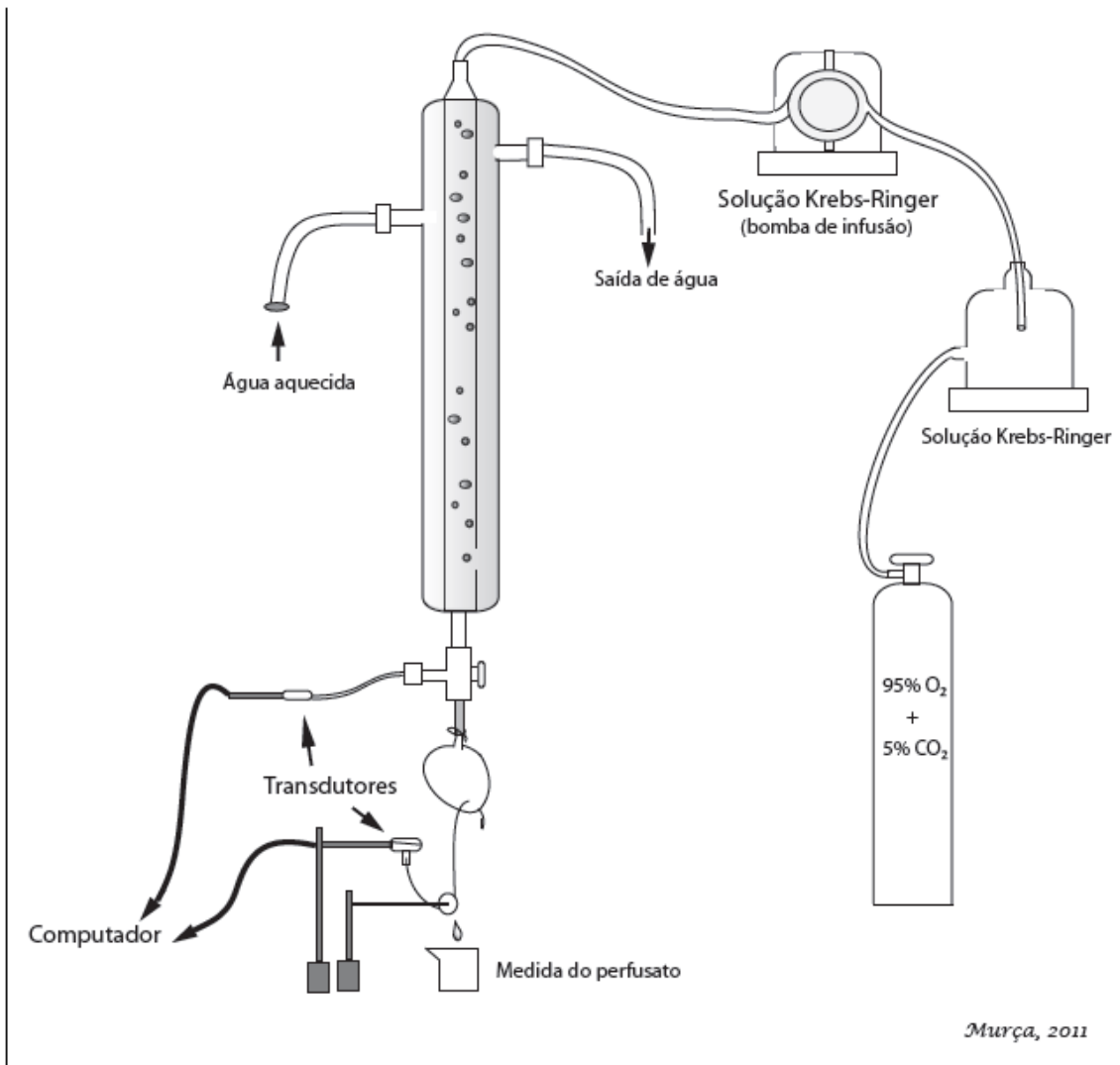
Os seguintes antagonistas e inibidores do SRA foram utilizados: i) A-779, antagonista específico do receptor Mas (23 nM e 230 pM - Bachem, Inc.); ii) Losartan, antagonista específico do receptor AT<sub>1</sub> (2 µM - Sigma-Aldrich, Inc.); iii) Captopril, inibidor da ECA (2, 5 µM - Sigma-Aldrich, Inc.); iv) Enalapril, inibidor da ECA (2 µM - Sigma-Aldrich, Inc.); v) DX600, inibidor da ECA2 (0,1 nM - Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) e vi) L-NAME, inibidor da oxido nítrico sintase (30mg/Kg - Merck Biosciences, AG). A L-arginina (Sigma-Aldrich, Inc.) foi utilizada na mesma concentração utilizada para os peptídeos.

#### **4.4 Coração Isolado (Técnica de Langendorff) com Fluxo Constante**

Para análise da ação dos fragmentos angiotensinérgicos no leito coronariano de ratos, foi utilizada a técnica do coração isolado de Langendorff com fluxo constante (Ferreira e cols., 2007a; Skrzypiec-Spring e cols., 2007).

##### 4.4.1 O sistema de perfusão de Langendorff com fluxo constante

O sistema de perfusão (**Figura 3**) era constituído por um tubo de vidro de aproximadamente 30 cm de altura, conectado em sua extremidade superior a uma bomba de infusão a qual promovia um fluxo retrógrado de solução nutritora constante às coronárias de 8 a 9 mL/min. Na extremidade inferior do tubo foram conectados um transdutor de pressão, capaz de medir a pressão de perfusão, e uma pequena cânula de aço inoxidável a qual o coração era fixado. Ao ápice do coração era ainda acoplado um transdutor de tensão para o monitoramento da função cardíaca com a utilização de um transdutor de tensão. Ambos os transdutores eram conectados a um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA) ligado a um computador. O tubo de vidro era envolto por uma jaqueta de água em circulação aquecida a  $37\pm 1$  °C. A oxigenação da solução nutritora era feita diretamente em seu reservatório antes da perfusão dos corações com uma mistura carbogênica (95%O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).



**Figura 3 – Esquema ilustrativo do sistema de perfusão de coração isolado (Langendorff) com fluxo constante.**

#### 4.4.2 Preparo da solução de perfusão de Krebs-Ringer

A solução nutritora utilizada foi a solução de Krebs-Ringer (SKR) cuja composição é: NaCl 118,40 mM; KCl 4,70 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,17 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,50 mM; Dextrose anidra 1,65 mM e NaHCO<sub>3</sub> 26,30 mM. Para o preparo de dois litros desta solução foram utilizados 100 mL de uma solução estoque previamente preparada (NaCl 138,4g; KCl 7,0g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,2g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5,8g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 7,4g; H<sub>2</sub>O 1000 mL), 4,2g de glicose, 4,4g de NaHCO<sub>3</sub> e água deionizada até completar o volume. Depois de pronta, a solução foi filtrada (filtro EXPRESS<sup>TM</sup> 0.22 µm – Millipore e bomba a vácuo) e,

após a filtração, foi acrescida de albumina bovina (BSA) (200 ng/mL) para evitar a adsorção dos peptídeos no sistema.

#### 4.4.3 Protocolo de isolamento dos corações

Todos os animais foram heparinizados (400 UI) intraperitonealmente, 10 a 15 minutos antes do sacrifício por decapitação para a retirada dos corações. Após este período, a cavidade torácica era então exposta e o coração retirado juntamente com pulmões, timo, traqueia e segmentos da veia cava, artérias pulmonares e aorta. Posteriormente, o coração era colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritora (SKR) oxigenada e gelada para remoção dos tecidos adjacentes ao coração. Desta forma, a integridade do tecido era preservada até o início da perfusão com solução nutritora. Após a secção do arco aórtico na altura de seu primeiro ponto de bifurcação (tronco braquicefálico), o segmento ascendente da aorta era introduzido na ponta de uma cânula de aço inoxidável e fixado com linha. A cânula era, então, acoplada ao sistema de perfusão.

#### 4.4.4 Protocolos experimentais

Os experimentos tiveram duração de 60 minutos, sendo meia hora de estabilização dos corações e meia hora de registro após a adição dos peptídeos (ou L-arginina). Nos experimentos com inibidores e bloqueadores (A-779, Losartan, Captopril, Enalapril e DX-600), as drogas foram adicionadas a solução no início da estabilização e suas concentrações foram mantidas constantes durante todo o experimento (**Figura 4**). No caso da utilização do L-NAME, a droga foi administrada no rato intraperitonealmente aproximadamente uma hora antes do sacrifício dos animais (**Figura 5**). No grupo controle foi feita a adição do mesmo volume utilizado para a adição dos peptídeos de solução salina a SKR após a estabilização. Durante os experimentos, a pressão de perfusão e a função cardíaca foram registradas pelo sistema de aquisição de dados (Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). Tanto a pressão de perfusão como os demais parâmetros foram analisados aproximadamente três



minutos após a adição dos peptídeos a solução. O valor basal correspondeu ao tempo 2 minutos antes da adição de peptídeos.



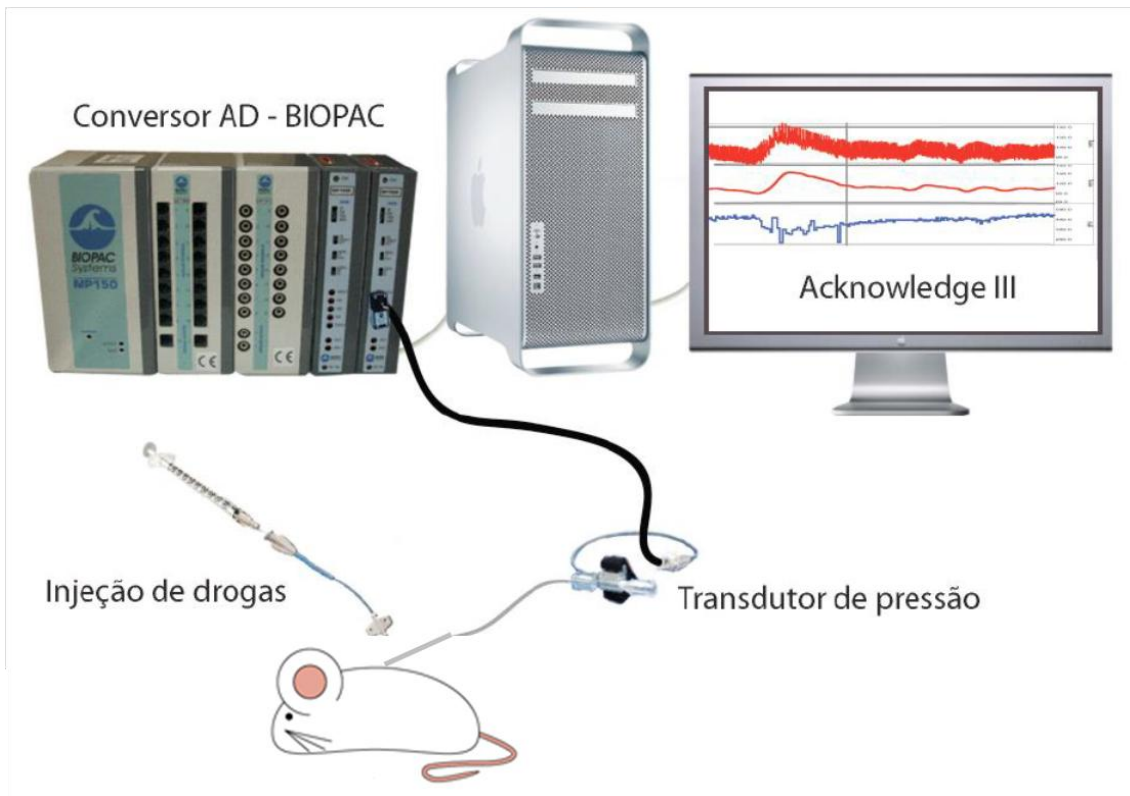
**Figura 4 – Protocolo experimental dos corações isolados com a utilização de inibidores e bloqueadores específicos do SRA.**



**Figura 5 – Protocolo experimental dos corações isolados com a utilização do L-NAME.**

#### **4.5 Infusão Venosa de Ang-(1-2) e Registro dos Parâmetros Cardiovasculares em Ratos Wistar e Espontaneamente Hipertensos Acordados**

Para possibilitar a avaliação da atividade da Ang-(1-2) nos parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar e SHR acordados, foi feito o cateterismo da artéria femoral para o registro da pressão arterial e frequência cardíaca e da veia femoral para a administração do peptídeo. Para o registro do experimento, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador e conversor analógico/digital (MP100 - AcqKnowledge III, Biopac System Inc., EUA. **Figura 6**). A frequência de amostragem utilizada foi de 200Hz.



**Figura 6 – Esquema ilustrativo do sistema de registro dos parâmetros cardiovasculares.**

#### 4.5.1 Confeção das cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE50 (CPL Produtos Médicos Ltda., Brasil) e PE10 (BD Intramedic, Clay Adams, EUA). As cânulas arteriais foram confeccionadas com 15 cm do tubo de polietileno PE50 soldado por aquecimento a 4 cm do tubo de polietileno PE10. As cânulas venosas, por sua vez, foram confeccionadas com 15 cm do tubo de polietileno PE50 soldado por aquecimento a 2 cm do tubo de polietileno PE10. As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e a extremidade livre do PE50 foi ocluída com pino de metal.

#### 4.5.2 Procedimento cirúrgico

A cateterização dos vasos foi realizada 24 horas antes da realização dos experimentos. Os animais foram anestesiados com solução de quetamina 10% e xilazina 2% (60:6 mg/kg, i.p.) e colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica. As patas anteriores e posteriores foram imobilizadas e os pelos da

região inguinal esquerda retirados. Após assepsia da pele com álcool iodado, uma pequena incisão foi feita e a musculatura foi divulsionada para visualização e dissecação do feixe vaso-nervoso femoral. A região proximal das cânulas (PE10) foi introduzida na aorta abdominal, via artéria femoral, para registro da pressão arterial, e na veia femoral, para administração de drogas. A seguir, as cânulas foram fixadas ao vaso no ponto de junção entre o PE10 e o PE50 com fios de sutura. Após a fixação das cânulas, as mesmas foram dirigidas via subcutânea, com auxílio de um trocater, para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos aquecidos até a completa recuperação da anestesia e, em seguida, colocados em caixas individuais com água e ração até o momento do registro.

#### 4.5.3 Protocolo experimental

Após a prévia calibração do equipamento, a pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), a pressão arterial média (PAM, mmHg) e a frequência cardíaca (FC, bpm) foram registradas. A PAM e a FC foram calculadas via *software* a partir dos valores da PAP. Após no mínimo 15 minutos de estabilização do experimento, uma injeção de solução salina (controle) foi feita através da cânula ligada a veia femoral. Aproximadamente 30 minutos após a injeção de salina foi feita a injeção de dose única de 20 nM da Ang-(1-2) em *bolus* de 0,1 mL. O registro foi mantido por mais 30 minutos após a injeção de Ang-(1-2) (**Figura 7**). O valor basal foi estabelecido 2 minutos antes da primeira injeção e a análise do efeito da salina e da Ang-(1-2) foi feita de 2 em 2 minutos.



**Figura 7 – Protocolo experimental dos procedimentos cirúrgicos e registro dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados**

#### **4.6 Imunohistoquímica**

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para demonstrar a presença de componentes do SRA que possuem atividade ou participam da metabolização e da ação de peptídeos angiotensinérgicos nas coronárias. Corações de ratos Wistar foram removidos e fixados em Bouin 4% por 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação induzida por concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina de modo que o corte histológico fosse feito transversalmente à coronária descendente esquerda.

A partir dos blocos de parafina foram realizados cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura, que foram montados em lâminas previamente silanizadas. Os cortes foram, então, diafanizados e hidratados em álcool 100, 95, 70, 50 e 25%. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 15 minutos, prosseguindo com o bloqueio de ligações inespecíficas através da solução de BSA (2%) + Tween 20 (0,1%) por uma hora em câmara úmida. Os anticorpos primários [anti-Ang-(1-7) (1:600) (Becker e cols., 2007), anti-ECA (1:200 - Abcam, Inc.), anti-ECA2 (1:500 – Gene Tex) e anti-Mas (1:50 - Alomone)] foram diluídos em uma solução de PBS + BSA 2% + Tween 20 0,1% e a incubação ocorreu em câmara úmida durante a noite a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 1 hora. A amplificação do sinal foi realizada através da incubação com streptavidina-biotina-peroxidase do kit LSAB/DAKO. A revelação da marcação foi realizada através da diaminobenzidina (DAB) 0,025% e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram, então, montadas com a utilização de lamínulas e Entelan, analisadas e fotografadas em microscópio óptico modelo Olympus BX 51 (Olympus, Inc., Irving, TX, USA) utilizando-se uma objetiva de 40X. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por 1% (p/v) de PBS-BSA. As imagens, quando necessário, foram tratadas com a utilização do programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, USA) para melhoras de contraste e brilho.

#### **4.7 Análises Estatísticas**

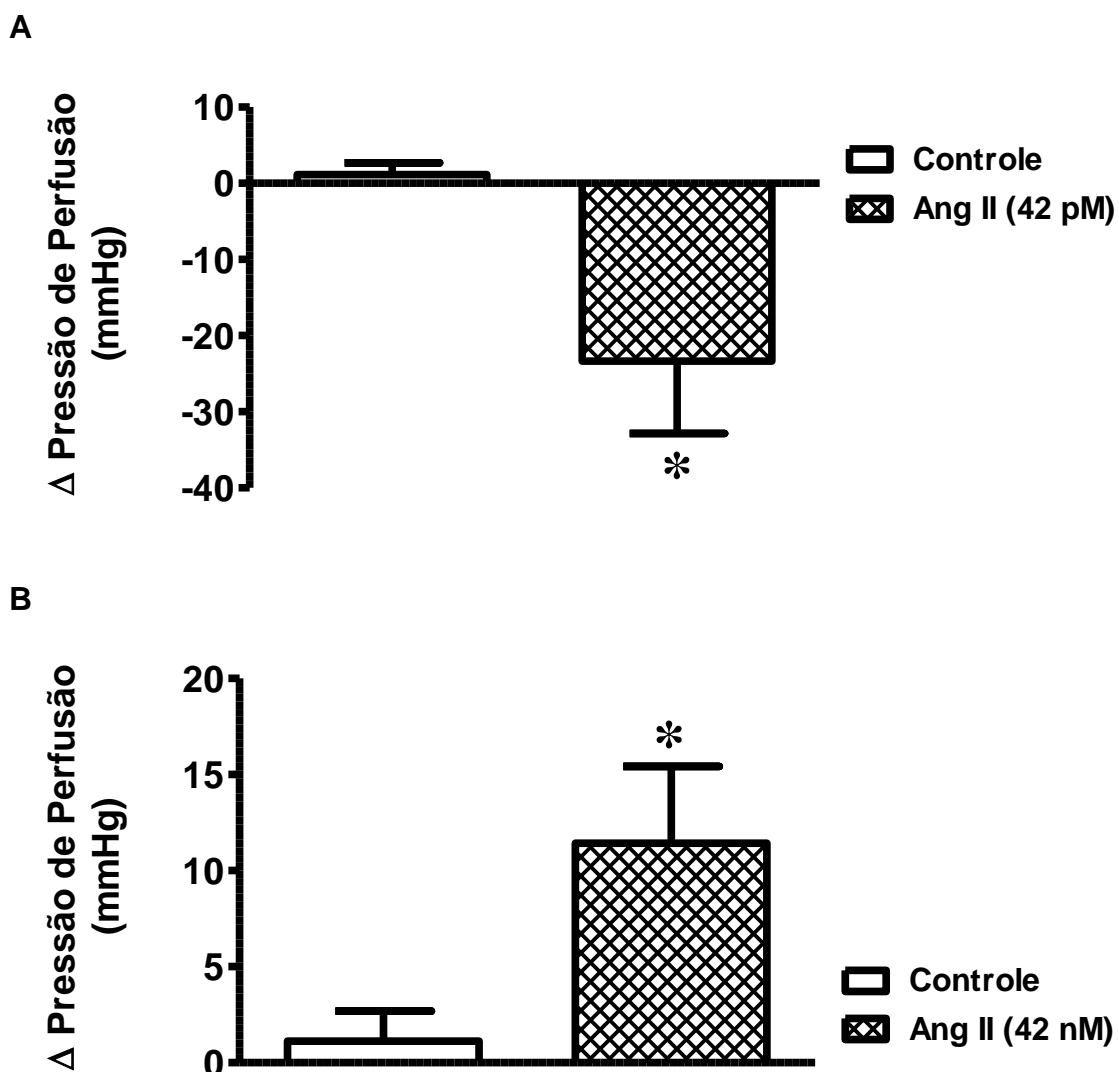
A análise estatística foi realizada com a utilização do *software* Graph Pad Prism 5. O teste estatístico empregado para a comparação das médias de vários grupos contendo dados com distribuição paramétrica foi o One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Neuman-Keuls. Quando estes dados não apresentaram distribuição paramétrica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Para a comparação de dois grupos individuais foi empregado o teste *t* de Student não pareado ou teste de Mann-Whitney (para dados com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente).

A comparação de dados correspondentes a duas medidas de um mesmo experimento (ex: situação basal e situação experimental) foram analisados com o teste *t* de Student pareado ou teste de Wilcoxon (para dados não paramétricos). O teste Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foi utilizado na análise estatística de experimentos com duas variáveis, como grupo e tempo. Os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade da ocorrência do erro do tipo 1 foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **V. RESULTADOS**

### 5.1 Efeitos Vasculares da Angiotensina II no Leito Coronariano

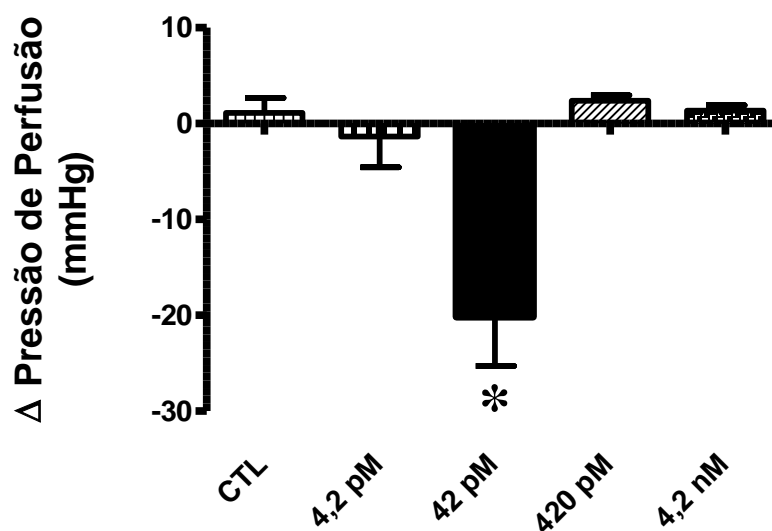
Como controle da nossa preparação de coração isolado com fluxo constante para constatação de alterações de pressão de perfusão, primeiramente avaliamos os efeitos da Ang II em duas concentrações distintas: 42 nM e 42 pM. Na menor concentração, a Ang II causou redução na pressão de perfusão [controle:  $1,13 \pm 1,56$  mmHg, n=6 e Ang II (42 pM):  $-23,35 \pm 9,50$  mmHg, n=5 – **Figura 8A**], enquanto na maior concentração, a Ang II induziu aumento na pressão de perfusão [controle:  $1,13 \pm 1,56$  mmHg, n=6 e Ang II (42 nM):  $11,43 \pm 4,00$  mmHg, n=4 – **Figura 8B**].



**Figura 8 – Efeitos vasculares da Ang II no leito coronariano.** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang II. (A) Ang II 42 pM e (B) Ang II 42 nM. Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle (Teste *t* de Student não pareado).

## 5.2 Efeitos Vasculares da Angiotensina-(1-7) no Leito Coronariano

Para avaliarmos os efeitos da Ang-(1-7) no leito coronariano, fizemos uma curva concentração-resposta para este peptídeo. A concentração de 42 pM foi capaz de causar grande redução na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-7) (4,2 pM):  $-1,35 \pm 3,19$  mmHg,  $n=4$ ; Ang-(1-7) (42 pM):  $-20,15 \pm 5,14$  mmHg,  $n=9$ ; Ang-(1-7) (420 pM):  $2,38 \pm 0,58$  mmHg,  $n=4$ ; Ang-(1-7) (4,2 nM):  $1,35 \pm 0,55$  mmHg,  $n=4$  – **Figura 9**], demonstrando a capacidade deste peptídeo de causar vasodilatação neste leito coronariano.



**Figura 9 – Curva concentração-resposta para Ang-(1-7) no leito coronariano.** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-7) a 4,2 pM; 42 pM; 420 pM e 4,2 nM. Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  vs. todos os outros grupos (One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

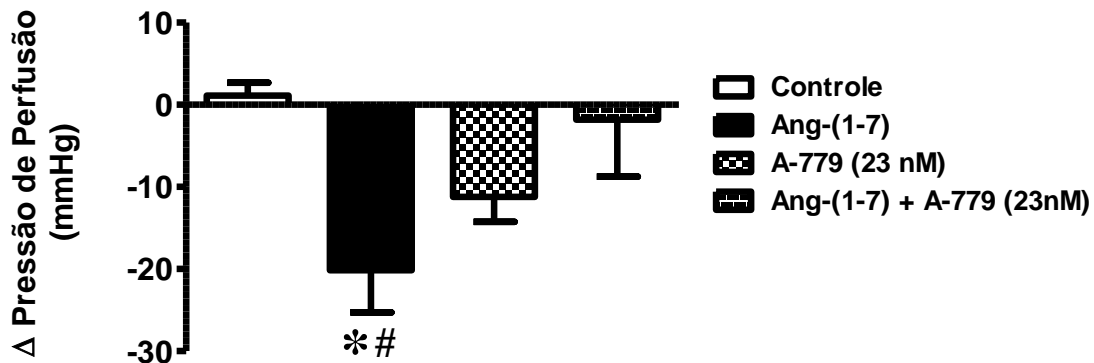
### 5.2.1 Papel de receptores e enzimas do SRA no efeito vascular da Ang-(1-7)

Para analisarmos os mecanismos envolvidos no efeito vasodilatador da Ang-(1-7), alguns bloqueadores e inibidores do SRA foram utilizados. O primeiro componente deste sistema avaliado foi o receptor Mas de Ang-(1-7). Para isto, utilizamos o antagonista específico do receptor Mas, A-779, em duas concentrações diferentes (23 nM e 230 pM). A 23 nM, o A-779 foi capaz de bloquear o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-7) (42 pM):  $-20,15 \pm 5,14$  mmHg,  $n=9$ ; A-779 (23

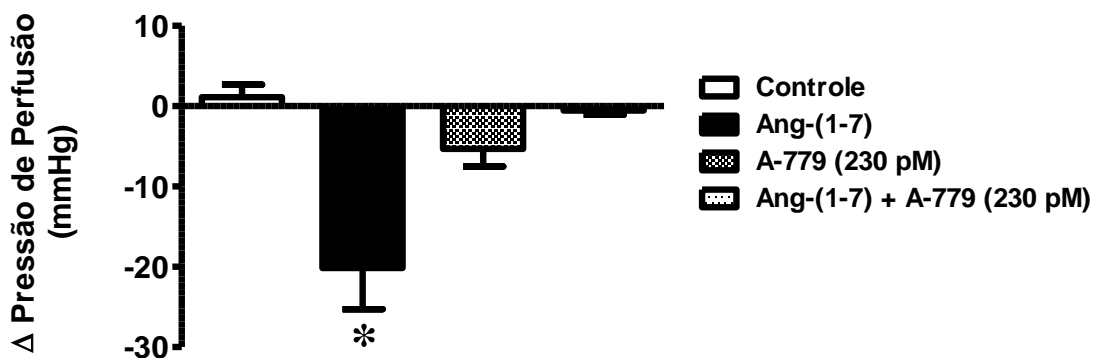


nM):  $-11,21 \pm 3,03$  mmHg, n=5 e Ang-(1-7) + A-779 (23 nM)  $-1,81 \pm 6,94$  mmHg, n=5 – **Figura 10A**], assim como a 230 pM [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-7) (42 pM):  $-20,15 \pm 5,14$  mmHg, n=9; A-779 (230 pM):  $-5,30 \pm 2,22$  mmHg, n=5 e Ang-(1-7) + A-779 (230 pM)  $-0,55 \pm 0,51$  mmHg, n=5 – **Figura 10B**].

A



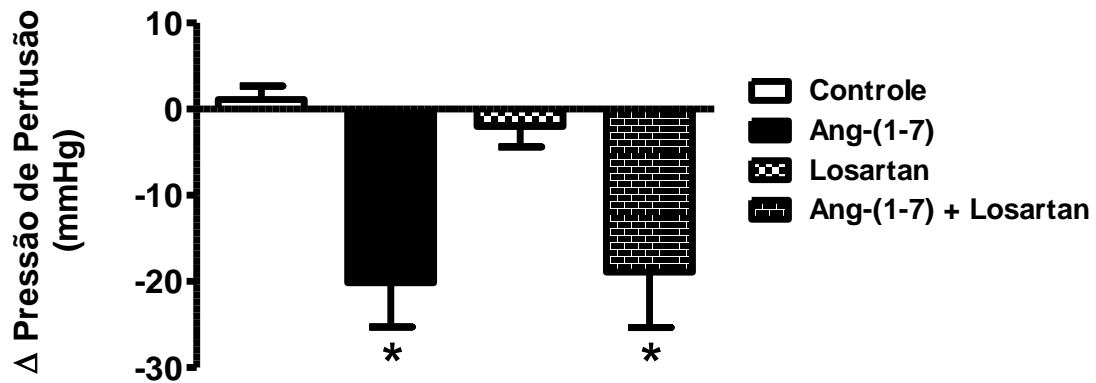
B



**Figura 10 – Papel do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-7) + A-779. (A) Ang-(1-7) + A-779 (23 nM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle e # $p < 0,05$  vs. Ang-(1-7) + A-779. (B) Ang-(1-7) + A-779 (230 pM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  vs. todos os outros grupos. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

Em seguida, avaliamos o papel do receptor  $AT_1$  de Ang II no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano. A perfusão de Losartan (antagonista específico do receptor  $AT_1$  - 2  $\mu$ M) juntamente com Ang-(1-7) não alterou o efeito deste peptídeo [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-7) (42 pM):  $-20,15 \pm 5,14$  mmHg, n=9; Losartan (2  $\mu$ M):  $2,02 \pm 2,37$  mmHg, n=4; Ang-(1-7) + Losartan:  $-18,91 \pm 6,44$  mmHg, n=6 – **Figura 11**], indicando que não há

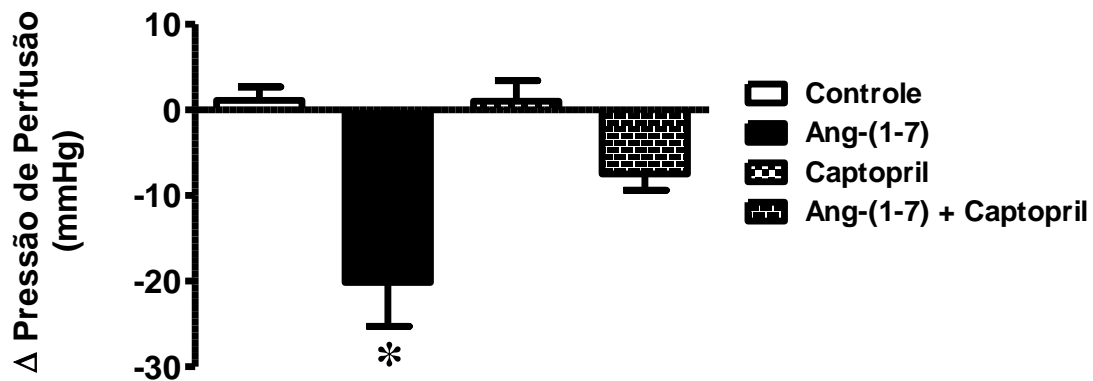
participação do receptor  $AT_1$  no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano.



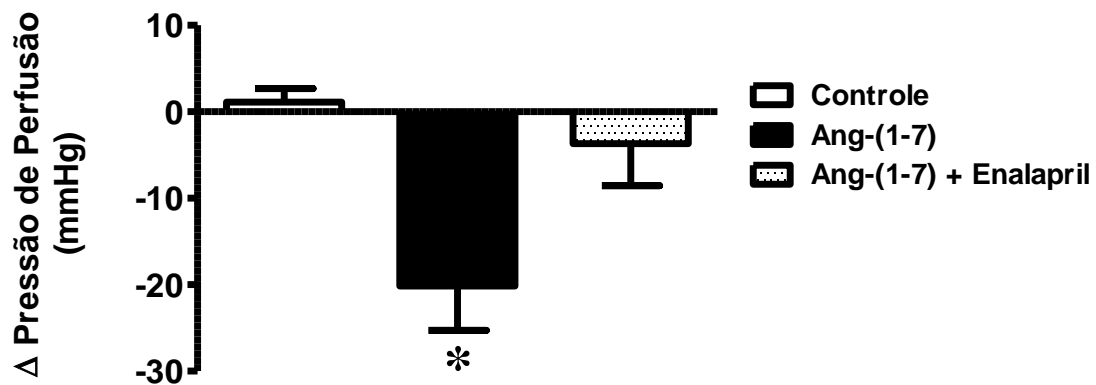
**Figura 11 – Papel do receptor  $AT_1$  no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-7) + Losartan (2  $\mu$ M). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. grupo controle (One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Finalmente, o papel das enzimas ECA e ECA2 no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano foi avaliado. Primeiramente, a perfusão de corações isolados com Captopril (inibidor específico da ECA – 2,5  $\mu$ M) juntamente com Ang-(1-7) foi capaz de bloquear o efeito vasodilatador deste peptídeo [controle: 1,12  $\pm$  1,56 mmHg, n=6; Ang-(1-7) (42 pM): -20,15  $\pm$  5,14 mmHg, n=9; Captopril (2,5  $\mu$ M): 1,03  $\pm$  2,39 mmHg, n=4; Ang-(1-7) + Captopril: -7,47  $\pm$  1,92 mmHg, n=8 – **Figura 12A**]. Para confirmar este dado, utilizamos outro inibidor específico da ECA (enalapril - 2  $\mu$ M). Assim como o captopril, o enalapril também foi capaz de bloquear o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) [controle: 1,12  $\pm$  1,56 mmHg, n=6; Ang-(1-7) (42 pM): -20,15  $\pm$  5,14 mmHg, n=9 e Ang-(1-7) + enalapril: -3,69  $\pm$  4,85 mmHg, n=4, **Figura 12B**].

A

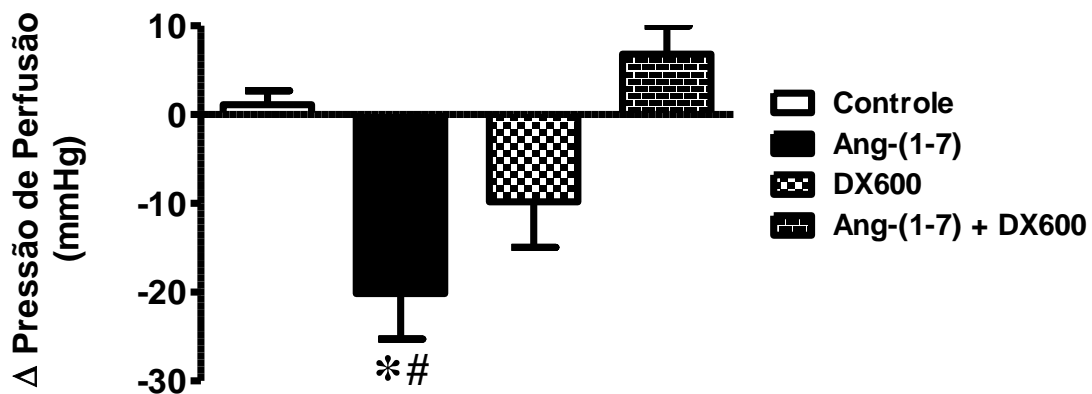


B



**Figura 12 – Papel da ECA no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-7) + Captopril (2,5  $\mu$ M - A) e com Ang-(1-7) + Enalapril (2,0  $\mu$ M - B). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. todos os outros grupos (One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Para a avaliação do papel da ECA2 utilizamos o DX-600 (inibidor específico da ECA2 – 0,1 nM). O DX-600, perfundido juntamente com Ang-(1-7), também foi capaz de bloquear o efeito deste peptídeo [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-7) (42 pM):  $-20,15 \pm 5,14$  mmHg,  $n=9$ ; DX-600 (0,1 nM):  $-9,81 \pm 5,13$  mmHg,  $n=4$ ; Ang-(1-7) + DX-600:  $6,82 \pm 3,16$  mmHg,  $n=4$  – **Figura 13**]. Em conjunto, estes dados demonstram que tanto ECA quanto ECA2 possuem um papel importante na vasodilatação desencadeada pela Ang-(1-7) no leito coronariano.



**Figura 13 – Papel da ECA2 no efeito vasodilatador da Ang-(1-7).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-7) + DX-600 (0,1 nM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. controle e # $p < 0,01$  vs. Ang-(1-7) + DX-600 (One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

### 5.3 Efeitos Vasculares de Fragmentos Angiotensinérgicos Menores no Leito Coronariano

O fato de a inibição das enzimas ECA e ECA2 ter bloqueado o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano de ratos Wistar sugere que fragmentos menores derivados da clivagem da Ang-(1-7) por estas enzimas podem estar envolvidos no efeito vascular observado com a perfusão da Ang-(1-7). Desta forma, na próxima etapa deste estudo avaliamos os efeitos de Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) no leito coronariano de ratos.

#### 5.3.1 Efeito vascular da Angiotensina-(1-5)

O primeiro peptídeo avaliado foi a Ang-(1-5). Confirmando estudos anteriores que descrevem a Ang-(1-5) como um peptídeo inativo, a perfusão de Ang-(1-5) (42 pM) não promoveu mudanças na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-5) (42 pM):  $-1,92 \pm 1,49$  mmHg,  $n=4$  – **Figura 14**].

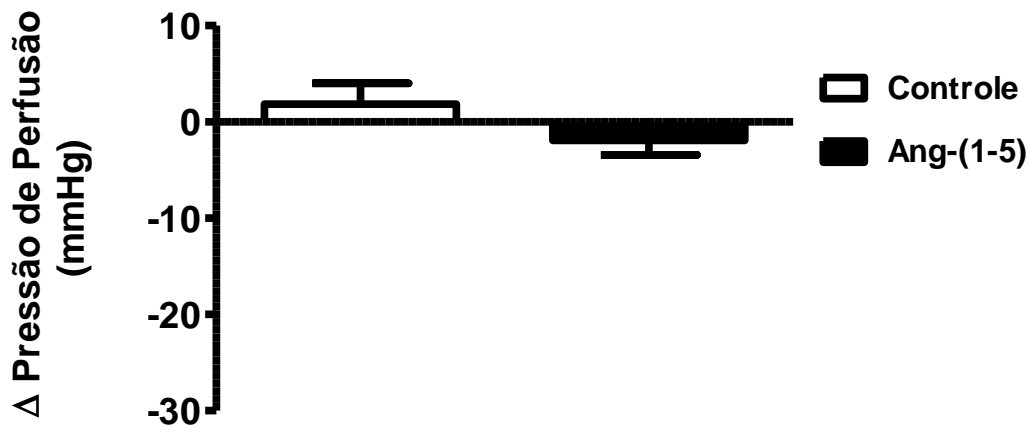


Figura 14– Efeito vascular da Ang-(1-5) no leito coronariano. Ausência de alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-5) (42 pM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student não pareado.

### 5.3.2 Efeito vascular da Angiotensina-(1-4)

O segundo peptídeo avaliado foi a Ang-(1-4). A perfusão de Ang-(1-4) (42 pM) promoveu redução na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-4) (42 pM):  $-12,81 \pm 4,07$  mmHg,  $n=5$  – **Figura 15**], indicando que este peptídeo, assim como a Ang-(1-7), induz vasodilatação no leito coronariano.

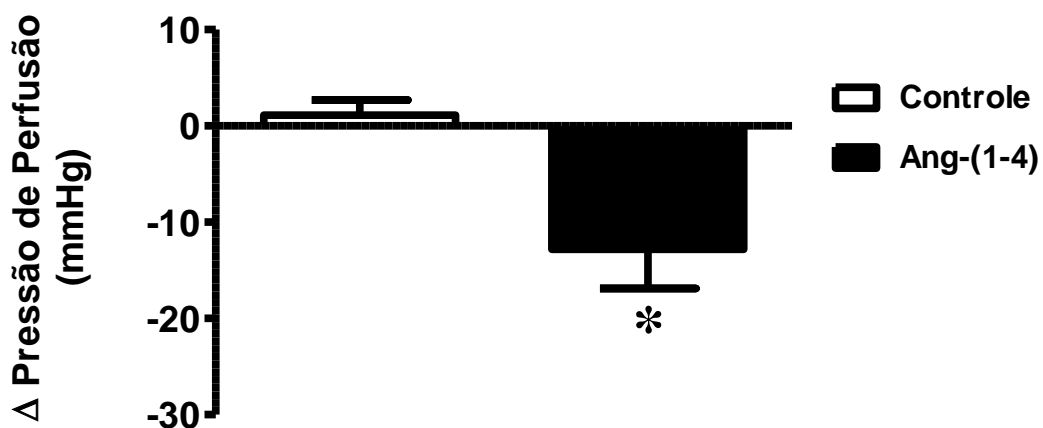
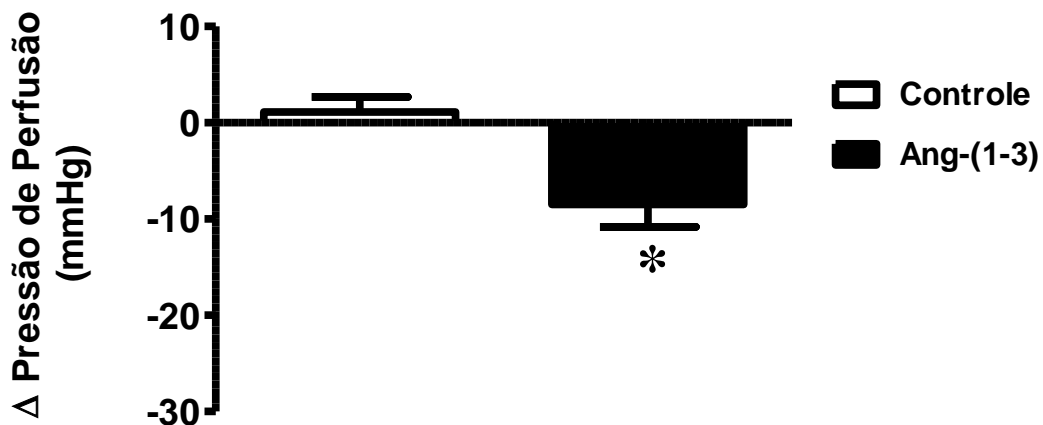


Figura 15 – Efeito vasodilatador da Ang-(1-4) no leito coronariano. Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-4) (42 pM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. grupo controle (teste *t* de Student não pareado).

### 5.3.3 Efeito vascular da Angiotensina-(1-3)

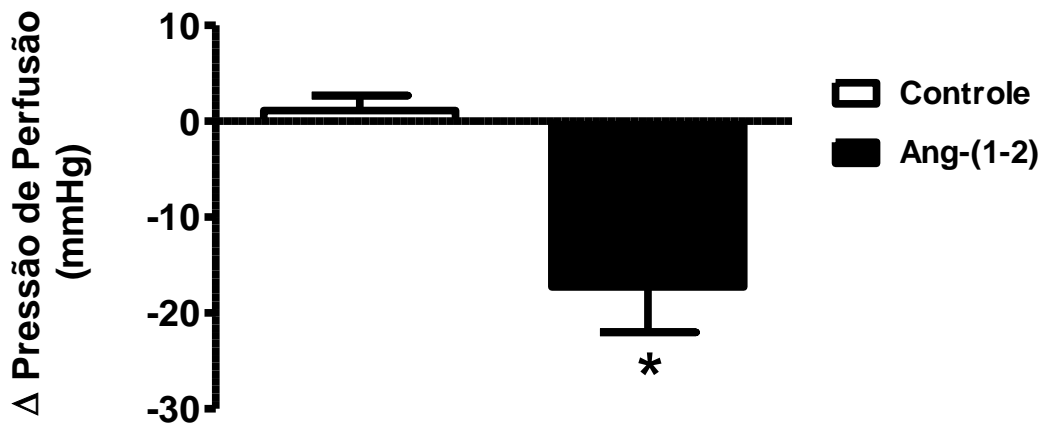
Em seguida, a Ang-(1-3) foi avaliada. A perfusão de corações isolados com Ang-(1-3) (42 pM) também promoveu diminuição na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-3) (42 pM):  $-8,47 \pm 2,35$  mmHg, n=6 – **Figura 16**].



**Figura 16 – Efeito vasodilatador da Ang-(1-3) no leito coronariano.** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-3) (42 pM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. grupo controle (teste *t* de Student não pareado).

### 5.3.4 Efeito vascular da Angiotensina-(1-2)

Por último, avaliamos o efeito da Ang-(1-2) (42 pM) no leito coronariano de ratos. A perfusão de corações isolados com este peptídeo também promoveu redução na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-2) (42 pM):  $-17,27 \pm 4,75$  mmHg, n=6 – **Figura 17**].

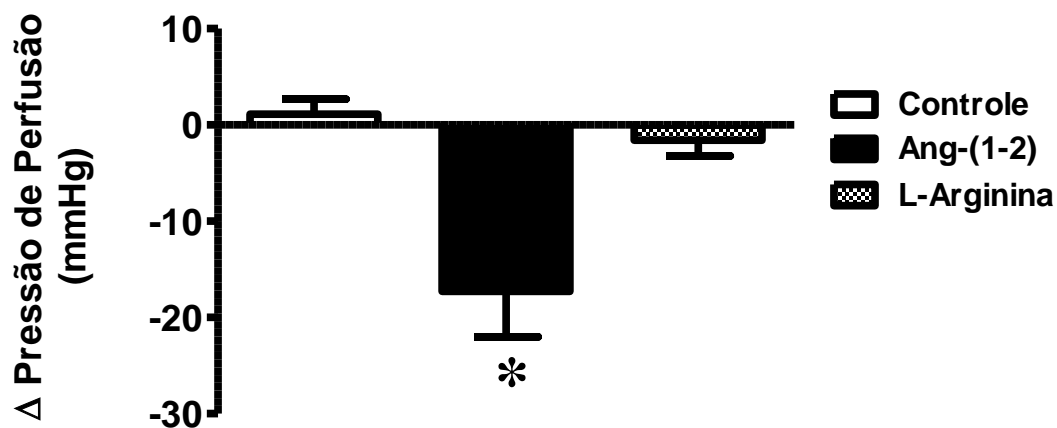


**Figura 17 – Efeito vasodilatador da Ang-(1-2) no leito coronariano.** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-2) (42 pM). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. grupo controle (teste de Mann-Whitney).

Como a Ang-(1-2) é o menor peptídeo com a extremidade amino-terminal conservada possível de se obter a partir da Ang-(1-7), além de ter apresentado o resultado mais próximo ao deste peptídeo, avaliamos alguns mecanismos pelos quais este fragmento induz seu efeito vasodilatador no leito coronariano de ratos Wistar.

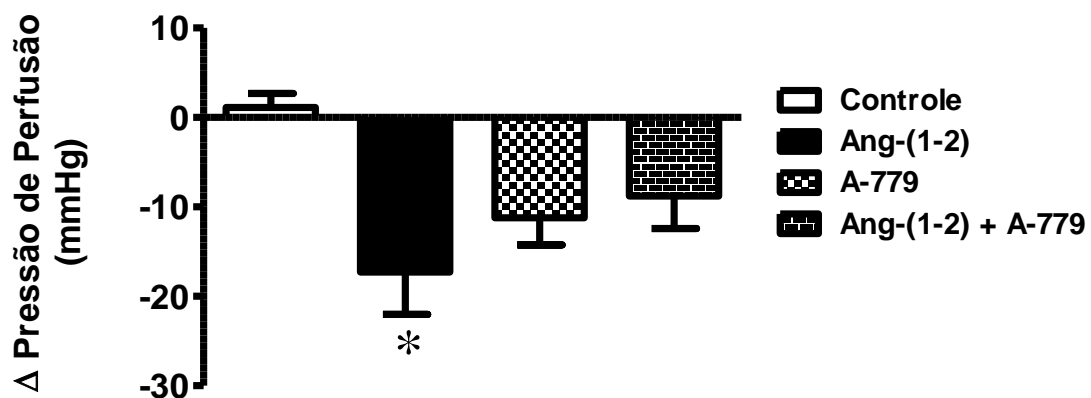
#### 5.4.3.1 Papel de receptores e enzimas no efeito vascular da Ang-(1-2)

Primeiramente avaliamos o efeito da perfusão de L-arginina (42 pM) no coração isolado. A L-arginina é um aminoácido que apresenta atividade vasodilatadora confirmada e está presente na estrutura dipeptídica da Ang-(1-2). Este aminoácido, entretanto, não foi capaz de causar variações na pressão de perfusão [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-2) (42 pM):  $-17,27 \pm 4,75$  mmHg,  $n=6$ ; L-Arginina (42 pM):  $-1,58 \pm 1,62$  mmHg,  $n=7$  – **Figura 18**]. Deste modo, descartamos a possibilidade de o efeito da Ang-(1-2) ser devido somente ao efeito vasodilatador de um de seus aminoácidos isoladamente.



**Figura 18 – Efeito vascular da L-Arginina no leito coronariano.** Ausência de alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com L-Arginina (42 pM). Os dados representam média ± EPM. \* $p < 0,01$  vs. todos os outros grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns).

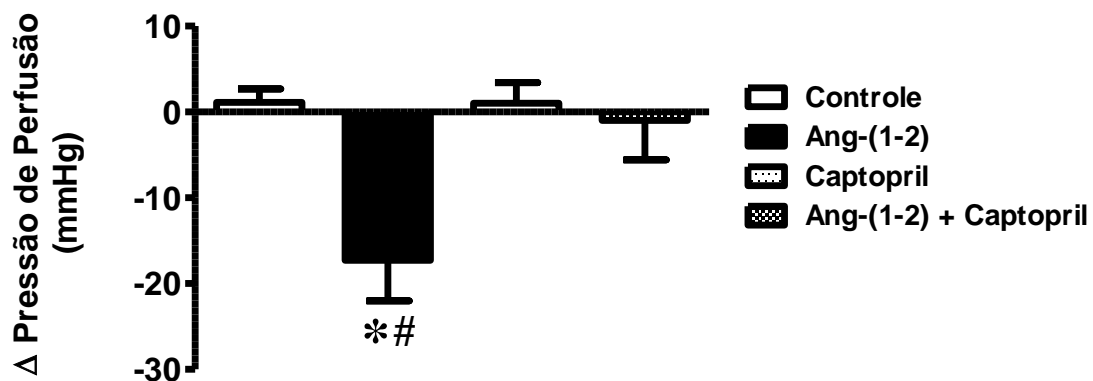
A perfusão de A-779 (23 nM) juntamente com Ang-(1-2) foi capaz de reduzir o efeito vasodilatador deste peptídeo [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg,  $n=6$ ; Ang-(1-2) (42 pM):  $-17,27 \pm 4,75$  mmHg,  $n=6$ ; A-779 (23 nM):  $-11,21 \pm 3,03$  mmHg,  $n=5$ ; Ang-(1-2) + A-779 (23 nM):  $-8,78 \pm 3,64$  mmHg,  $n=7$  – **Figura 19**].



**Figura 19 – Papel do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-2).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-2) + A-779 (23 nM). Os dados representam média ± EPM. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle (teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns).

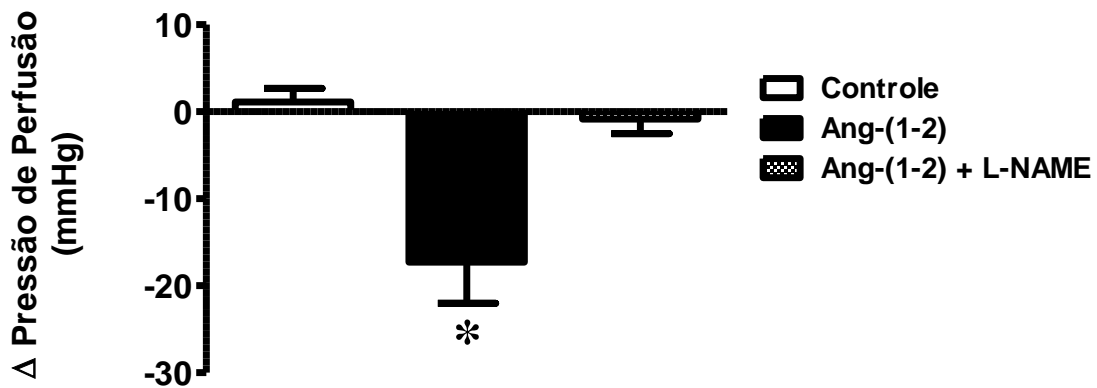


A participação da ECA também foi avaliada no efeito vasodilatador da Ang-(1-2). A perfusão de corações isolados com Captopril (inibidor específico da ECA – 2,5  $\mu$ M) juntamente com Ang-(1-2) também foi capaz de bloquear parcialmente o efeito vasodilatador deste peptídeo [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-2) (42 pM):  $-17,27 \pm 4,75$  mmHg, n=6; Captopril (2,5  $\mu$ M):  $1,03 \pm 2,39$  mmHg, n=4; Ang-(1-2) + Captopril:  $-0,98 \pm 4,59$  mmHg, n=8 – **Figura 20**].



**Figura 20 – Papel da ECA no efeito vasodilatador da Ang-(1-2).** Alteração da pressão de perfusão em corações isolados perfundidos com Ang-(1-2) + Captopril (2,5  $\mu$ M). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  vs. grupo controle e # $p < 0,001$  vs. Captopril (teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns).

Além de alguns componentes do SRA, avaliamos também a participação da NOS e a importância da produção de NO para a vasodilatação desencadeada pela Ang-(1-2). A administração de L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase, 30mg/kg – i.p.) 30 minutos antes do sacrifício foi capaz de bloquear completamente o efeito vasodilatador da Ang-(1-2) [controle:  $1,12 \pm 1,56$  mmHg, n=6; Ang-(1-2) (42 pM):  $-17,27 \pm 4,75$  mmHg, n=6; Ang-(1-2) + L-NAME:  $-0,86 \pm 1,66$  mmHg, n=5 – **Figura 21**].



**Figura 21 – Papel da NOS no efeito vasodilatador da Ang-(1-2).** Ausência de alteração da pressão de perfusão em corações isolados após a administração de L-NAME e perfundidos com Ang-(1-2). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. todos os outros grupos (teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunns).

#### 5.4 Efeitos dos Peptídeos Angiotensinérgicos na Função Cardíaca

A partir dos registros de coração isolado com a perfusão dos diferentes peptídeos, analisamos também o efeito da perfusão destes nos parâmetros cardíacos. Foram analisados tensão sistólica (TS), tensão diastólica (TD), dT/dt positiva e negativa (índice de contração e relaxamento, respectivamente) e frequência cardíaca (FC) comparando-se os valores basais aos valores após a adição dos peptídeos.

##### 5.4.1 Efeitos de Ang-(1-7), Ang-(1-5), Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) na função cardíaca

Como observado na Tabela 1, a Ang-(1-7), assim como a Ang-(1-4), promoveu redução da TS e aumento da TD nos corações isolados. Ang-(1-3) e Ang-(1-2) não provocaram alterações significativas na TD, mas também causaram redução da TS. Além disso, Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) promoveram redução nos valores de dT/dt positiva e negativa. Nenhum peptídeo causou alterações na FC. A perfusão de Ang-(1-5) não causou alterações em nenhum destes parâmetros.

Parâmetros	Controle		Ang-(1-7)		Ang-(1-5)		Ang-(1-4)		Ang-(1-3)		Ang-(1-2)	
	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.
<b>Tensão Sistólica (g)</b>	9,70 ± 1,03	9,43 ± 1,18	11,46 ± 1,90	8,65 ± 1,05*	6,91 ± 1,34	6,51 ± 1,22	10,47 ± 1,19	8,31 ± 1,06**	9,85 ± 0,74	8,17 ± 0,74**	10,40 ± 1,32	9,44 ± 1,41*
<b>Tensão Diastólica (g)</b>	0,87 ± 0,03	0,92 ± 0,01	0,83 ± 0,02	1,02 ± 0,06**	0,94 ± 0,02	0,95 ± 0,03	0,86 ± 0,02	0,99 ± 0,03*	0,93 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,85 ± 0,03	1,069 ± 0,10
<b>dT/dt positiva (g/min)</b>	143,90 ± 14,40	138,80 ± 15,70	196,90 ± 32,43	156,60 ± 17,11	97,34 ± 24,21	92,43 ± 21,64	154,10 ± 20,13	124,8 ± 17,66*	132,50 ± 9,95	115,20 ± 10,52*	153,90 ± 23,85	136,40 ± 24,52*
<b>dT/dt negativa (g/min)</b>	114,90 ± 17,17	109,00 ± 15,50	188,50 ± 32,04	136,10 ± 14,41	100,10 ± 17,57	95,78 ± 16,22	135,20 ± 14,28	88,72 ± 13,81**	112,10 ± 10,43	83,06 ± 6,64*	140,50 ± 23,84	118,30 ± 25,63*
<b>Frequência Cardíaca (bpm)</b>	200,90 ± 9,08	197,90 ± 14,17	216,30 ± 7,29	209,40 ± 5,75	228,10 ± 7,78	232,00 ± 11,21	207,60 ± 10,88	194,50 ± 10,32	191,20 ± 7,38	193,70 ± 9,78	207,40 ± 12,21	206,00 ± 11,89

**Tabela 1 – Alterações nos parâmetros cardíacos decorrentes da perfusão de peptídeos no coração isolado.** Alterações de tensão sistólica, tensão diastólica, dT/dt positiva e negativa e frequência cardíaca de corações isolados após a perfusão de Ang-(1-7) (n=9), Ang-(1-5) (n=4), Ang-(1-4) (n=6), Ang-(1-3) (n=6) e Ang-(1-2) (n=6). Os dados representam média ± EPM. \*p<0,05 vs. Basal, e \*\*p<0,01 vs. Basal (Teste T de Student ou teste de Wilcoxon pareados).

O próximo passo foi, então, avaliar se os inibidores e antagonistas utilizados para a investigação dos mecanismos de ação da Ang-(1-7) e Ang-(1-2) foram capazes de inibir os efeitos na função cardíaca produzidos por estes peptídeos.

#### 5.4.2 Participação de Mas, ECA e ECA2 nas alterações promovidas pela Ang-(1-7) na função cardíaca.

Tanto o bloqueio do Mas, como a inibição da ECA2 foram capazes de prevenir os efeitos na função cardíaca produzidos pela perfusão de Ang-(1-7) (Tabela 2). As perfusões de captopril e de enalapril juntamente com Ang-(1-7) não foram capazes de prevenir a redução na tensão sistólica promovida por Ang-(1-7) além de o enalapril também não prevenir o aumento da tensão diastólica, apesar de a inibição da ECA ter sido capaz de bloquear totalmente o efeito vascular da Ang-(1-7).

#### 5.4.3 Participação de Mas, ECA e NOS nas alterações promovidas pela Ang-(1-2) na função cardíaca

A inibição da NOS com L-NAME foi capaz de prevenir todas as alterações provocadas pela perfusão de Ang-(1-2) (Tabela 3). A perfusão de captopril juntamente com a Ang-(1-2) bloqueou somente a variação na dT/dt positiva. A perfusão do A-779 juntamente com Ang-(1-2) não alterou os efeitos deste peptídeo.

Parâmetros	Ang-(1-7)		Ang-(1-7) + A-779		Ang-(1-7) + Captopril		Ang-(1-7) + Enalapril		Ang-(1-7) + DX-600	
	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.
<b>Tensão Sistólica (g)</b>	11,46 ± 1,90	8,65 ± 1,05*	10,17 ± 0,77	9,08 ± 1,39	9,45 ± 0,48	8,15 ± 0,40**	13,21 ± 1,64	8,84 ± 0,74*	12,85 ± 0,38	12,33 ± 0,31
<b>Tensão Diastólica (g)</b>	0,83 ± 0,02	1,02 ± 0,06**	0,87 ± 0,03	1,08 ± 0,09	0,89 ± 0,04	1,48 ± 0,52	0,85 ± 0,01	1,00 ± 1,01*	0,89 ± 0,03	0,78 ± 0,07

**Tabela 2 – Efeitos do bloqueio do receptor Mas e da inibição de ECA e ECA2 nas alterações provocadas pela perfusão de Ang-(1-7) na função cardíaca.** Alterações na tensão sistólica e tensão diastólica de corações isolados após a perfusão de Ang-(1-7) (n=9), Ang-(1-7) + A-779 (n=5), Ang-(1-7) + Captopril (n=8), Ang-(1-7) + Enalapril (n=5) e Ang-(1-7) + DX-600 (n=4). Os dados representam média ± EPM. \*\*p<0,01 vs. Basal (Teste T de Student ou teste de Wilcoxon pareados).

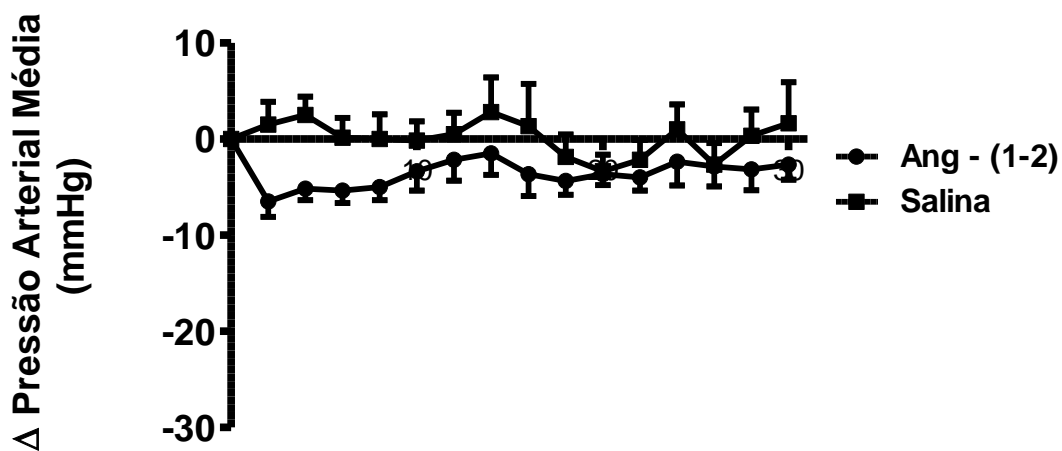
Parâmetros	Ang-(1-2)		Ang-(1-2) + A-779		Ang-(1-2) + Captopril		Ang-(1-2) + L-NAME	
	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.	Basal	Exp.
<b>Tensão Sistólica (g)</b>	10,40 ± 1,32	9,44 ± 1,41*	8,54 ± 0,68	6,37 ± 0,66*	8,73 ± 0,63	7,76 ± 0,55*	7,35 ± 2,28	7,09 ± 2,14
<b>dT/dt positivo (g/min)</b>	153,90 ± 23,85	136,40 ± 24,52*	142,90 ± 18,37	110,60 ± 21,12*	123,80 ± 9,80	112,60 ± 7,74	117,20 ± 40,71	112,60 ± 38,10
<b>dT/dt negativo (g/min)</b>	140,50 ± 23,84	118,30 ± 25,63*	130,30 ± 15,11	88,00 ± 18,20*	109,50 ± 11,76	90,90 ± 10,05*	98,16 ± 33,62	95,49 ± 32,46

**Tabela 3 – Efeitos do bloqueio do receptor Mas e da inibição de ECA e NOS nas alterações provocadas pela perfusão de Ang-(1-2) na função cardíaca.** Alterações de tensão sistólica e dT/dt positiva e negativa em corações isolados após a perfusão de Ang-(1-2) (n=6), Ang-(1-2) + A-779 (n=4), Ang-(1-2) + Captopril (n=8) e Ang-(1-2) + L-NAME (n=5). Os dados representam média ± EPM. \*p<0,05 vs. Basal (Teste T de Student ou teste de Wilcoxon pareados).

## 5.5 Efeitos da Infusão de Ang-(1-2) na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Ratos Wistar e SHR Acordados

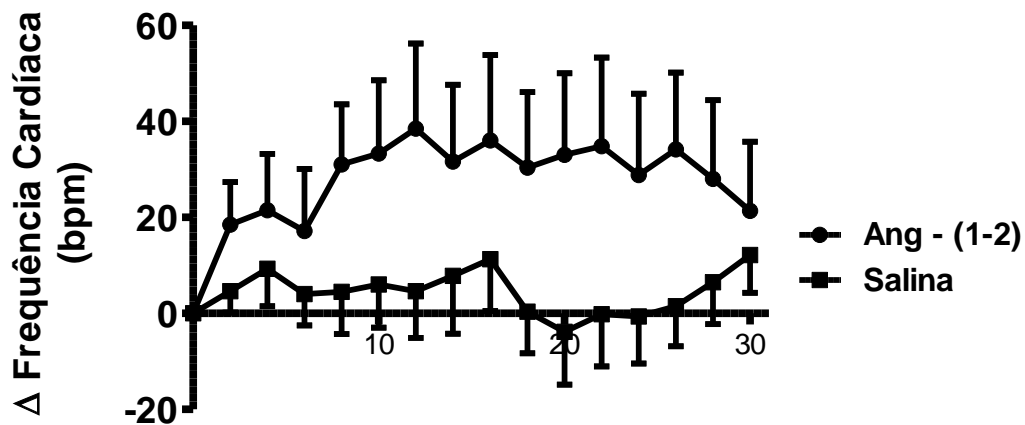
### 5.5.1 Ratos Wistar.

Em ratos Wistar, a infusão de Ang-(1-2) causou pequena alteração na PAM, que não foi estatisticamente significativa em relação ao controle (**Figura 22**).



**Figura 22** – Efeito da infusão de Ang-(1-2) na pressão arterial média de ratos Wistar acordados. Ausência de alteração na PAM em função do tempo em ratos Wistar acordados após a infusão de Ang-(1-2). Os dados representam média  $\pm$  EPM. (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

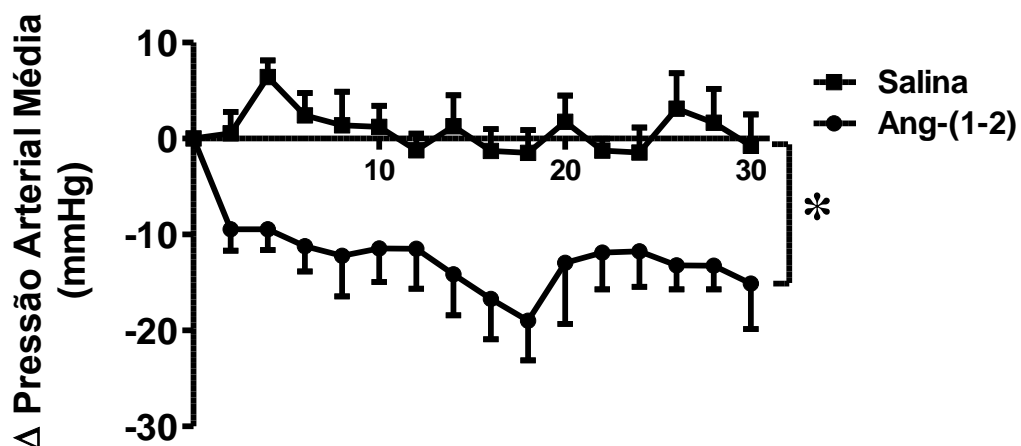
A infusão deste peptídeo também não causou alteração significativa na FC dos ratos Wistar (**Figura 23**). Os valores basais de FC e PAM se encontram na Tabela 4.



**Figura 23 – Efeito da infusão de Ang-(1-2) na frequência cardíaca de ratos Wistar acordados.** Ausência de alteração na FC em função do tempo em ratos Wistar acordados após a infusão de Ang-(1-2). Os dados representam média  $\pm$  EPM (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

#### 5.5.2 Ratos espontaneamente hipertensos.

Em ratos SHR, a perfusão de Ang-(1-2) causou redução significativa na PAM, que perdurou pelo restante do experimento (30 min).



**Figura 24 – Efeito hipotensor da infusão de Ang-(1-2) em ratos espontaneamente hipertensos acordados.** Alteração na PAM em função do tempo em ratos SHR acordados após a infusão de Ang-(1-2). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,01$  vs. salina (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).



A FC dos ratos SHR, assim como nos ratos Wistar, não foi alterada pela infusão de Ang-(1-2). Os valores basais de FC e PAM se encontram na Tabela 4.

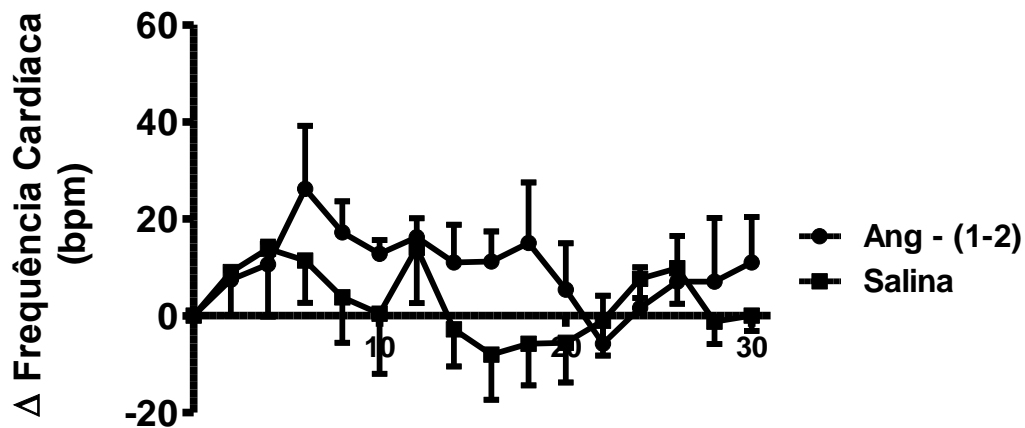


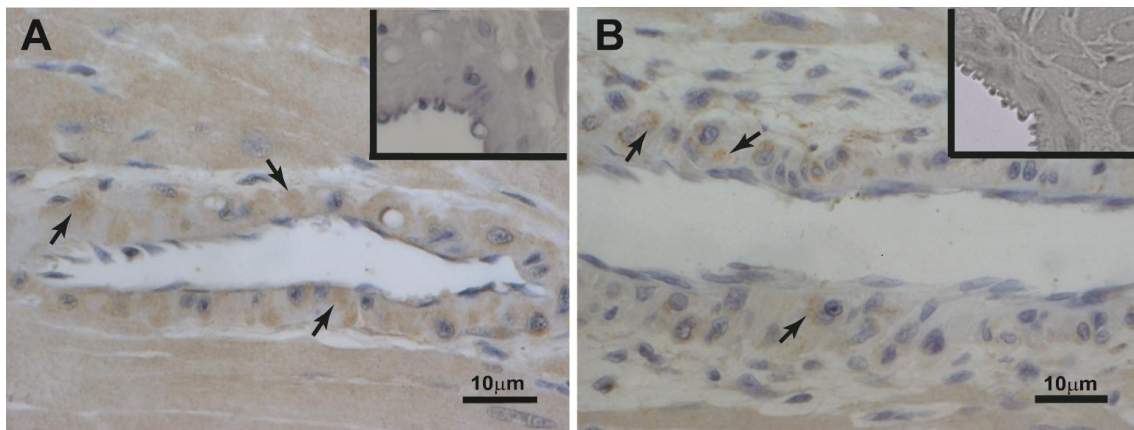
Figura 25 – Efeito da infusão de Ang-(1-2) na frequência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos acordados. Ausência de alteração na FC em função do tempo em ratos Wistar acordados após a infusão de Ang-(1-2). Os dados representam média  $\pm$  EPM. (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

	Ratos Wistar	Ratos Espontaneamente Hipertensos
Pressão Arterial Média (mmHg)	101,8 $\pm$ 2,6	151,4 $\pm$ 3,7
Frequência Cardíaca (bpm)	336,3 $\pm$ 8,1	329,6 $\pm$ 20,9

Tabela 4 – Valores basais de pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos Wistar e espontaneamente hipertensos. Os dados representam média  $\pm$  EPM.

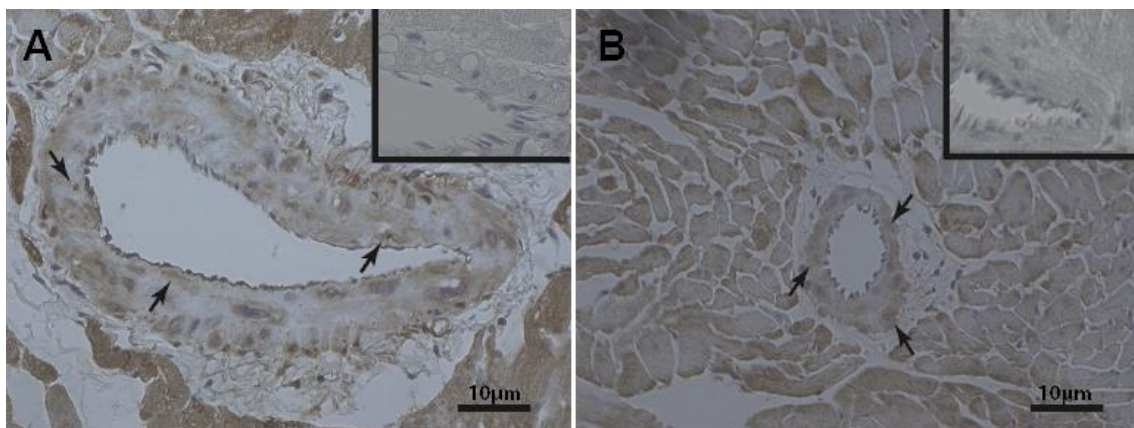
## 5.6 Imunohistoquímica

A Imunohistoquímica evidenciou a presença de Ang-(1-7) e do receptor Mas (**Figura 26**) em coronárias de ratos Wistar, o que corrobora com a importância e atividade destes componentes no leito coronariano.



**Figura 26- Expressão de Ang-(1-7) e Mas em coronárias de ratos.** (A) Ang-(1-7) e (B) receptor Mas. Insetos representam controles negativos obtidos com a omissão do anticorpo primário no procedimento de incubação. Setas: Imunomarcção positiva.

ECA e ECA2 também foram identificadas pela técnica de imunohistoquímica em coronárias de ratos (**Figura 27**), colaborando com a possibilidade da participação destas enzimas na metabolização e na atividade de peptídeos angiotensinérgicos neste leito.



**Figura 27- Expressão de ECA e ECA2 em coronárias de ratos.** (A) ECA e (B) ECA2. Insetos representam controles negativos obtidos com a omissão do anticorpo primário no procedimento de incubação. Setas: Imunomarcção positiva.

## **VI. DISCUSSÃO**

Desde a sua descoberta, a Ang-(1-7) se tornou foco de diversos estudos nas áreas de fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (Santos & Campagnole-Santos, 1994; Ferrario e cols., 1998). Já foi demonstrado que as ações vasculares da Ang-(1-7) são dependentes do leito e da concentração testadas (Santos e cols., 2000). Nesse aspecto, Neves e colaboradores demonstraram que em concentrações altas (maiores que 25 nM) a Ang-(1-7) é capaz de induzir em ratos redução do fluxo coronariano em corações isolados mantidos a pressão constante (Neves e cols., 1997), o que indica uma atividade vasoconstritora. Em contrapartida, o presente estudo demonstrou com uma técnica semelhante (coração isolado com fluxo constante), efetiva redução na pressão de perfusão de corações perfundidos com Ang-(1-7) em baixa concentração (42 pM). Esta redução na pressão de perfusão é um reflexo da atividade vasodilatadora direta deste peptídeo no leito coronariano.

Nos túbulos proximais, este efeito concentração-dependente da Ang-(1-7) é atribuído à ação bifásica deste peptídeo na bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  assim como o apresentado pela Ang II. Ang-(1-7) estimula esta bomba em concentrações das ordens pico e nanomolar e inibe em concentrações da ordem micromolar ou maiores. No leito coronariano, a Ang II causa um efeito bifásico causando vasodilatação a 42 pM e vasoconstrição a 42 nM, como verificamos neste estudo. Possíveis fatores relacionados ao efeito vasodilatador da Ang II incluem: i) ligação da Ang II em receptores  $\text{AT}_1$  presentes no endotélio vascular, induzindo a liberação de fatores relaxantes (Boulanger e cols., 1995) e ii) ligação em receptores do tipo  $\text{AT}_2$  (Toda & Miyazaki, 1981; Oliveira-Souza & De Mello-Aires, 2000; Katada & Majima, 2002; Musa-Aziz e cols., 2005; Castelo-Branco e cols., 2013).

Apesar da existência de diversos estudos avaliando os efeitos da Ang-(1-7) no coração (Neves e cols., 1997; Almeida e cols., 2000; Ferreira e cols., 2001; Loot e cols., 2002), seu efeito vasodilatador direto no leito coronariano de ratos ainda não foi descrito, provavelmente pela particularidade da dose ou por diferenças na técnica utilizada. A maioria destes estudos utilizou a técnica de Langendorff com pressão constante. Entretanto, a técnica de Langendorff com fluxo constante é muito mais sensível a mudanças no diâmetro dos vasos coronarianos, o que nos possibilitou a detecção de pequenas mudanças na pressão de perfusão, tanto com a utilização de Ang-(1-7) como de outros

peptídeos. É ainda importante mencionar que, indicações da propriedade vasodilatadora da Ang-(1-7) já haviam sido descritas em estudos que utilizaram anéis de artérias coronárias de cães (Brosnihan e cols., 1996) e porcos (Porsti e cols., 1994; Gorelik e cols., 1998).

Além do efeito na pressão de perfusão, a perfusão de Ang-(1-7) também causou redução na tensão sistólica e aumento da tensão diastólica nos corações isolados de ratos. A propriedade cardioprotetora da Ang-(1-7) já foi extensamente relatada. Entretanto, nossos resultados contrariam estes achados e demonstram redução da função contrátil do coração após a perfusão de Ang-(1-7). A técnica de coração isolado com fluxo constante não é a mais adequada para o estudo da função cardíaca, ao contrário do que acontece para o estudo da vasculatura do leito coronariano, já que o fluxo determinado pela técnica impõe um trabalho ao coração. Este pode ser um dos motivos pelo qual nossos resultados diferem da literatura.

Corroborando com a literatura (Santos e cols., 2003), o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito coronariano foi dependente da ativação do receptor Mas, já que a utilização de um antagonista seletivo deste receptor foi capaz de bloquear totalmente o efeito vasodilatador da Ang-(1-7). Além disso, é tentador especular que, além da ativação do Mas, a vasodilatação causada pela Ang-(1-7) também envolve a liberação de NO e prostaglandinas. A participação desses fatores já foi extensivamente relatada na cascata de sinalização que sucede a ativação do receptor Mas (Porsti e cols., 1994; Brosnihan e cols., 1996; Gorelik e cols., 1998; Almeida e cols., 2000; Ferreira e cols., 2001; Ferreira e cols., 2002; Sampaio e cols., 2007b). Entretanto, a produção de NO e prostaglandinas desencadeada pela Ang-(1-7) no leito coronariano deve ser confirmada em futuros estudos com a utilização de L-NAME e indometacina, respectivamente. Além disso, a presença da Ang-(1-7) e do Mas nas coronárias fornecem evidências morfológicas para a importância fisiológica desta interação neste leito.

É importante ainda citar que, atualmente, não é possível excluir ações indiretas adicionais da Ang-(1-7), como a potenciação do efeito vasodilatador da bradicinina endógena (Paula e cols., 1999; Almeida e cols., 2000) e a oposição da ação vasoconstritora da Ang II (Roks e cols., 1999; Stegbauer e cols., 2004). A utilização do antagonista do receptor AT<sub>1</sub> (Losartan) confirmou

que este receptor não tem nenhum papel na ação vasodilatadora da Ang-(1-7), como já demonstrado por diversos estudos, já que a ativação do AT<sub>1</sub> por Ang-(1-7) só ocorre se este peptídeo estiver presente em grandes concentrações (Brosnihan e cols., 1996). O A-779 também foi capaz de bloquear os efeitos da Ang-(1-7) na função cardíaca (aumento da TS e redução da TD), demonstrando que estes efeitos também são mediados pelo Mas.

O bloqueio do efeito da Ang-(1-7), tanto pela perfusão com os inibidores da ECA (captopril e enalapril) quanto pela perfusão com o inibidor da ECA2 (DX600), indica que as duas enzimas participam do efeito vasodilatador deste peptídeo. A participação destas enzimas sugere que este efeito não se deve somente à ligação da Ang-(1-7) ao Mas. A metabolização da Ang-(1-7), e consequente formação de outros peptídeos vasoativos, também pode ser uma importante via para seu efeito vasodilatador, apesar de a participação de ECA e ECA2 não ser, necessariamente, de forma hidrolítica, podendo se dar também com a interação dessas enzimas com receptores, por exemplo. A demonstração da presença da ECA e ECA2 nas coronárias pela imunohistoquímica reforça essa possibilidade.

A inibição da ECA pelo captopril e da ECA2 pelo DX-600 também bloquearam o efeito da Ang-(1-7) na TD, enquanto somente DX-600 foi capaz de bloquear o efeito na TS. O captopril não foi capaz de bloquear o efeito da Ang-(1-7) na TS, enquanto o enalapril não bloqueou o efeito nem na TS nem na TD. Esses dados mais uma vez indicam a participação da ECA e da ECA2 nos efeitos cardíacos da Ang-(1-7).

Muitos estudos relatam interações entre Ang-(1-7) e as enzimas ECA e ECA2. Ang-(1-7) é tanto um substrato quanto um inibidor da ECA, dependendo da quantidade de peptídeo e do domínio em que ele se liga (Deddish e cols., 1998; Tom e cols., 2001). Já foi demonstrada a participação da ECA na potenciação do efeito vasodilatador da bradicinina por Ang-(1-7) (Li e cols., 1997; Tom e cols., 2001), provavelmente de forma não hidrolítica, além de a Ang-(1-7) favorecer o *crosstalk* entre ECA e o receptor B<sub>2</sub> (Erdos e cols., 2002). A observação de que o A-779 reverte a potenciação da bradicinina induzida por enalapril ou enalaprilato em microvasos mesentéricos (Fernandes & Sa-Correia, 2001) e atenua a resposta hipotensiva a bradicinina em ratos tratados com captopril (Maia e cols., 2004) indica que a Ang-(1-7) está envolvida nos

efeitos da bradicinina relacionados a inibidores de ECA. Como já mencionado, a ECA2 também possui atividades não hidrolíticas comprovadas (Li e cols., 2003; Lin e cols., 2004; Kuba e cols., 2010) e, portanto, a interação não hidrolítica entre essas enzimas e peptídeos e receptores do SRA não pode ser descartada.

Em corações isolados de ratos, a passagem da Ang I uma única vez pelo coração resulta na formação de diversos peptídeos angiotensinérgicos menores (Neves e cols., 1995). Este fato, juntamente com a demonstração de um SRA local, corrobora para a hipótese de que peptídeos do SRA podem ser metabolizados no coração. O nosso estudo não é o primeiro a demonstrar a participação de metabólitos de um determinado peptídeo contribuindo para a ação deste peptídeo (Schiffers e cols., 1991; Matsufuji e cols., 1995). No caso da Ang-(1-7), esta possibilidade ainda é apoiada pelo fato de que a meia-vida da Ang-(1-7) infundida *in vivo* é muito curta (10,1 segundos) e aumenta com a inibição da ECA (Yamada e cols., 1998), enzima da qual é substrato.

ECA e ECA2 são carboxipeptidases e clivam dois e um aminoácidos, respectivamente, da extremidade carboxi-terminal de seus substratos (Skeggs e cols., 1954b; Donoghue e cols., 2000b). Com isso, a participação tanto de ECA quanto de ECA2 no efeito vasodilatador produzido pela perfusão de Ang-(1-7) no coração, se hidrolítica, indica que pelo menos três aminoácidos devem ser retirados da extremidade carboxi-terminal da Ang-(1-7). A Ang-(1-5) é um peptídeo que já foi dito como inativo (Bader, 2013), e nossos resultados comprovam que ele realmente não exerce nenhum efeito tanto no calibre das coronárias quanto na dinâmica cardíaca. Assim, confirmamos que este é um peptídeo biologicamente inativo e ainda obtivemos um controle negativo da nossa preparação. Posteriormente, retomamos a investigação de quais peptídeos poderiam participar do efeito vasodilatador da Ang-(1-7) utilizando a Ang-(1-4), que possui três aminoácidos a menos que a Ang-(1-7) na extremidade carboxi-terminal. Ang-(1-4) apresentou efeito vasodilatador, além de reduzir a TS, aumentar a TD e reduzir os índices de contração e de relaxamento (dT/dt positivo e negativo, respectivamente), indicando redução da função cardíaca. Continuamos a investigação retirando mais aminoácidos da extremidade carboxi-terminal. Ang-(1-3), assim como Ang-(1-2), também apresentaram efeito vasodilatador no leito coronariano de ratos, redução da TS

e das dT/dts positivas e negativas. A redução observada na função cardíaca após a perfusão de Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2) não significa necessariamente que estes peptídeos exerçam efeitos deletérios no coração e na sua atividade contrátil, já que obtivemos resultados semelhantes com a Ang-(1-7), que é um reconhecido peptídeo cardioprotetor. Estes resultados enfatizam a atividade biológica destes peptídeos e indicam que eles provavelmente possuem atividade sobre componentes do coração responsáveis pela atividade contrátil e, por isto, devem ser mais profundamente estudados.

A Ang-(1-2) é o menor peptídeo angiotensinérgico que pode ser derivado da Ang-(1-7) e que possui a extremidade amino-terminal conservada. Além disso, este peptídeo foi o que apresentou a redução na pressão de perfusão mais próxima da Ang-(1-7). Sendo assim, avaliamos a participação do Mas, da ECA e do NO nos efeitos deste peptídeo. Verificamos, com a utilização do A-779, que a ação da Ang-(1-2), tanto vascular quanto na função cardíaca, é apenas parcialmente dependente do Mas. Este resultado conflita com os resultados de um estudo que reconhece o primeiro e o segundo aminoácidos da Ang-(1-7) como sendo essenciais para a sua ligação com o Mas (Lautner e cols., 2011), apesar de isso não significar que estes dois aminoácidos sozinhos garantam a ligação com o receptor Mas e sua ativação, tendo em vista que uma estrutura mínima é requerida para a ligação entre agonista e receptor.

Para a confirmação de que a Ang-(1-2) não age totalmente via Mas é importante avaliar o efeito do outro antagonista deste receptor, o D-pro-Ang-(1-7), já que estudos mostram que, em algumas circunstâncias, a ativação do Mas, pelo menos por Ang-(1-7), não é bloqueada por A-779, mas sim por D-pro-Ang-(1-7) (Kluskens e cols., 2009; Herath e cols., 2013). Se realmente o Mas não for confirmado como o único receptor da Ang-(1-2), os receptores AT<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> também devem ser investigados, já que a ativação destes dois receptores provoca vasodilatação e vários estudos indicam interação destes com a Ang-(1-7) (ou, no caso, de seu metabólito) (Walters e cols., 2005; Lara Lda e cols., 2006).

Como já foi observado que peptídeos contendo arginina em sua composição podem ser vasodilatadores somente por disponibilizarem L-arginina, que é o precursor da formação de NO endotelial pela NOS, ao



endotélio (Thomas e cols., 1986), nós perfundimos a L-arginina no coração isolado como controle. Entretanto, nesta preparação, o aminoácido sozinho não foi capaz de causar alterações na pressão de perfusão. Este resultado pode estar relacionado ao fato de a perfusão do coração ocorrer de forma rápida, e assim, a L-arginina não ficar tempo suficiente em contato com o endotélio. Por outro lado, o peptídeo pode ser retido e exercer seu efeito apesar da velocidade da perfusão.

A inibição da ECA pelo captopril também foi capaz de bloquear parcialmente o efeito vasodilatador da Ang-(1-2) e impediu a redução da dT/dt positiva. Como não temos uma explicação para esse dado, mais investigações devem ser feitas a respeito da interação entre Ang-(1-2) e ECA, assim como com ECA2.

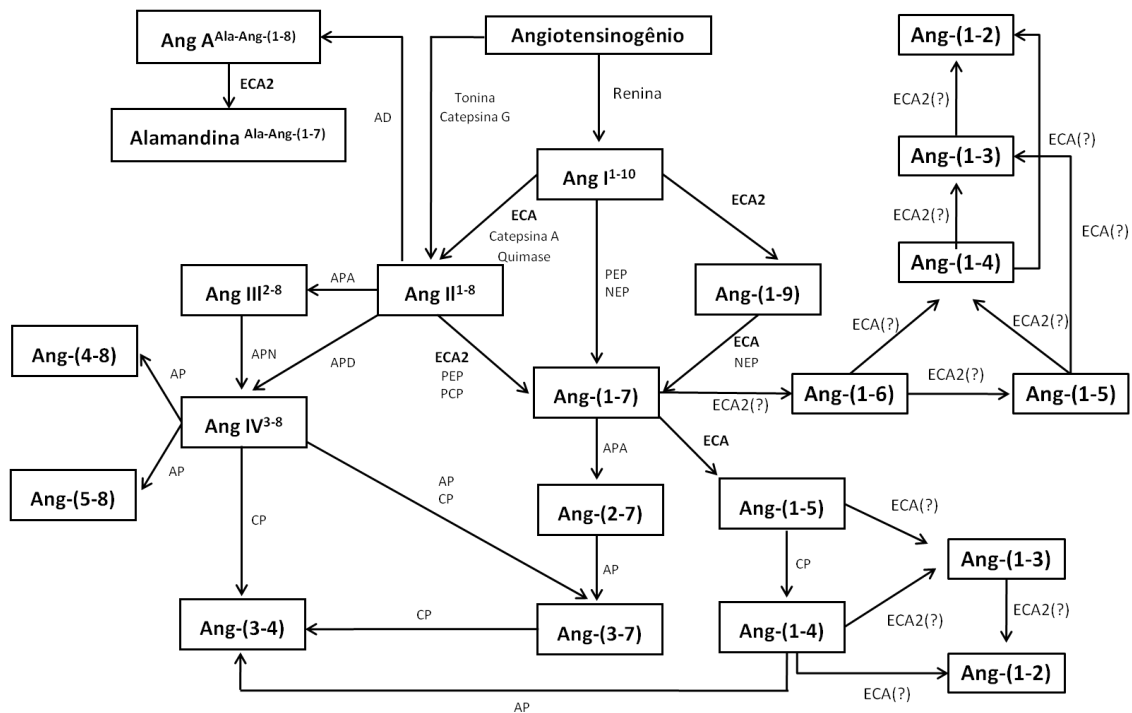
Apesar de a L-arginina sozinha não ser capaz de provocar redução na pressão de perfusão de corações isolados de ratos, a produção de NO pela NOS é imprescindível para o efeito vasodilatador da Ang-(1-2), já que o L-NAME bloqueou o efeito da Ang-(1-2) na pressão de perfusão. Provavelmente, assim como Ang-(1-7) (Sampaio e cols., 2007b), a Ang-(1-2) deve desencadear a produção de NO via eNOS, e assim, causar vasodilatação. A utilização do L-NAME também foi capaz de bloquear todos os efeitos da Ang-(1-2) na função cardíaca. Desta forma, é provável que nos cardiomiócitos, assim como nas células endoteliais, a Ang-(1-2) ative a via de sinalização que envolve eNOS, PI3K e Akt, culminando com a produção de NO e, assim como a Ang-(1-7), também altere a atividade e a expressão de componentes da maquinaria contrátil dos cardiomiócitos (Sampaio e cols., 2007b; Dias-Peixoto e cols., 2008), apesar de a cascata desencadeada com a Ang-(1-2) possivelmente não se iniciar com a ativação apenas do Mas.

A Ang-(1-2) também se mostrou diferente da Ang-(1-7) ao reduzir a PAM de ratos SHR acordados após infusão periférica única em *bolus*, provavelmente por vasodilatação. Já foi descrito que a infusão crônica de Ang-(1-7) no ventrículo lateral do cérebro é capaz de prevenir a progressão da hipertensão de ratos DOCA-sal (Guimaraes e cols., 2012), e que a infusão crônica de Ang-(1-7) é capaz de reduzir a PAM de SHR de forma transitória (Benter e cols., 1995). Entretanto, a redução da pressão arterial de forma aguda ainda não foi mostrada com a Ang-(1-7). Este fato colabora para nos mostrar a importância

que esses e outros pequenos peptídeos do SRA podem apresentar como sendo pontos chave para a intervenção farmacológica no tratamento de DCV. Em ratos Wistar, entretanto, a Ang-(1-2) não alterou significativamente a PAM. Isso pode ser explicado devido ao fato de o SRA estar em equilíbrio em ratos normotensos e estar hiperativado em ratos hipertensos. Outra explicação possível seria o controle barorreflexo da pressão arterial funcionando perfeitamente em ratos Wistar.

Como observado no coração isolado, a Ang-(1-2) também não apresentou efeito cronotrópico significante *in vivo*, tanto em SHR quanto em Wistar. Entretanto, nos ratos Wistar há um aumento sustentado, porém não significativo, da frequência cardíaca. Esse aumento da FC foi provavelmente causado pela regulação barorreflexa, que pode ter impedido a redução da pressão arterial desses ratos. Esse aumento da FC, entretanto, não ocorreu nos ratos SHR, que desse modo sofreram redução na PAM. A incapacidade do controle barorreflexo em SHR neste caso pode ser explicada pela redução da sensibilidade barorreflexa apresentada por esses ratos (Averill & Diz, 2000; Veerasingham & Raizada, 2003).

Ang-(1-5) é, provavelmente, o primeiro peptídeo formado na metabolização de Ang-(1-7) (**Figura 28**), já que este peptídeo não é substrato da ECA2 ou esta enzima possui afinidade muito baixa por Ang-(1-7) (Vickers e cols., 2002). Ainda assim, a formação de Ang-(1-6) por ECA2 a partir de Ang-(1-7) não pode ser descartada até o momento. Ang-(1-5), posteriormente, pode ser clivada em Ang-(1-4) ou Ang-(1-3). A formação de Ang-(1-4) a partir de Ang-(1-5) por uma carboxipeptidase já foi demonstrada, e por isso acreditamos que esta é a via mais provável. Ang-(1-4), por sua vez, pode ser teoricamente clivada tanto por ECA quanto por ECA2, formando Ang-(1-2) e Ang-(1-3), respectivamente. Como a participação da ECA2 foi comprovada, este é provavelmente o passo da via em que esta possível participação hidrolítica ocorre. Assim, a Ang-(1-4) é provavelmente hidrolisada por esta enzima em Ang-(1-3), que finalmente pode formar Ang-(1-2). A Figura 28 representa uma tentativa de representar a cascata de formação dos peptídeos angiotensinérgicos juntamente com os novos peptídeos descritos neste trabalho.



**Figura 28 - Representação da cascata de formação dos peptídeos angiotensinérgicos com possíveis vias de formação dos novos peptídeos propostos.** Ang: angiotensina; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; AP: aminopeptidase; AD: aspartato-descarboxilase; APA: aminopeptidase A; APD: aminopeptidase D; APN: aminopeptidase N; CP: carboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolilcarboxipeptidase; PEP: prolilendopeptidase.

## **VII. CONCLUSÃO**

A Ang-(1-7), na concentração de 42 pM, possui efeito vasodilatador direto no leito coronariano e também possui efeitos ionotrópicos no coração isolado de ratos. Estes efeitos são dependentes do Mas, da ECA e daECA2. Além disso, parte dos efeitos da Ang-(1-7) é devida a ação dos peptídeos Ang-(1-4), Ang-(1-3) e Ang-(1-2), indicando que estes fragmentos menores do SRA são biologicamente ativos no sistema cardiovascular.

## **VIII. REFERÊNCIAS**

- Abbas, A., Gorelik, G., Carbini, L. A. and Scicli, A. G. 1997. Angiotensin-(1-7) Induces Bradykinin-Mediated Hypotensive Responses in Anesthetized Rats. **Hypertension**, 30(2 Pt 1): 217-221.
- Accorsi-Mendonca, D., Correa, F. M. and Oliveira, A. M. 2006. B(2)-Receptor Modulation of the Reactivity to Phenylephrine and Angiotensin Ii in the Carotid Artery of Normotensive Rats after Trandolapril Treatment. **J Smooth Muscle Res**, 42(1): 21-31.
- Admiraal, P. J., van Kesteren, C. A., Danser, A. H., Derkx, F. H., Sluiter, W. and Schalekamp, M. A. 1999. Uptake and Proteolytic Activation of Prorenin by Cultured Human Endothelial Cells. **J Hypertens**, 17(5): 621-629.
- Alderman, M. H., Madhavan, S., Ooi, W. L., Cohen, H., Sealey, J. E. and Laragh, J. H. 1991. Association of the Renin-Sodium Profile with the Risk of Myocardial Infarction in Patients with Hypertension. **N Engl J Med**, 324(16): 1098-1104.
- Alenina, N., Xu, P., Rentzsch, B., Patkin, E. L. and Bader, M. 2008. Genetically Altered Animal Models for Mas and Angiotensin-(1-7). **Exp Physiol**, 93(5): 528-537.
- Almeida, A. P., Frabregas, B. C., Madureira, M. M., Santos, R. J., Campagnole-Santos, M. J. and Santos, R. A. 2000. Angiotensin-(1-7) Potentiates the Coronary Vasodilatory Effect of Bradykinin in the Isolated Rat Heart. **Braz J Med Biol Res**, 33(6): 709-713.
- Ardailou, R. 1997. Active Fragments of Angiotensin Ii: Enzymatic Pathways of Synthesis and Biological Effects. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 6(1): 28-34.
- Atlas, S. A. 1998. The Renin-Angiotensin System Revisited: Classical and Nonclassical Pathway of Angiotensin Formation. **Mt Sinai J Med**, 65(2): 87-96.
- Averill, D. B. and Diz, D. I. 2000. Angiotensin Peptides and Baroreflex Control of Sympathetic Outflow: Pathways and Mechanisms of the Medulla Oblongata. **Brain Res Bull**, 51(2): 119-128.
- Axelband, F., Dias, J., Miranda, F., Ferrao, F. M., Barros, N. M., Carmona, A. K., *et al.* 2009. A Scrutiny of the Biochemical Pathways from Ang Ii to Ang-(3-4) in Renal Basolateral Membranes. **Regul Pept**, 158(1-3): 47-56.
- Bader, M. 2013. Ace2, Angiotensin-(1-7), and Mas: The Other Side of the Coin. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, 465(1): 79-85.
- Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Muller, D. N., Luft, F. C. and Ganten, D. 2001. Tissue Renin-Angiotensin Systems: New Insights from Experimental Animal Models in Hypertension Research. **J Mol Med**, 79(2-3): 76-102.
- Becker, L. K., Etelvino, G. M., Walther, T., Santos, R. A. and Campagnole-Santos, M. J. 2007. Immunofluorescence Localization of the Receptor Mas in Cardiovascular-Related Areas of the Rat Brain. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 293(3): H1416-1424.
- Belova, L. A. 2000. Angiotensin Ii-Generating Enzymes. **Biochemistry (Mosc)**, 65(12): 1337-1345.
- Benter, I. F., Diz, D. I. and Ferrario, C. M. 1993. Cardiovascular Actions of Angiotensin(1-7). **Peptides**, 14(4): 679-684.

- Benter, I. F., Ferrario, C. M., Morris, M. and Diz, D. I. 1995. Antihypertensive Actions of Angiotensin-(1-7) in Spontaneously Hypertensive Rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 269(1): H313-H319.
- Bernstein, K. E., Ong, F. S., Blackwell, W.-L. B., Shah, K. H., Giani, J. F., Gonzalez-Villalobos, R. A., *et al.* 2013. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. **Pharmacol Rev**, 65(1): 1-46.
- Bojestig, M., Nystrom, F. H., Arnqvist, H. J., Ludvigsson, J. and Karlberg, B. E. 2000. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System Is Suppressed in Adults with Type 1 Diabetes. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, 1(4): 353-356.
- Bosnyak, S., Widdop, R. E., Denton, K. M. and Jones, E. S. 2012. Differential Mechanisms of Ang (1-7)-Mediated Vasodepressor Effect in Adult and Aged Candesartan-Treated Rats. **Int J Hypertens**, (2012).
- Boulanger, C. M., Caputo, L. and Levy, B. I. 1995. Endothelial At1-Mediated Release of Nitric Oxide Decreases Angiotensin II Contractions in Rat Carotid Artery. **Hypertension**, 26(5): 752-757.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. and Munoz, J. M. 1940. The Substance Causing Renal Hypertension. **J Physiol**, 98(3): 283-298.
- Braun-Menendez, E. and Page, I. H. 1958. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. **Science**, 127(3292): 242.
- Brosnihan, K. B., Li, P. and Ferrario, C. M. 1996. Angiotensin-(1-7) Dilates Canine Coronary Arteries through Kinins and Nitric Oxide. **Hypertension**, 27(3 Pt 2): 523-528.
- Brosnihan, K. B., Li, P., Tallant, E. A. and Ferrario, C. M. 1998. Angiotensin-(1-7): A Novel Vasodilator of the Coronary Circulation. **Biol Res**, 31(3): 227-234.
- Burns, G. A., Ann-Marie, T., Jodie, H. and Harding, J. W. 2004. At4 Receptor Binding in the Developing Rabbit. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, 281(2): 1276-1285.
- Burrell, L. M., Risvanis, J., Kubota, E., Dean, R. G., MacDonald, P. S., Lu, S., *et al.* 2005. Myocardial Infarction Increases Ace2 Expression in Rat and Humans. **Eur Heart J**, 26(4): 369-375; discussion 322-364.
- Campbell, D. J., Aggarwal, A., Esler, M. and Kaye, D. 2001. Beta-Blockers, Angiotensin II, and Ace Inhibitors in Patients with Heart Failure. **Lancet**, 358(9293): 1609-1610.
- Campbell, D. J., Woodward, M., Chalmers, J. P., Colman, S. A., Jenkins, A. J., Kemp, B. E., *et al.* 2005. Prediction of Myocardial Infarction by N-Terminal-Pro-B-Type Natriuretic Peptide, C-Reactive Protein, and Renin in Subjects with Cerebrovascular Disease. **Circulation**, 112(1): 110-116.
- Castelo-Branco, R. C., Leite-Delova, D. C. A. and de Mello-Aires, M. 2013. Dose-Dependent Effects of Angiotensin-(1-7) on the Nhe3 Exchanger and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in in Vivo Proximal Tubules. **Am J Physiol Renal Physiol**, 304(10): F1258-F1265.



- Castro, C. H., Santos, R. A., Ferreira, A. J., Bader, M., Alenina, N. and Almeida, A. P. 2005. 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.
- Castro, C. H., Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Bader, M., Alenina, N. and Almeida, A. P. 2006. Effects of Genetic Deletion of Angiotensin-(1-7) Receptor Mas on Cardiac Function During Ischemia/Reperfusion in the Isolated Perfused Mouse Heart. **Life Sci**, 80(3): 264-268.
- Chan, W. C. and White, P. D., 2000. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. Oxford University Press.
- Chen, Z., Tan, F., Erdös, E. G. and Deddish, P. A. 2005. Hydrolysis of Angiotensin Peptides by Human Angiotensin I-Converting Enzyme and the Resensitization of B2 Kinin Receptors. **Hypertension**, 46(6): 1368-1373.
- Coutinho, D. C., Foureaux, G., Rodrigues, K. D., Salles, R. L., Moraes, P. L., Murca, T. M., *et al.* 2013. Cardiovascular Effects of Angiotensin A: A Novel Peptide of the Renin-Angiotensin System. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**
- Danser, A. H., van Kats, J. P., Admiraal, P. J., Derkx, F. H., Lamers, J. M., Verdouw, P. D., *et al.* 1994. Cardiac Renin and Angiotensins. Uptake from Plasma Versus in Situ Synthesis. **Hypertension**, 24(1): 37-48.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. and Unger, T. 2000. International Union of Pharmacology. Xxiii. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacol Rev**, 52(3): 415-472.
- de Lannoy, L. M., Danser, A. H., van Kats, J. P., Schoemaker, R. G., Saxena, P. R. and Schalekamp, M. A. 1997. Renin-Angiotensin System Components in the Interstitial Fluid of the Isolated Perfused Rat Heart. Local Production of Angiotensin I. **Hypertension**, 29(6): 1240-1251.
- De Mello, W. C. and Danser, A. H. 2000. Angiotensin II and the Heart : On the Intracrine Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, 35(6): 1183-1188.
- Deddish, P. A., Marcic, B., Jackman, H. L., Wang, H. Z., Skidgel, R. A. and Erdos, E. G. 1998. N-Domain-Specific Substrate and C-Domain Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: Angiotensin-(1-7) and Keto-Ace. **Hypertension**, 31(4): 912-917.
- Dempsey, P. J., McCallum, Z. T., Kent, K. M. and Cooper, T. 1971. Direct Myocardial Effects of Angiotensin II. **Am J Physiol**, 220(2): 477-481.
- Dias-Peixoto, M. F., Santos, R. A., Gomes, E. R., Alves, M. N., Almeida, P. W., Greco, L., *et al.* 2008. Molecular Mechanisms Involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Pathway in Cardiomyocytes. **Hypertension**, 52(3): 542-548.
- Domenighetti, A. A., Wang, Q., Egger, M., Richards, S. M., Pedrazzini, T. and Delbridge, L. M. 2005. Angiotensin II-Mediated Phenotypic Cardiomyocyte Remodeling Leads to Age-Dependent Cardiac Dysfunction and Failure. **Hypertension**, 46(2): 426-432.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., *et al.* 2000a. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (Ace2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circ Res**, 87(5): E1-9.

- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., *et al.* 2000b. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (Ace2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circ Res**, 87(5): e1-e9.
- Donoghue, M., Wakimoto, H., Maguire, C. T., Acton, S., Hales, P., Stagliano, N., *et al.* 2003. Heart Block, Ventricular Tachycardia, and Sudden Death in Ace2 Transgenic Mice with Downregulated Connexins. **J Mol Cell Cardiol**, 35(9): 1043-1053.
- Dostal, D. E. and Baker, K. M. 1999. The Cardiac Renin-Angiotensin System: Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? **Circ Res**, 85(7): 643-650.
- Dzau, V. J., Ellison, K. E., Brody, T., Ingelfinger, J. and Pratt, R. E. 1987. A Comparative Study of the Distributions of Renin and Angiotensinogen Messenger Ribonucleic Acids in Rat and Mouse Tissues. **Endocrinology**, 120(6): 2334-2338.
- Erdos, E. G., Jackman, H. L., Brovkovich, V., Tan, F. and Deddish, P. A. 2002. Products of Angiotensin I Hydrolysis by Human Cardiac Enzymes Potentiate Bradykinin. **J Mol Cell Cardiol**, 34(12): 1569-1576.
- Esther, C. R., Howard, T. E., Marino, E. M., Goddard, J. M., Capecchi, M. R. and Bernstein, K. E. 1996. Mice Lacking Angiotensin-Converting Enzyme Have Low Blood Pressure, Renal Pathology, and Reduced Male Fertility. **Lab invest**, 74(5): 953-965.
- Faria-Silva, R., Duarte, F. V. and Santos, R. A. 2005. Short-Term Angiotensin(1-7) Receptor Mas Stimulation Improves Endothelial Function in Normotensive Rats. **Hypertension**, 46(4): 948-952.
- Fernandes, A. R. and Sa-Correia, I. 2001. The Activity of Plasma Membrane H(+)-Atpase Is Strongly Stimulated During *Saccharomyces Cerevisiae* Adaptation to Growth under High Copper Stress, Accompanying Intracellular Acidification. **Yeast**, 18(6): 511-521.
- Fernandes, L., Loiola, R. A., Tostes, R. C., Nigro, D., Fortes, Z. B. and de Carvalho, M. H. 2005. Angiotensin Ii-Induced Venoconstriction Involves Both At1 and At2 Receptors and Is Counterbalanced by Nitric Oxide. **Peptides**, 26(12): 2458-2463.
- Ferrario, C. M. 1998. Angiotensin-(1-7) and Antihypertensive Mechanisms. **J Nephrol**, 11(6): 278-283.
- Ferrario, C. M. 2002. Does Angiotensin-(1-7) Contribute to Cardiac Adaptation and Preservation of Endothelial Function in Heart Failure? **Circulation**, 105(13): 1523-1525.
- Ferrario, C. M. 2010. New Physiological Concepts of the Renin-Angiotensin System from the Investigation of Precursors and Products of Angiotensin I Metabolism. **Hypertension**, 55(2): 445-452.
- Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Dean, R. H. and Iyer, S. N. 1998. Novel Angiotensin Peptides Regulate Blood Pressure, Endothelial Function, and Natriuresis. **J Am Soc Nephrol**, 9(9): 1716-1722.
- Ferreira, A. J., Moraes, P. L., Foureaux, G., Andrade, A. B., Santos, R. A. and Almeida, A. P. 2011a. The Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis Is Expressed in Sinoatrial Node Cells of Rats. **J Histochem Cytochem**, 59(8): 761-768.

- Ferreira, A. J., Oliveira, T. L., Castro, M. C., Almeida, A. P., Castro, C. H., Caliari, M. V., *et al.* 2007a. Isoproterenol-Induced Impairment of Heart Function and Remodeling Are Attenuated by the Nonpeptide Angiotensin-(1-7) Analogue Ave 0991. **Life Sci**, 81(11): 916-923.
- Ferreira, A. J. and Santos, R. A. 2005. Cardiovascular Actions of Angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, 38(4): 499-507.
- Ferreira, A. J., Santos, R. A. and Almeida, A. P. 2001. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. **Hypertension**, 38(3 Pt 2): 665-668.
- Ferreira, A. J., Santos, R. A. and Almeida, A. P. 2002. Angiotensin-(1-7) Improves the Post-Ischemic Function in Isolated Perfused Rat Hearts. **Braz J Med Biol Res**, 35(9): 1083-1090.
- Ferreira, A. J., Shenoy, V., Qi, Y., Fraga-Silva, R. A., Santos, R. A., Katovich, M. J., *et al.* 2011b. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activation Protects against Hypertension-Induced Cardiac Fibrosis Involving Extracellular Signal-Regulated Kinases. **Exp Physiol**, 96(3): 287-294.
- Ferreira, A. J., Shenoy, V., Yamazato, Y., Sriramula, S., Francis, J., Yuan, L., *et al.* 2009. Evidence for Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Pulmonary Hypertension. **Am J Resp Crit Care**, 179(11): 1048-1054.
- Ferreira, P. M., Souza dos Santos, R. A. and Campagnole-Santos, M. J. 2007b. Angiotensin-(3-7) Pressor Effect at the Rostral Ventrolateral Medulla. **Regul Pep**, 141(1-3): 168-174.
- Fink, G. D. and Bruner, C. A. 1985. Hypertension During Chronic Peripheral and Central Infusion of Angiotensin Iii. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 249(2): E201-E208.
- Fraga-Silva, R. A., Costa-Fraga, F. P., Sousa, F. B. D., Alenina, N., Bader, M., Sinisterra, R. D., *et al.* 2011. An Orally Active Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces an Antithrombotic Effect. **Clinics**, 66: 837-841.
- Fukada, S. Y., Iyomasa, M. M., Cunha, F. Q., Correa, F. M. and de Oliveira, A. M. 2004. Mechanisms of Impaired Vascular Response to Ang II in Perivascular Injured Carotid Arteries of Ovariectomized Rat. **J Cardiovasc Pharmacol**, 44(3): 393-400.
- Fukada, S. Y., Tirapelli, C. R., de Godoy, M. A. and de Oliveira, A. M. 2005. Mechanisms Underlying the Endothelium-Independent Relaxation Induced by Angiotensin II in Rat Aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, 45(2): 136-143.
- Gava, E., de Castro, C. H., Ferreira, A. J., Colleta, H., Melo, M. B., Alenina, N., *et al.* 2012. Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Is an Essential Modulator of Extracellular Matrix Protein Expression in the Heart. **Regul Pept**, 175(1-3): 30-42.
- Gembardt, F., Westermann, D., Heringer-Walther, S., Schultheiss, H. P., Tschöpe, C. and Walter, T. 2003. Deficiency in the G Protein-Coupled Receptor Mas Leads to Cardiomyopathy and Demonstrates the Importance of the Endogenous Ligand Angiotensin-(1-7) for the Cardiac Function. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**: 369.

- Gjymishka, A., Kulemina, L. V., Shenoy, V., Katovich, M. J., Ostrov, D. A. and Raizada, M. K. 2010. Diminazene Aceturate Is an Ace2 Activator and a Novel Antihypertensive Drug. **FASEB J**(April 2010, 24 ): 1032-1033.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F. and Summerville, W. W. 1934. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. **J Exp Med**, 59(3): 347-379.
- Gorelik, G., Carbini, L. A. and Scicli, A. G. 1998. Angiotensin 1-7 Induces Bradykinin-Mediated Relaxation in Porcine Coronary Artery. **J Pharmacol Exp Ther**, 286(1): 403-410.
- Grobe, J. L., Mecca, A. P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T. A., Machado, J. M., *et al.* 2007. Prevention of Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling by Angiotensin-(1-7). **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 292(2): H736-742.
- Guimaraes, P. S., Santiago, N. M., Xavier, C. H., Velloso, E. P. P., Fontes, M. A. P., Santos, R. A. S., *et al.* 2012. Chronic Infusion of Angiotensin-(1-7) into the Lateral Ventricle of the Brain Attenuates Hypertension in Doca-Salt Rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 303(3): H393-H400.
- Hall, J. E. 2003. Historical Perspective of the Renin-Angiotensin System. **Mol Biotechnol**, 24(1): 27-39.
- Handa, R. K., Ferrario, C. M. and Strandhoy, J. W. 1996. Renal Actions of Angiotensin-(1-7): In Vivo and in Vitro Studies. **Am J Physiol Renal Physiol**, 270(1): F141-F147.
- Herath, C. B., Mak, K., Burrell, L. M. and Angus, P. W. 2013. Angiotensin-(1-7) Reduces the Perfusion Pressure Response to Angiotensin II and Methoxamine Via an Endothelial Nitric Oxide-Mediated Pathway in Cirrhotic Rat Liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 304(1): G99-G108.
- Hoffmann, S., Krause, T., van Geel, P. P., Willenbrock, R., Pagel, I., Pinto, Y. M., *et al.* 2001. Overexpression of the Human Angiotensin II Type 1 Receptor in the Rat Heart Augments Load Induced Cardiac Hypertrophy. **J Mol Med**, 79(10): 601-608.
- Hsueh, W. A. and Baxter, J. D. 1991. Human Prorenin. **Hypertension**, 17(4): 469-477.
- Hu, W. Y., Fukuda, N., Ikeda, Y., Suzuki, R., Tahira, Y., Takagi, H., *et al.* 2003. Human-Derived Vascular Smooth Muscle Cells Produce Angiotensin II by Changing to the Synthetic Phenotype. **J Cell Physiol**, 196(2): 284-292.
- Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Jr., Ichiki, T., Gaffney, F. A. and Inagami, T. 2001. Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II-Induced Hypertension. **Circulation**, 104(3): 346-351.
- Israel, A., Cierco, M. and Sosa, B. 2000. Angiotensin AT<sub>2</sub> Receptors Mediate Vasodepressor Response to Footshock in Rats. Role of Kinins, Nitric Oxide and Prostaglandins. **Eur J Pharmacol**, 394(1): 103-108.
- Iyer, S. N., Ferrario, C. M. and Chappell, M. C. 1998. Angiotensin-(1-7) Contributes to the Antihypertensive Effects of Blockade of the Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, 31(1 Pt 2): 356-361.

- Jankowski, V., Vanholder, R., van der Giet, M., Tölle, M., Karadogan, S., Gobom, J., *et al.* 2007. Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. **Arteriosc, Thromb Vasc Biol**, 27(2): 297-302.
- Joyner, J., Neves, L. A., Granger, J. P., Alexander, B. T., Merrill, D. C., Chappell, M. C., *et al.* 2007. Temporal-Spatial Expression of Ang-(1-7) and Angiotensin-Converting Enzyme 2 in the Kidney of Normal and Hypertensive Pregnant Rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 293(1): R169-177.
- Katada, J. and Majima, M. 2002. At(2) Receptor-Dependent Vasodilation Is Mediated by Activation of Vascular Kinin Generation under Flow Conditions. **Br J Pharmacol**, 136(4): 484-491.
- Kim, H. S., Krege, J. H., Kluckman, K. D., Hagaman, J. R., Hodgins, J. B., Best, C. F., *et al.* 1995. Genetic Control of Blood Pressure and the Angiotensinogen Locus. **Proc Natl Acad Sci**, 92(7): 2735-2739.
- Kluszens, L. D., Nelemans, S. A., Rink, R., de Vries, L., Meter-Arkema, A., Wang, Y., *et al.* 2009. Angiotensin-(1-7) with Thioether Bridge: An Angiotensin-Converting Enzyme-Resistant, Potent Angiotensin-(1-7) Analog. **J Pharmacol Exp Ther**, 328(3): 849-854.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G. and Nishiyama, A. 2007. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. **Pharmacol Rev**, 59(3): 251-287.
- Kohlstedt, K., Gershon, C., Friedrich, M., Müller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F., Busse, R., *et al.* 2006a. Angiotensin-Converting Enzyme (Ace) Dimerization Is the Initial Step in the Ace Inhibitor-Induced Ace Signaling Cascade in Endothelial Cells. **Molec Pharmacol**, 69(5): 1725-1732.
- Kohlstedt, K., Kellner, R., Busse, R. and Fleming, I. 2006b. Signaling Via the Angiotensin-Converting Enzyme Results in the Phosphorylation of the Nonmuscle Myosin Heavy Chain I $\alpha$ . **Molec Pharmacol**, 69(1): 19-26.
- Kohlstedt, K., Trouvain, C., Boettger, T., Shi, L., Fisslthaler, B. and Fleming, I. 2013. The Amp-Activated Protein Kinase Regulates Endothelial Cell Angiotensin-Converting Enzyme Expression Via P53 and the Post-Transcriptional Regulation of MicroRNA-143/145. **Circ Res**.
- Kokkonen, J. O., Saarinen, J. and Kovanen, P. T. 1998. Angiotensin II Formation in the Human Heart: An Ace or Non-Ace-Mediated Pathway? **Ann Med**, 30 Suppl 1: 9-13.
- Krege, J. H., John, S. W., Langenbach, L. L., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., *et al.* 1995. Male-Female Differences in Fertility and Blood Pressure in Ace-Deficient Mice. **Nature**, 375(6527): 146-148.
- Kuba, K., Imai, Y., Ohto-Nakanishi, T. and Penninger, J. M. 2010. Trilogy of Ace2: A Peptidase in the Renin–Angiotensin System, a Sars Receptor, and a Partner for Amino Acid Transporters. **Pharmacol Ther**, 128(1): 119-128.
- Kucharewicz, I., Pawlak, R., Matys, T., Pawlak, D. and Buczek, W. 2002. Antithrombotic Effect of Captopril and Losartan Is Mediated by Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, 40(5): 774-779.

- Kumar, R., Singh, V. P. and Baker, K. M. 2007. The Intracellular Renin-Angiotensin System: A New Paradigm. **Trends Endocrinol Metab**, 18(5): 208-214.
- Lambert, D., Clarke, N. and Turner, A. 2010. Not Just Angiotensinases: New Roles for the Angiotensin-Converting Enzymes. **Cell Mol Life Sci**, 67(1): 89-98.
- Langeveld, B., van Gilst, W. H., Tio, R. A., Zijlstra, F. and Roks, A. J. M. 2005. Angiotensin-(1-7) Attenuates Neointimal Formation after Stent Implantation in the Rat. **Hypertension**, 45(1): 138-141.
- Lara Lda, S., Cavalcante, F., Axelband, F., De Souza, A. M., Lopes, A. G. and Caruso-Neves, C. 2006. Involvement of the Gi/O/Cgmp/Pkg Pathway in the At2-Mediated Inhibition of Outer Cortex Proximal Tubule Na<sup>+</sup>-Atpase by Ang-(1-7). **Biochem J**, 395(1): 183-190.
- Lautner, R. Q., Verano-Braga, T., Andrade, C. R., Pessoa, C. D., Prates, J. B., Ribeiro, L. I. L., *et al.*, 2011. Ala-Scan of Angiotensin-(1-7) Unravel Critique Residues Fos Mas-Dependent Activity. pp: 88.
- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N. C., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., *et al.* 2013. Discovery and Characterization of Alamandine, a Novel Component of the Renin-Angiotensin System. **Circ Res**.
- Lemos, V. S., Silva, D. M., Walther, T., Alenina, N., Bader, M. and Santos, R. A. 2005. The Endothelium-Dependent Vasodilator Effect of the Nonpeptide Ang(1-7) Mimic Ave 0991 Is Abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. **J Cardiovasc Pharmacol**, 46(3): 274-279.
- Li, P., Chappell, M. C., Ferrario, C. M. and Brosnihan, K. B. 1997. Angiotensin-(1-7) Augments Bradykinin-Induced Vasodilation by Competing with Ace and Releasing Nitric Oxide. **Hypertension**, 29(1 Pt 2): 394-400.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., *et al.* 2003. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the Sars Coronavirus. **Nature**, 426(6965): 450-454.
- Lin, Q., Keller, R. S., Weaver, B. and Zisman, L. S. 2004. Interaction of Ace2 and Integrin B1 in Failing Human Heart. **BBA-Mol Basis Dis**, 1689(3): 175-178.
- Liu, E., Xu, Z., Li, J., Yang, S., Yang, W. and Li, G. 2011. Enalapril, Irbesartan, and Angiotensin-(1-7) Prevent Atrial Tachycardia-Induced Ionic Remodeling. **Int J Cardiol**, 146(3): 364-370.
- Loot, A. E., Roks, A. J., Henning, R. H., Tio, R. A., Suurmeijer, A. J., Boomsma, F., *et al.* 2002. Angiotensin-(1-7) Attenuates the Development of Heart Failure after Myocardial Infarction in Rats. **Circulation**, 105(13): 1548-1550.
- Maia, L. G., Ramos, M. C., Fernandes, L., de Carvalho, M. H., Campagnole-Santos, M. J. and Souza dos Santos, R. A. 2004. Angiotensin-(1-7) Antagonist a-779 Attenuates the Potentiation of Bradykinin by Captopril in Rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, 43(5): 685-691.
- Marques, F. D., Ferreira, A. J., Sinisterra, R. D., Jacoby, B. A., Sousa, F. B., Caliari, M. V., *et al.* 2011. An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. **Hypertension**, 57(3): 477-483.

- Matsufuji, H., Matsui, T., Ohshige, S., Kawasaki, T., Osajima, K. and Osajima, Y. 1995. Antihypertensive Effects of Angiotensin Fragments in Shr. **Biosci Biotechnol Biochem**, 59(8): 1398-1401.
- Mercure, C., Yogi, A., Callera, G. E., Aranha, A. B., Bader, M., Ferreira, A. J., *et al.* 2008. Angiotensin(1-7) Blunts Hypertensive Cardiac Remodeling by a Direct Effect on the Heart. **Circ Res**, 103(11): 1319-1326.
- Mordwinkin, N. M., Meeks, C. J., Jadhav, S. S., Espinoza, T., Roda, N., diZerega, G. S., *et al.* 2012. Angiotensin-(1-7) Administration Reduces Oxidative Stress in Diabetic Bone Marrow. **Endocrinology**, 153(5): 2189-2197.
- Mosterd, A., D'Agostino, R. B., Silbershatz, H., Sytkowski, P. A., Kannel, W. B., Grobbee, D. E., *et al.* 1999. Trends in the Prevalence of Hypertension, Antihypertensive Therapy, and Left Ventricular Hypertrophy from 1950 to 1989. **N Engl J Med**, 340(16): 1221-1227.
- Murca, T. M., Almeida, T. C., Raizada, M. K. and Ferreira, A. J. 2012. Chronic Activation of Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protects Diabetic Rats from Cardiovascular Autonomic Dysfunction. **Exp Physiol**, 97(6): 699-709.
- Musa-Aziz, R., Oliveira-Souza, M. and Mello-Aires, M. 2005. Signaling Pathways in the Biphasic Effect of Ang Ii on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in T84 Cells. **J Membr Biol**, 205(2): 49-60.
- Neves, L. A., Almeida, A. P., Khosla, M. C., Campagnole-Santos, M. J. and Santos, R. A. 1997. Effect of Angiotensin-(1-7) on Reperfusion Arrhythmias in Isolated Rat Hearts. **Braz J Med Biol Res**, 30(6): 801-809.
- Neves, L. A., Almeida, A. P., Khosla, M. C. and Santos, R. A. 1995. Metabolism of Angiotensin I in Isolated Rat Hearts. Effect of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. **Biochem Pharmacol**, 50(9): 1451-1459.
- Ng, K. K. and Vane, J. R. 1967. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin Ii. **Nature**, 216(5117): 762-766.
- Nguyen, G., Burckle, C. A. and Sraer, J. D. 2004. Renin/Prorenin-Receptor Biochemistry and Functional Significance. **Curr Hypertens Rep**, 6(2): 129-132.
- Niimura, F., Labosky, P. A., Kakuchi, J., Okubo, S., Yoshida, H., Oikawa, T., *et al.* 1995. Gene Targeting in Mice Reveals a Requirement for Angiotensin in the Development and Maintenance of Kidney Morphology and Growth Factor Regulation. **J Clin Invest**, 96(6): 2947-2954.
- Ocaranza, M. P., Lavandero, S., Jalil, J. E., Moya, J., Pinto, M., Novoa, U., *et al.* 2010. Angiotensin-(1-9) Regulates Cardiac Hypertrophy in Vivo and in Vitro. **J Hypertens**, 28(5): 1054-1064 1010.1097/HJH.1050b1013e328335d328291.
- Oliveira-Souza, M. and De Mello-Aires, M. 2000. Interaction of Angiotensin Ii and Atrial Natriuretic Peptide on Phi Regulation in Mdck Cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, 279(5): F944-F953.
- Osei, S. Y., Ahima, R. S., Minkes, R. K., Weaver, J. P., Khosla, M. C. and Kadowitz, P. J. 1993. Differential Responses to Angiotensin-(1-7) in the Feline Mesenteric and Hindquarters Vascular Beds. **Eur J Pharmacol**, 234(1): 35-42.

- Page, I. H. and Helmer, O. M. 1940a. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. **J Exp Med**, 71(1): 29-42.
- Page, I. H. and Helmer, O. M. 1940b. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. **J Exp Med**, 71(1): 29-42.
- Patel, V. B., Bodiga, S., Fan, D., Das, S. K., Wang, Z., Wang, W., *et al.* 2012. Cardioprotective Effects Mediated by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade and Enhancing Angiotensin 1-7 in Experimental Heart Failure in Angiotensin-Converting Enzyme 2-Null Mice. **Hypertension**, 59(6): 1195-1203.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. and Kreutz, R. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiol Rev**, 86(3): 747-803.
- Paul, M., Wagner, J. and Dzau, V. J. 1993. Gene Expression of the Renin-Angiotensin System in Human Tissues. Quantitative Analysis by the Polymerase Chain Reaction. **J Clin Invest**, 91(5): 2058-2064.
- Paula, R. D., Lima, C. V., Britto, R. R., Campagnole-Santos, M. J., Khosla, M. C. and Santos, R. A. S. 1999. Potentiation of the Hypotensive Effect of Bradykinin by Angiotensin-(1-7)-Related Peptides. **Peptides**, 20(4): 493-500.
- Peach, M. J. 1977. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. **Physiol Rev**, 57(2): 313-370.
- Pendergrass, K. D., Pirro, N. T., Westwood, B. M., Ferrario, C. M., Brosnihan, K. B. and Chappell, M. C. 2008. Sex Differences in Circulating and Renal Angiotensins of Hypertensive Mren(2).Lewis but Not Normotensive Lewis Rats. **A J Physiol Heart Circ Physiol**, 295(1): H10-H20.
- Porsti, I., Bara, A. T., Busse, R. and Hecker, M. 1994. 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.
- Probstfield, J. L. and O'Brien, K. D. 2010. Progression of Cardiovascular Damage: The Role of Renin-Angiotensin System Blockade. **Am J Cardiol**, 105(1 Suppl): 10A-20A.
- Prosser, H. C. G., Forster, M. E., Richards, A. M. and Pemberton, C. J. 2009. Cardiac Chymase Converts Rat Proangiotensin-12 (Pa12) to Angiotensin II: Effects of Pa12 Upon Cardiac Haemodynamics. **Cardiovasc Res**, 82(1): 40-50.
- Rabelo, L. A., Xu, P., Todiras, M., Sampaio, W. O., Buttgerit, J., Bader, M., *et al.* 2008. Ablation of Angiotensin (1-7) Receptor Mas in C57bl/6 Mice Causes Endothelial Dysfunction. **J Am Soc Hypertens**, 2(6): 418-424.
- Raffai, G., Durand, M. J. and Lombard, J. H. 2011. Acute and Chronic Angiotensin-(1-7) Restores Vasodilation and Reduces Oxidative Stress in Mesenteric Arteries of Salt-Fed Rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 301(4): H1341-1352.
- Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J. and Hooper, N. M. 2004. Evaluation of Angiotensin-Converting Enzyme (Ace), Its Homologue Ace2 and Nephilysin in Angiotensin Peptide Metabolism. **Biochem J**, 383(Pt 1): 45-51.



- Rieger, K. J., Saez-Servent, N., Papet, M. P., Wdzieczak-Bakala, J., Morgat, J. L., Thierry, J., *et al.* 1993. Involvement of Human Plasma Angiotensin I-Converting Enzyme in the Degradation of the Haemoregulatory Peptide N-Acetyl-Seryl-Aspartyllysyl-Proline. **Biochem J**, (296): 373–378.
- Roks, A. J., van Geel, P. P., Pinto, Y. M., Buikema, H., Henning, R. H., de Zeeuw, D., *et al.* 1999. Angiotensin-(1-7) Is a Modulator of the Human Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, 34(2): 296-301.
- Sampaio, W. O., Henrique de Castro, C., Santos, R. A., Schiffrin, E. L. and Touyz, R. M. 2007a. Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells. **Hypertension**, 50(6): 1093-1098.
- Sampaio, W. O., Nascimento, A. A. and Santos, R. A. 2003. Systemic and Regional Hemodynamic Effects of Angiotensin-(1-7) in Rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 284(6): H1985-1994.
- Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L. and Touyz, R. M. 2007b. Angiotensin-(1-7) through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Via Akt-Dependent Pathways. **Hypertension**, 49(1): 185-192.
- Santos, R. A., Brum, J. M., Brosnihan, K. B. and Ferrario, C. M. 1990. The Renin-Angiotensin System During Acute Myocardial Ischemia in Dogs. **Hypertension**, 15(2 Suppl): 1121-127.
- Santos, R. A. and Campagnole-Santos, M. J. 1994. Central and Peripheral Actions of Angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, 27(4): 1033-1047.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J. and Andrade, S. P. 2000. Angiotensin-(1-7): An Update. **Regul Pept**, 91(1-3): 45-62.
- Santos, R. A., Castro, C. H., Gava, E., Pinheiro, S. V., Almeida, A. P., Paula, R. D., *et al.* 2006. Impairment of in Vitro and in Vivo Heart Function in Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Knockout Mice. **Hypertension**, 47(5): 996-1002.
- Santos, R. A., Ferreira, A. J., Nadu, A. P., Braga, A. N., de Almeida, A. P., Campagnole-Santos, M. J., *et al.* 2004. Expression of an Angiotensin-(1-7)-Producing Fusion Protein Produces Cardioprotective Effects in Rats. **Physiol Genomics**, 17(3): 292-299.
- Santos, R. A. S., e Silva, A. C. S., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., de Buhr, I., *et al.* 2003. Angiotensin-(1-7) Is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci**, 100(14): 8258-8263.
- Saris, J. J., Derkx, F. H., De Bruin, R. J., Dekkers, D. H., Lamers, J. M., Saxena, P. R., *et al.* 2001. High-Affinity Prorenin Binding to Cardiac Man-6-P/Igf-1 Receptors Precedes Proteolytic Activation to Renin. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 280(4): H1706-1715.
- Schiffers, P. M., Struyker-Boudier, H. A. and De Mey, J. G. 1991. Effects of Angiotensin II and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors on Contractile and Growth Responses in Isolated Carotid Arteries of the Rat. **Basic Res Cardiol**, 86 Suppl 1: 83-89.

Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Azevedo e Silva, G., Menezes, A. M., Monteiro, C. A., Barreto, S. M., *et al.* 2011. Chronic Non-Communicable Diseases in Brazil: Burden and Current Challenges. **Lancet**, 377(9781): 1949-1961.

Skeggs, L. T., Jr., Marsh, W. H., Kahn, J. R. and Shumway, N. P. 1954a. The Existence of Two Forms of Hypertensin. **J Exp Med**, 99(3): 275-282.

Skeggs, L. T., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumway, N. P. and Woods, K. R. 1956. The Amino Acid Sequence of Hypertensin-li. **J Exp Med**, 104(2): 193-197.

Skeggs, L. T., Marsh, W. H., Kahn, J. R. S. and Shumway, N. P. 1954b. The Existence of Two Forms of Hypertension. **J. Exp. Med**, 99: 275-282.

Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A. and Schulz, R. 2007. Isolated Heart Perfusion According to Langendorff---Still Viable in the New Millennium. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 55(2): 113-126.

Soares de Moura, R., Resende, A. C., Emiliano, A. F., Tano, T., Mendes-Ribeiro, A. C., Correia, M. L., *et al.* 2004. The Role of Bradykinin, At2 and Angiotensin 1-7 Receptors in the Edrf-Dependent Vasodilator Effect of Angiotensin li on the Isolated Mesenteric Vascular Bed of the Rat. **Br J Pharmacol**, 141(5): 860-866.

Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., *et al.* 1988. Two Putative Active Centers in Human Angiotensin I-Converting Enzyme Revealed by Molecular Cloning. **Proc Natl Acad Sci**, 85(24): 9386-9390.

Steckelings, U. M., Kaschina, E. and Unger, T. 2005. The At2 Receptor—a Matter of Love and Hate. **Peptides**, 26(8): 1401-1409.

Stegbauer, J., Oberhauser, V., Vonend, O. and Rump, L. C. 2004. Angiotensin-(1-7) Modulates Vascular Resistance and Sympathetic Neurotransmission in Kidneys of Spontaneously Hypertensive Rats. **Cardiovasc Res**, 61(2): 352-359.

Takahashi, N., Lopez, M. L. S. S., Cowhig, J. E., Taylor, M. A., Hatada, T., Riggs, E., *et al.* 2005. Ren1c Homozygous Null Mice Are Hypotensive and Polyuric, but Heterozygotes Are Indistinguishable from Wild-Type. **J Am Soc Nephrol**, 16(1): 125-132.

Tallant, E. A. and Clark, M. A. 2003. Molecular Mechanisms of Inhibition of Vascular Growth by Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, 42(4): 574-579.

Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., *et al.* 1994. Angiotensinogen-Deficient Mice with Hypotension. **J Biol Chem**, 269(50): 31334-31337.

Thomas, G., Mostaghim, R. and Ramwell, P. W. 1986. Endothelium Dependent Vascular Relaxation by Arginine Containing Polypeptides. **Biochem Biophys Res Commun**, 141(2): 446-451.

Thomas, W., McEneaney, V. and Harvey, B. J. 2008. Aldosterone-Induced Signalling and Cation Transport in the Distal Nephron. **Steroids**, 73(9–10): 979-984.

Tiegerstedt, R. and Bergman, P. 1898. Niere Und Kreislauf. **Skand Arch Physiol**: 223-271.

- Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G. and Turner, A. J. 2000. A Human Homolog of Angiotensin-Converting Enzyme. Cloning and Functional Expression as a Captopril-Insensitive Carboxypeptidase. **J Biol Chem**, 275(43): 33238-33243.
- Tirapelli, C. R., Fukada, S. Y., de Godoy, M. A. and de Oliveira, A. M. 2006. Analysis of the Mechanisms Underlying the Vasorelaxant Action of Angiotensin II in the Isolated Rat Carotid. **Life Sci**, 78(23): 2676-2682.
- Toda, N. and Miyazaki, M. 1981. Angiotensin-Induced Relaxation in Isolated Dog Renal and Cerebral Arteries. **Am J Physiol**, 240(2): H247-254.
- Tom, B., de Vries, R., Saxena, P. R. and Danser, A. H. 2001. Bradykinin Potentiation by Angiotensin-(1-7) and ACE Inhibitors Correlates with ACE C- and N-Domain Blockade. **Hypertension**, 38(1): 95-99.
- Trask, A. J., Averill, D. B., Ganten, D., Chappell, M. C. and Ferrario, C. M. 2007. Primary Role of Angiotensin-Converting Enzyme-2 in Cardiac Production of Angiotensin-(1-7) in Transgenic Ren-2 Hypertensive Rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 292(6): H3019-H3024.
- Tschope, C., Schultheiss, H. P. and Walther, T. 2002. Multiple Interactions between the Renin-Angiotensin and the Kallikrein-Kinin Systems: Role of ACE Inhibition and AT1 Receptor Blockade. **J Cardiovasc Pharmacol**, 39(4): 478-487.
- Tsuchida, S., Matsusaka, T., Chen, X., Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., *et al.* 1998. Murine Double Nullizygotes of the Angiotensin Type 1a and 1b Receptor Genes Duplicate Severe Abnormal Phenotypes of Angiotensinogen Nullizygotes. **J Clin Invest**, 101(4): 755-760.
- Urata, H., Healy, B., Stewart, R. W., Bumpus, F. M. and Husain, A. 1990. Angiotensin II-Forming Pathways in Normal and Failing Human Hearts. **Circ Res**, 66(4): 883-890.
- van Esch, J. H. M., Oosterveer, C. R., Batenburg, W. W., van Veghel, R. and Danser, A. H. J. 2008. Effects of Angiotensin II and Its Metabolites in the Rat Coronary Vascular Bed: Is Angiotensin III the Preferred Ligand of the Angiotensin AT2 Receptor? **Europ J Pharmacol**, 588(2-3): 286-293.
- van Kats, J. P., Danser, A. H., van Meegen, J. R., Sassen, L. M., Verdouw, P. D. and Schalekamp, M. A. 1998. Angiotensin Production by the Heart: A Quantitative Study in Pigs with the Use of Radiolabeled Angiotensin Infusions. **Circulation**, 98(1): 73-81.
- Veerasingham, S. J. and Raizada, M. K. 2003. Brain Renin-Angiotensin System Dysfunction in Hypertension: Recent Advances and Perspectives. **Br J Pharmacol**, 139(2): 191-202.
- Velez, J. C. Q., Ierardi, J. L., Bland, A. M., Morinelli, T. A., Arthur, J. M., Raymond, J. R., *et al.* 2012. Enzymatic Processing of Angiotensin Peptides by Human Glomerular Endothelial Cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, 302(12): F1583-F1594.
- Verano-Braga, T., Schwämmle, V., Sylvester, M., Passos-Silva, D. G., Peluso, A. A. B., Etelvino, G. M., *et al.* 2012. Time-Resolved Quantitative Phosphoproteomics: New Insights into Angiotensin-(1-7) Signaling Networks in Human Endothelial Cells. **J Proteome Res**, 11(6): 3370-3381.

- 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.
- Walters, P. E., Gaspari, T. A. and Widdop, R. E. 2005. Angiotensin-(1-7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats. **Hypertension**, 45(5): 960-966.
- Welches, W. R., Santos, R. A. S., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., Greene, L. J. and Ferrario, C. M. 1991. Evidence That Prolyl Endopeptidase Participates in the Processing of Brain Angiotensin. **J Hypertens**, 9(7): 631-638.
- WHO 2009. World Health Statistics 2009. **Geneva**: World Health Organization, 2009.
- Xu, P., Costa-Goncalves, A. C., Todiras, M., Rabelo, L. A., Sampaio, W. O., Moura, M. M., *et al.* 2008. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in Mas Gene-Deleted Mice. **Hypertension**, 51(2): 574-580.
- Yamada, K., Iyer, S. N., Chappell, M. C., Ganten, D. and Ferrario, C. M. 1998. Converting Enzyme Determines Plasma Clearance of Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, 32(3): 496-502.
- Yang, R., Smolders, I., Vanderheyden, P., Demaegdt, H., Van Eeckhaut, A., Vauquelin, G., *et al.* 2011. Pressor and Renal Hemodynamic Effects of the Novel Angiotensin a Peptide Are Angiotensin II Type 1a Receptor Dependent. **Hypertension**, 57(5): 956-964.
- Yang, R., Walther, T., Gembardt, F., Smolders, I., Vanderheyden, P., Albiston, A. L., *et al.* 2010. Renal Vasoconstrictor and Pressor Responses to Angiotensin IV in Mice Are AT1a-Receptor Mediated. **J Hypertens**, 28(3): 487-494