

*UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
TESE DE DOUTORADO*

*AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOPATOLÓGICO DA
ANGIOTENSINA-(1-7) EM MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROSE HEPÁTICA*

Regina Maria Pereira

**Belo Horizonte
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

***AVALIAÇÃO DO PAPEL FISIOPATOLÓGICO DA ANGIOTENSINA-
(1-7) EM MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE HEPÁTICA***

Regina Maria Pereira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Doutor.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

**Orientadora: Profa Ana Cristina Simões e Silva
Prof. Adjunta do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais**

**Co-orientador: Prof. Robson Augusto Souza dos Santos
Prof. Titular do Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Ronaldo Tadeu Pena

Vice-Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais

Prf^ª. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Jaime Arturo Ramirez

Pró-reitor de Pesquisa

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Sub-coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria

Profª. Cleonice de Carvalho Coelho Mota

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Prof. Joel Alves Lamounier

**Sub-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Prf. Joel Alves Lamounier

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof^ª. Ivani Novato Silva

Prof. Francisco José Penna

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof. Marcos Borato Viana

Prof^ª. Regina Lunardi Rocha

Prof. Roberto Assis Ferreira

Miguir Terezinha Vieccelli Donoso (Rep. Discente – Titular)

Agradecimentos

Diversas pessoas colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste estudo, especialmente:

- Professora Ana Cristina Simões e Silva, minha orientadora, pelos inúmeros ensinamentos de cunho científico e profissional, mas sobretudo pela amizade;
- Professor Robson Augusto Souza dos Santos, meu co-orientador, por viabilizar a parte experimental deste trabalho bem como pela significativa contribuição científica;
- Professor Mauro Martins Teixeira, por colaborar com o estudo através dos ensaios imunoenzimáticos e de valiosas discussões científicas;
- Professora Virgínia Hora Rios Leite, pela realização da análise histológica dos fígados;
- Aos alunos de iniciação científica Lincoln Paiva Costa, Filipi Leles da Costa Dias e Alysson Souza Rezende, pelo imenso auxílio na realização do trabalho;
- Aos colegas Guilherme Birchal Collares e Lucíola Barcellos, pelo fundamental auxílio em alguns protocolos experimentais;
- Aos meus colegas do Hospital Odilon Berhens, especialmente Paulo Fernando Martins Pinheiro e Leonardo Augusto Silva Machado, pela colaboração e solidariedade;
- A todos do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG, especialmente José Roberto Silva;
- Aos Professores Sérgio Veloso Brant Pinheiro, Alexandre Rodrigues Ferreira e Eduardo Araújo Oliveira, membros de minha banca do exame de qualificação, pela criteriosa análise deste trabalho e por suas valiosas críticas e sugestões;
- Aos meus pais e demais familiares, pelo amor e compreensão durante a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

γ GT – gama-glutamyl transpeptidase ou gama-glutamyl transpeptidase

A-779 – antagonista do receptor Mas da Angiotensina-(1-7)

ACE – angiotensin converting enzyme

ACE2 - angiotensin converting enzyme 2

ALP – alkaline phosphatase

ALT - alanina aminotransferase ou alanine aminotransferase

Ang – Angiotensina ou Angiotensin

ARP - atividade de renina plasmática

AST - aspartato aminotransferase ou aspartate aminotransferase

AT₁ - receptores angiotensinérgicos do tipo 1

AT₂ - receptores angiotensinérgicos do tipo 2

AVE 0991 – agonista oral do receptor Mas da Angiotensina-(1-7)

Bb – bilirrubina ou bilirubin

BDL – bile duct ligation

BSA - albumina bovina ou bovine serum albumin

CBP – carboxipeptidase

CEBIO – Centro de Bioterismo

CEH – célula estrelada hepática

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CH₂O - *clearance* de água livre ou free water clearance

CK – células de Kupffer

COsm - *clearance* osmolar ou osmolal clearance

D-Pro⁷-Ang-(1-7) – antagonista seletivo da Angiotensina-(1-7)

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 - Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2

EDTA - ácido etilenodinitrilo tetra-acético

ELISA – ensaio imunoenzimático immunoenzymatic assay

EPM - erro padrão da média

HRS – hepatorenal syndrome

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

Il – interleucina

LDB - ligadura do ducto biliar comum
LDB – ligadura do ducto biliar comum
MAS – receptor da Angiotensina-(1-7)
MEC – matriz extracelular
MEOH - metanol
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
NEP – endopeptidase neutra
PEP – prolil-endopeptidase
PMSF - para-metilsulfonil fluoreto
POHHgBz - para-hidroximercúrio-benzoato
PRA – plasma renin activity
RAS – Renin Angiotensin System
RIA - radioimmunoassay
RIE – radioimunoensaio
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
SCC - sistema caliceína cinina
SNS - sistema nervoso simpático
SRA - Sistema Renina-Angiotensina
TFA - ácido trifluoroacético ou trifluoroacetic acid
TGF β - fator de crescimento e transformação do tipo beta
TNF α - fator de necrose tumoral do tipo alfa
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
Artigo: Mecanismos fisiopatológicos da fibrose hepática: Papel do Sistema Renina Angiotensina	
3. OBJETIVOS.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Materiais	50
4.1.1 Animais.....	50
4.1.2 Modelo experimental.....	50
4.1.3 Grupos Experimentais.....	51
4.2 Métodos.....	53
4.2.1 Protocolo experimental.....	53
4.2.2 Procedimentos analíticos.....	53
4.2.2.1 Dosagem de sódio e potássio.....	56
4.2.2.2 Clearance de creatinina.....	57
4.2.2.3 Determinação das osmolalidades sérica e urinária.....	58
4.2.2.4 Pesquisa de elementos anormais na urina.....	60
4.2.2.5 Marcadores de lesão hepatocitária e provas de função hepática.....	62
4.2.2.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para TGF- β	69
4.2.2.7 Determinação das concentrações teciduais de hidroxiprolina.....	71
4.2.2.8 Radioimunoensaio.....	72
4.2.3 Análise histopatológica.....	84
4.2.4 Análise Estatística.....	85
4.2.5 Aspectos Éticos.....	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
Artigo 1: Renin Angiotensin System in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7)	89
Artigo 2: Changes in the circulating Renin Angiotensin System during the development of Hepatorenal Syndrome in bile duct ligated rats	114
6. COMENTÁRIOS FNAIS.....	157

1 - INTRODUÇÃO

Esta tese de doutorado está inserida em uma linha de pesquisa já bem estabelecida, envolvendo o estudo do papel do Sistema Renina Angiotensina (SRA) em doenças humanas, mais especificamente neste caso, na fibrose hepática. Além disso, esta tese consolida definitivamente uma importante interação do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG com dois laboratórios de pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, o Laboratório de Hipertensão do Prof Robson Augusto Souza dos Santos do Departamento de Fisiologia e Biofísica e o Laboratório de Imunofarmacologia do Professor Mauro Martins Teixeira do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Nesta tese de doutorado aprofundamos no estudo de um modelo experimental de fibrose hepática que imita doenças obstrutivas do trato biliar, freqüentes na faixa etária pediátrica. Tais enfermidades são pouco conhecidas do ponto de vista fisiopatológico e sua abordagem terapêutica continua bastante limitada, determinando prognóstico reservado para os pacientes (ROQUETE et al, 2005).

É importante mencionar ainda que esta tese de doutorado dá continuidade à minha dissertação de mestrado que abordou o perfil do SRA circulante no mesmo modelo experimental de fibrose hepática. Tal dissertação de mestrado produziu, até o momento, a apresentação dos dados em três congressos internacionais (Experimental Biology 2003, San Diego, California; European Congress of Nephrology 2004, Lisboa, Portugal e V International Symposium of Vasoactive Peptides 2004, Ouro Preto, MG, Brasil), a publicação de um resumo em periódico internacional (FASEB Journal – vide anexo 1), dois resumos em anais de congressos internacionais (vide anexo 1) e de um artigo de revisão em periódico nacional – “Revista Médica de Minas Gerais 2004;14(3):189-195” (PEREIRA et al, 2003;

PEREIRA et al, 2004; SILVA et al, 2004 - vide anexo 1). Em síntese, minha dissertação de mestrado mostrou uma ativação global dos componentes circulantes do SRA conforme a progressão da doença hepática, sugerindo a possibilidade de novas estratégias terapêuticas para as hepatopatias a partir da modulação do metabolismo das angiotensinas (PEREIRA, 2004). Foi observado um aumento progressivo da Angiotensina II (Ang II) e da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Fisiologicamente, a Ang II, considerada principal efector do SRA, age tanto como um hormônio circulante quanto como um componente ativo do SRA tecidual (TALLANT et al, 1999; SANTOS et al, 2000a; KIM & IWAO, 2001; SANTOS et al, 2001). A Ang II apresenta ações pró-fibróticas, protrombóticas, mitogênicas e tróficas (FREEMAN et al, 1996; WEBER, 1999; TALLANT et al 1999; THARAUX et al, 2000; KIM & IWAO, 2001; KUCHARWICZ et al, 2002; TALLANT et al, 2003; TALLANT et al, 2005). Vários estudos sugerem que a Ang II poderia mediar e exacerbar a fibrose hepática através da ativação das células estreladas e pelo estímulo ao TGF β ₁ (BATALLER et al, 2000; ROJKIND & GREENWEL, 2001; BISSELL et al, 2001, JONSSON et al, 2001; YANG et al, 2002; FRIEDMAN, 2003; BATALLER & BRENNER, 2005). Já existem evidências de que o antagonismo à Ang II, através do tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou com antagonistas dos receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT₁) pode exercer um efeito benéfico nas hepatopatias (BATALLER et al, 2000; GIRGRAH et al, 2000; LEE et al, 2000; PAIZIS et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001; JONSSON et al, 2002; PAIZIS et al, 2002; YANG et al, 2002; BATALLER et al, 2005; PAIZIS et al, 2005). Diversos estudos têm mostrado a importância fisiológica da Ang-(1-7) (SANTOS et al, 2000b; CESARI et al, 2002; KUCHARWICZ et al, 2002; CAREY et al, 2003; FERRARIO & CHAPPELL, 2004; SANTOS et al, 2005). Neste sentido, mais recentemente, nosso grupo publicou um artigo de revisão que destaca o potencial terapêutico da Ang-(1-7) nas doenças cardiovasculares, renais e, talvez, nas hepatopatias (SIMÕES e SILVA et al, 2006 - vide

anexo 2). Na maioria das vezes, a Ang-(1-7) exerce ações opostas à Ang II, conferindo ao sistema uma influência dual em vários tecidos (MACHADO et al, 1999; KUCHARWICZ et al, 2002; FERRARIO & CHAPPELL, 2004; FERREIRA & SANTOS, 2005; SIMÕES e SILVA et al, 2006). Existem algumas evidências sugerindo que a Ang-(1-7) está envolvida em alguns efeitos benéficos dos bloqueadores dos receptores AT₁ e dos inibidores da ECA e da vasopeptidase nas doenças cardiovasculares (MAIA et al, 2004; FERRARIO et al, 2002). Dessa forma, pode-se hipotetizar que um dos mecanismos através dos quais os bloqueadores do SRA atenuam a fibrose hepática seria através da elevação dos níveis de Ang-(1-7). Assim, independente do papel da Ang-(1-7) na doença hepática, a estimulação ou o bloqueio de suas ações poderia constituir-se em uma ferramenta útil para o entendimento e, até mesmo, para o tratamento da fibrose hepática.

Neste contexto, o presente estudo consolida e estende os resultados anteriores (PEREIRA et al, 2003; PEREIRA, 2004) através da análise mais detalhada de parâmetros de função hepática, função renal, alterações dos níveis circulantes de angiotensinas de acordo com a progressão da fibrose hepática produzida pela duração progressiva da ligadura do ducto biliar comum, correlacionando estes dados com as mudanças histológicas do fígado e com a mensuração das concentrações de hidroxiprolina no tecido hepático, que refletem o conteúdo de colágeno e conseqüentemente o grau de fibrose (REDDY & ENWEMEKA, 1996). Além disso, foi realizada uma avaliação do papel fisiopatológico da Ang-(1-7) endógena durante as etapas iniciais do processo de fibrose hepática através do tratamento por uma semana de infusão contínua dos animais submetidos à ligadura com o antagonista do receptor Mas da Ang-(1-7), o composto A-779. O A-779 foi inicialmente caracterizado como antagonista seletivo e específico da Ang-(1-7) através de estudo realizado no laboratório de Hipertensão do ICB da UFMG (SANTOS et al, 1994) e, desde então, vem sendo utilizado em diferentes modelos experimentais (SANTOS et al, 1996; FONTES et al, 1997; SIMÕES e

SILVA et al, 1998; SANTOS et al, 2000b; FERREIRA et al 2001). Mais recentemente, foi mostrado que os efeitos de antagonismo à Ang-(1-7) pelo A-779 ocorrem através da ligação ao recém caracterizado receptor desta angiotensina, que é acoplado à proteína G e denominado de receptor Mas (SANTOS et al, 2003; PINHEIRO et al, 2004; KOSTENIS et al, 2005; FERREIRA et al, 2006). O receptor Mas foi recentemente caracterizado como um dos receptores para a Ang-(1-7) que medeia as principais ações cardiovasculares e alguns efeitos renais dessa angiotensina (SANTOS et al, 2003; PINHEIRO et al, 2004; FERREIRA & SANTOS, 2005; SANTOS et al, 2005; SANTOS et al, 2006; SIMÕES e SILVA et al, 2006). Neste estudo, foi também avaliado o papel do antagonismo ao receptor Mas da Ang-(1-7) sobre a resposta fibrogênica hepática, através da medida da concentração de hidroxiprolina no tecido hepático, que reflete o conteúdo tecidual de colágeno (REDDY & ENWEMEKA, 1996) e pela determinação dos níveis hepáticos do fator de crescimento e transformação do tipo beta (TGF- β), que é considerado o mediador final do processo de fibrose hepática (SHERLOCK & DOOLEY, 1997; KANZLER et al, 1999; BISSEL et al, 2001; ROJKIND & GREENWEL, 2001; FRIEDMAN, 2003; YANG et al, 2003; BATALLER & BRENNER, 2005). Em resumo, esta tese de doutorado teve como principal objetivo avaliar o papel fisiopatológico da Ang-(1-7) na fibrose hepática experimental, abrindo perspectivas para o melhor entendimento de sua fisiopatologia e, quem sabe, para novas abordagens terapêuticas.

Finalmente, é importante explicar que esta tese de doutorado foi elaborada conforme o modelo aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, que permite sua confecção no formato de artigos científicos a serem submetidos a revistas médicas. Sendo assim, a estruturação do trabalho foi elaborada da seguinte maneira:

1. Introdução (que corresponde à presente seção)

2. Breve revisão sobre o tema apresentada sob a forma do artigo:

Mecanismos fisiopatológicos da fibrose hepática: Papel do Sistema Renina Angiotensina (artigo que foi submetido ao periódico nacional “Arquivos de Gastroenterologia” em julho de 2006)

3. Seção de Objetivos

4. Seção de Metodologia

5. Seção de Resultados e de Discussão apresentada sob a forma de dois artigos:

Renin Angiotensin System in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7) (artigo já submetido ao periódico internacional “The Journal of Hepatology” em junho de 2006)

Changes in the circulating Renin Angiotensin System during the development of Hepatorenal Syndrome in bile duct ligated rats (artigo já submetido ao periódico internacional “American Journal of Physiology” em junho de 2006)

6. Seção de Comentários Finais

Obs: As referências bibliográficas estão dispostas após cada artigo ou após cada seção. As referências dos artigos seguem as normas de cada periódico específico para o qual o trabalho foi submetido. As referências listadas ao término das seções estão dispostas em ordem alfabética e seguem as normas de Vancouver.

Referências Bibliográficas

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218.
2. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055.
3. Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156.
4. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001; 34 (5): 859-867.
5. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the Renin-Angiotensin System: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Rev* 2003; 24(3): 261-271.
6. Cesari M, Rossi GP, Pessina AC. Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: Implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2002; 20: 793-799.
7. Ferrario CM, Averril DB, Brosnihan B, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 2002; 62: 1349-1357.
8. Ferrario CM, Chappell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2720-2727.
9. Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension* 2001; 38[part 2]: 665-668.

10. Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 499-507.
11. Fontes MAP, Martins-Pinge MC, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, Santos RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensins antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res* 1997; 750: 305-310.
12. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant A. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996; 28: 104-108.
13. Friedman SL, Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. *Hepatitis annual update* 2003; 13-39.
14. Girgrah N, Liu P, Collier J, Blendis L, Wong F. Haemodynamic, renal sodium handling and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000; 46: 114-120.
15. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn NJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-155.
16. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P. TGF-beta 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068.
17. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2001; 52: 11-34.
18. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; 111 (14): 1806-1813.

19. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002; 40: 774-779.
20. Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterol* 2000; 47: 767-770.
21. Machado RDP, Santos RAS, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 1999; 66: 67-76.
22. Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, de Carvalho MH, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(5): 685-691.
23. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676.
24. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385.
25. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, *et al.* Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. *Gut* 2005; 54 (12): 1790-1796.
26. Pereira RM, Santos RAS, Leite VHR, Fagundes-Moura CR, Collares GB, Simões e Silva AC. Evidence for a physiological role of circulating Renin Angiotensin System in experimental hepatic fibrosis. *FASEB J* 2003; 17 (4): A481-A419 “abstract”.
27. Pereira RM. Perfil do Sistema Renina Angiotensina circulante em modelo experimental de fibrose hepática. Thesis, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

28. Pereira RM, Santos RAS, Costa LP, Simões e Silva AC. The circulating Renin Angiotensin System profile in Hepatorenal Syndrome in a rat model of liver fibrosis. *Annals of XLI Congress of European Renal Association 2004*; 17: 234 “abstract MP006”.
29. Pinheiro SVB, Simões e Silva AC, Sampaio WO, Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RAS. The nonpeptide AVE0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004; 44: 490-496.
30. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996; 29: 225-229.
31. Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver biology and pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 721-738.
32. Roquete MLV, Pereira RM, Simões e Silva AC. Atresia biliar. In: Pereira RM, Simões e Silva AC, Pinheiro PFM, eds. *Cirurgia Pediátrica: Condutas clínicas e cirúrgicas*. 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi & Guanabara-Koogan, 2005: 425-430.
33. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000b; 91:45-62.
34. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues ARV, Gropen Jr C, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): Evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35 (4): 293-298.
35. Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of

- in vitro and in vivo heart function in Angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension* 2006; 47 (5): 996-1002.
36. Santos RAS, Fagundes-Moura CR and Simões e Silva AC. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Rev Bras Hipertens* 2000a; 3: 227-236.
37. Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14 (8): 1019-1031.
38. Santos RAS, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M, Simões e Silva AC. Interactions between Angiotensin-(1-7), Kinins and Angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 2001; 38: 660-664.
39. Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Cesar KR, Passaglio KT, Baracho NCV. Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996; 27: 875-884.
40. Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 2003b; 100 (14): 8258-8263.
41. Sherlock S, Dooley J. Hepatic Cirrhosis. In: Sherlock S, Dooley J, eds. Diseases of the liver and biliary system. 10th ed. London: Blackwell Science Ltd. 1997: 371-384.
42. Silva MO, Pereira RM, Araújo AG, Madureira F, Lopes MG, Simões e Silva AC. Papel do mediadores endógenos na fisiopatologia de cirrose hepática. *Rev Med de Minas Gerais* 2004; 14 (3): 189-195.

43. Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, Khosla MC, Santos RAS. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and Hypertensive rats. *Regul Pept* 1998; 74:177-184.
44. Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003; 42: 574-579.
45. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999; 34: 950-957.
46. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1560-1566.
47. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP-ERK kinase pathway. *Hypertension* 2000; 36: 330-336.
48. Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regul Pept* 1999; 82: 1-17.
49. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159.
50. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750.

Artigo de revisão:

**Papel do Sistema Renina Angiotensina na fibrose hepática:
Mecanismos fisiopatológicos**

Regina Maria Pereira¹, Robson Augusto Souza dos Santos², Filipi Leles da Costa Dias³,
Lincoln Paiva Costa³, Alysson Souza Rezende³, Ana Cristina Simões e Silva⁴

¹Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina – UFMG, Professora do Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Belo Horizonte - UNIBH.

²Doutor em Fisiologia, Professor Titular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

³Graduandos da Faculdade de Medicina da UFMG, Bolsistas de Iniciação Científica do CNPq

⁴Doutora em Pediatria, Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina – UFMG.

Correspondência para Ana Cristina Simões e Silva

Endereço: Rua Timbiras 1364, ap 1704 bloco A

Bairro Funcionários, 30140-060, Belo Horizonte, MG, Brazil.

FAX: + 55-31-32489770

TEL: + 55-31-32249937

E-mail: acsilva@hotmail.com ou ana@medicina.ufmg.br

Resumo

A fibrose hepática é considerada resposta comum a inúmeras agressões hepáticas crônicas. Apesar de muitos estudos em relação ao desenvolvimento da fibrose hepática, o entendimento de sua etiopatogênese continua obscuro. Dentre os diversos mediadores que atuam neste processo, os componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) têm, cada vez mais, assumido um papel relevante. Nesse sentido, a Angiotensina II age como um mediador pró-fibrótico e a Angiotensina-(1-7), o recém-identificado componente do SRA, parece exercer um papel contrarregulador também no tecido hepático. Este artigo de revisão pretende discutir algumas evidências experimentais relativas à participação dos mediadores do SRA na fisiopatologia da fibrose hepática.

Palavras-chave: fibrose hepática, Sistema Renina-Angiotensina, Angiotensina, Angiotensina-(1-7).

Abstract

The hepatic fibrosis is considered common response to many chronic hepatic injuries. In a spite of many studies regarding the development of fibrosis, the understanding of the etiopathogenesis remains obscure. Among the diversity of mediators that take part in this process, the components the Renin Angiotensin System (RAS) have progressively assumed an important role. In this regard, Angiotensin II acts as a profibrotic mediator and Angiotensin-(1-7), the newly recognized RAS component, appears to exert a counterregulatory role also in liver tissue. This review aims to discuss some experimental evidences regarding the participation of RAS mediators in the physiopathology of hepatic fibrosis.

Key-words: hepatic fibrosis, Renin Angiotensin System, Angiotensin II, Angiotensin-(1-7).

Introdução

A fibrose hepática é a resposta comum às agressões hepáticas crônicas, durante a qual a arquitetura normal do fígado é distorcida por cicatriz tecidual (4, 30, 54, 65). Trata-se de um processo pouco conhecido do ponto de vista etiopatogenético e fisiopatológico. Além disso, a abordagem terapêutica dos pacientes portadores de hepatopatias ainda é bastante limitada, determinando prognóstico reservado. Atualmente não há nenhuma opção terapêutica bem estabelecida capaz de retardar ou reverter a fibrose hepática. Dessa forma, é de grande relevância o entendimento de mecanismos envolvidos no desenvolvimento de fibrose hepática. Este artigo de revisão aborda a fisiopatologia da fibrose hepática e o papel do Sistema Renina Angiotensina neste processo, à luz dos recentes avanços científicos.

Fisiopatologia da fibrose hepática

A fibrose hepática é um processo dinâmico, resultando em excesso de deposição dos componentes da matriz extracelular. Tal processo é multifatorial, envolvendo vários tipos de células, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (4, 30, 54, 65). Isto resulta do desequilíbrio de mecanismos homeostáticos que mantêm o ecossistema hepático. A cascata fibrogênica pode ser resumida nas seguintes etapas:

- a. Ativação de células estreladas e de células de Kupffer;
- b. Migração e proliferação de células estreladas;
- c. Síntese e deposição de componentes da matrix extracelular;
- d. Remodelamento da cicatriz tecidual;
- e. Contração da lesão;
- f. Apoptose de células estreladas.

Embora todos os tipos celulares do fígado exerçam um papel específico na produção de fatores que ativam a cascata fibrogênica em resposta a uma lesão, as células estreladas

hepáticas são as principais responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular em fígados normais e doentes, com deposição excessiva dos componentes do tecido conectivo, incluindo o colágeno tipo I. A matriz extracelular funciona como um sítio de armazenamento de citocinas e fatores de crescimento, cuja liberação pode ser induzida pela lesão tecidual. Estes eventos são responsáveis por desencadear o sinal inicial para o reparo tecidual, antes mesmo da ativação de células inflamatórias. Tal fenômeno pode levar à cirrose, que representa o estágio final da doença hepática. Apesar de múltiplos agentes biológicos e químicos induzirem fibrose através de mecanismos diferentes, todas as respostas individuais convergem para um caminho comum que regula a expressão dos componentes da matriz extracelular nas células estreladas. As células estreladas produzem colágeno no sítio da lesão, remodelando e contraindo a cicatriz. Sua sobrevivência é sustentada pelas células de Kupffer e inflamatórias até completar sua função fibrogênica, quando, então, entra em processo de apoptose. Esta hipótese tem importantes implicações, pois, nesta fase, a fibrose hepática pode ser reversível, a partir de intervenções terapêuticas que removam o tecido cicatricial sem induzirem resposta regenerativa e/ou atividade inflamatória. De acordo com essa hipótese, a reversibilidade da fibrose baseia-se no fato de que as células estreladas produzem metaloproteinases capazes de degradarem o colágeno intersticial e da membrana basal. Dessa forma, quando o estímulo fibrogênico ainda não induziu uma deposição excessiva de componentes da matriz extracelular acompanhada de distorção da arquitetura hepática, o processo pode ser completamente reversível. Neste estágio, a descontinuidade do estímulo fibrogênico resulta em morte das células estreladas com liberação de metaloproteinases que degradam o colágeno intersticial e da membrana basal. No entanto, quando o processo fibrogênico já se associa à formação de septos de tecido conectivo, *shunts* vasculares e distorção da arquitetura hepática, a fibrose torna-se irreversível (4,30,54,65).

As células estreladas (células de armazenamento de lípidos, lipócitos ou células de Ito), que são encontradas no espaço de Disse entre as células endoteliais e os hepatócitos. Essas células compreendem aproximadamente um terço da população de células não parenquimatosas, ou 15% do número total de células hepáticas. A principal função dessas células é metabolizar a vitamina A, que é estocada no interior dessas células como corpúsculos citoplasmáticos de gordura, na forma primária de ésteres de retinol. Tais células também contêm uma pequena quantidade de triglicérides, fosfolípidos, colesterol e ácidos graxos livres. Além disso, produzem citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios. Embora a ativação das células estreladas não seja um processo bem definido, caracteriza-se pela depleção no estoque de vitamina A e diminuição de cadeias de retinol. Há também, importante mudança morfológica e funcional nas células estreladas ativadas caracterizada pelo aumento da expressão de proteínas mio gênicas e neurogênicas e sua transformação em fibroblastos altamente contráteis. Com a lesão do hepatócito, as células estreladas perdem suas gotículas lipídicas, proliferam, migram para zona 3 do ácino, modificam-se adquirindo um fenótipo tipo miofibroblasto e produzem colágeno dos tipos I, III e IV e laminina. É aceito que a expressão da actina muscular α reflete o estado ativado das células estreladas. O fenômeno de ativação das células estreladas ainda não foi totalmente estabelecido. E ainda não se sabe se há correlação da ativação no fígado lesado “in vivo” e o processo “in vitro”. As células estreladas migram para sítios lesados e proliferam em resposta a múltiplos fatores de crescimento. Embora as células estreladas sejam as principais produtoras de matriz extracelular no fígado, outros tipos de células também contribuem significativamente para síntese de uma ou mais dessas macromoléculas. As células estreladas por estarem firmemente aderidas às células endoteliais hepáticas exercem um papel chave na regulação da pressão portal. Além disso, devido ao fato de expressarem múltiplas actinas e miosinas musculares e não musculares, quando

transformadas em miofibroblastos, adquirem a capacidade de contrair o tecido cicatricial e os septos fibrosos nos quais se encontram (4, 30, 54, 65).

As células de Kupffer são macrófagos, altamente móveis ligados ao endotélio. Essas células fagocitam células velhas, partículas estranhas, células tumorais, bactérias, fungos, vírus e parasitas. Realizam a captação e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e removem proteínas desnaturadas e fibrina. As células de Kupffer possuem receptores de membrana para imunoglobulinas e complemento, que são importantes para apresentação de antígenos. Fisiologicamente, produzem fatores que previnem a proliferação e/ou a síntese de colágeno pelas células estreladas. Por outro lado, em fígados lesados, essas células ativadas possuem uma alça autócrina que sintetiza citocinas, sustentando-as em altos níveis e, uma alça parácrina, que induz a expressão do fator de transformação e crescimento do tipo β (TGF β), o qual promove a proliferação de células estreladas e hepatócitos e/ou quimiotaxia para células inflamatórias e estreladas. Além disso, em fígados lesados, estas células possuem maior ação fagocitária e sua capacidade de prevenir que as endotoxinas atinjam altos níveis plasmático está prejudicada. Os níveis de endotoxinas plasmáticas estão aumentados, bem como os níveis de citocinas induzidas, tais como, fator de necrose tumoral tipo α (TNF α), interleucina-6, interleucina-1 e oncostatina M. Estas citocinas aumentam durante a resposta de fase aguda e exercem importante efeito regulatório na expressão do gene do colágeno pelas células estreladas. Todos os dados mencionados suportam a hipótese de que as células de Kupffer exercem um papel chave na ativação das células estreladas e/ou no aumento de sua capacidade de produzir componentes da matriz extracelular na doença hepática. Citocinas e quimiocinas, tais como, interleucina-8, fator estimulador de colônias, proteína quimiotática para monócitos e leucotrienos, possuem um papel chave em recrutar neutrófilos e monócitos para dentro do sítio de lesão. Essas células inflamatórias, juntamente

com as células de Kupffer ativadas, produzem citocinas e fatores de crescimento necessários para sustentar a resposta fibrogênica (4, 30, 54, 65).

A superfamília dos TGF β compreende um largo número de citocinas que incluem, entre outras, os diversos tipos de TGF β . Estas citocinas possuem numerosas atividades biológicas e exercem importante função durante o desenvolvimento, diferenciação e remodelação tecidual. O TGF β_1 é um forte modulador da proliferação celular e exerce essa função aumentando a produção de proteínas da matriz extracelular e inibidores de proteases, e diminuindo a expressão de várias metaloproteinases. No fígado normal, o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do TGF β_1 e β_2 é predominantemente expresso pelas células de Kupffer, enquanto o TGF β_3 é detectado nas células estreladas. Durante a fibrogênese, a expressão dos TGF β_2 e β_3 está diminuída, enquanto que a expressão do TGF β_1 está significativamente aumentada nas células estreladas e endoteliais. O TGF β é altamente expresso durante a regeneração hepática e fibrogênese. Esta citocina é um potente inibidor da proliferação dos hepatócitos, podendo, por outro lado, regular o crescimento dos hepatócitos durante a regeneração. O TGF β induz acúmulo de água oxigenada em vários tipos celulares, e este tipo de reação oxigenada está envolvido na ativação de células estreladas e no aumento da expressão do RNAm do colágeno tipo I (4, 30, 54, 65).

Dependendo do tamanho da lesão, a resposta do hospedeiro poderá ser local e/ou sistêmica. Quando os eventos são localizados no fígado, restringem-se à ativação de células estreladas e Kupffer, ou resultam em recrutamento de células inflamatórias, que, juntas com as células de Kupffer, produzem citocinas e fatores de crescimento necessários para a cicatrização. Quando a extensão da lesão é maior, e os eventos locais não conseguem controlá-los, há uma resposta sistêmica, que é comum a todo processo inflamatório, independente do agente. Esta reação sistêmica corresponde à resposta de fase aguda. A

resposta de fase aguda é um processo inespecífico caracterizado pelo aumento da produção de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral α , interleucina-6, interleucina-1, oncostatina M e alterações na expressão de um grupo de proteínas hepatócito-específicas, determinadas proteínas de fase aguda. Durante a lesão tecidual, a interleucina-6 é o maior sinal de alarme sistêmico, produzindo mudanças no estado bioquímico, fisiológico e imunológico do hospedeiro. Embora estas alterações objetivem limitar a injúria tecidual, a alta expressão da interleucina-6 pode contribuir para a fibrose hepática. No fígado, a interleucina-6 é uma citocina profilática que aumenta a deposição de matriz extracelular através do aumento do colágeno do tipo I e da transcrição genética da fibronectina, estímulo a outras citocinas fibrogênicas (fibrosinas e TGF β) e aumento da produção de inibidores de metaloproteinases.

O fígado contém uma pequena quantidade de tecido conjuntivo, no qual o colágeno é o componente mais abundante. O colágeno está localizado principalmente nos espaços vasculares, tais como trato portal e áreas perivenulares, e, em geral, somente pequenas quantidades dessas proteínas estão presentes dentro do parênquima. O colágeno está aumentado de 5 a 10 vezes no fígado cirrótico.

Há um grande número de fatores envolvidos no remodelamento da matriz extracelular, incluindo metaloproteinases da matriz e da membrana e inibidores teciduais de metaloproteinases. As metaloproteinases 1 e 13, também conhecidas como colagenases 1 e 3, respectivamente, são as principais proteinases neutras secretadas capazes de iniciar a degradação do colágeno dos tipos I, III e V (73). A contribuição individual das metaloproteinases na degradação da matriz extracelular no fígado normal e durante a fibrogênese hepática continua pouco clara. As células estreladas humanas expressam o gene para o RNAm da metaloproteinases 1, porém seus níveis não se encontram aumentados em pacientes com fibrose. Em relação à metaloproteinase 13, tem-se observado aumento de sua expressão em fases precoces do processo fibrótico, precedendo o aumento da produção do

colágeno tipo I (73). Dentre as outras metaloproteinases, as do tipo 2 e 3 apresentam sua expressão aumentada nas células estreladas durante as fases intermediária e precoce, respectivamente, da fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (54, 69, 73). A metaloproteinase 9, também conhecida como gelatinase B, é capaz de degradar colágeno tipo IV, gelatina e laminina, facilitando a migração celular através das membranas basais (54, 73). Existem também inibidores teciduais das metaloproteinases que regulam sua atividade e exercem um papel em diferentes modelos de fibrose hepática (34). Em síntese, o processo de remodelamento do tecido hepático é altamente complexo, sendo resultante de um equilíbrio entre degradação e síntese de colágeno.

Trabalhos pioneiros demonstraram a interferência no processo de síntese do colágeno, usando o análogo da prolina, ácido L-azetidina-2-carboxílico. Tal composto mostrou-se capaz de prevenir a deposição de colágeno, melhorando a fibrose e restaurando a função hepática em modelos experimentais (55). Já foi mostrado que a droga antiinflamatória colchicina previne a cirrose em ratos, melhora a cirrose em humanos e, em alguns casos, reverte a fibrose (38).

O entedimento das vias de ativação das células estreladas e o advento da biologia molecular têm fornecido novas estratégias para a terapia hepática antifibrótica (4, 30, 54, 65). Muitas dessas estratégias terapêuticas são baseadas na inibição da deposição do colágeno e/ ou na inativação das células estreladas, obtendo sucesso em estudos experimentais nos quais o tratamento é administrado simultaneamente e/ ou durante o curso de indução da fibrose. Tal abordagem pode incluir:

- a. Cura da doença primária para prevenir a lesão;
- b. Redução da inflamação ou da resposta do hospedeiro para evitar ativação da célula estrelada (interferon α , ácido ursodesoxicólico, corticosteróides e antagonistas do fator de necrose tumoral α);

- c. Inibição direta da ativação da célula estrelada (antioxidantes – vitamina E e interferon γ , antagonista do receptor de endotelina);
- d. Neutralização das respostas proliferativa, fibrogênica, contrátil e/ou pró-inflamatória das células estreladas [inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), antagonista do receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT₁), inibidores de proteases, fator de crescimento do hepatócito, inibidores da tirosinaquinase, antagonista do receptor de endotelina];
- e. Estímulo à apoptose das células estreladas (gliotoxina, ligantes do Fas);
- f. Aumento da degradação da matriz cicatricial, tanto pela estimulação de células produtoras de proteases, quanto pela administração dessas proteases (antagonista do TGF β , antagonistas dos inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz).

Entretanto, a fibrose hepática em humanos é uma doença silenciosa. Muitos pacientes são diagnosticados em fase avançada onde já existem septos fibrosos e distorção da arquitetura hepática. Dessa forma, torna-se essencial o desenvolvimento de novas terapêuticas, objetivando a remoção de septos fibrosos e a estimulação da regeneração do tecido hepático.

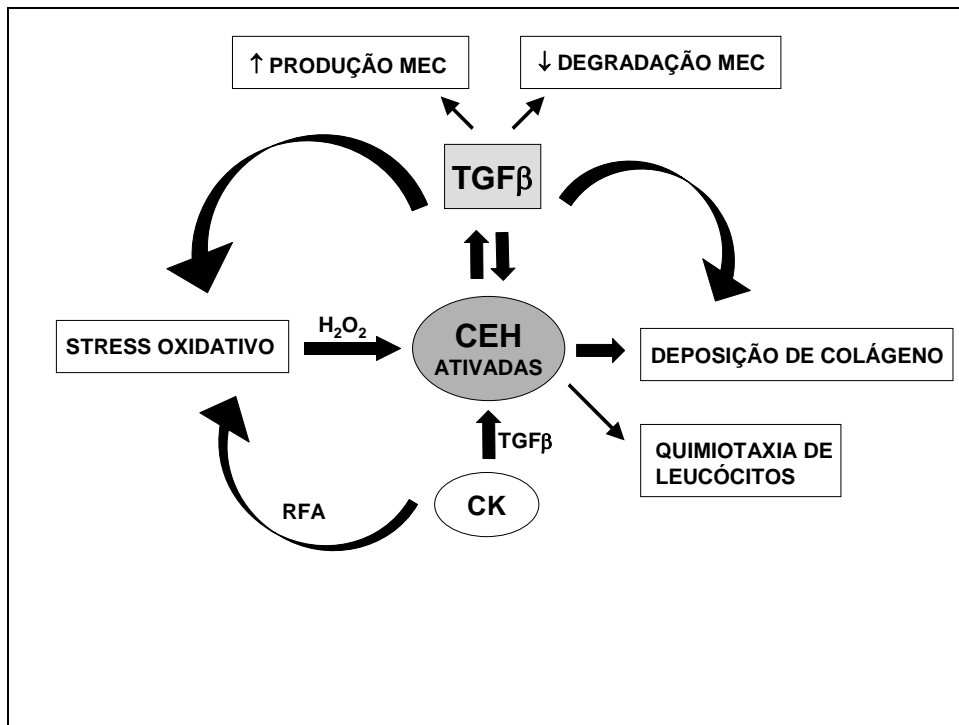


Figura 1 Visão esquemática das ações das células estreladas.

Legenda: CEH – células estreladas hepáticas; CK – célula de Kupffer; RFA – resposta de fase aguda; MEC – matriz extracelular; TGFβ - fator de transformação e crescimento do tipo beta.

Aspectos atuais do Sistema Renina Angiotensina

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é classicamente concebido como uma cascata hormonal responsável pelo controle das funções cardiovasculares, renais e adrenais que regulam o equilíbrio hidroeletrolítico e a pressão arterial através das ações da Angiotensina (Ang) II (78). Recentes avanços em biologia celular e molecular, bem como abordagens fisiológicas e farmacológicas, têm gerado novos conceitos através da identificação de novos peptídeos, enzimas que originam os peptídeos, receptores, novas funções para os mediadores recém-descobertos e para aqueles já conhecidos. Adicionalmente, um SRA tecidual tem sido caracterizado nos diferentes órgãos e sistemas, verificando-se interações significativas entre

seus receptores, mediadores e vias metabólicas (18, 27, 58). Nesse sentido, alguns recentes avanços merecem ser mencionados:

- a caracterização de outros fragmentos biologicamente ativos do SRA, além da Ang II, tais como a Ang III, a Ang IV e a Ang-(1-7) (18, 27, 58).
- o descobrimento de uma enzima homóloga à enzima conversora de angiotensina (ECA) denominada de ECA2 (24, 71), principal responsável pela síntese de Ang-(1-7) a partir da Ang II (25, 53);
- a identificação do receptor acoplado à proteína G, denominado receptor Mas, como sendo um receptor funcional para a Ang-(1-7) (62).

Todas estas descobertas têm aumentado o entendimento do papel do SRA em estados fisiológicos e nas doenças (68).

Dentre os possíveis mediadores do SRA, a Ang-(1-7) se mostrou particularmente interessante devido à sua seletividade, atribuída à ausência do aminoácido fenilalanina (Phe) na posição C-terminal, que é crítica para a ligação da Ang II aos receptores AT₁ (39). Várias rotas enzimáticas podem estar envolvidas na formação de Ang-(1-7) tanto diretamente através da Ang I quanto da Ang II através da ação de peptidases teciduais, incluindo endopeptidase neutra, oligopeptidase, prolil-carboxipeptidase, prolil-endopeptidase, e, possivelmente por uma via envolvendo a enzima da família das enzimas conversoras denominada ECA2 (25, 60). A recente descoberta da ECA2 fornece uma importante via para produção de Ang-(1-7). A ECA2 é altamente eficiente para conversão de Ang II em Ang-(1-7). Acredita-se que esta enzima exerça um papel importante na formação de Ang-(1-7) tecidual, como indicado pelo concomitante aumento de expressão da ECA2 e conteúdo de Ang-(1-7) nos túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos (18).

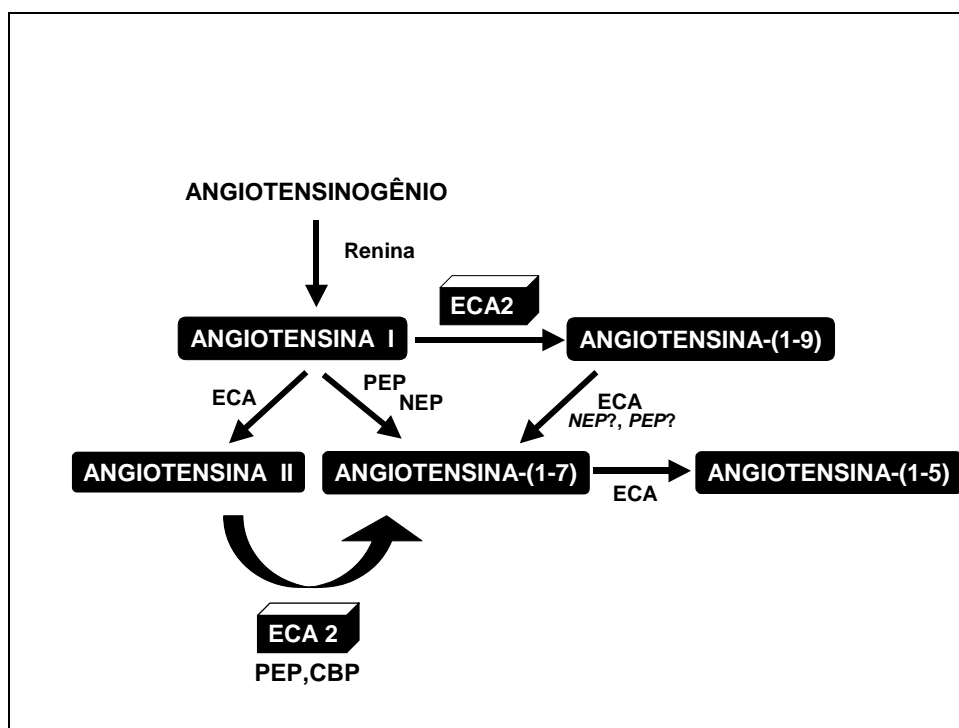


Figura 2 Vias metabólicas do Sistema Renina Angiotensina.

Legenda: ECA – enzima conversora de angiotensina, PEP – prolil-endopeptidase, NEP – endopeptidase neutra, CBP – carboxipeptidase.

Uma vez formada, a Ang-(1-7) é rapidamente hidrolizada, sobretudo pela ECA. Na presença de inibição da ECA e após administração crônica de bloqueadores do receptor AT₁, os níveis de Ang-(1-7) aumentam várias vezes, sugerindo que esse heptapeptídeo contribui para os efeitos dos bloqueadores do SRA (17, 28, 60). Diversos estudos têm mostrado a importância fisiológica da Ang-(1-7) (19, 28, 42, 60). Na maioria das vezes, a Ang-(1-7) exerce ações opostas à Ang II, conferindo ao sistema uma influência dual em vários tecidos (28, 60). Nos vasos, a Ang-(1-7) exibe efeitos vasodilatadores e anti-proliferativos, antagonizando a ação da Ang II (45, 70). Essa característica permite ao SRA influenciar o crescimento vascular, por exemplo, tanto estimulando (Ang II) como inibindo [Ang-(1-7)]. O crescimento vascular é regulado pelo equilíbrio entre fatores proliferativos e antiproliferativos. A Ang II é claramente mitogênica em cultura de músculo liso vascular,

bem como em artérias intactas, na ausência de alterações hemodinâmicas. Em contraste, a Ang-(1-7) inibe o crescimento do músculo liso vascular e reduz a formação neointimal na ausência de alterações da pressão sanguínea. Um equilíbrio entre as concentrações teciduais de Ang II e Ang-(1-7) é, então, crítico para a manutenção da estrutura vascular (45, 70). Dessa forma, em alguns tecidos, a ação predominante do SRA pode depender mais do perfil local de angiotensinas do que do nível absoluto do principal mediador, a Ang II. Em síntese, o SRA pode influenciar as funções orgânicas tanto através da distribuição relativa de receptores AT₁ e receptor angiotensinérgico do tipo 2 (AT₂), bem como da concentração de angiotensinas, especialmente Ang II e Ang-(1-7) (19, 28, 56).

Outra ação biológica relevante da Ang-(1-7) se refere ao controle do equilíbrio hidroeletrólítico (61, 66). De forma sintética, observou-se que a Ang-(1-7) encontra-se presente em regiões do SNC (núcleos supra-ópticos e paraventriculares) envolvidas no controle da osmolaridade e volemia, promove a liberação de vasopressina *in vitro*, apresenta atividade antidiurética potente em ratos submetidos à sobrecarga hídrica (3, 61), aumenta a reabsorção de água em túbulos proximais e ductos coletores intramedulares (46, 61) e produz natriurese em animais anestesiados submetidos à desnervação renal (20). A avaliação do papel fisiológico da Ang-(1-7) demorou ainda alguns anos após sua descoberta pela inexistência de um antagonista seletivo para essa angiotensina. Entretanto, foram caracterizados no Laboratório de Hipertensão do ICB - UFMG dois antagonistas seletivos para a Ang-(1-7), denominados A-779 (57) e D-Pro⁷-Ang-(1-7) (59). A administração de A-779 permitiu uma avaliação mais direta dos efeitos renais da Ang-(1-7), sugerindo que esse peptídeo tenha predominantemente ação antidiurética e antinatriurética (61, 66, 67). À semelhança do A-779, o composto D-Pro⁷-Ang-(1-7) também produziu inibição do efeito antidiurético da Ang-(1-7) em ratos submetidos à sobrecarga hídrica (59). Mais recentemente, a importância da Ang-(1-7) como mediador do SRA foi substanciada pela

descoberta de um de seus possíveis receptores, denominado receptor *Mas* (62). Trata-se de receptor acoplado a proteína G que mostrou alta afinidade e especificidade de ligação à Ang-(1-7) em tecido renal e a capacidade de mediar ações vasculares e renais deste heptapeptídeo (62). A caracterização de antagonistas da Ang-(1-7) e a descoberta de seu receptor abre novas perspectivas para a modulação do SRA.

Papel do Sistema Renina-Angiotensina na fibrose hepática

Apesar de muitos estudos em relação ao desenvolvimento da fibrose hepática, o entendimento de sua etiopatogenêse continua obscuro. Diversos mediadores tais como componentes do SRA (8,33,35,51,76), o sistema nervoso simpático (SNS) (33), a vasopressina (21), os peptídeos natriuréticos (14), o sistema caliceína-cinina (SCC) (14), a endotelina (22) e o óxido nítrico (48) podem participar desses mecanismos.

Inúmeras evidências indicam que o SRA está envolvido na fisiopatologia da fibrose hepática (4, 5, 6, 51, 52, 76). No que se refere à insuficiência hepática crônica, tem sido observado um aumento na atividade de renina plasmática e nos níveis de aldosterona circulante nos pacientes portadores de cirrose hepática, especialmente naqueles com síndrome hepatorenal (7, 8, 12, 64). As ações renais de Ang II e aldosterona determinam vasoconstrição renal, redistribuição do fluxo sangüíneo e aumento da reabsorção tubular de sódio e água (2, 32, 66, 75). Todos esses efeitos tendem para uma normalização da pressão de perfusão dos órgãos e da volemia efetiva do plasma. Os níveis circulantes elevados de renina e aldosterona são decorrentes de uma produção excessiva dessas substâncias e não de um catabolismo hepático diminuído (7, 8). Essa produção aumentada pode ser atribuída tanto a uma resposta fisiológica à vasodilatação sistêmica presente nos cirróticos (8, 10) quanto a uma ativação do SRA intrahepático (6, 50, 51, 52, 74, 76).

A resposta fibrótica é comum a inúmeras doenças crônicas em muitos órgãos, independente da etiologia, levando à produção, por exemplo, de cirrose no fígado, glomeruloesclerose no rim, fibrose intersticial no pulmão e hipertrofia cardíaca. Dessa forma, à semelhança do que ocorre na fibrose renal (49, 75) e cardíaca (72), vários estudos sugerem que a Ang II poderia mediar e exacerbar a fibrose hepática através da ativação das células estreladas e pelo estímulo ao TGF β ₁ (6, 9, 35, 54, 75). Bataller et al. (6) mostraram, em culturas de células estreladas humanas ativadas, a presença de receptores AT₁ para Ang II. A Ang II induz contração e proliferação de células hepáticas estreladas, a qual é considerada o principal efector da fibrose hepática acinar. Efeito similar foi observado em células de músculo liso vascular e células mesangiais. Os receptores AT₁ estão presentes na maioria das células mesenquimais e mediam a maioria dos efeitos biológicos da Ang II, incluindo o aumento da concentração de cálcio intracelular, contração e proliferação celular (50, 51). A intensidade da resposta contrátil à Ang II pelas células hepáticas estreladas foi comparável à observada após estimulação dessas células com endotelina 1, considerada o mais poderoso agente contrátil para tal linhagem celular. As mudanças na concentração de cálcio intracelular, contração e proliferação celular foram completamente bloqueadas pela pré-incubação das células estreladas com losartan, indicando que ambos efeitos são mediados através de receptores AT₁ (76). Adicionalmente, os efeitos contráteis da Ang II foram atenuados em presença de vasodilatadores potentes, tais como óxido nítrico e prostaglandinas (6). Recentemente, os efeitos proliferativos da Ang II têm sido focados. Estudos *in vitro* mostraram que a Ang II é mitogênica para vários tipos celulares (40, 72, 77).

Embora os mecanismos da resposta fibrogênica hepática não sejam totalmente entendidos, assim como em outros tecidos, evidências experimentais consideráveis indicam uma função chave para o TGF- β ₁. No coração e nos rins, inúmeros peptídeos vasoativos se mostram capazes de aumentar a expressão do TGF- β ₁, incluindo a Ang II. No fígado, a Ang

II aumenta o TGF- β_1 e a expressão genética do colágeno do tipo I via receptores AT₁ (51, 76). O TGF- β_1 induz a ativação de células hepáticas estreladas, que, por sua vez, aumentam a expressão do próprio TGF- β_1 (9). Polimorfismos genéticos funcionais dos genes do TGF- β_1 e do angiotensinogênio foram relatados por Jonsson et al. (35). Esses autores investigaram a herança do polimorfismo nos genes do TGF- β_1 e do angiotensinogênio e a influência dos genótipos nos estágios de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica. Uma significativa relação foi observada entre a herança de genótipos produtores de TGF- β_1 e de angiotensinogênio e o desenvolvimento de fibrose hepática. Os pacientes, que não exibiam os genótipos profibróticos, não evoluíram para fibrose ou esta foi mínima. A presença de uma significativa relação entre o genótipo do angiotensinogênio e a fibrose hepática sugere, mais uma vez, que a Ang II pode ser um mediador de fibrose hepática.

A inibição do SRA reduz a expressão do colágeno tipo IV e a expansão intersticial em diferentes tecidos. A importância do SRA na fibrose renal e cardíaca foi mostrada usando bloqueadores AT₁ e inibidores da ECA, que melhoram a morbi-mortalidade em nefropatias e na insuficiência cardíaca (40, 72, 77). A fibrose tubulointersticial do rim induzida por ciclosporina foi atenuada pela inibição do SRA (15). Similarmente, o bloqueio farmacológico do SRA também reduziu a expressão do colágeno tipo IV e a expansão intersticial em ratos com obstrução renal (36). A importância do SRA na fibrose hepática também tem sido evidenciada por estudos em animais e humanos nos quais o tratamento com inibidores da ECA e bloqueadores AT₁ apresentaram efeitos benéficos na doença hepática (43, 51). Alguns estudos mostraram redução dos níveis de RNAm do TGF- β_1 e procolágeno α_1 nos fígados de ratos tratados com captopril após ligadura do ducto biliar comum (LDB), suportando a hipótese de uma ação da Ang II nas células estreladas hepáticas. Em adição aos efeitos antifibróticos, o captopril melhorou as alterações hemodinâmicas, a função renal e a

colestase (31, 35, 43, 50, 76). Paizis et al. (51) mostraram que o bloqueio do SRA pelo antagonista do receptor AT_1 , irbersartan, em modelo de LDB reduz a expressão do TGF- β_1 e da proteína da matriz do colágeno tipo I no fígado. Esses achados são consistentes com o conceito de que o eixo Ang II - TGF- β_1 pode funcionar no fígado como uma via para fibrose orgânica, como previamente demonstrado em outros modelos de lesão hepática, tais como uso de tetracloreto de carbono (13), na esquistossomose mansônica (23) e, mais recentemente, em camundongos transgênicos com alta expressão do TGF- β_1 (37). De fato, a produção local de Ang II, além da ativação do SRA circulante, pode ser parte significativa da resposta geral dos tecidos à lesão.

Entretanto, existe apenas um estudo recente na literatura que mencionou a possibilidade de formação de Ang-(1-7) na doença hepática (52). No referido estudo foi detectado um aumento na expressão da ECA2, que é uma enzima homóloga da ECA responsável pela formação de Ang-(1-7) a partir da Ang II (24,71), em fígado de ratos submetidos à LDB e de pacientes cirróticos (52). Como já mencionado, a Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang I e da Ang II através da ação de peptidases teciduais, incluindo endopeptidase neutra, oligopeptidase, prolil-carboxipeptidase, prolil-endopeptidase, e, possivelmente por uma via envolvendo a enzima ECA2, membro da família das enzimas conversoras (25,53,56,60). Baseados nesse achado de aumento da ECA2, Paizis et al. (52) hipotetizaram que ocorra uma maior formação de Ang-(1-7) tanto em ratos submetidos à LDB quanto em pacientes cirróticos e este pode ser um dos fatores responsáveis pela vasodilatação sistêmica presente nas hepatopatias (1,10,11). No entanto, outra possibilidade é que o aumento da síntese de Ang-(1-7) poderia representar uma resposta contrarregulatória geral aos múltiplos efeitos deletérios do aumento da produção local de Ang II.

Conclusão

Concluindo, a melhora do entendimento dos mecanismos subjacentes à fibrose hepática torna a terapia antifibrótica efetiva uma realidade iminente. Entretanto, o tratamento ainda continua a ser um desafio e, até o momento, nenhum agente anti-fibrótico foi aprovado para uso em humanos. É importante mencionar ainda que a Ang-(1-7) é rapidamente hidrolizada, sobretudo pela ECA e em presença de inibição da ECA e após administração crônica de bloqueadores AT₁, seus níveis aumentam várias vezes (16, 17, 60), sugerindo que esse heptapeptídeo possa contribuir para os efeitos dos bloqueadores do SRA. Evidências experimentais sugerem que a Ang-(1-7) está envolvida em alguns efeitos benéficos dos bloqueadores dos receptores AT₁ e dos inibidores da ECA e da vasopectidase (26, 27, 58). Dando suporte a esta hipótese, Maia et al. (47) mostraram que o A-779 atenuou a resposta hipotensora à bradicinina em animais tratados com inibidores da ECA, sugerindo que a Ang-(1-7) participe dos efeitos cardiovasculares desses fármacos. Adicionalmente, Kostenis et al. (41) recentemente demonstraram que o receptor Mas da Ang-(1-7) pode hetero-oligomerizar-se com o receptor AT₁ da Ang II e, através disso, inibir as ações da Ang II. Acredita-se, então, que o receptor Mas atue *in vivo* como um antagonista do receptor AT₁ (29, 41, 58, 68). Dessa forma, avança-se a hipótese de que o SRA atue através de duas vias que apresentam efeitos antagônicos: a primeira, responsável pelas principais ações do sistema é constituída pelo eixo ECA-Ang II-receptor AT₁ e a segunda, a via contrarreguladora, é formada pelo eixo ECA₂-Ang-(1-7)-receptor Mas. Neste sentido, pode-se postular que os mecanismos através dos quais os bloqueadores do SRA atenuam a fibrose hepática poderiam ser, não somente pelo antagonismo ao eixo ECA-Ang II-receptor AT₁, mas também através da ativação do eixo ECA₂-Ang-(1-7)-receptor Mas (68). Finalmente, acredita-se que a modulação do SRA, através do uso de inibidores da ECA, antagonistas dos receptores AT₁ e, quem sabe, agonistas e antagonistas do receptor Mas da Ang-(1-7) podem passar a ser importantes

ferramentas para o estudo e, talvez futuramente, para a abordagem terapêutica das hepatopatias.

Referências Bibliográficas:

1. Aliaga L, Zozoya JM, Omar M, Mediavilla JD, Prieto J. Interrelationships between systemic hemodynamics, urinary sodium excretion, and renin-angiotensin system in cirrhosis. *Acta Gastro-Enterol Belg* 1995; 58: 213-221.
2. Arendshorst WJ, Brännström K, Ruan X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J Am. Soc. Nephrol* 1999; 10: S149-S161.
3. Baracho NCV, Simões e Silva AC, Khosla MC, Santos RAS. Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:1221-1227.
4. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218.
5. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055.
6. Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156.
7. Bataller R, Sort P, Ginès P, Arroyo V. Hepatorenal syndrome: definition, pathophysiology, clinical features and management. *Kidney Int* 1998; 53: S47-S53.
8. Bernardi M, Trevisani F, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Hepatorenal disorders: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Semin liver dis* 1994; 14: 23-34.
9. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001; 34 (5): 859-867.
10. Blendis L and Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacol & Ther* 2001; 89: 221-231.
11. Bonzon A and Huang YT. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol & Ther* 2001; 89: 255-272.
12. Bosch J, Arroyo V, Betriu A. Hepatic Haemodynamics and the renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis. *Gastroenterology* 1980; 78: 92-99.

13. Brenner DA, Westwick J, Breindl M. Type I collagen gene regulation and the molecular pathogenesis of cirrhosis. *Am J Physiol* 1993; 264 (4): G589-595.
14. Brunkhorst R, Wrenger E, Malcharzik C, Brabant G, Koch KM. Renal effects of atrial natriuretic peptide in cirrhotic rats with and without captopril pretreatment. *Nephron* 1993; 64: 275-281.
15. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, Lindsley J, Bennett WM. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* 1995; 269: F491-F499.
16. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A and Valentin AJ. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* 1991; 18: 763-773.
17. Campbell DJ. The Renin Angiotensin and Kallikrein Kinin Systems. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 784-791.
18. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the Renin-Angiotensin System: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Rev* 2003; 24(3): 261-271.
19. Cesari M, Rossi GP, Pessina AC. Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: Implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2002; 20: 793-799.
20. Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1998; 31: 362-7.
21. Claria J, Jiménez W, Arroyo V, Castro A, Asbert M, Ros J et al. Doses of endothelin have natriuretic effects in conscious rats with cirrhosis and ascites. *Kidney Int* 1991; 40: 182-187.
22. Claria J, Jiménez W, Arroyo V, Villa G, López C, Asbert M et al. Effect of V₁ – Vasopressin receptor blockade on arterial pressure in conscious rats with cirrhosis and ascites. *Gastroenterology* 1991; 100: 494-501.
23. Czaja MJ, Weiner FR, Takahashi S, Giambrone MA, van der Meide PH, Schellekens H, Biempica L, Zern MA. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology* 1989; 10 (5): 795-800.
24. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-

- converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). *Circ Res* 2000; 87:1-9.
25. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for Angiotensin-Converting enzymes. *Curr Biol* 2002; 12: R745-R752.
 26. Ferrario CM, Averril DB, Brosnihan B, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 2002; 62: 1349-1357.
 27. Ferrario CM, Chappell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2720-2727.
 28. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am. Soc. Nephrol* 1998; 9: 1716-1722.
 29. Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 499-507.
 30. Friedman SL, Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. *Hepatitis annual update* 2003; 13-39.
 31. Girgrah N, Liu P, Collier J, Blendis L, Wong F. Haemodynamic, renal sodium handling and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000; 46: 114-120.
 32. Harris PJ & Navar LG. Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol* 1985; 248: F621-F630.
 33. Hayes PC, Cumming AD, Craig KJ, Watson M, Bouchier IAD. Portal and systemic hemodynamics and humoral factors in cirrhosis with and without ascites. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1433-1438.
 34. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 419-424.
 35. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn NJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-155.

36. Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed kidney of the rat. *Kidney Int* 1994; 45: 1637-1647.
37. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol.* 1999; 276(4): G1059-1068.
38. Kershenobich D, Vargas F, Garcia-Tsao G. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1988; 318: 1709-1713.
39. Khosla MC, Smeby RR, Bumpus FM. Structure-activity relationship in angiotensin II analogues. In: Page IH and Bumpus FM, ed. *Handbook of Experimental Pharmacology Angiotensin*. Berlin: Springer-Verlag. 1974:126-161.
40. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2001; 52: 11-34.
41. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 2005; 111 (14): 1806-13.
42. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002; 40: 774-779.
43. Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterol* 2000; 47: 767-770.
44. Li D, Friedman SL. Hepatic stellate cells: morphology, function, and regulation. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver biology and pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 455-468.
45. Machado RDP, Santos RAS, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 1999; 66: 67-76.
46. Magaldi AJ, Cesar KR, Araújo M, Simões e Silva AC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: Evidence for novel involvement of Vasopressin V₂ receptor. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 2003; 8: 111-118.

47. Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, de Carvalho MH, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(5): 685-691.
48. Martin PY, Ohara M, Ginès P et al. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 1998; 101:235-42.
49. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 635-638.
50. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676.
51. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385.
52. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, et al. Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. *Gut* 2005; 54 (12): 1790-1796.
53. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J* 2004; 383(Pt 1):45-51.
54. Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver biology and pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 721-738.
55. Rojkind M. Fibrogenesis in cirrhosis. Potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 1992; 53: 81-104.
56. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 2000; 91:45-62.
57. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorme SM, Rodrigues ARV, Gropen Jr C, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35 (4): 293-298.

58. Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14 (8): 1019-1031.
59. Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, Leite MF, Lemos VS, Silva DMR, Guerra MT, Khosla MC. Characterization of a new selective antagonist for Angiotensin-(1-7), D-Pro⁷-Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003; 41[part 2]: 737-743.
60. Santos RAS, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M, Simões e Silva AC. Interactions between Angiotensin-(1-7), Kinins and Angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 2001; 38: 660-664.
61. Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Cesar KR, Passaglio KT, Baracho NCV. Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996; 27: 875-884.
62. Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100 (14): 8258-8263.
63. Schuppan D, Strobel D, Hahn EG. Hepatic fibrosis – Therapeutic strategies. *Digestion* 1998; 59: 385-390.
64. Sellers L, Shore C, Wilkinson R, James FW, Robson V. Sodium status and the renin-angiotensin system in compensated liver disease. *Eur J Clin Invest* 1981; 11: 299-304.
65. Sherlock S, Dooley J. Hepatic Cirrhosis. In: Sherlock S, Dooley J, eds. Diseases of the liver and biliary system. 10th ed. London: Blackwell Science Ltd. 1997: 371-384.
66. Simões e Silva AC, Baracho NCV, Passaglio KT, Santos RAS. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1997; 30 (4): 503-513.
67. Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, Khosla MC, Santos RAS. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and Hypertensive rats. *Regul Pept* 1998; 74:177-184.

68. Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin Angiotensin System mediator. *Mini-Rev Med Chem* 2006; 6 (5): 603-609.
69. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995; 21: 787-795.
70. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999; 34: 950-957.
71. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of Angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275:33238-33243.
72. Unger T. The role of the Renin Angiotensin System in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89 (suppl): 3A-10A.
73. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-792.
74. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159.
75. Yang J, Day C, Liu Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and Angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2464-2477.
76. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750.
77. Yu L, Nobel NA, Border WA. Therapeutic strategies to halt renal fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 177-181.
78. Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. Drugs targeting the Renin Angiotensin Aldosterone System. *Nature* 2002; 1: 621-636.

3 - OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação da Ang-(1-7) na fibrose hepática através da determinação de seus níveis circulantes e do uso do antagonista específico de seu receptor Mas, o composto A-779, em modelo experimental de fibrose hepática, que mimetiza doenças obstrutivas das vias biliares, tais como a atresia biliar e o cisto de colédoco, que acometem pacientes pediátricos.

Objetivos específicos:

- (a) Determinar a atividade de renina plasmática e os níveis de angiotensinas [Ang I, Ang II e Ang-(1-7)] no plasma de ratos com uma, duas, quatro e seis semanas após ligadura do ducto biliar comum ou cirurgia fictícia;
- (b) Avaliar os parâmetros de função hepática em ratos com uma, duas, quatro e seis semanas após ligadura do ducto biliar comum ou cirurgia fictícia;
- (c) Avaliar as alterações histopatológicas e determinar o conteúdo de hidroxiprolina no parênquima hepático de ratos com uma, duas, quatro e seis semanas após a ligadura do ducto biliar comum ou cirurgia fictícia;
- (d) Avaliar o papel da Ang-(1-7) endógena através da infusão contínua de seu antagonista específico, o composto A-779, comparando o conteúdo total de TGF- β no fígado e o grau de fibrose hepática (análise histológica e quantificação tecidual de hidroxiprolina) em ratos com uma semana de ligadura de ducto biliar comum, recebendo veículo ou A-779;
- (e) Avaliar os parâmetros de função renal e desenvolvimento da síndrome hepatorenal em ratos com duas, quatro e seis semanas após ligadura do ducto biliar comum ou cirurgia

fictícia e correlacioná-los com o perfil circulante dos componentes do Sistema Renina Angiotensina, o grau de fibrose hepática (análise histológica e quantificação tecidual de hidroxiprolina) e o grau de fibrose renal (quantificação tecidual de hidroxiprolina).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Animais:

Foram estudados ratos Wistar machos, provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do ICB – UFMG. Estes animais pesaram de 220g a 300g e foram alimentados no pós-operatório com ração (Nuvilab CR1 - NUVITAL®) e água sob livre demanda, mantidos sob temperatura controlada e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

4.1.2 Modelo experimental:

A fibrose hepática foi induzida pela ligadura e secção do ducto biliar comum (KOUNTOURAS et al, 1984; POO et al, 1997; JONSSON et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001; PAIZIS et al, 2001; PAIZIS et al, 2002; BATALLER at al, 2005; PAIZIS et al, 2005). Para tal procedimento, os ratos foram anestesiados com Tri-bromoetanol 2.5% na dose de 1 ml /100 g de peso corporal, por via intra-peritoneal. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal de 1.5 cm na linha mediana, aberta cavidade abdominal, identificado o ducto biliar comum, sendo feitas ligaduras proximal e distal, com posterior secção do ducto biliar comum. Então, foram suturadas a parede abdominal, em plano único, e a pele, ambas com fio 4.0 de poliglactina 910.

Um grupo de ratos (*sham* ou controle cirúrgico) foi submetido à cirurgia fictícia, que consistiu em abertura da cavidade abdominal, identificação e manipulação do ducto biliar comum, sem ligadura deste, com posterior fechamento da cavidade abdominal, em plano único, e sutura da pele com fio 4.0 de poliglactina 910.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com as recomendações de protocolos de uso e cuidados com animais de laboratório [vide protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG no anexo 1].

Este modelo experimental foi escolhido por duas razões. A primeira diz respeito ao fato deste modelo experimental mimetizar as doenças obstrutivas das vias biliares, que acometem frequentemente os pacientes pediátricos, tais como a atresia de vias biliares e o cisto de colédoco. O segundo motivo se deve às vantagens apresentadas por este modelo comparado com outras metodologias de indução de cirrose, discutidas por Poo et al (1997):

1. baixa mortalidade, em torno de 20-25%;
2. cirrose abrangendo, seguramente, todo parênquima hepático;
3. pequeno intervalo de tempo para desenvolvimento de cirrose, aproximadamente quatro semanas.

Comparando com outros métodos de indução de fibrose hepática, o agente tóxico tetracloreto de carbono, por exemplo, apresenta as seguintes desvantagens (POO et al, 1997):

1. ajuste de dose individual para cada animal;
2. necessidade de administração contínua;
3. alta taxa de mortalidade, em torno de 50 a 70%;
4. longo intervalo de tempo para o desenvolvimento da cirrose, aproximadamente 10 a 13 semanas;
5. área restrita de parênquima hepático acometida por fibrose em alguns animais.

4.1.3 Grupos experimentais:

Os ratos foram divididos em dois grandes grupos:

- ✓ **PROTOCOLO 1:** animais não tratados, ou seja, aqueles submetidos à ligadura do ducto biliar comum (LDB) que não foram submetidos a nenhuma intervenção terapêutica;
- ✓ **PROTOCOLO 2:** animais tratados, ou seja, aqueles que, após a LDB, receberam antagonista do receptor Mas da Ang-(1-7) o análogo D-Ala⁷-Ang-(1-7) denominado de A-779 (SANTOS et al, 1994; SANTOS et al, 1996; SANTOS et al, 2003; SIMÕES e SILVA et al, 2006), ou o veículo.

Os animais do PROTOCOLO 1 foram subdivididos conforme o tempo após a ligadura do ducto biliar comum ou cirurgia fictícia em:

- **GRUPO 1 SEMANA:** ratos com uma semana de LDB;
- **GRUPO 2 SEMANAS:** ratos com duas semanas de LDB;
- **GRUPO 4 SEMANAS:** ratos com quatro semanas de LDB;
- **GRUPO 6 SEMANAS:** ratos com seis semanas de LDB;
- **GRUPO CONTROLE:** ratos sham submetidos à cirurgia fictícia. Este grupo foi constituído pela combinação de dados provenientes de animais após 2 (n=5) e 4 semanas (n=7) de cirurgia fictícia, perfazendo um total de 12 animais. Esta conduta foi optada tendo em vista que os valores obtidos para todos os parâmetros estudados em cada subgrupo eram bastante similares, sem qualquer diferença estatística. Além disso, de acordo com os princípios da ética em experimentação animal, buscamos evitar o sacrifício desnecessário de um maior número de animais de experimentação.
- Os ratos do **PROTOCOLO 2** foram tratados o antagonista do receptor Mas da Ang-(1-7), o análogo D-Ala⁷-Ang-(1-7) denominado de A-779 (tratamento)

(SANTOS et al, 1994; SANTOS et al, 1996; SANTOS et al, 2003; SIMÕES e SILVA et al, 2006) ou veículo (controle do tratamento) sob a forma de infusão contínua (SIMÕES e SILVA et al, 1998), durante uma semana

4.2 Métodos

4.2.1 Protocolo experimental:

✓ PROTOCOLO 1 – ratos não tratados

Este grupo teve por objetivo avaliar os componentes do SRA circulante, as provas de função hepática e renal, a histologia hepática e o conteúdo de colágeno nos tecidos hepático e renal de acordo com o tempo de progressão da fibrose hepática. Os animais incluídos neste grupo foram submetidos à LDB ou cirurgia fictícia.

Os animais incluídos no PROTOCOLO 1 foram submetidos às intervenções cirúrgicas (LDB ou cirurgia fictícia) e recuperação pós-operatória. Os ratos foram transferidos para gaiolas metabólicas quatro dias antes do término do período experimental de cada subgrupo de animais, ou seja, animais com uma, duas, quatro, seis semanas de ligadura do ducto biliar ou seus respectivos controles cirúrgicos. Nessas gaiolas metabólicas, foi possível a determinação de algumas medidas gerais, tais como: ingesta hídrica, ingesta alimentar e volume urinário (SIMÕES e SILVA et al, 1998). Os animais permaneceram nessas gaiolas por um período de adaptação de três dias (POO et al, 1997), sendo, posteriormente, submetidos à coleta de amostra de urina de 24 horas, medidas de ingesta hídrica e alimentar. Durante as 24 horas que antecederam o término do período experimental para cada grupo de ratos foram coletadas amostras de urina de 24 horas para determinação de creatinina, osmolalidade, sódio e potássio urinários. Após completar uma, duas, quatro ou seis semanas de LDB ou cirurgia fictícia, os animais foram pesados, anestesiados e

submetidos à coleta de sangue após terem sido sacrificados por decaptação. As amostras de sangue se destinaram à determinação de atividade de renina plasmática (ARP), da imunorreatividade para Ang I, Ang II e Ang-(1-7) no plasma, das provas de função hepática (albumina sérica, aminotransferases, bilirrubinas, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina) e renal (creatinina, osmolalidade, sódio e potássio séricos). Logo após as coletas de sangue, o fígado foi rapidamente retirado, pesado e congelado em gelo seco para posterior análise histológica e determinação do conteúdo tecidual de hidroxiprolina.

O mesmo procedimento foi realizado em todos os animais do GRUPO A, diferindo apenas em relação ao momento de colocação nas gaiolas metabólicas e das coletas de sangue, urina e estudo histopatológico (vide tabela abaixo). Os grupos controles foram submetidos ao mesmo protocolo experimental.

Tabela 4.1 Esquema geral do protocolo operacional dos grupos experimentais

Tempo de LDB	Período de recuperação	Gaiola metabólica	Período de adaptação	Coleta de material
1 semana de LDB e controle	D1-D3	D3	D3-D6	D7
2 semanas de LDB e controle	D1-D9	D10	D10-D13	D14
4 semanas de LDB e controle	D1-D23	D24	D24-D27	D28
6 semanas de LDB e controle	D1-D37	D38	D38-D41	D42

NOTA. LBD – ligadura do ducto biliar comum, D - dia

Em todos os animais do PROTOCOLO 1 (não tratados) foram realizados os seguintes exames:

Em urina de 24 horas:

- dosagem de sódio e potássio;
- dosagem de creatinina;
- determinação de osmolaridade;
- pesquisa de elementos anormais.

Em amostras de sangue:

- parâmetros de função renal: sódio, potássio, creatinina e osmolaridade;
- avaliação de componentes do SRA: determinação de atividade de renina plasmática (ARP), Ang I, Ang II e Ang-(1-7);
- marcadores de lesão hepatocitária e provas de função hepática: bilirrubinas totais e frações, albumina, transaminases, gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina.

Em fragmentos do tecido hepático:

- análise histopatológica convencional em HE, tricrômio de Masson;
- determinação da quantidade de hidroxiprolina por grams de tecido através da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA).

✓ **PROTOCOLO 2 – ratos tratados**

Este grupo teve por objetivo avaliar o papel da Ang-(1-7) endógena nas fases iniciais de desenvolvimento da fibrose hepática, através do tratamento com o antagonista seletivo de seu receptor Mas, o composto A-779 (SANTOS et al, 1994; SANTOS et al, 1996; SANTOS et al, 2003; SIMÕES e SILVA et al, 2006).

Os ratos foram submetidos à ligadura do ducto biliar comum conforme a técnica já descrita. No mesmo ato cirúrgico-anestésico, os ratos foram submetidos à implantação de

minibombas osmóticas (osmotic minipump, model 2001, Alzet) no tecido subcutâneo do dorso para liberação controlada de A-779 na dose de 1 µg/ hora ou veículo. A dose escolhida baseou-se nos resultados obtidos por SIMÕES e SILVA et al (1998), em estudo anterior. A velocidade de infusão das minibombas foi de 1.03 ± 0.02 µl/ hora, permitindo a liberação controlada do tratamento ou do veículo durante uma semana. Dessa forma, após a implantação das minibombas, os ratos permaneceram em tratamento por uma semana. Após este período, os animais foram pesados, anestesiados e sacrificados por decaptação. O fígado foi, então, rapidamente retirado e separado em dois fragmentos. O primeiro deles foi imediatamente congelado para posterior determinação do conteúdo tecidual de hidroxiprolina e os níveis de fator de transformação e crescimento do tipo beta (TGF-β) total no tecido hepático. O segundo destinou-se à análise histológica convencional, sendo fixado em formaldeído a 20%, Bouin e Carnoy;

4.2.2 Procedimentos Analíticos

Para essas análises foram coletados um volume mínimo de ~ 4 ml de sangue de cada rato. Após a coleta das amostras de sangue, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada e centrifugados a 2000 rpm, durante 20 minutos, numa temperatura de -4 °C. O soro obtido foi mantido em tubos dentro de um freezer a aproximadamente -20 °C, para posterior dosagens. Para estudos realizados em outro laboratório, as amostras foram mantidas em gelo para transporte. A urina coletada por 24 horas foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm e armazenada a -20 °C. Foram feitas duplicatas de todas as amostras de soro e urina, para verificar a reprodutibilidade das leituras obtidas com esse ensaio.

4.2.2.1 Dosagem de Sódio e Potássio

A leitura de sódio das amostras de urina e soro coletadas foram realizadas por fotometria de chama. Para leitura do sódio sérico e urinário, 100 µl das amostras foram diluídos em 9.9 ml de água deionizada e, a seguir, foi feita a leitura direta por fotometria de chama. Todas as amostras foram processadas em duplicata e rediluídas, no caso de ser detectada uma diferença considerável entre essas duplicatas. Os dados obtidos foram expressos como concentração (mEq/ l).

A quantidade excretada de sódio e potássio foi calculada através da fórmula abaixo, expresso em mEq:

$$\text{concentração urinária} \times \text{volume urinário}$$

A fração excretada de sódio e potássio foi calculada através da fórmula abaixo, expresso em porcentagem:

$$\frac{\text{quantidade excretada}}{\text{quantidade filtrada}} \times 100$$

Para o cálculo da quantidade filtrada utilizou-se:

$$\text{concentração sérica} \times \text{ritmo de filtração glomerular}$$

O ritmo de filtração glomerular foi estimado pelo *clearance* de creatinina (vide a seguir, item 4.2.2.2).

4.2.2.2 Clearance de Creatinina

As dosagens de creatinina sérica e urinária foram realizadas pelo método fotolorimétrico, baseado na reação da creatinina com a solução de picrato em meio alcalino. Para a realização dessas dosagens foi utilizado o Kit 35 E do LABTEST Sistemas para Diagnóstico.

Protocolo

(a) Reagentes

- Ácido pícrico - 44.4 mmol/ l.
- Tampão contendo 0.25 mmol/ l de hidróxido de sódio, 25 mmol/ l de fosfato de sódio, 24 mmol/ l de tetraborato de sódio e surfactantes não reativos.
- Padrão - Creatinina 4 mg/ dl.
- Acidificante - Ácido acético 11.2 mmol/ l.

(b) Curva padrão

Foi verificada a linearidade do ensaio, através da construção de curvas padrão, utilizando, inicialmente, cinco pontos experimentais que correspondem às concentrações de creatinina de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 8.0 mg/ dl. Após confirmada a linearidade do ensaio, a curva padrão foi obtida a partir da leitura de três diferentes concentrações de creatinina (1.0, 2.0 e 4.0 mg/ dl), sendo as duas primeiras obtidas pela diluição do padrão de creatinina contendo 4.0 mg/ dl. A curva padrão foi realizada em todos os ensaios, sendo determinado um fator de calibração (inclinação da reta obtida a partir dos três pontos experimentais), que permitiu a transformação das leituras das absorvâncias para concentrações em mg/ dl para cada ensaio.

(c) Ensaio

1- Preparar em tubos de ensaio conforme descrito abaixo:

	Branco	Padrão 1.0	Padrão 2.0	Padrão 4.0	Amostras
Tampão	2.0 ml	2.187 ml	2.125 ml	2.0 ml	2.0 ml
Amostras	-	-	-	-	0.25 ml
Água	0.25 ml	-	-	-	-
Padrão 4.0	-	63 µl	0.125 ml	0.25 ml	-
Ác. Pícrico	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

2- Misturar e colocar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

3- Determinar as absorbâncias em 510 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero do espectrofotômetro com o branco do ensaio. Essa primeira leitura de absorbância corresponde à absorbância total e é denominada A₁.

4- Após a leitura do branco, padrões e amostras, adicionar no branco e nas amostras 100 µl do acidificante, a fim de detectar a presença de cromógenos que podem também reagir com o ácido pícrico.

5- Misturar e deixar em temperatura ambiente por 5 minutos.

6- Fazer nova leitura das absorbâncias em 510 nm, acertando o zero do espectrofotômetro com o branco do ensaio. Essa segunda leitura corresponde à reação do ácido pícrico com os cromógenos em pH = 5, após adição do acidificante e é denominada A₂.

(d) Cálculos

1- Determinação da creatinina sérica

$S = (A_1 - A_2) \times F$, onde S é valor da creatinina sérica em mg/ dl, A_1 é a absorvância total, A_2 é a leitura da absorvância após a adição do acidificante e F é o fator de calibração obtido pela curva padrão.

2- Determinação da creatinina urinária

$U = (A_1 - A_2) \times F \times D$, onde U é o valor da creatinina urinária em mg/ dl e D corresponde ao fator de diluição das amostras de urina.

3- Determinação do clearance de creatinina

O clearance de creatinina foi calculado pela fórmula abaixo:

$$\frac{U \text{ (creatinina urinária)} \times V \text{ (volume de urina em ml)}}{S \text{ (creatinina sérica)} \times T \text{ (tempo de coleta em min.)}}$$

O ritmo de filtração glomerular foi, então, estimado a partir do cálculo do *clearance* de creatinina.

4.2.2.3 Determinação das Osmolalidades Sérica e Urinária

A determinação das osmolalidades sérica e urinária foi obtida a partir da colocação de 50 µl das amostra em tubo apropriado para o osmômetro. O método utilizado foi o de osmometria de congelamento. Para a leitura das amostras, o osmômetro foi calibrado como a seguir:

- ✓ Osmolalidade sérica: foram utilizadas duas soluções padrão, uma contendo 100 mOsm/ Kg de água e a outra 500 mOsm/ Kg de água. A faixa de leitura usada foi de 0 a 1000 mOsm/ Kg de água.
- ✓ Osmolalidade urinária: foram utilizadas as mesmas soluções padrão. A faixa de leitura usada foi de 0 a 1000 mOsm/ Kg de água para a maioria das amostras. Quando a osmolalidade urinária não se encontrava entre 0 e 1000 mOsm/ Kg, foi alterada a faixa de leitura para 1000 a 3000 mOsm/ Kg e repetida a calibração com um padrão contendo 1600 mOsm/ Kg.

Foram realizadas duas leituras para cada amostra de soro e de urina. Quando entre essas leituras foi observada uma diferença considerável, a calibração do osmômetro foi repetida, realizando-se uma nova leitura dessas amostras.

O *clearance* osmolar (COsm) foi obtido a partir do seguinte cálculo:

$$\text{COsm (em ml/ min)} = \frac{\text{OU (osmolalidade urinária)} \times \text{V (volume urinário em ml)}}{\text{OS (osmolalidade sérica)} \times \text{T (tempo de coleta em min)}}$$

O *clearance* de água livre (CH₂O) foi obtido a partir do seguinte cálculo:

$$\text{CH}_2\text{O (em ml/ min)} = \text{Vm (volume urinário expresso em ml/ min)} - \text{COsm (em ml/ min)}$$

Para o cálculo do Vm divide-se o volume urinário (ml) pelo período de coleta das amostras de urina expresso em minutos.

4.2.2.4 Pesquisa de elementos anormais na urina

A pesquisa dos elementos anormais na urina foi realizada utilizando fitas reagentes da marca Multistix[®] 10SG – Bayer Diagnósticos, sendo qualitativamente avaliados a bilirrubina, a albumina e a presença de hemácias, conforme as recomendações do fabricante.

4.2.2.5 Marcadores de lesão hepatocitária e provas de função hepática

As provas de função hepática incluíram determinações dos níveis séricos de bilirrubinas totais e frações, albumina, transaminases, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase. Estas dosagens foram realizadas no laboratório de análises clínicas Cesar Macedo. Para essas análises foram coletados aproximadamente 4 ml de sangue total para cada rato. Após a coleta das amostras de sangue, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada e centrifugados a 2000 rpm, durante 20 minutos, numa temperatura de -4 °C. O soro obtido foi mantido em tubos dentro de um freezer a aproximadamente -20 °C, para posterior transporte ao laboratório, mantido em gelo. Todas as dosagens foram realizadas de modo semi-automático em aparelho BIO 2000.

4.2.2.5.1 Bilirrubinas totais e direta

As dosagens das bilirrubinas no soro foram realizadas pelo método colorimétrico (Sims-Horn) sem diluições, usando o Kit Katal.

Protocolo

(a) Reagentes

- Acelerador - solução de cafeína 130 mmol/l, benzoato de sódio 260 mmol/l e acetato de sódio 460 mmol/l.

- Ácido sulfanílico - solução de ácido sulfanílico 5,75 mmol/l em ácido clorídrico 180 mmol/l
- Nitrito de sódio - solução de nitrito de sódio 72,4 mmol/l
- Padrão - 0,3 mg de bilirrubina dessecada
- Solvente - dimetilsulfóxido anidro.
- Diazo Reagente - foi adicionado 1 gota de nitrito de sódio a 1,5 ml de ácido sulfanílico
- Padrão - foi adicionado 3 ml do solvente ao frasco do padrão (0,3 mg de bilirrubina dessecada) e agitado. A concentração do padrão foi de 10 mg/dl. Manipulou-se ao abrigo de luz direta.

(b) Calibração

Foi realizada a construção de curvas padrão, utilizando dois tubos, o branco e o padrão.

(c) Ensaio

1- Tubos de ensaio foram preparados conforme descrito a seguir:

	Branco	Padrão
Acelerador	1,8 ml	1,8 ml
Ácido sulfanílico	150 µl	-
Diazo reagente	-	150 µl
Padrão	50 µl	50 µl

2- Homogeneizou-se adequadamente a solução e aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente.

3- Determinou-se a absorvância dos padrões a 525 nm , acertando o zero com o Branco.

4- Realizou-se a leitura dos 3 tubos e procedeu-se como a seguir:

	Branco	Direta	Total
Água destilada	1,8 ml	1,8 ml	-
Acelerador	-	-	1,8 ml
Ácido sulfanílico	150 µl	-	-
Diazo reagente	-	150 µl	150 µl
Amostra	50 µl	50 µl	50 µl

5- Homogeneizou-se novamente a solução e aguardou-se 5 min em temperatura ambiente. A absorbância das bilirrubinas direta e total a 525 nm foi determinada, acertando o zero com o branco.

(d) Cálculo: Bilirrubina (mg/dl) = (absorbância da amostra - absorbância do padrão) x 10.

4.2.2.5.2 Albumina

Para dosagem de albumina foi utilizado o método colorimétrico (verde de Bromocresol) e o Kit Katal.

(a) Reagentes

- Reagente de cor-estoque - solução tamponada em pH 3,8 (10 vezes) concentrada contendo verde de bromocresol 1,7 mmol/l e azida sódica 8,5 mmol/l. Para fazer o reagente de cor de uso: foi diluído o reagente de cor estoque (10 vezes) com água deionizada.

- Padrão - solução aquosa de albumina bovina 3,8 g/dl, contendo azida sódica 8,5 mmol/l.

(b) Ensaio

1- Realizou-se a leitura dos 3 tubos, procedendo-se como a seguir:

	Branco	Amostra	Padrão
Amostra	-	10µl	-
Padrão	-	-	10µl
Reag. De cor (uso)	2ml	2ml	2ml

2- Homogeneizou-se a solução e aguardou-se 15 min em temperatura ambiente.

3- Absorbâncias do teste e do padrão em 630 nm foram determinadas, acertando-se o zero com o Branco.

(c) Cálculo: albumina (g/dl) = (absorbância da amostra - absorbância do padrão) x 3,8.

4.2.2.5.3 Aspartato Aminotransferase (AST)

A dosagem da AST foi feita por método cinético, utilizando o Kit – Katal.

(a) Reagentes

- Tampão - solução tamponada em pH 7,8, contendo α -cetogluturato 12 mmol/l, L-aspartato 240 mmol/l, EDTA 5 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l

- Reagente enzimático - solução tamponada em pH 7,8, 100 vezes concentrada contendo desidrogenase málica ≥ 42.000 U/l, desidrogenase láctica ≥ 60.000 U/l e azida sódica 15,5 mmol/l
- Coenzima - solução 100 vezes concentrada contendo NADH₂ 5 mmol/l
- Reagente de Trabalho - foi adicionado 250 μ l de reagente enzimático e 250 μ l de coenzima a 25 ml de Tampão e homogeneizado adequadamente.

(b) Ensaio

- 1- Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml de reagente de trabalho. Equilibrou-se a solução na temperatura de trabalho que deve ser fixa (37°C), durante 2 min.
- 2- Foi adicionado 100 μ l de amostra e homogeneizado rapidamente, efetuando a leitura inicial na absorvância de 365 nm, disparando-se o cronômetro simultaneamente.
- 3- Efetuou-se novas leituras com 1, 2 e 3 min. A média das diferenças das leituras (ΔA médio) foi utilizado para o cálculo da dosagem.

(c) Cálculo: $AST (U/l) = \Delta A \text{ médio} \times 3280$.

4.2.2.5.4 Alanina aminotransferase (ALT)

Foi utilizado método cinético UV para determinação da ALT e o Kit Katal.

(a) Reagentes

- Tampão - solução tamponada em pH 7,8, contendo α -cetogluturato 12 mmol/l, L-alanina 500 mmol/l, EDTA 5 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l

- Reagente enzimático - solução tamponada em pH 7,8, 100 vezes concentrada contendo, desidrogenase láctica ≥ 120.000 U/l e azida sódica 15,5 mmol/l
- Coenzima - solução 100 vezes concentrada contendo NADH₂ 5 mmol/l
- Reagente de Trabalho - Foi adicionado 250 μ l de reagente enzimático e 250 μ l de coenzima a 25 ml de Tampão e homogeneizado adequadamente.

(b) Ensaio

1- Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml de reagente de trabalho e equilibrado na temperatura de trabalho que deve ser fixa (37°C), durante 2 min.

2- Adicionou-se 100 μ l de amostra e homogeneizou-se rapidamente.

3- A leitura inicial foi efetuada na absorbância de 365 nm, disparando-se o cronômetro simultaneamente.

4- Efetuaram-se novas leituras com 1, 2 e 3 min. A média das diferenças das leituras (ΔA médio) foi utilizada para o cálculo da dosagem.

(c) Cálculo: $ALT (U/l) = \Delta A \text{ médio} \times 3280$.

4.2.2.5.5 Fosfatase Alcalina

O método cinético e o Kit Katal foram utilizados para determinação da fosfatase alcalina.

(a) Reagentes

- Tampão - solução tamponada em pH 9,8, contendo cloreto de magnésio 0,5 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l

- Substrato - solução aquosa 10 vezes concentrada, contendo p-nitrofenilfosfato de sódio 100 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l
- Reagente de Trabalho - foi adicionado 5 ml de substrato a 45 ml de tampão e homogeneizou-se adequadamente.

(b) Ensaio

- 1- Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml de reagente de trabalho e equilibrado na temperatura de trabalho que deve ser fixa (37°C), durante 2 min.
- 2- Adicionou-se 20 µl de amostra e homogeneizou-se rapidamente.
- 3- Efetuou-se a leitura inicial na absorvância de 405 nm, disparando-se o cronômetro simultaneamente.
- 4- Efetuaram-se novas leituras com 1, 2 e 3 min. A média das diferenças das leituras (ΔA médio) foi utilizada para o cálculo da dosagem.

(c) Cálculo: Fosfatase Alcalina (U/l) = ΔA médio x 2700.

4.2.2.5.6 Gama Glutamiltransferase

A dosagem da gama glutamiltransferase (γ GT) foi feita pelo método cinético, utilizando o Kit Katal.

(a) Reagentes

- Tampão - solução tamponada em pH 8,2, contendo glicil-glicina 150 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l
- Substrato - solução aquosa 5 vezes concentrada, contendo L- γ -glutamil-p-nitroanilida 6,0 mmol/l e azida sódica 15,5 mmol/l

- Reagente de Trabalho - O frasco contendo substrato foi aquecido por 1 a 2 min, em banho-maria a 56°C, para diluição completa dos cristais. Adicionou-se 4 ml de substrato a 16 ml de Tampão e homogeneizou-se adequadamente.

(b) Ensaio

- 1- Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 ml de reagente de trabalho, equilibrando a temperatura de trabalho que deve ser fixa (37°C), durante 2 min.
- 2- Adicionou-se 20 µl de amostra e homogeneizou-se rapidamente, efetuando a leitura inicial na absorbância de 405 nm com disparo simultâneo do cronômetro.
- 3- Efetuaram-se novas leituras com 1, 2 e 3 min. A média das diferenças das leituras (ΔA médio) foi utilizada para o cálculo da dosagem.

(c) Cálculo: $\gamma\text{GT (U/l)} = \Delta A \text{ médio} \times 2121$.

4.2.2.6 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para determinação do TGF- β total no tecido hepático

Como mencionado anteriormente, os ratos do PROTOCOLO 2 (ratos tratados com infusão contínua de A-779 ou veículo) foram submetidos à decaptação e, a seguir, remoção do fígado, que foi imediatamente congelado em gelo seco e mantido em freezer a -80°C. Um fragmento do tecido hepático foi separado para posterior realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para determinação das concentrações teciduais de TGF- β total e de hidroxiporlina. O tecido hepático foi homogenizado em 1.0 ml de 1x PBS (pH 7.4),

contendo 0.05% Tween 20 (Difco). Em seguida, o material foi centrifugado a 4°C durante 10 min a 10.000 g. O sobrenadante assim obtido destinou-se à realização de ELISA, utilizando Kit específico da R&D systems e seguindo o protocolo do referido fabricante. Brevemente, placas planas de 96 poços (Nunc) foram preenchidas com 100 µl/ poço do anticorpo monoclonal apropriado para o TGF-β por 18 horas a 4°C e então lavadas com 1x PBS (pH 7.4), contendo 0.05% Tween 20 (tampão de lavagem). Sítios de ligação não específica foram bloqueados com 200 µl/ poço da solução de BSA a 1 % em PBS (tampão de bloqueio). Em seguida, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem e as amostras, apropriadamente diluídas são adicionadas (100 µl/ poço). Novamente o material foi incubado por 18 horas a 4°C. As placas foram então lavadas e adicionou-se 100 µl/ poço de solução biotinizada para detecção de anticorpos diluída em tampão de bloqueio, contendo 0.05% Tween 20 durante 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas mais uma vez, adicionando-se uma solução de estreptavidina-peroxidase (100 µl/well), com posterior incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas, sendo adicionados 100 µl/ poço de substrato cromógeno OPD (o-phenyldiamine, Sigma) diluído em tampão citrato (pH 5.0) contendo 0.02% 30 volumes de H₂O₂. As placas foram, a seguir, incubadas no escuro por 30 minutos, em temperatura ambiente. A reação foi finalizada com 50 µl/ poço de solução de H₂SO₄ 1 M. As placas foram lidas a 492 nm em espectrofotômetro (E max – Molecular Devices). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Os padrões consistem em diluições 0.5-log de TGF-β recombinante em concentrações que variam de 7.5 pg/ ml a 1000 pg/ ml (100 µl).

4.2.2.7 Determinação das concentrações teciduais de hidroxiprolina

Os ratos de cada grupo experimental (PROTOCOLO 1 e PROTOCOLO 2) foram submetidos à decaptação e, a seguir, o fígado foi retirado e imediatamente congelado em gelo seco e mantido em freezer a -80°C . No caso dos ratos do PROTOCOLO 1 (ratos não tratados submetidos a diferentes períodos de ligadura do ducto biliar comum ou à cirurgia fictícia), além do fígado foram também retirados os rins. Fragmentos do tecido hepático (200 mg) e do tecido renal (100 mg) foram separados para posterior determinação da concentração tecidual de hidroxiprolina através de metodologia descrita anteriormente por REDDY & ENWEMEKA (1996). Os fragmentos do fígado e do rim dos ratos foram homogenizados em solução salina 0.9%, congelados e liofilizados. O ensaio foi realizado com 20 mg do material liofilizado, submetido à hidrólise alcalina em 300 μl acrescidos de 75 μl NaOH 10 M a 120°C durante 20 minutos. Uma alíquota de 50 μl do tecido hidrolisado foi adicionada a 450 μl de reagente oxidante de Cloramina T (Cloramina T 0.056 M, *n*-propanol 10% em tampão acetato/citrato pH 6.5), permanecendo em reação por 20 minutos. Utilizou-se uma curva padrão de hidroxiprolina com concentração máxima de 400 μg . A coloração da reação foi obtida pelo acréscimo de 500 μl de reagente Ehrlich (*p*-dimetilaminabenzaldeído 1M, diluído em *n*-propanol/ ácido perclórico 2:1 v/v). As amostras foram então centrifugadas a 1500 g durante 10 min a 4°C . Uma alíquota de 200 μl do sobrenadante foi transferida às placas de 96 poços. A absorbância foi lida a 550 nm em espectrofotômetro ((E max – Molecular Devices).

4.2.2.8 Radioimunoensaio

Como já citado, foram coletadas amostras de sangue dos ratos do GRUPO A (4 ml por rato) para realização de radioimunoensaio (RIE) para determinar a atividade de renina plasmática (ARP, RIE para angiotensina I) e para a detecção da imunorreatividade para as angiotensinas [Ang I, Ang II e Ang-(1-7)]. Os RIE foram realizados conforme os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB – UFMG (BOTELHO et al, 1994; NEVES et al, 1995; SIMÕES e SILVA et al, 2004).

Equipamentos utilizados:

- Agitador magnético FISATON (Fisaton, Brasil);
- Agitador vortex TE 162 TECNAL (Pachame, Brasil);
- Balança Analítica S200 BOSCH;
- Balança Granatária B360 MICRONAL (Micronal, Brasil);
- Banho-Maria mod. 100 FANEM (Fanem, Brasil);
- Centrífuga evaporadora VR-1 (Heto, USA);
- Centrífuga EXCELSA 2 (Fanem, Brasil);
- Centrífuga refrigerada FR-2 (Fanem, Brasil);
- Colunas Bond Elut (Analytichem Internacional, USA);
- Detector de Radiação γ 1275 LKB WALLAC Minigama (Wallac, Finlândia);

Drogas e reagentes utilizados:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| - Acetonitrila (ACN) | grau HPLC (Merck, Alemanha) |
| - Ácido Acético | PA (Merck, Brasil) |
| - Ácido Bórico | PM 61.83 (Merck, Brasil) |
| - Ácido Clorídrico (HCl) fumegante | PA (Merck, Brasil) |

- Ácido Etilenodinitrilo tetra-acético (EDTA) PM 372.24 (Merck, Brasil);
- Ácido Heptafluorobutírico (HFBA) PM 214.04 (Merck, Alemanha)
- Ácido Trifluoracético (TFA) PM 114.02 (Merck, Alemanha);
- Albumina de soro bovino (BSA) Sigma, USA;
- Azida Sódica PM 65.01 (Merck, Alemanha);
- Bacitracina PM 1421 (Sigma, USA);
- Bestatina PM 308.38 (Sigma, USA);
- Carbonato de Sódio (NaHCO₃) PM 84.01 (Merck, Brasil);
- Carvão ativado Merck, Brasil;
- Cloreto de Sódio (NaCl) PM 58.45 (Merck, Brasil);
- Dextran Pharmacia, USA;
- Hidróxido de Sódio (NaOH) PM 40.0 (F. Maia, Brasil);
- Iodo Radioativo (¹²⁵I) Amersham Internacional, USA;
- Lisozima Sigma, USA;
- Metanol (MeOH) Merck, Brasil;
- O-ftaldialdeído PM 134.10 (Sigma, USA);
- O-fenantrolina PM 198.2 (Sigma, USA);
- Para-hidroximercúrio-benzoato (pOHHgBz) PM 360.1 (Sigma, USA);
- Para-metilsulfonil fluoreto(PMSF) PM 174.2 (Calbiochem, USA);
- Pepstatina A PM 685.9 (Sigma, USA);
- Tris (Hidroximetil)-aminometano PM 121.4 (Merck, Brasil);
- Os anticorpos para Ang-(1-7) e Ang II serão gentilmente cedidos pelo Dr. C.M. Ferrario (Cleveland Clinic Foundation, USA);
- O anticorpo Anti-Ang I foi gentilmente cedido pelo Prof. J.L. Pesquero (Laboratório de Biofísica do Dept^o de Fisiologia e Biofísica do ICB-UFMG);

- Os peptídeos Ang I, Ang II, Ang-(1-7) foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. M.C. Khosla (Cleveland Clinic Foundation, USA).

Protocolo geral

(a) Coleta de sangue:

As amostras de sangue para dosagem da atividade de renina plasmática e para determinação das angiotensinas foram obtidas através de coleta por decaptação.

Foram coletados 1 ml de sangue de cada rato para determinação da ARP, em seringas lavadas com EDTA a 7.5% e imediatamente transferidas para tubos de polietileno mantidos em gelo, contendo 100 µl de EDTA a 7.5%.

Foram também coletados 3 ml de sangue de cada rato para determinação das angiotensinas em seringas lavadas com um coquetel de inibidores de angiotensinases (vide abaixo). As amostras foram coletadas em tubos de polietileno, contendo 420 µl do coquetel de inibidores (140 µl para cada 1 ml de sangue) e mantidas no gelo.

Composição do Coquetel de Inibidores:

Inibidores enzimáticos utilizados	Concentração	Volume/ 1 ml de sangue coletado
Para-hidroximercúrio-benzoato (pOHHgBz)	1 mM	10 µl
O-fenantrolina	30 mM	50 µl
Para-metilsulfonil fluoreto (PMSF)	1 mM	10 µl
Pepstatin A	1 mM	20 µl
Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA)	75 g/l	50 µl

As soluções de pOHHgBz e o PMSF foram preparadas imediatamente antes das coletas da seguinte forma:

- Pesa-se 1 mg de pOHHgBz em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 2.5 ml de NaCl 0.9%;
- Pesa-se 1.74 mg de PMSF em balança analítica, diluindo-se, a seguir, em 10 ml de MeOH a 50%.

A seguir, foi preparado o coquetel de inibidores de angiotensinas logo antes do momento da coleta de sangue, utilizando as soluções acima juntamente com pepstatin A 1 mM e o-fenantrolina 30 mM, que foram conservados em freezer a -20°C e EDTA a 7.5% , mantido em geladeira.

(b) Obtenção das amostras de plasma:

Após a coleta das amostras de sangue, os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada e centrifugados a 2000 rpm durante 20 minutos numa temperatura de -4°C . O plasma obtido foi mantido em tubos dentro de um freezer a aproximadamente -20°C , para extração imediata das angiotensinas ou nas próximas 48 horas e processamento dos RIE em 3 a 7 dias, no máximo.

(c) Extração das amostras:

As angiotensinas do plasma foram extraídas em colunas C18 (Bond-Elut[®]). As soluções e amostras de plasma foram passadas pela coluna através da adaptação de uma seringa que permitia aplicar pressão positiva na coluna. Antes das amostras serem aplicadas na coluna, as mesmas foram re-centrifugadas a -4°C sob 2.000 rpm e durante 20 minutos. O mecanismo de extração para as amostras foi feito através do seguinte processo: a coluna *Bond Elut* foi pré-ativada através da lavagem com 20 ml de Metanol 99.9% (MeOH 99.9%) / ácido

trifluoroacético 0.1% (TFA 0.1%) e 20 ml de uma solução aquosa de TFA 0.1%. A seguir, a coluna foi lavada seqüencialmente com 10 ml de TFA 0.1%, 3 ml de TFA 0.1% / BSA 0.1%, 10 ml de MeOH 10% / TFA 0.1% e, por último, 3 ml de TFA 0.1%. Nesse momento, aplicou-se a amostra, anotando-se o volume de plasma colocado na coluna. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada duas vezes com 10 ml TFA 0,1% e, a seguir, com 10 ml de MeOH a 20% / TFA 0.1%. Os peptídios retidos na coluna foram eluídos com 3 ml de MeOH 99.9% / TFA 0,1% e armazenados a -20°C em tubo de cristal previamente lavado com BSA 0.1%.

Os peptídeos, em solução alcoólica, foram concentrados até resíduo através da evaporação do componente alcoólico em centrífuga evaporadora, durante 8 a 12 horas e, em seguida, ressuspendidos em 0.65 ml de Tampão II RIE Ang II e submetidos ao RIE (ver abaixo).

4.2.2.8.1 Determinação da atividade de renina plasmática (ARP):

Para determinação da ARP, o plasma (0.2 ml) foi incubado em banho-maria a 37°C durante 3 h, juntamente com 0.2 ml de tampão I da Ang I (pH 7.4), 0.02 ml de 8-OH-Quinoleína 48 mM e 0.01 ml de PMSF 161 mM. Uma alíquota similar foi mantida a 4°C em banho de gelo. Ao final do tempo de incubação, 0.1 ml de cada amostra do plasma incubado foi adicionado no RIE para Ang I descrito no item d.2. A ARP foi determinada através de radioimunoensaio para Ang I. A determinação foi feita pela quantidade de Ang I formada no período de incubação (3 h), a 37° C, sendo expressa em ng Ang I/ ml de plasma/ h. A ARP foi calculada subtraindo-se a concentração de Ang I na amostra incubada a 37° C daquela mantida em banho de gelo.

4.2.2.8.2 Radioimunoensaio para Angiotensina I

Soluções:

- Tampão Tris acetato 0,2 M pH 7,4 (Tampão I): 12,1g de Tris foram dissolvidos em aproximadamente 450 ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com ácido acético e o volume completado para 500 ml com H₂O deionizada.
- Tampão Tris acetato 0,2 M pH 6,8 com BSA 0,05% (Tampão II): Preparado no momento de uso, pela adição de 0,5 mg de BSA por ml de tampão Tris acetato 0,2 M em pH de 7,4.
- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1 % / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl 0.9% e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500 ml de solução de ácido acético 0,03%.
- Anticorpo policlonal (título 1:20.000): Preparado a partir de uma solução do estoque no título de 1:4, pela dissolução em Tampão I. Este anticorpo apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com a Ang II e a Ang-(1-7) e 100% de reatividade cruzada com a Ang-(2-10), Ang-(3-10) e Ang-(4-10).
- ¹²⁵IAng I: ¹²⁵IAng I marcada e purificada foi diluída com Tampão II para uma concentração de 6000 cpm por cada 0,1 ml.
- Padrões: As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 pg/ 0,1 ml, preparadas a partir de uma solução do estoque de 1 mg/ ml diluída na SR.
- Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 62,5 mg de dextran e 625 mg de carvão ativado, dissolvidos em 100 ml de Tampão I. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.
- Albumina Bovina 5%: 0,5g de BSA "*fat free*" foram dissolvidas em 10 ml de H₂O destilada.

Cada ensaio foi realizado em duplicata conforme o seguinte protocolo:

Soluções (ml)	Total	Branco	Bo (Lne)	Padrão	Amostra
SR	—	0,1	0,1	—	—
Tampão II	1,5	0,4	0,3	0,3	0,3
BSA 5%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Amostra	—	—	—	—	0,1
Padrões (200-6,25 pg)	—	—	—	0,1	—
¹²⁵Iang I (6000 cpm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Anticorpo (1:20.000)	—	—	0,1	0,1	0,1
Volume Final	1,7	0,7	0,7	0,7	0,7

Os tubos foram agitados em vortex e incubados a 4° C durante 18 a 22 h.

Suspensão de carvão	—	1,0	1,0	1,0	1,0
----------------------------	---	-----	-----	-----	-----

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran os tubos foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C, em 2.500 rpm e por 20 min, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ .

4.2.2.8.3 Radioimunoensaio para Angiotensina II

Soluções:

- Tampão Tris-HCl 0,1 M, EDTA 15 mM, lisozima 0,1% pH 7,4 (Tampão I): 6,0g de Tris juntamente com 2,79g de EDTA e 0,5g de lisozima foram dissolvidos em,

aproximadamente, 450 ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3N e o volume completado para 500 ml com H₂O deionizada.

- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1 % / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl 0.9% e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500 ml de solução de ácido acético 0,03%.
- Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 (Tampão II): 6,0g de Tris foram dissolvidos em, aproximadamente, 450 ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3N e o volume completado para 500 ml com H₂O deionizada.
- Anticorpo policlonal (título 1:160.000): Preparado a partir de uma solução do estoque no título de 1:2500, pela dissolução em Tampão I. Esse anticorpo apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e a Ang-(1-7), menos de 0.002% de reatividade cruzada com a Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com a Ang-(2-8), Ang-(3-8) e Ang-(4-8).
- ¹²⁵IAng II: ¹²⁵IAng II marcada e purificada foi diluída com Tampão I para uma concentração de 6000 cpm por cada 0,1 ml.
- Padrões: As concentrações de padrão utilizadas foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 pg/ 0,2 ml, preparadas a partir de uma solução do estoque de 2 mg/ ml diluída na SR.
- Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 25 mg de dextran e 250 mg de carvão ativado, dissolvidos em 100 ml de Tampão II. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.

Cada ensaio foi realizado em duplicata conforme o seguinte protocolo:

Soluções (ml)	Total	Branco	Bo (Lne)	Padrão	Amostra
Tampão I	1,1	0,1	—	—	—
SR	0,2	0,2	0,2	—	—
Amostra	—	—	—	—	0,2
Padrões (80-2,5 pg)	—	—	—	0,2	—
¹²⁵Iang II (6000 cpm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Anticorpo (1:160.000)	—	—	0,1	0,1	0,1
Volume Final	1,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Os tubos foram agitados em vortex e incubados a 4° C durante 18 a 22 h.

Suspensão de carvão	—	1,0	1,0	1,0	1,0
----------------------------	---	-----	-----	-----	-----

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran os tubos foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C, em 2.500 rpm e por 20 min, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ .

4.2.2.8.4 Radioimunoensaio para Angiotensina-(1-7)

Soluções:

- Tampão Tris-HCl 50 mM, BSA 0,1%, NaCl 50 mM, Ázida Sódica 0,02% pH 7,5 (Tampão I): 3,0g de Tris juntamente com 0,5g de BSA, 1,46g de NaCl e 0,1g de Ázida Sódica foram dissolvidos em, aproximadamente, 450 ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,5 com HCl 3N e o volume completado para 500 ml com H₂O deionizada.

- Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1 % / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500 ml de solução de ácido acético 0,03%.
- Anticorpo policlonal (título 1:20.000): Preparado a partir de uma solução do estoque no título de 1:500, pela dissolução em Tampão I. Este anticorpo apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e a Ang II, 0,01% de reatividade cruzada com a Ang-(2-7), Ang-(3-7), 0,08% de reatividade cruzada com a Ang-(4-7) e 0,005% com a Ang-(1-5).
- ^{125}I Ang-(1-7): ^{125}I Ang-(1-7) marcada e purificada foi diluída com Tampão I para uma concentração de 6000 cpm por cada 0,1 ml.
- Padrões: As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 pg/ 0,1 ml, preparados a partir de uma solução do estoque de 2 mg/ ml diluída na SR.
- Suspensão de Carvão: A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 62,5 mg de dextran e 625 mg de carvão ativado, dissolvidos em 100 ml de Tampão I. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por 1 hora antes do uso.

Cada ensaio foi realizado em duplicata conforme o seguinte protocolo:

Soluções (ml)	Total	Branco	Bo (Lne)	Padrão	Amostra
SR		0,1	0,1	—	—
Tampão I	1,3	0,2	0,1	0,1	0,1
Amostra	—	—	—	—	0,1

Padrões (200-6,25 pg)	—	—	—	0,1	—
¹²⁵I ang-(1-7)(6000cpm)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Anticorpo (1:20.000)	—	—	0,1	0,1	0,1
Volume Final	1,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Os tubos foram agitados em vortex e incubados a 4°C, durante 18 a 22 h.

Suspensão de carvão	—	1,0	1,0	1,0	1,0
----------------------------	---	-----	-----	-----	-----

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran os tubos foram imediatamente agitados em vortex e centrifugados a 4°C, em 2.500 rpm e por 20 min, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ .

(e) Cálculo das concentrações peptídicas:

A curva padrão foi obtida pela relação $B-Br / (Bo-Br) \times$ concentração de padrão em picograma (pg). A concentração de peptídeo (pg/ 0,1ml) foi determinada pela intersecção da relação $B-Br / Bo-Br$ na curva padrão de acordo com a programação do contador de radiação γ , onde:

- B = fração de peptídeo marcado ligado.
- Bo = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado.
- Br = branco.

(f) Marcação radioativa e purificação dos peptídeos:

As angiotensinas, usadas como padrão, foram marcadas com Iodo radioativo (¹²⁵I) pelo método da Cloramina T. A proporção ¹²⁵I por peptídeo por Cloramina T utilizada na

reação foi de 1 mCi por 50 µg/ 50 µl por 100 µg. A reação foi executada em capela. O ^{125}I tamponado foi colocado em tubos Eppendorf, e, em seguida, adicionou-se o peptídeo. Foram também colocados 5 a 10 µl de Tampão fosfato 0.5 mM pH 7.4. A reação foi iniciada pela adição de 5 µl da Cloramina T/ Tampão fosfato 0.5 mM pH 7.4, na concentração apropriada. A reação prosseguia sob agitação constante por 60 segundos. Após esse tempo interrompia-se a mesma com 250 µl de solução de TFA 0.1%. As amostras foram extraídas imediatamente em colunas de *Bond-Elut* para a separação do ^{125}I livre. A coluna foi previamente ativada pela lavagem seqüencial com 10 ml de MeOH 80% / TFA 0.1%, 10 ml de TFA 0.1% e 3 ml de TFA 0.1% / BSA 0.1%. Após a ativação a amostra foi aplicada. O frasco da reação foi lavado com 250 µl de TFA 0.1% / BSA 0.1%, que também foram aplicados na coluna. Esta então, foi lavada com 10 ml de TFA 0.1% e 10 ml de MeOH 20% / TFA 0.1%. A amostra foi, então, extraída com 3 ml de MeOH 80% / TFA 0.1% em tubos de polietileno lavados com BSA. Após a extração, contava-se em detector de radiação γ 10 µl do marcado diluídos em água, para determinação do rendimento da reação. Os peptídeos marcados foram armazenados a -20°C , em recipientes de chumbo.

Os peptídeos marcados foram purificados para separação da fração diiodada e peptídeo “frio”. Aproximadamente 10^7 cpm dos peptídeos foram aplicados no sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Esta quantidade deveria estar contida, em um volume máximo de 200 µl (volume do *loop*), caso contrário, a amostra foi previamente concentrada. O solvente B foi utilizado para essa separação e constituído de 0.13% HFBA / 80% ACN em água. Coletava-se cada fração em fluxo constante (1 ml/min) e por 60 segundos. Depois da coleta, as amostras foram levadas ao contador γ para determinação das frações correspondentes ao pico do peptídeo monoiodado. As frações que correspondiam ao pico de radioatividade foram separadas e, a estas, adicionava-se 10 µl de

BSA 5%. Após a purificação os peptídeos foram armazenados a -20° C. Os gradientes de eluição utilizados foram: de 31% a 40% do solvente B em 30 min, seguido de 41% a 60% do solvente B até 40 min e, finalmente, 60% a 31% do solvente B até 50 min para a purificação da Ang-(1-7); 36% a 42% do solvente B em 30 min, seguido de 42% do solvente B até 43 min, 42% a 70% do solvente B até 50 min e, finalmente, 70% a 36% do solvente B até 60 min para a purificação da Ang II; a purificação da Ang I foi em condição isocrática de 40% do solvente B.

4.2.3 Análise histopatológica

Os fragmentos de tecido hepático foram conservados em formol a 10% e encaminhados para estudo histopatológico ao Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. Os fígados foram examinados macroscopicamente e fragmentos retirados do lobo direito, fixados em formol, foram incluídos em parafina, cortados e corados pela hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e pela prata amoniacal de Gomori. Todos os cortes histológicos foram analisados por uma única patologista ao microscópio óptico.

4.2.4 Análise Estatística

Cálculo do tamanho da amostra: Baseado nos dados obtidos por PEREIRA (2004) foram utilizados um total de 5 a 10 ratos por cada subgrupo experimental para possibilitar comparações. No referido estudo já foi possível detectar diferenças significativas em relação à ARP e aos níveis circulantes de angiotensinas nos animais com fibrose hepática e o grupo controle, utilizando um total de 4 a 5 animais por grupo (erro α de 0.05 e erro β de 0.20, com poder estatístico superior a 80 %). Dessa forma, o tamanho da amostra neste estudo baseiou-

se inicialmente nesses dados anteriores, estimando-se um mínimo de 5 ratos por grupo experimental. Segundo Lemeshow et al (1990) é aceitável que os cálculos que estimam o tamanho da amostra possam ser feitos baseados em experimentos prévios similares.

Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão e o nível de significância estatística considerado será o de $p < 0.05$. A comparação dos dados obtidos no grupo dos animais não tratados (PROTOCOLO 1) foi feita por análise de variância seguida pelo método da diferença mínima significativa de Fisher. Os cálculos foram realizados utilizando o programa SPSS versão 3.0. As comparações entre os grupos de animais tratados e recebendo veículo foram realizadas pelo teste T de Student para dados não pareados.

4.2.5 Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado de acordo com as normas da ética para experimentação e cuidado com animais de laboratório e recebeu aprovação por parte do Comitê de ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (vide protocolo no anexo 1).

Refêrencias Bibliográficas:

1. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055.
2. Botelho LMO, Block CH, Khosla MC, Santos RAS. Plasma angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation and hemorrhage. *Peptides* 1994; 15 (4): 723-729.
3. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn NJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-155.
4. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1984; 65: 305-311.
5. Lemeshow S, Hosner DH, Klar J and Lwanga SK. *Adequacy of sample size in health studies*. New York: John Wiley, 1990: 239 p.
6. Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Santos RAS. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts: effect of angiotensin converting inhibitors. *Biochem Pharm* 1995; 50 (9): 1451-1459.
7. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676.
8. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385.

9. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, *et al.* Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. *Gut* 2005; 54 (12): 1790-1796.
10. Pereira RM, Santos RAS, Leite VHR, Fagundes-Moura CR, Collares GB, Simões e Silva AC. Evidence for a physiological role of circulating Renin Angiotensin System in experimental hepatic fibrosis. *FASEB J* 2003; 17 (4): A481-A419 “abstract”.
11. Pereira RM. Perfil do Sistema Renina Angiotensina circulante em modelo experimental de fibrose hepática. Thesis, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2004b.
12. Poo JL, Estanes A, Chaverri JP, Cruz C, Pérez C, Humberman A et al. Cronología de hipertensión portal, disminución de excreción de sodio y activación del sistema renina-angiotensina en cirrosis biliar experimental. *Rev Invest Clin* 1997; 49: 15-23.
13. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues ARV, Gropen Jr C, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35 (4): 293-298.
14. Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Cesar KR, Passaglio KT, Baracho NCV. Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996; 27: 875-884.
15. Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100 (14): 8258-8263.

16. Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, Khosla MC, Santos RAS. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and Hypertensive rats. *Regul Pept* 1998; 74:177-184.
17. Simões e Silva AC, Diniz JSS, Regueira Filho A, Santos RAS. The Renin Angiotensin System in childhood hypertension: Selective increase of Angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Pediatr* 2004; 145(1):93-98.
18. Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin Angiotensin System mediator. *Mini-Rev Med Chem* 2006; 6 (5): 603-609.
19. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750.

Artigo 1:

**Renin Angiotensin System in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for
a protective role of Angiotensin-(1-7)**

Regina Maria Pereira¹, Robson Augusto Souza dos Santos², Mauro Martins Teixeira³,
Virginia Hora Rios Leite⁴, Lincoln Paiva Costa¹, Filipi Leles da Costa Dias¹, Lucíola S.
Barcelos³, Guilherme Birchal Collares⁴, Ana Cristina Simões e Silva¹

¹Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

²Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

³Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

⁴Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina–UFMG, Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

Correspondence to Ana Cristina Simões e Silva, PhD

Current address: Rua Timbiras, 1634 Apt 1704 bloco A Funcionários

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30140061

Phone: + 55 31 32249937; e-mail: acssilva@hotmail.com

Abstract

Background & Aims: The Circulating Renin-Angiotensin System (RAS) [plasma renin activity (PRA), Angiotensin (Ang) I, Ang II and Ang-(1-7)] was evaluated in a rat model of hepatic fibrosis. To investigate the pathophysiological involvement of Ang-(1-7), additional animals were treated with the Ang-(1-7) Mas receptor antagonist, A-779.

Methods: RAS components, liver function and histology were examined in male Wistar rats (220-300g). Animals were submitted to sham-surgery or ligation of the bile duct and evaluated at different post-procedure periods: one, two, four and six weeks. Blood samples were then obtained to determine biochemical parameters and RAS components. A second group was treated with A-779 or vehicle to measure liver hydroxyproline and total transforming growth factor beta 1 (TGF β_1).

Results: PRA and Ang I exhibited significant elevation in rats at four and six weeks when compared to sham-operated animals. Ang II and Ang-(1-7) increased progressively after surgery. Changes in RAS profile correlated with histological fibrosis and liver function deterioration. Pharmacological blockade of the Ang-(1-7) receptor aggravated liver fibrosis with a significant elevation in hydroxyproline and total TGF β_1 .

Conclusion: The present study shows that hepatic fibrosis is associated with RAS activation. Our data also suggest that Ang-(1-7) plays a protective role in hepatic fibrosis.

Key words: Angiotensin-(1-7), Angiotensin II, A-779, transforming growth factor, liver injury.

Electronic word count: abstract (200 words) and manuscript (2998 words)

Introduction

It is well established that the Renin Angiotensin System (RAS) is involved in a number of fibrogenic processes[1-4]. Angiotensin (Ang) II acts predominantly through Type 1 receptors (AT_1) as a circulating hormone and as a tissue RAS component with profibrotic and mitogenic effects[1,4,5]. RAS inhibition has reduced collagen expression and interstitium expansion in models of kidney[2] and heart injury[3].

Recent studies indicate that the RAS is also involved in hepatic fibrosis[6-11]. Ang II induces contraction and proliferation of hepatic stellate cells[11-13] and increases transforming growth factor beta-1 ($TGF\beta_1$) and collagen I gene expression via AT_1 receptors[8,10]. $TGF\beta_1$ induces the activation of hepatic stellate cells, which enhance $TGF\beta_1$ expression. Thus, autocrine and paracrine loops are formed, assuring the continuous production of this fibrogenic cytokine[12,14].

However, the role of other angiotensins has yet to be evaluated in hepatic fibrosis models. Among these putative RAS mediators, Ang-(1-7) is particularly interesting, as it can be formed directly from Ang I by neutral-endopeptidase 24.11 or prolyl-endopeptidase or from Ang II via prolyl-endopeptidase, prolyl-carboxypeptidase[15,16] or the newly discovered enzyme ACE2[17]. Experimental evidence has shown that Ang-(1-7) plays a counter-regulatory role in the RAS[15,18] by opposing the vascular and proliferative effects of Ang II[15,18,19]. The physiological relevance of Ang-(1-7) has been substantiated by the use of its antagonist, A-779[20-22], and, more recently, by the demonstration that Ang-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein-coupled receptor Mas, which is involved in mediating a number of the biological actions of this peptide and can be blocked by A-779[23].

The aims of the present study were to measure the circulating RAS components [plasma renin activity (PRA), Ang I, Ang II and Ang-(1-7)] in a rat model of bile duct ligation (BDL) and evaluate the effect of Mas receptor antagonism on the early stages of hepatic fibrosis.

Material and Methods

Animals and experimental design – Male Wistar rats (220 to 300g) were maintained under the standard conditions of our animal facility. Hepatic fibrosis was induced through BDL. Animals were anesthetized intraperitoneally with 2.5% tribromoethanol. A 1.5 cm midline incision was made and the common bile duct was located, double ligated with 4-0 silk and sectioned as described elsewhere[24]. The ethics committee of our institution approved the study.

- **Protocol 1 –Progression of liver damage and RAS circulating profile according to the duration of BDL** - Animals were randomized into the following groups: sham-operated and BDL rats. Sham-operated rats underwent a midline incision and manipulation of the bile duct without ligation[24] and were grouped according to the time following sham-surgery as one (n=5), two (n=5), four (n=7), and six-week (n=5) animals. BDL rats were also grouped according to the time following BDL: one (n=8), two (n=8); four (n=7) and six weeks (n=7). Three days before blood sampling, all rats were placed in metabolic cages to measure urine volume as well as water and food intake. At the end of the experiment, animals were weighed and blood samples were collected by decapitation to determine RAS components and hepatic function parameters. Liver and spleen weight were determined and liver tissue fragments were obtained for histological analysis.
- **Protocol 2 – Effect of the blockade of Ang-(1-7) receptor on the early stages of liver fibrosis** - The Ang-(1-7) Mas receptor antagonist, A-779[21,22] was chronically infused

in an additional group to evaluate the effect of receptor blockade during the installation of liver fibrosis. After anesthesia, rats were submitted to sham-surgery or BDL accompanied by the implantation in the dorsal subcutaneous tissue of osmotic minipumps filled with A-779 solution (1 μ g/ μ L) or vehicle (0.9%NaCl). Infusion rate was 1.02 \pm 0.03 μ L/hour (1 μ g of A-779 per hour), administered for for one week. The rats were grouped as follows: one-week-sham-operated animals (n=5), rats submitted to BDL receiving vehicle infusion (0.9%NaCl, 1 μ L/h, n=7), rats submitted to BDL receiving A-779 infusion (1 μ g/h, n=7, A-779 group) and a group of intact rats receiving the same A-779 infusion (n=5). At the end of the experimental period, animals were sacrificed through decapitation. Liver tissue samples were obtained for histological analysis as well as to measure hydroxyproline and total TGF β ₁ content.

Blood Sampling

Blood samples were collected in three different sets of ice-cooled tubes: empty tubes for biochemical determinations; tubes containing 7.5%EDTA (100 μ l per 1mL of blood) for PRA determinations; and tubes containing a cocktail of protease inhibitors (0.01mM p-hydroxy-mercury benzoate; 1.5mM o-phenanthroline; 0.01mM para-methyl-sulfonil-fluoride; 0.05mM Pepstatin A and 10mM EDTA) for the angiotensin measurements (140 μ l per 1mL of blood). Blood samples were centrifuged at 2000g for 20 min at 4 $^{\circ}$ C and the plasma was stored at -20° C.

Plasma Extraction

Plasma samples were extracted using phenyl Bond-Elut cartridges (Analytichem International, Harbor City, CA). Columns were activated by sequential washes with 10mL

99.9%methanol/0.1%trifluoroacetic acid (TFA), 20mL 0.1%TFA and 3mL 0.1%TFA containing 0.1%bovine serum albumin (BSA). After application of the plasma samples, the columns were washed with 20mL 0.1%TFA, 10mL 20%methanol/0.1%TFA and the adsorbed peptides were eluted with 3mL 99.9%methanol/0.1%TFA. Using this procedure, recovery of ¹²⁵I-labeled Ang I, Ang II, and Ang-(1-7) was 79.2±2.3, 86.9±0.8 and 83.5±0.9%, respectively.

Radioimmunoassays

After extraction, plasma samples were re-suspended in 650µL of aqueous solution containing 0.1%BSA, 0.9%NaCl and 0.003%acetic acid. PRA and Ang I, Ang II and Ang-(1-7) concentrations were determined through radioimmunoassay (RIA), as described elsewhere[25]. Results were expressed as nanograms of Ang I generated per mL of plasma per hour (ngAngI/mL/h) for PRA and pg/mL of plasma for the angiotensin measurements.

ELISA for total TGFβ₁

The hepatic tissue was homogenized in 0.9%NaCl, frozen and liophilized. The assay was performed with 100mg of the liophilized, which was homogenized in 1.0mL 1xPBS (pH 7.4) containing 0.05%Tween 20 (Difco), followed by centrifugation at 4°C for 10min at 10,000g. The supernatant was combined with the inflammatory fluid and ELISA assays were performed using kits from R&D systems for TGFβ₁, as described elsewhere[26].

Hydroxyproline determination

Fragments (200mg) of liver tissue were removed for hydroxyproline determination as an indirect measure of tissue collagen content, as described by Reddy & Enwemeka[27].

Biochemical parameters

Aminotransferases (enzyme kinetic method), albumin (colorimetric reaction method), bilirubin (Sims-Horn colorimetric method) and alkaline phosphatase (enzyme kinetic method) were measured using the Katal Kit and a semi-automatic analyzer (BIO 2000).

Histological analysis

Five-micrometer sections of formalin-fixed and paraffin-embedded right liver lobes were processed routinely with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Sirius red stains. A single, expert pathologist analyzed all fragments using light microscopy as a blinded observer. The degree of fibrosis was measured based on the semi-quantitative scoring described by Ishak et al[28]. Apoptotic cells were quantified based on morphological appearance (cell shrinkage with dense cytoplasm and peripheral condensation of nuclear chromatin). Fifty representative histological fields (400x) were counted in each group.

Statistical analysis

Data are expressed as mean±standard deviation (SD). Median values were used when appropriate. Variables with Gaussian distribution were analyzed through ANOVA. Comparisons between groups were performed using Fisher's least significant difference method. Non-Gaussian variables were expressed as medians and compared through Kruskal-Wallis. Values of $p < 0.05$ were considered significant and adjusted using the Bonferroni correction according to the number of comparisons performed.

Results

Protocol 1 – Progression of liver damage and RAS circulating profile according to the duration of BDL

General measures – Sham group comprised pooled data from animals at one, two, four and six weeks after sham-operation, as no differences were observed between subgroups. All rats presented a similar body weight at the beginning of the experimental protocol and no differences were observed in water and food intake (Table 1). The 24-hour urinary volume of animals at one and two weeks after BDL did not differ from sham-operated rats. However, urinary volume was significantly higher in animals at four and six weeks after BDL when compared to sham-operated rats. Liver and spleen weight increased significantly in animals at two, four and six weeks after BDL when compared to sham values. At the end of the experimental protocol, animals at one and two weeks after BDL showed less weight gain when compared to all other groups (Table 1). No ascites was observed in the rats at one and two weeks after BDL. In contrast, animals at four and six weeks clearly exhibited ascites, indicating the progression of hepatic dysfunction.

RAS profile - Our data revealed an overall activation of circulating RAS in rats with hepatic fibrosis. PRA (2.2 ± 0.8 ngAngI/mL/h) and Ang I (361 ± 30 pg/mL) exhibited a 2.8-fold elevation in rats at four weeks after BDL when compared to four-week-sham-operated animals (Figure 1). Rats at six weeks after BDL presented a 8.4-fold increase in PRA (6.7 ± 0.8 ngAngI/mL/h) and a 6.4-fold elevation of Ang I levels (820 ± 34 pg/mL) in comparison to sham-operated animals ($p < 0.05$). In contrast, rats at one and two weeks after BDL presented similar PRA and Ang I levels to sham-operated animals at the same time periods ($p > 0.05$ for all comparisons). Regarding Ang II and Ang-(1-7), a significant increase of both mediators was detected even in the early stages of liver fibrosis. When compared to sham-operated animals, rats at one and two weeks after BDL presented a 3-fold elevation of Ang II and a 2-fold increase of Ang-(1-7). Four weeks after BDL, Ang II levels (155 ± 17 pg/mL) remained 3-fold higher than in sham-operated animals at four weeks and

Ang-(1-7) concentrations ($55\pm 5\text{pg/mL}$) achieved a 3-fold increase ($p<0.05$ for all comparisons). In animals at six weeks after BDL, plasma concentrations of Ang II ($400\pm 27\text{pg/mL}$) and Ang-(1-7) ($117\pm 18\text{pg/mL}$) increased 7.4 and 6.5-fold, respectively, when compared to sham-operated rats at six weeks, and approximately 2.5-fold in comparison to all other groups (Figure 1).

Liver function parameters – As expected, the animals presented post-operation liver function parameters that deteriorated over time (Table 1). Aminotransferases, bilirubin levels and alkaline phosphatase were significantly higher in all groups when compared to sham-operated animals ($p<0.05$). A progressive, significant reduction in albumin levels was also observed.

Morphological studies – Figure 2 and Table 2 display the progression of hepatic fibrosis according to time after BDL. Based on Ishak's score[28], rats at one week after BDL exhibited fibrous expansion of most portal tracts, either with or without short fibrous septa (Score 2); at two weeks, there was fibrous expansion of portal tracts with occasional portal-to-portal bridging (Score 3); at four weeks, there was fibrous expansion of portal tracts with marked bridging portal-to-portal as well as portal-to-central (Score 4); at six weeks, a probable or definite cirrhosis occurred (Score 6). Sham-operated rats (Panel A) showed a normal hepatic architecture and no apoptotic cells were counted. Other histological aspects, such as bile duct proliferation in the periphery of portal areas and apoptosis of the hepatocytes, were also detected at four or six weeks after BDL (Figure 2). Animals also exhibited a progressive increase in apoptotic cell count (Table 2).

Protocol 2 – Effect of the blockade of the Ang-(1-7) receptor Mas on the early stages of liver fibrosis

Morphological studies – At one week after BDL, rats receiving A-779 infusion presented a significant increase in hepatic fibrosis when compared to vehicle-infused animals (Figure 3, Table 3). BDL animals receiving the vehicle exhibited fibrous expansion of most portal tracts, either with or without short fibrous septa (Score 2). Fibrosis worsened in rats treated with A-779; these rats presented fibrous expansion of portal tracts with marked bridging portal-to-portal as well as portal-to-central (Score 4). A-779 alone appeared to have no effects on the liver, as there were no changes in liver histology or biochemical parameters of the liver in intact rats infused with the same dose of A-779 for one week (data not shown).

Hydroxyproline and total TGF β_1 tissue content – The histological findings were corroborated by the increase of liver tissue collagen content in A-779-treated animals. Sham-operated rats represented the basal values of hydroxyproline and total TGF β_1 content from a normal liver (Table 3). One week after BDL, liver hydroxyproline and total TGF β_1 content was significantly increased in vehicle and A-779 infused animals. However, the blockade of Ang-(1-7) Mas receptor with A-779 produced an even more pronounced elevation of both parameters than in BDL rats receiving the vehicle ($p < 0.05$).

Discussion

The present study supports the concept that the RAS possibly contributes to organ damage in the liver as well as in other tissues[2-4]. The overall activation of circulating RAS was associated with the progression of hepatic fibrosis. Our data show that liver failure is characterized by marked changes in Ang II and Ang-(1-7) levels. Furthermore, the

pharmacological blockade of endogenous Ang-(1-7) accelerated the installation of liver fibrosis by increasing collagen tissue and total TGF β ₁ content.

This study confirmed that the duration of BDL is positively correlated with the histological progression of hepatic fibrosis and metabolic disarrangement[24]. Animals at one and two weeks after BDL represented a compensated state of hepatic injury without ascites and with initial histological and biochemical changes. A significant alteration in RAS profile, however, could already be detected. Significant elevations of Ang II and Ang-(1-7) were observed in comparison to sham-operated rats, but no changes in PRA and in Ang I levels were verified. These findings indicate that the elevation of Ang II and Ang-(1-7) could be at least partially due to the local RAS source, since PRA and Ang I levels remained in the controlled range. As in the heart[3,4] and kidney[2,4], angiotensins can act either as systemic hormones (endocrine) or as locally generated factors[15,18]. This observation is in accordance with other studies that found an elevation of plasma Ang II in cirrhotic patients[28] and an up-regulation of AT₁ receptors in fibrotic liver tissue[8-10]. The normal PRA could be attributed to the intact feedback effect of high Ang II levels at this stage of the disease[7,29,30].

Four weeks after BDL, RAS profile changed toward an overall enhancement of the PRA and angiotensins. These data were associated with progression of hepatic damage, as confirmed by histological and biochemical features. Rats at this stage presented ascites and changes in water balance. RAS activation can be considered a cause and/or consequence of the homeostatic impairment produced by liver damage[31]. Rats at six weeks after BDL exhibited a cirrhotic pattern, as revealed by histological and biochemical findings. At this time, the circulating levels of Ang II and Ang-(1-7) were significantly higher than at the beginning of the process.

The precise meaning of RAS activation during liver damage remains unclear. The primary action of the RAS is to regulate vascular tone and renal salt excretion, although Ang II has a number of blood pressure-independent actions, including mitogenic and trophic effects[1,4,32]. A number of studies have found that Ang II may mediate and exacerbate liver damage[12,14]. Enhanced levels of circulating Ang II could trigger the hepatic fibrogenic cascade by activating the stellate cells through AT₁ receptors[11] and stimulating the expression of TGFβ₁[6,8,12,14]. Bataller et al[33] has recently reported that increased systemic Ang II augments hepatic fibrosis and promotes inflammation, oxidative stress and thrombogenic events in BDL rats. Other studies have found a reduction in hepatic fibrosis produced by the blockade of AT₁ receptors[8,10] and by ACE inhibition[6,7].

However, until the present study, there have been no data demonstrating the protective role of Ang-(1-7) in liver damage. This heptapeptide is formed directly from Ang I and Ang II, largely through ACE2 activity[15,18]. Once synthesized, Ang-(1-7) is rapidly hydrolyzed, especially by ACE. Paizis et al[9] found a general increase in ACE expression and other RAS components in the livers of BDL rats. More recently, the same group observed an up-regulation of ACE2 and its widespread expression throughout the liver in BDL animals and in human cirrhosis[34]. The authors believe that ACE2 up-regulation may facilitate the formation of Ang-(1-7), which may be one of the factors responsible for the vasodilation of cirrhosis[34]. Another possibility is that the elevated activity of ACE2 during hepatic injury could promote Ang-(1-7) synthesis, which may therefore represent a more general counter-regulatory response to the multiple deleterious effects of increased local Ang II production. In this regard, chronic treatment with ACE inhibitors or AT₁ blockers raises Ang-(1-7) levels[15,18,19], suggesting that this heptapeptide contributes toward the effects of RAS blockade. The physiological relevance of Ang-(1-7) as an important RAS mediator was evidenced by the use of its selective Mas receptor antagonist, A-779[20-23]. Concerning

hepatic fibrosis, we chronically infused A-779 in one-week-BDL rats to evaluate the effect of Mas receptor antagonism during the installation of the process. In BDL animals, A-779 produced an early onset of histological liver fibrosis, increased tissue collagen and total TGF β ₁ content. It should be pointed that the infusion of same doses of A-779 in intact rats failed to produce changes in liver parenchyma. These data indicate that the pro-fibrotic effects of A-779 in BDL rats were due to the blockade of Ang-(1-7) action at the Mas receptor level.

In most situations, Ang II and Ang-(1-7) have opposing actions, suggesting a primary role for Ang-(1-7) as a counter-regulatory angiotensin in the cardiovascular and proliferative actions of Ang II[15,18,32,35-42] According to previous experimental and clinical evidence, it is likely that Ang II acts as a profibrotic mediator in liver tissue[6-11,33] However, the elevation of Ang-(1-7) levels in hepatic fibrosis may be a compensatory mechanism opposing the deleterious actions of Ang II in liver tissue. Data obtained with A-779 infusion in BDL rats corroborate this hypothesis. Furthermore, our results are in keeping with recent findings showing an anti-fibrogenic effect of Ang-(1-7) in the heart through activation of the Mas receptor[37]. Tallant et al have also shown that Ang-(1-7) exhibits anti-proliferative effects on vascular smooth muscles[38,39]. Machado et al observed that Ang-(1-7) produces anti-angiogenesis in a mouse sponge model, in sharp contrast to the stimulatory action of Ang II[40]. In summary, we currently believe that Ang-(1-7)/ Mas axis could antagonize the profibrotic effects of Ang II in liver tissue as well.

There is substantial evidence to suggest that Ang-(1-7) is involved in some beneficial actions of AT₁ receptor blockers, ACE and vasopeptidase inhibitors[18,32,41,42]. We now present evidence that the mechanisms through which RAS blocking agents attenuate liver fibrosis not only by antagonize Ang II, but could also elevate of Ang-(1-7) levels. Thus, the

administration of Ang (1-7) could be used to further the understanding of fibrosis mechanisms and possibly for the treatment of liver disease.

References

1. Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regul Pept* 1999;**82**:1-17.
2. Yu L, Nobel NA, Border WA. Therapeutic strategies to halt renal fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 2002;**2**:177-81.
3. Unger T. The role of the Renin Angiotensin System in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002;**89**(suppl):3A-10A.
4. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2001;**52**:11-34.
5. Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999;**10**:S30-9.
6. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;**121**:148-55.
7. Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, *et al.* Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterology* 2000;**47**:767-70.
8. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, *et al.* Effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001;**35**:376-85.
9. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, *et al.* Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002;**123**:1667-76.
10. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;**34**:745-50.

11. Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, *et al.* Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;**118**:1149-56.
12. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;**115**:209-18.
13. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, *et al.* Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003;**124**:147-59.
14. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001;**34**:859-67.
15. Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin Angiotensin System mediator. *Mini Rev Med Chem* 2006;**6**:603-9.
16. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the Renin-Angiotensin System: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Rev* 2003;**24**:261-71.
17. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for Angiotensin-Converting enzymes. *Curr Biol* 2002;**12**:R745-52.
18. Ferrario CM, Chapell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 2004;**61**:2720-7.
19. Campbell DJ. The Renin Angiotensin and Kallikrein Kinin Systems. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;**35**:784-91.
20. Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, *et al.* Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996;**27**:875-84.

21. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, *et al.* Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7) Evidence that the actions of angiotensin (1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994;**35**:293-8.
22. Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, *et al.* Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regul Pept* 1998;**74**:177-84.
23. Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:8258-63.
24. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1984;**65**:305-11.
25. Botelho LMO, Block CH, Khosla MC, *et al.* Plasma angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation and hemorrhage. *Peptides* 1994;**15**:723-9.
26. Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, *et al.* Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 2005;**50**:935-41.
27. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;**29**:225-9.
28. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, *et al.* Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;**22**:696-9.
29. Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodés J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension. *Sem Gastroentest Dis* 1995;**6**:140-7.
30. Girgrah N, Liu P, Collier J, *et al.* Haemodynamic, renal sodium handling and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000;**46**:114-20.

31. Blendis L and Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacology & Therapeutics* 2001;**89**:221-31.
32. Santos RAS, Passaglio KT, Bader M, *et al.* Interactions between Angiotensin-(1-7), Kinins and Angiotensin II in Kidney and Blood Vessels. *Hypertension* 2001;**38**:660-4.
33. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, *et al.* Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2005;**41**:1046-55.
34. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, *et al.* Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. *Gut* 2005;**54**:1790-6.
35. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, *et al.* Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002;**40**:774-9.
36. Cesari M, Rossi GP, Pessina AC. Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: Implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2002;**20**:793-9.
37. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H1560-6.
38. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999;**34**:950-7.
39. Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003;**42**:574-9.
40. Machado RDP, Santos RAS, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 1999;**66**:67-76.
41. Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005;**38**:499-507.

42. Ferrario CM, Averril DB, Brosnihan B, *et al.* Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 2002;**62**:1349-57.

Figure legends

Figure 1 – Circulating RAS components in a rat model of hepatic fibrosis: plasma renin activity, Angiotensin I, Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) plasma levels. * $p < 0.05$ compared to sham-operated animals at the same point in time. $\Psi p < 0.05$ for the comparison of rats at six weeks after BDL with all other groups of BDL rats.

Figure 2 – Representative microphotographs of the liver sections from BDL and sham operated rats (Sirius red staining, original magnification, 100X). Panel A – Sham operated rat with normal liver architecture and the absence of fibrosis (Score 0); Panel B – BDL rat at one week showing fibrous expansion of most portal areas with or without short fibrous septa (Score 2); Panel C – BDL rat at two weeks exhibiting fibrous expansion of portal areas with occasional portal-to-portal bridging (Score 3); Panel D – BDL rat at four weeks showing fibrous expansion of portal areas with marked portal-to-portal as well as portal-to-central bridging (Score 4); Panel E – BDL rat at six weeks with definite cirrhosis (Score 6).

Figure 3 – Representative microphotographs of the liver sections from BDL rats treated with A-779 infusion or vehicle for one week (Sirius red staining, original magnification, 100X). Panel A – Vehicle infused animal with fibrous expansion of most portal areas with or without short fibrous septa, classified as Score 2. Panel B – A-779 treated rat with fibrous expansion of portal areas with marked portal-to-portal as well as portal-to-central bridging (black arrow), classified as Score 4.

Table 1 – General measures and liver function parameters in sham-operated (Sham) and bile duct ligated rats at one, two, four and six weeks.

	Sham (n=22)	1 week (n=5)	2 weeks (n=8)	4 weeks (n=7)	6 weeks (n=7)
Initial weight (g)	275 ± 14	252 ± 15	243 ± 11	281 ± 16	253 ± 9
Final weight (g)	321 ± 13	268 ± 11*	262 ± 8 *	313 ± 21	299 ± 8
Weight gain(g)	42 ± 8	16 ± 6*	15 ± 4*	49 ± 17	46 ± 6
Urine volume (mL)	12.0 ± 0.5	11.5 ± 1.5	14.2 ± 1.0	19.4 ± 1.7 *	20.4 ± 2.8 *
Water intake (mL)	41 ± 2	35 ± 5	38 ± 2	43 ± 2	43 ± 2
Food intake (g)	24 ± 2	20 ± 2	25 ± 1	26 ± 3	21 ± 1
Liver weight (g)	11 ± 1	13 ± 1	18 ± 1 *	24 ± 2 *	22 ± 1 *
Spleen weight (g)	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1 *	3.1 ± 0.3 *	2.5 ± 0.2 *
Total Bb (mg/dL)	0.3 ± 0.1	6.2 ± 0.4*	5.1 ± 0.5 *	4.0 ± 1.1 *	4.6 ± 0.2 *
Conjugated Bb (mg/dL)	0.1 ± 0.1	5.1 ± 0.6*	2.8 ± 0.3 *	3.1 ± 0.9 *	3.8 ± 0.2 *
AST (U/ L)	60 (51-72)	295(254-331) ^ψ	497(453-529) ^ψ	520(464-572) ^ψ	680(660-704) ^ψ
ALT (U/ L)	35 (30-44)	110(88-125) ^ψ	190(164-216) ^ψ	356(297-378) ^ψ	605(589-621) ^ψ
γ-GT (U/ L)	7 ± 1	45 ± 7 *	49 ± 7 *	56 ± 5 *	113 ± 8 *
ALP (U/ L)	110(96-124)	658(596-720) ^ψ	630(561-699) ^ψ	600(574-526) ^ψ	505(483-527) ^ψ
Albumin (mg/ dl)	3.8 ± 0.1	3 ± 0.1 *	2.8 ± 0.2 *	2.3 ± 0.2 *	1.5 ± 0.1 *

NOTE. Values are expressed as mean ± SD for all variables, except for AST, ALT and ALP where medians, 25% and 75% percentiles are showed. Bb – bilirubin; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; γ-GT – gama-glutamyl transpeptidase; ALP – alkaline phosphatase. *p<0.05 compared to Sham (ANOVA followed by Fisher's least significant difference method) ^ψ p<0.05 compared to Sham (Kruskal-Wallis adjusted by Bonferroni correction).

Table 2 – Semi-quantitative score of hepatic fibrosis (Ishak’s score) and apoptotic cells count (mean of cells counted per fifty histological fields) according to the time after bile duct ligation (BDL).

Time after BDL	Histological findings	Ishak’s score	Apoptotic cells count
One week	Fibrous expansion of portal areas with short fibrous septa	2.0 ± 0.7	1.5 ± 0.3
Two weeks	Fibrous expansion of portal areas with occasional portal-to-portal bridging	3.0 ± 0.5*	6.2 ± 0.5*
Four weeks	Fibrous expansion of portal areas with marked bridging (portal-to-portal and central-to-portal)	4.0 ± 0.6*	10.2 ± 0.4*
Six weeks	Cirrhosis, probable or definite	5.7 ± 0.5* ^ψ	15.5 ± 0.6* ^ψ

*p<0.05 compared to rats with one week of BDL. ^ψp<0.05 for the comparison of rats with six weeks of BDL with all other groups (ANOVA followed by Fisher’s least significant difference method).

Table 3 – Comparison between Ishak’s score, hydroxiprolin (OH-pro) and total transforming growth factor beta1 (TGFβ₁) hepatic tissue content in sham-operated rats (Sham) and bile duct ligated animals (BDL) receiving vehicle (0.9% NaCl, 1 μL/h) or A-779 (1 μg/h) for one week

	Sham (n=5)	BDL + vehicle (n=7)	BDL + A-779 (n=7)
Ishak’s score	0 ± 0	2.0 ± 0.6*	3.8 ± 0.4* ^ψ
OH-pro (μg/mg of tissue)	258 ± 32	483 ± 52*	643 ± 32* ^ψ
TGFβ₁ (pg/mg of tissue)	2104 ± 359	3557 ± 437*	4716 ± 239* ^ψ

Note. Values of OH-pro and of TGFβ₁ liver content are expressed as means ± SD. * p<0.05 for the comparison of bile duct ligated animals (BDL+vehicle and BDL+A-779) with sham operated rats (Sham). ^ψ p<0.05 for the comparison between BDL rats receiving A-779 and receiving vehicle (ANOVA followed by Fisher’s least significant difference method).

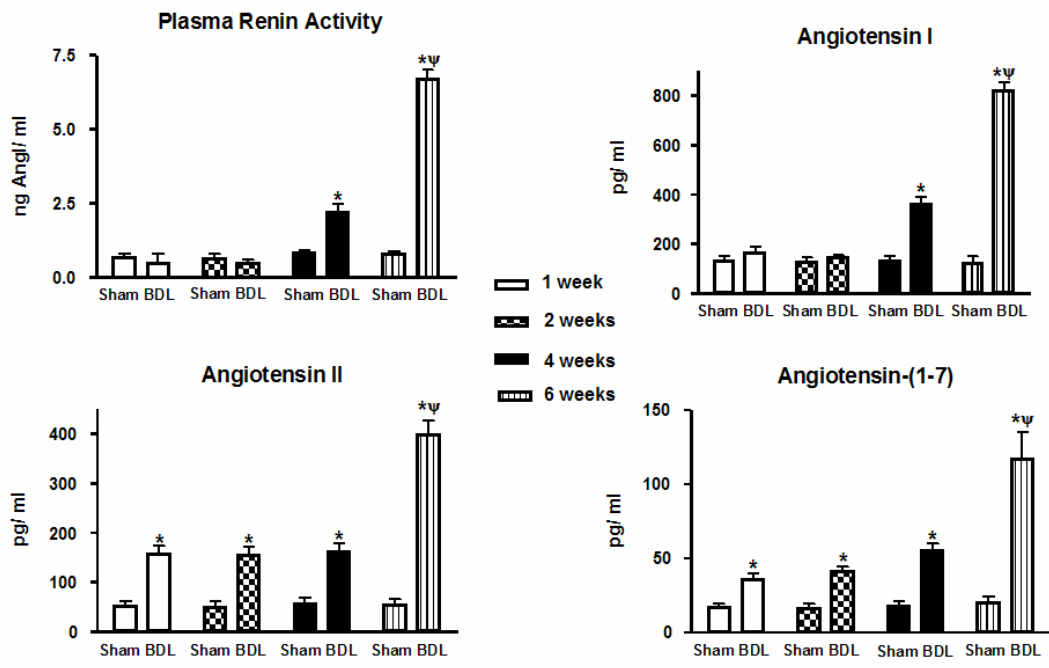


Figure 1

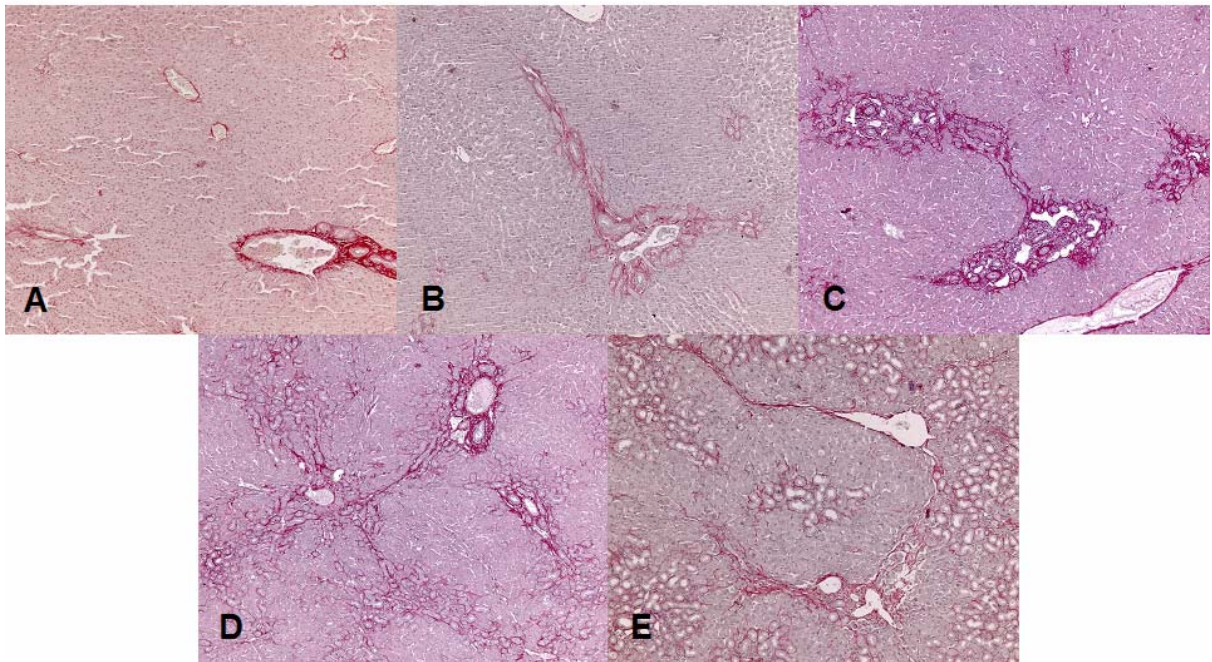


Figure 2

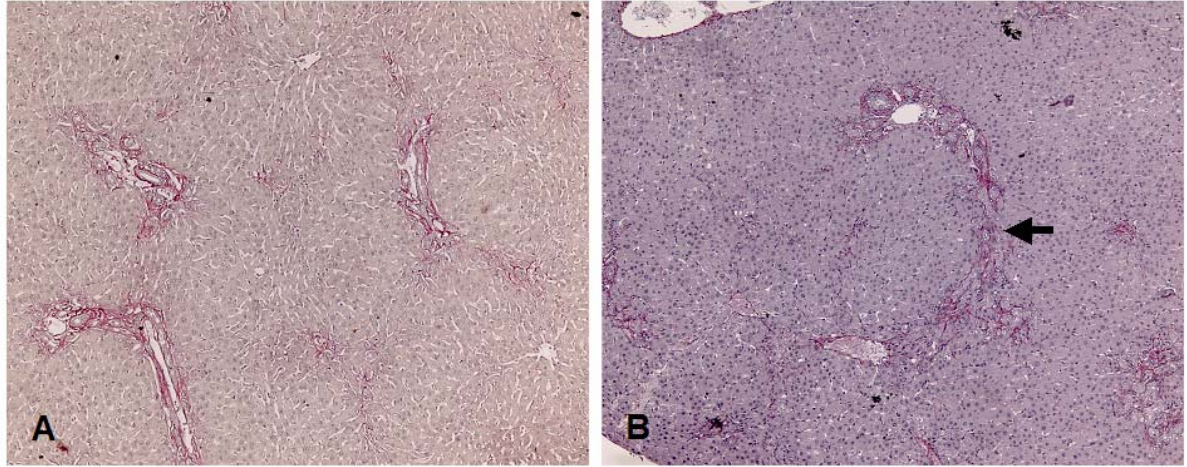


Figure 3

Artigo 2:

Changes in the circulating Renin Angiotensin System during the development of Hepatorenal Syndrome in bile duct ligated rats

Short title: Hepatorenal Syndrome and Renin Angiotensin System

Regina Maria Pereira¹, Robson Augusto Souza dos Santos², Filipi Leles da Costa Dias¹, Alysson Souza Rezende¹, Lincoln Paiva Costa¹, Guilherme Birchal Collares³, Ana Cristina Simões e Silva¹

¹Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina–UFMG, Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

³Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Medicina–UFMG, Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Correspondence to Ana C Simoes e Silva, PhD

Current address: Rua Timbiras, 1634 Apt 1704/A Funcionários

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, .CEP: 30140061

Phone: (31)23249937;

e-mail: acssilva@hotmail.com

Abstract

This study evaluated circulating Renin Angiotensin System (RAS) components [plasma renin activity (PRA), Angiotensin (Ang) I, Ang II and Ang-(1-7)] during the development of hepatorenal syndrome in a rat model of hepatic fibrosis. Male Wistar rats (220-300g) were submitted to sham surgery (control group, n=12) or bile duct ligation (BDL) under anesthesia and divided according to the time after surgery (2-weeks, n=8; 4-weeks, n=7; 6-weeks, n=7). Rats were placed in metabolic cages to measure urine volume, food and water intake. At the end of the experiment, urine and blood (decapitation) were collected to determine renal function parameters and RAS components by radioimmunoassay. Tissue histology and hydroxyproline content were evaluated in liver and kidney. Rats with 2-weeks of BDL increased free water clearance and potassium excretion, reduced the urinary osmolality and serum creatinine in comparison with control group ($p<0.05$). In contrast, rats with 4 and 6-weeks of BDL showed significant increase in serum creatinine with a reduction in creatinine clearance, water excretion and urinary sodium concentration. PRA and Ang I levels exhibited significant elevation in 4 and 6-weeks animals compared with 2-weeks and control rats. Ang II and Ang-(1-7) concentrations progressively increased according to the time after surgery, with values significantly higher than control data. Hepatic fibrosis was confirmed by histology and the increased levels of liver hydroxyproline, contrasting with normal content in renal tissue. Our data showed that hepatorenal syndrome is associated with global RAS activation and suggested that, besides Ang II, Ang-(1-7) could play a role in this process.

Key words: hepatorenal syndrome, Renin Angiotensin System, hepatic fibrosis

Introduction

Hepatorenal syndrome (HRS) has been defined as a progressive renal failure that occurs in patients with chronic liver disease and advanced hepatic failure in the absence of any apparent clinical cause for renal insufficiency [5,18]. HRS represents the final stage of a process that gradually reduces the renal blood flow and the glomerular filtration rate (GFR) due to a marked renal vasoconstriction [3,5,12,18]. Despite the severity of renal failure, no significant histological abnormalities are found in the kidneys. The prognosis of HRS is poor and, except for hepatic transplantation, there are currently no approved therapeutic options designed to delay or reverse the process.

There are many experimental models to induce hepatic cirrhosis [20]. However, two models are the most frequently used: the administration carbon tetrachloride and the common bile duct ligation (BDL) [23]. The main advantage of the BDL is to allow the study of renal function alterations in a short period of time with lower mortality rates than the administration of carbon tetrachloride [23].

Many mechanisms are involved in the development of HRS such as increased production of vasodilator factors, activation of the hepatorenal nerve reflex, hemodynamic changes that lead to systemic hypoperfusion and stimulation of vasoconstrictor humoral systems [3,5,12,18]. In this context, a growing body of evidence indicates that the Renin Angiotensin System (RAS) activation is clearly involved in the development of HRS [3,12,18]. In the presence of systemic vasodilation as occurred in hepatic cirrhosis, the RAS is inappropriately stimulated leading to an elevation of circulating and intrarenal Ang II levels [5,12]. Ang II, acting on AT₁ receptors, produces renal vasoconstriction and promotes sodium and water retention, which in turn contribute to both systemic and glomerular capillary hypertension, inducing endothelial and glomerular function alterations [5,12,15].

However, other angiotensin peptides, beside Ang II, could be involved in the development of HRS. Among the novel RAS peptides, Ang-(1-7) is particularly interesting because many studies showed that this heptapeptide are related to the mechanisms that control the function of the RAS in physiological and pathophysiological states [9,27,34]. Ang-(1-7) is produced either from Ang I or Ang II, reducing their concentration. In general, Ang-(1-7) opposes the vascular and proliferative effects of Ang II and also exerts complex renal actions [8,29,32,34] through a G protein coupled receptor denominated Mas receptor [31]. Kostenis et al [16] recently demonstrated that the receptor Mas can hetero-oligomerize with Ang II type 1 receptor (AT₁) and by so doing inhibit the actions of Ang II. Indeed, receptor Mas acts *in vivo* as an antagonist of the AT₁ receptor [16]. Consequently, the RAS could act through two opposite arms: one is constituted by the ACE-Ang II-AT₁ receptor axis and the other, a counterregulatory arm, is formed by the ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis.

The aim of this study was to evaluate the circulating RAS components [plasma renin activity (PRA), Ang I, Ang II and Ang-(1-7)] during the development of HRS in bile duct-ligated rats.

Material and Methods

Animals and experimental design – Male Wistar rats weighing 220 to 300 g were maintained under temperature controlled conditions with an artificial 12-hour light-dark cycle, and were allowed standard chow and water *ad libitum*. The hepatic fibrosis was induced by bile duct ligation (BDL). Briefly, the animals were anesthetized with intraperitoneal administration of 2.5% tribromoethanol (1 ml/ 100 g of body weight). A 1.5 cm midline incision was made and the common bile duct was located, double ligated with 4-0 silk and sectioned as previously described [17]. All animal procedures were performed according to approved protocols and in accordance with the recommendations for the proper care and use of laboratory animals.

Experimental protocol Sham-operated rats (control group, n=12) underwent a midline incision and manipulation of the bile duct, without ligation [17]. After BDL, the rats were divided according to the time after surgery: two weeks (n = 8); four weeks (n = 7) and six weeks (n= 7). Three days before blood sampling, the rats were placed in metabolic cages to measure urine volume, water and food intake. At the end of the experimental period, all animals were weighed and blood samples were collected by decapitation to determine RAS components, hepatic and renal function parameters. After killed by decapitation, the liver and spleen weight were determined, and liver and renal tissue fragments were obtained for hydroxyproline determination.

Blood Sampling

All blood samples for biochemical parameters, PRA and plasma angiotensin-immunoreactivity (ir) peptide measurements were obtained by decapitation at the end of each experimental period. The samples were collected into three different sets of ice-cooled tubes: first, empty tubes for biochemical determinations (2 ml of blood); second, tubes containing 7.5% EDTA (100µl per 1 ml of blood) for PRA determinations; and third, tubes containing a cocktail of protease inhibitors (0.01mM p-hydroxy-mercury benzoate; 1.5 mM o-phenanthroline; 0.01 mM para-methyl-sulfonyl fluoride - PMSF; 0.05 mM Pepstatin A and 10 mM EDTA) for plasma angiotensin peptide measurements (140 µl per 1 ml of blood). Blood samples were centrifuged at 2000 x g for 20 min at 4°C, and the plasma was stored at -20°C.

Plasma Extraction

Plasma samples were extracted using phenyl Bond-Elut cartridges (Analytichem International, Harbor City, CA). The columns were activated by sequential washes with 10

ml 99.9% methanol/0.1% trifluoroacetic acid (TFA), 20 ml 0.1% TFA and 3 ml 0.1% TFA containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). After application of the plasma samples, the columns were washed with 20 ml 0.1% TFA, 10 ml 20% methanol/0.1% TFA and the adsorbed peptides were eluted with 3 ml 99.9% methanol/0.1% TFA. Using this procedure, the recovery of ¹²⁵I-labeled Ang I, Ang II, and Ang-(1-7) was 79.2 ± 2.3, 86.9 ± 0.8 and 83.5 ± 0.9 %, respectively.

Radioimmunoassays

After extraction, plasma samples were resuspended in 650 µl of aqueous solution containing 0.1% BSA, 0.9% NaCl and 0.003% acetic acid. The concentration of Ang I, Ang II and Ang-(1-7) in plasma and in hepatic tissue was determined by radioimmunoassays (RIA) using three different antibodies as described in detail previously. [7] Ang I, Ang II and Ang-(1-7) were radioiodinated (¹²⁵I) by the chloramine-T method. Immediately after iodination, the peptides were partially purified by adsorption onto Bond-Elut cartridges as described above. Further purification was achieved by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu HPLC system (Shimadzu Corporation, Japan).

- **Ang I RIA** - The polyclonal Ang I antibody used for the Ang I radioimmunoassay presented a cross-reactivity of less than 0.001 % with Ang-(1-7) and Ang II. The Ang I antibody cross-reacted 100% with the carboxy-terminal fragments Ang-(2-10), Ang-(3-10) and Ang-(4-10). Extracted plasma samples (50 µl) were incubated for 18-22 hours with Ang I antibody at a final dilution of 1:10000, and with [¹²⁵I]Ang I (5000-7000 cpm/tube) in a final volume of 0.7 ml of 100 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4, containing 5% BSA. The minimal detection limit of the Ang I RIA was 2.5 pg. The inter- and intra-assay variability was 7.8% and 3.5%, respectively. Plasma Ang I-ir corresponded mainly

(over 80%) to true Ang I. The remaining immunoreactivity coeluted with Ang-(2-10), Ang-(3-10) and Ang-(4-10).

- **Ang II RIA** - A detailed documentation of the Ang II RIA was published elsewhere [7]. The polyclonal Ang II antibody cross-reacts 100 % with the angiotensin fragments, Ang-(2-8), Ang-(3-8), and Ang-(4-8). Cross-reactivity of less than 0.001 % was observed with Ang I and Ang-(1-7). Plasma Ang II-ir corresponded mainly (over 80%) to true Ang II and, to a lesser extent, to the Ang II fragments Ang-(2-8), Ang-(3-8), and Ang-(4-8).
- **Ang-(1-7) RIA** - Plasma Ang-(1-7)-ir was determined using a polyclonal antibody that cross-reacts less than 0.001 % with Ang I and Ang II, less than 0.01% with Ang-(2-7) and Ang-(3-7), and less than 0.08 % with Ang-(4-7). The analytical procedure was previously described elsewhere [7]. Briefly, extracted plasma samples (50-100 μ l) were incubated for 18-22 hours at 4°C with Ang-(1-7) antibody (final dilution 1:20000) and [¹²⁵I]Ang-(1-7), 5000-7000 cpm/tube, in a final volume of 0.4 ml of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1 % BSA, 0.02 % sodium azide, and 50 mM NaCl. The minimal detection limit of the Ang-(1-7) RIA was 3.25 pg. The inter- and intra-assay variability was 8.6% and 4.8%, respectively. HPLC analysis of a plasma pool showed that most of plasma Ang-(1-7) immunoreactivity (over 90%) was concentrated in a single peak corresponding to the elution time of synthetic Ang-(1-7). [Botelho et al, 1994] Blank samples were prepared by “extracting” in Bond-Elut cartridges an amount of inhibitor cocktail similar to that used for plasma collection. The values obtained for the blank samples were below the detection limit of the Ang I, Ang II or Ang-(1-7) RIAs.
- **PRA** - PRA was determined by incubating 0.2 ml of human plasma with 0.2 ml of Ang I buffer (0.02 ml of OH-Quinolein 48 mM and 0.01 ml of PMSF 161 mM, pH 7.4) for 2 hours at 37° C. A similar sample was incubated at 4° C for the same period of time. At the end of the incubation period, 0.1 ml of each sample was used for Ang I RIA as

described above. The PRA was calculated by subtracting the amount of Ang I formed at 37° C during the incubation period of 2 hours from the concentration of Ang I at 4° C. Results were expressed as nanograms of Ang I generated per ml of plasma per hour (ng Ang I/ml/h).

Biochemical Parameters

Aminotransferases (enzyme kinetic method), albumin (colorimetric reaction method), bilirubin (Sims-Horn colorimetric method) and alkaline phosphatase (enzyme kinetic method) were measured using Katal Kit and a semi-automatic analyzer BIO 2000. Serum and urinary levels of creatinine (Jaffe method) were measured using Katal Kit and a semi-automatic analyzer BIO 2000. Urinary and serum osmolality were determined using a freezing point Osmometer (Fiske Osmometer, Fiske Ass. Inc., MA, USA). Serum and urinary levels of sodium and potassium were measured by flame photometry (Corning 400, Corning Inc., NY, USA).

Hydroxyproline determination

To evaluate the process of fibrosis, fragments of 200 mg of liver and renal tissue were removed for hydroxyproline determination as an indirect measure of tissue collagen content as described by REDDY & ENWEMEKA, 1996 [24]. Briefly, the tissue was homogenized in saline 0.9%, frozen and liophilized. The assay was performed with 40 mg of the liophilized that was subjected to alkaline hydrolysis in 300 µl plus 75 µl NaOH 10 M at 120°C for 20 minutes. An aliquot of 50 µl of the hydrolysed tissue were added to 450 µl of Chloramine T oxidizing reagent (Chloramine T 0.056 M, *n*-propanol 10% in acetate/citrate buffer pH 6.5) and allowed to react for 20 minutes. A hydroxyproline standard curve with the highest concentration of 400 µg was prepared likewise. Colour was developed by the addition

of 500 μ l of the Ehrlich reagent (*p*-dimethylaminebenzaldehyde 1M) diluted in *n*-propanol/perchloric acid 2:1 v/v). The samples were then centrifuged for 1500 g for 10 min for 4°C. An aliquot of 200 μ l of the supernatant was transferred to 96-well plates and the absorbance was read at 550 nm.

Histological analysis

Five-micrometer-thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded right liver lobes were processed routinely for hematoxylin-eosin, Masson's tri-chromium and ammoniac silver of Gomori. A single pathologist analyzed all fragments using light microscopy.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm standard error (SE). Analysis of variance followed by Student Newman Keuls test was used to compare the difference between groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

General measures and liver function parameters – All groups of rats presented a similar body weight at the beginning of the experimental protocol (table 1). No differences were observed in water and food intake among these groups. However, the 24-hour urinary volume was significantly higher in animals with 4 and 6 weeks after BDL compared to control group. On the other hand, the 24-hour urinary volume of 2 weeks animals did not differ from control. At the end of the experimental period, the liver and spleen weight significantly increased in all groups compared to control values. At the end of the experimental protocol, the animals with 2 weeks of BDL showed less weight gain as

compared to all other groups. As expected, the animals presented deterioration of liver function parameters according to the time after surgery. As also shown in table 1, the aminotransferases, the bilirubin levels and alkaline phosphatase were significantly higher in all groups compared to sham operated animals ($p < 0.05$). A progressive and significant reduction in albumin levels was also observed. The rats of 2 weeks demonstrated some compensatory mechanisms against hepatic damage as evidenced by the absence of ascites and water retention. In sharp contrast, the animals with 4 and 6 weeks of BDL exhibited ascites, indicating the progression of hepatic dysfunction.

Renal function parameters – As shown in table 2, the rats with 2 weeks of BDL exhibit an attempt to compensate the hydroelectrolyte imbalance produced by hepatic dysfunction. These animals significantly increased water excretion, reduced the urinary osmolality and serum creatinine levels in comparison to sham-operated rats ($p < 0.05$). An elevation in potassium excretion was also observed, however the fractional excretion of this ion was unchanged in comparison to control values. In contrast, rats with 4 weeks of BDL presented a progression in renal dysfunction as showed by a significant increase in serum creatinine and a reduction in urinary sodium concentration when compared to sham operated animals ($p < 0.05$ for both comparisons, table 2). Rats with 6 weeks of BDL clearly developed hepatorenal syndrome as revealed by a complete deterioration in renal compensatory mechanisms. These animals presented high levels of serum creatinine, a pronounced decrease in creatinine clearance, and an important impairment in water excretion when compared to sham operated and 2-weeks of BDL animals ($p < 0.05$ for all comparisons, table 2). Rats with 4 and 6 weeks of BDL also presented an elevation of fractional excretion of potassium when compared to control group and animals with 2 weeks of BDL ($p < 0.05$ for both comparisons, table 2).

RAS profile - Our data showed a global activation of circulating RAS in bile duct ligated rats. As shown in table 3, PRA and Ang I exhibited a significant elevation in rats with 4 and 6 weeks after BDL compared with sham-operated animals ($p < 0.05$ for all comparisons). However, no differences were observed for PRA and Ang I levels in the rats with 2 weeks of BDL ($p > 0.05$ for both comparisons). Alternatively, a progressive increase of both Ang II and Ang-(1-7) levels was observed according to the time after surgery (2, 4 and 6 weeks), with values significantly higher than in sham operated rats (table 3).

Morphological studies – As shown in figure 1, a progression of the hepatic fibrosis characterized by crescent portal tract expansion and development of linkages was clearly observed in accordance with the time after surgery. The intensity of portal inflammation was also correlated with the time after BDL. Sham operated rats (panel A) exhibited a habitual hepatic architecture. In contrast, animals 2 weeks after BDL (panel B) presented portal enlargement by fibrosis and bile duct proliferation in the periphery of portal areas. Four weeks after BDL, the liver histology showed an expansion of portal tract by fibrosis and connective-tissue septa bridged portal to portal areas. Hydropic degeneration and apoptosis of the hepatocytes was also detected (panel C). Finally, rats with 6 weeks of BDL (panel D) also exhibited a connective-tissue septa bridged portal area to central vein, with a completed disarrangement of hepatic architecture, characterizing cirrhosis.

Hydroxyproline determination - Sham-operated rats represented the basal values of hydroxyproline content ($235 \pm 45 \mu\text{g}/\text{mg}$ of liver tissue) from a normal liver. According to the time after BDL, hydroxyproline content progressively increased in liver tissue, reaching values significantly higher than control group (2-weeks: $540 \pm 60 \mu\text{g}/\text{mg}$; 4-weeks: 863 ± 57

$\mu\text{g}/\text{mg}$; 6-weeks: $1735 \pm 73 \mu\text{g}/\text{mg}$, $p < 0.05$ for all comparisons, figure 2A). The highest amount of liver hydroxyproline was detected in animals with 6-weeks of BDL, indicating an intense collagen deposition (figure 2A). In contrast, hydroxyproline content in renal tissue remained unchanged in sham-operated animals ($288 \pm 31 \mu\text{g}/\text{mg}$ of kidney tissue) as well as in all groups of bile duct ligated rats (2-weeks: $298 \pm 55 \mu\text{g}/\text{mg}$; 4-weeks: $300 \pm 73 \mu\text{g}/\text{mg}$; 6-weeks: $294 \pm 39 \mu\text{g}/\text{mg}$, $p > 0.05$ for all comparisons, figure 2B).

Discussion

This study supported the concept that the progression of hepatic damage promotes RAS activation and the manifestation of HRS. Indeed, the duration of BDL is positively correlated with the metabolic disarrangement, the elevation of circulating RAS components and with the progression of collagen deposition.

In this context, the animals with 2 weeks of BDL presented a compensated state of hepatic injury, without ascites and alterations in water balance. These rats also exhibited a well-preserved renal function, suggesting that the homeostatic compensatory mechanisms remained intact at this moment of the hepatic damage. However, a significant alteration in RAS profile was already detected. Compared to the control group, an elevation of Ang II and Ang-(1-7) was observed, no changes in Ang I levels and a slight reduction in PRA. The elevation of Ang II and Ang-(1-7) in early stages of hepatic damage (2 weeks of BDL) could represent an attempt to compensate the metabolic disarrangement. Another possibility is that the elevation of Ang II and Ang-(1-7) can be, at least in part, due to local RAS source, since PRA and Ang I levels stayed in control range. As well as in the heart [10] and the kidney [8,34], the angiotensin peptides can act either as systemic hormones (endocrine) or as locally generated factors (paracrine, autocrine). This observation is in accordance with other studies that showed an elevation of plasma Ang II levels in cirrhotic patients [see ref 3, for review]

and an up-regulation of AT₁ receptors in fibrotic liver tissue [21,34,37]. The slight reduction of PRA could be attributed to the feed back effect of high Ang II plasma levels.

Four weeks after BDL, the rats already presented ascites, changes in water balance and an initial disturbance in renal function, revealed by sodium retention and an increase of the serum creatinine levels. RAS profile changed toward an overall enhancement of the PRA and angiotensin peptides circulating levels. These data were associated with a progression of hepatic damage, confirmed by an increase in collagen deposition. In this stage of the disease, the RAS activation can be considered as cause and/ or consequence of the hemodynamic and hydroelectrolyte impairment produced by liver injury [1,3,12].

After six weeks of BDL, the hepatic damage evolved into a non-compensated stage with features of hepatorenal syndrome, such as reduction in creatinine clearance, sodium and water retention. At this moment, the circulating levels of Ang II and Ang-(1-7) were higher than at the beginning of the process of hepatic dysfunction.

Many studies have addressed the role of RAS activation in hepatic cirrhosis and in the development of HRS [1,3,5,12,18]. The primary action of the RAS is to regulate vascular tone and renal salt excretion. During hepatic damage, it has been observed a systemic vasodilation and a hyperdynamic circulation [6]. These alterations stimulate the circulating RAS and promote an increase in plasma renin activity, Ang II and aldosterone levels, especially in the presence of HRS [3,12]. In this regard, it is well known that Ang II is one of the most powerful regulators of sodium excretion, operating through extrarenal mechanisms, such as the stimulation of sympathetic nervous system and aldosterone secretion, as well as intrarenal mechanisms [14,15,32]. In the physiological concentration range, Ang II acts mainly as an antinatriuretic hormone by directly and indirectly producing changes in renal hemodynamics and in sodium reabsorption [14,15,32]. At early stages of hepatic injury, the renal effects of Ang II represent a compensatory mechanism against the drop in organ

perfusion pressure [3,12]. However, the progression of the process culminates into a non-compensate state by compromising the negative feedback regulatory loops that leads to a vicious cycle [3,12]. Therefore, the RAS remains activated despite the hemodynamic state and the hydroelectrolyte imbalance.

It was clearly demonstrated that, resembling Ang II, Ang-(1-7) also plays a role in hydroelectrolyte balance through complex renal actions by modulating sodium and water excretion [8,29,32,34]. The question is whether Ang-(1-7) elevation in hepatorenal syndrome is a compensatory mechanism that opposes deleterious renal effects of Ang II or whether, at supra physiological concentrations, Ang-(1-7) could act as another RAS mediator of renal dysfunction.

Our group has reported that Ang-(1-7) has a potent antidiuretic activity in water-loaded rats [4,30] and mice [22,31] probably mediated by its specific G-protein coupled receptor Mas [31]. These data were in accordance with the renal effects produced by the selective Ang-(1-7) antagonists, A-779 [30,33] and D Pro⁷-Ang-(1-7) [28], and more recently, by the data obtained with the oral Ang-(1-7) receptor Mas agonist, the compound AVE 0991 [22]. In addition, some *in vitro* experiments corroborated these findings. Hence, Garcia and Garvin [11] showed that, at picomolar concentration, Ang-(1-7) increased fluid and bicarbonate reabsorption in the proximal straight tubules. Vallon et al [36] observed that intratubular Ang-(1-7) application at a concentration of 10^{-8} M augmented fluid reabsorption in micropunctured Henle's loop and, more recently, Magaldi et al [19] found that, at nanomolar concentration, Ang-(1-7) increased the water conductivity in intramedullary collecting ducts probably through an interaction between Mas and V₂ receptors. Therefore, these renal effects of Ang-(1-7) may produce kidney dysfunction, and thus could contribute to the development of hepatorenal syndrome as observed in rats with six weeks of BDL.

In contrast, other studies showed that Ang-(1-7) has natriuretic and diuretic effects in the isolated and *in situ* perfused kidney [2,8,13]. Infusion of Ang-(1-7) into the renal artery produced diuresis and natriuresis accompanied by modest increases in glomerular filtration rate [8]. In renal tubular epithelial cells, Ang-(1-7) inhibits transcellular flux of sodium which was associated with activation of phospholipase A2 and suggests that the peptide also influences Na⁺/H⁺ exchanger [2]. In addition, Ang-(1-7) appears to be an inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase activity in isolated convoluted tubules and in renal cortex [13]. In this context, the elevation of circulating Ang-(1-7) could be a compensatory mechanism for the fluid retention produced by Ang II during liver injury.

Beside important tubular actions, Ang-(1-7) is also involved in renal hemodynamic regulation. When the RAS is inappropriately stimulated, high Ang II levels, acting on AT₁ receptors, can contribute to both systemic and glomerular capillary hypertension [14,15]. On the other hand, Ren et al [25] demonstrated that Ang-(1-7) induced dilatation of pre-constricted renal afferent arterioles in rabbits and Sampaio et al. [26] showed that an infusion of low concentrations of Ang-(1-7) increased renal blood flow in rats, but the high doses of this heptapeptide produced an opposite effect. In addition, Ang-(1-7) attenuated the effect of Ang II-induced pressor responses and Ang II-enhanced noradrenaline release to renal nerve stimulation in rat isolated kidney [35]. These studies opened the possibility that Ang-(1-7) can also act as a physiological regulator of intraglomerular pressure, probably opposing the hypertensive effects of Ang II.

In spite of the controversial and complex findings, it has become clear that Ang-(1-7) participates in renal handling of sodium and water in physiological states and pathophysiological condition. Indeed, the overall state of sodium and water balance and the circulating and/or local concentrations of angiotensins may influence the direction of the observed renal actions. Further studies are necessary to clarify the precise meaning of the

elevation of plasma Ang-(1-7) levels in hepatorenal syndrome. In this regard, the agonists and antagonists of Ang-(1-7)- Mas Axis could be useful tools for the modulation of sodium and water excretion. Finally, the measurement of angiotensin peptides could be a marker of the kidney involvement in hepatic diseases.

References

43. **Aliaga L, Zozoya JM, Omar M, Mediavilla JD, and Prieto J.** Interrelationships between systemic hemodynamics, urinary sodium excretion, and renin-angiotensin system in cirrhosis. *Acta Gastro-Enterol Belg* 58:213-221, 1995.
44. **Andreatta-Van Leyen S, Romero MF, Khosla MC and Douglas JC.** Modulation of phospholipase A₂ activity and sodium transport by angiotensin-(1-7). *Kidney Int* 44: 932-936, 1993.
45. **Arroyo V and Jiménez W.** Complications of cirrhosis. II Renal and circulatory dysfunction. Lights and shadows in an important clinical problem. *J Hepatol* 32 (Suppl 1): 157-170, 2000.
46. **Baracho NCV, Simões e Silva AC, Khosla MC and Santos RAS.** Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res* 31:1221-1227, 1998.
47. **Bataller R, Sort P, Ginès P and Arroyo V.** Hepatorenal syndrome: Definition, pathophysiology, clinical features and management. *Kidney Int* 53 (Suppl 66): S47-S53, 1998.
48. **Blendis L and Wong F.** The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacology & Therapeutics* 89: 221-231, 2001.

49. **Botelho LMO, Block CH, Khosla MC and Santos RAS.** Plasma angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation and hemorrhage. *Peptides* 15 (4): 723-729, 1994.
50. **Chappell MC, Modrall JG, Diz DI and Ferrario CM.** Novel aspects of the renal Renin-Angiotensin System: Angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol* 143:77-89, 2004.
51. **Ferrario CM and Chappell MC.** Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 61: 2720-2727, 2004.
52. **Ferreira AJ and Santos RAS.** Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 38 (4): 499-507, 2005.
53. **Garcia NH and Garvin JL.** Angiotensin-(1-7) has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol* 5: 1133-1138, 1994.
54. **Gentilini P, Vizzutti F, Gentilini A, Zipoli M, Foschi M and Romanelli RG.** Update on ascites and hepatorenal syndrome. *Digest Liver Dis* 34: 592-605, 2002.
55. **Handa RK.** Angiotensin-(1-7) can interact with rat proximal tubule AT₄ receptor system. *Am J Physiol* 277: F75-F83, 1999.
56. **Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A and Navar LG.** Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol* 143: 117-130, 2004.
57. **Kim S and Iwao H.** Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52: 11-34, 2001.
58. **Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Hering-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP and Walther T.** G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111 (14): 1806-1813, 2005.

59. **Kountouras J, Billing BH and Scheuer PJ.** Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 65: 305-311, 1984.
60. **Lang F, Gerok W and Häussinger D.** New clues to the pathophysiology of hepatorenal failure. *Clin Investig* 71: 93-97, 1993.
61. **Magaldi AJ, Cesar KR, Araújo M, Simões e Silva AC and Santos RAS.** Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: Evidence for novel involvement of Vasopressin V₂ receptor. *Eur J Physiol* 447: 223-230, 2003.
62. **Olberti F, Vuillemin E, Fort J and Calès P.** Modèles expérimentaux d'hypertension portale. *Gastroenterol Clin Biol* 24: 896-901, 2000.
63. **Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM and Angus PW.** Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 123: 1667-1676, 2002.
64. **Pinheiro SVB, Simões e Silva AC, Sampaio WO, Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M and Santos RAS.** The nonpeptide AVE0991 is an angiotensin-(1-7) receptor mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 44:490-496, 2004.
65. **Poo JL, Estanes A, Chaverrí JP, Cruz C, Pérez C, Humberman A and Uribe M.** Cronología de hipertensión portal, disminución de excreción de sodio y activación del sistema renina-angiotensina en cirrosis biliar experimental. *Rev Invest Clin* 49: 15-23, 1997.
66. **Reddy GK and Enwemeka CS.** A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 29: 225-229, 1996.
67. **Ren Y, Garvin JL and Carretero OA.** Vasodilator action of Angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 39: 799-802, 2002.

68. **Sampaio WO, Nascimento NA and Santos RAS.** Systemic and regional hemodynamic effects of Angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol* 284: H1985-H1994, 2003.
69. **Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SVB, Sampaio WO, Touyz R and Campagnole-Santos MJ.** Angiotensin-(1-7) and its receptor Mas as a potential target for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1019-1031, 2005.
70. **Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, Leite MF, Lemos VS, Silva DMR, Guerra MT and Khosla MC** Characterization of a new selective antagonist for Angiotensin-(1-7), D-Pro⁷-Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 41: 737-743, 2003.
71. **Santos RAS, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M and Simões e Silva AC.** Interactions between Angiotensin-(1-7), Kinins and Angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 38: 660-664, 2001.
72. **Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Cesar KR. Passaglio KT and Baracho NCV.** Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 27: 875-884, 1996.
73. **Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R and Walther T.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 100 (14): 8258-8263, 2003.
74. **Simões e Silva AC, Baracho NCV, Passaglio KT and Santos RAS.** Renal actions of Angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 30: 503-513, 1997.
75. **Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, Khosla MC and Santos RAS.** Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective

Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regul Pept* 74: 177-184, 1998.

76. **Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ and Santos RAS.** The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin Angiotensin System mediator. *Mini-Rev Med Chem* 6(5):603-609, 2006.
77. **Stegbauer J, Vonend O, Oberhauser V and Rump LC.** Effects of angiotensin-(1-7) and other bioactive components of the renin-angiotensin system on vascular resistance and noradrenaline release in rat kidney. *J. Hypertens* 21: 1391-1399, 2003.
78. **Vallon V, Richter K, Heyne N and Osswald H.** Effect of intratubular application of angiotensin-(1-7) on nephron function. *Kidney Blood Press Res* 20:233-239, 1997.
79. **Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H and Fukui H.** Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 34: 745-750, 2001.

Figure legend

Figure 1 – Representative microphotographs of the liver sections from BDL and sham operated rats. Panel A – Sham operated or control group; Panel B – Two weeks after BDL; Panel C - Four weeks after BDL; Panel D – Six weeks after BDL.

Figure 2 – Hydroxyproline determinations in the liver and renal tissue from bile duct ligated and sham operated rats. Panel A – Hydroxyproline content in liver tissue of sham operated rats (control group), and animals with 2, 4 and 6 weeks of bile duct ligation; Panel B – Hydroxyproline content in renal tissue of sham operated rats (control group), and animals with 2, 4 and 6 weeks of bile duct ligation. * $p < 0.05$ compared to control group.

Table 1 – General measures and liver function parameters in BDL rats

	Control (n=12)	2 weeks (n=8)	4 weeks (n=7)	6 weeks (n=7)
Initial weight (g)	281 ± 16	243 ± 11	281 ± 16	253 ± 9
Final weight (g)	324 ± 15	262 ± 8 *	313 ± 21	299 ± 8
Weight gain(g)	43 ± 7	15 ± 4 *	49 ± 17	46 ± 6
Urine volume (ml)	12.0 ± 0.5	14.2 ± 1.0	19.4 ± 1.7 *	20.4 ± 2.8 *
Water intake (ml)	41 ± 1	38 ± 2	43 ± 2	43 ± 2
Food intake (g)	24 ± 1	25 ± 1	26 ± 3	21 ± 1
Liver weight (g)	11 ± 1	18 ± 1 *	24 ± 2 *	22 ± 1 *
Spleen weight (g)	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1 *	3.1 ± 0.3 *	2.5 ± 0.2 *
Total Bb (mg/dL)	0.3 ± 0.1	5.1 ± 0.5 *	4.0 ± 1.1 *	4.6 ± 0.2 *
Conjugated Bb (mg/dL)	0.1 ± 0.1	2.8 ± 0.3 *	3.1 ± 0.9 *	3.8 ± 0.2 *
AST (U/ L)	62 ± 14	491 ± 45 *	518 ± 58 *	685 ± 21 *
ALT (U/ L)	38 ± 7	180 ± 9 *	343 ± 38 *	605 ± 17 *
γ-GT (U/ L)	7 ± 1	49 ± 7 *	56 ± 5 *	113 ± 8 *
ALP (U/ L)	110 ± 32	627 ± 83 *	300 ± 28 *	505 ± 13 *
Albumin (mg/ dl)	3.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2 *	2.3 ± 0.2 *	1.5 ± 0.1 *

NOTE. Values are mean ± SEM. **Control**, sham-operated rats; **2, 4 and 6 weeks**, rats with 2, 4 and 6 weeks of bile duct ligation. **Bb** – bilirubin; **AST** – aspartate aminotransferase; **ALT** – alanine aminotransferase; **γ-GT** – γ-glutamyl transpeptidase; **ALP** – alkaline phosphatase. * p<0.05 compared to control group.

Table 2- Renal function parameters

	Control (n=12)	2 weeks (n=8)	4 weeks (n=7)	6 weeks (n=7)
Serum creatinine, mg/dL	0.60±0.10	0.28±0.05*	1.21±0.25*	2.50±0.40*
Creatinine clearance, mL/min	1.14±0.19	1.31±0.11	0.97±0.43	0.47±0.25*
Serum osmolality, mOsm/Kg	292±2	289±4	280±14*	282±3*
Urinary osmolality, mOsm/Kg	2147±115	1578±76*	1499±117*	1745±73*
Osmolal clearance, ml/min	0.061±0.003	0.049±0.002	0.071±0.009	0.088±0.013
Free water clearance, ml/min	-0.052±0.003	-0.040±0.002*	-0.056±0.008	-0.074±0.011*
Serum [Na ⁺], mEq/L	137±1	138±3	125±7	132±2*
Urinary [Na ⁺], mEq/L	111±13	102±10	57±15*	50±15*
Na ⁺ excreted, mEq	1.47±0.15	1.59±0.19	1.20±0.33	1.09±0.34
Fractional Na ⁺ excreted, %	0.65±0.17	0.63±0.13	0.91±0.40	1.72±0.61
Serum [K ⁺], mEq/L	4.5±0.3	5.1±0.4	4.0±0.5	4.3±0.1
Urinary [K ⁺], mEq/L	281±12	269±5	199±21*	180±27*
K ⁺ excreted, mEq	3.35±0.17	4.12±0.31*	3.65±0.56	3.38±0.39
Fractional K ⁺ excreted, %	38±6	43±8	>100*	>100*

NOTE. Values are mean ± SD. **Control**, sham-operated rats; **2, 4 and 6 weeks**, rats with 2, 4 and 6 weeks of bile duct ligation. [Na⁺], sodium concentration; [K⁺], potassium concentration. * p<0.05 compared to control group.

Table 3 Circulating Renin Angiotensin System profile

	Control	2 weeks	4 weeks	6 weeks
	(n=12)	(n=8)	(n=7)	(n=7)
PRA (ng Ang I/ ml/ h)	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.2 ± 1.1 *	6.7 ± 0.8 *
Ang I (pg/ ml)	128 ± 16	144 ± 11	361 ± 79 *	820 ± 91 *
Ang II (pg/ ml)	54 ± 9	155 ± 17 *	163 ± 16 *	400 ± 47 *
Ang-(1-7) (pg/ ml)	18 ± 2	41 ± 3 *	55 ± 5 *	117 ± 18 *

NOTE. Values are mean ± SD. **Control**, sham-operated rats; **2, 4 and 6 weeks**, rats with 2, 4 and 6 weeks of bile duct ligation. PRA – plasma renin activity; Ang I – Angiotensin I; Ang II – Angiotensin II and Ang-(1-7) – Angiotensin-(1-7). * p<0.05 compared to control group.

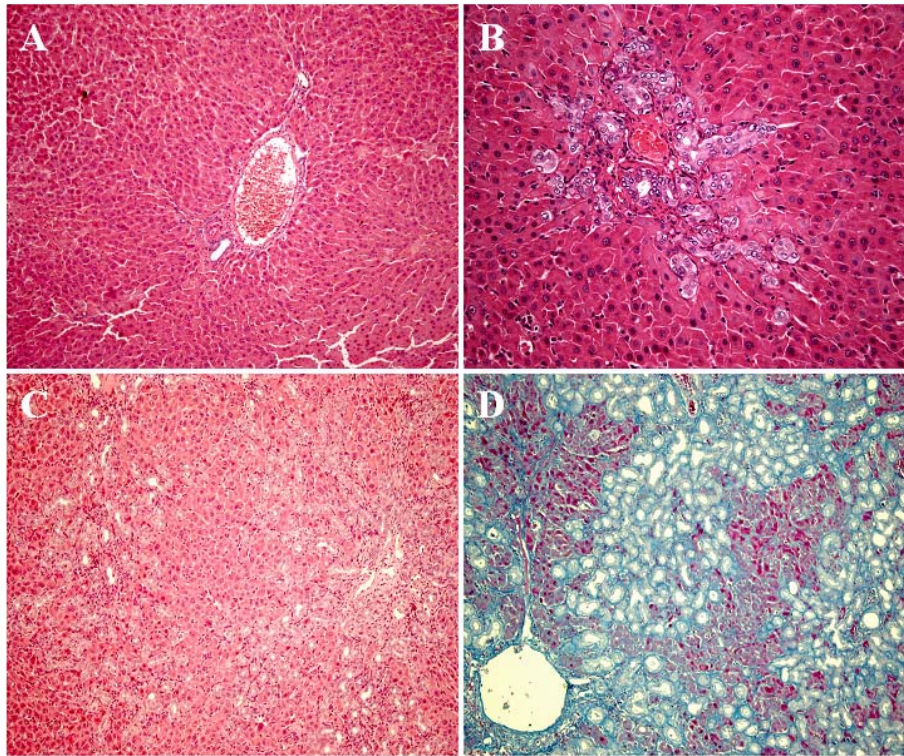


Figure 1

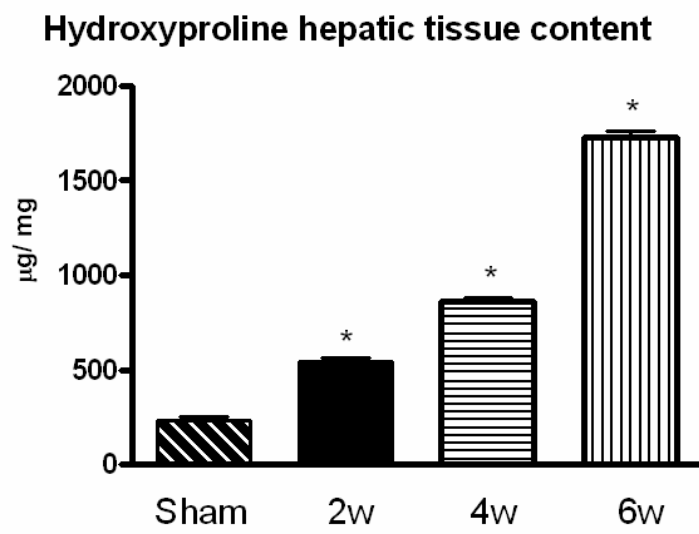


Figure 2 A

Hydroxyproline kidney tissue content

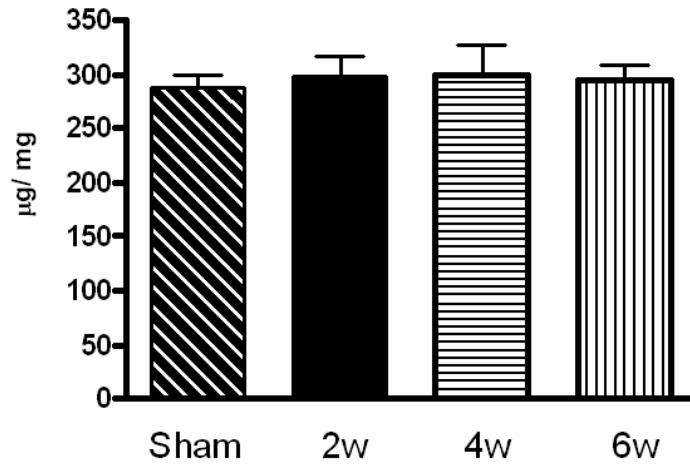


Figure 2 B

5 –COMENTÁRIOS FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem que, no fígado como em outros tecidos, a ativação do SRA contribui para o dano orgânico. A ativação global do SRA foi associada com a progressão da fibrose hepática, e a deterioração dos parâmetros de função hepática e renal. Nossos dados mostraram que a fibrose hepática é caracterizada por grandes mudanças nos níveis de Ang II e de Ang-(1-7), sugerindo o envolvimento desses peptídeos na patogênese desta doença.

Corroborando publicações anteriores (KOUNTOURAS et al, 1984; SCHEUER, 1991; POO et al, 1997; JONSSON et al, 2001; BATALLER et al, 2000; PAIZIS et al, 2001; PAIZIS et al, 2002; YOSHIJI et al, 2001), este estudo confirmou que o tempo de ligação do ducto biliar está positivamente correlacionado com a progressão histológica da fibrose hepática e o desequilíbrio metabólico produzido pelo dano hepático. Neste contexto, os animais com uma e duas semanas após LDB representam um estado compensado da doença hepática, sem ascite e/ou alterações do balanço hídrico. Esses ratos exibiram também mudanças histológicas e bioquímicas menos acentuadas. Em adição, a despeito das enzimas hepáticas já se encontrarem nitidamente aumentadas, a função renal ainda estava preservada, sugerindo que os mecanismos homeostáticos permaneceram intactos neste estágio da fibrose hepática. Entretanto, uma significativa alteração no perfil do SRA foi precocemente detectada, já presente nos animais com uma semana de LDB e mantendo-se inalterada com duas semanas de LDB. Comparando com o grupo controle, foram observadas elevações da Ang II e Ang-(1-7), nenhuma mudança nos níveis de Ang I e uma discreta redução na ARP tanto nos animais com uma quanto com duas semanas de LDB. Estes achados indicam que as elevações da Ang II e da Ang-(1-7) podem ser, pelo menos em parte, devido à síntese

tecidual de angiotensinas, ou seja, através ativação dos sistemas renina angiotensina locais (hepático, renal, vascular, por exemplo), uma vez que os níveis Ang I circulante e de ARP encontravam-se similares ao grupo controle. Nesse sentido, é importante mencionar que à semelhança do que ocorre no coração (UNGER, 2002; KIM & IWAO, 2001) e no rim (YU et al, 2002; KIM & IWAO, 2001), também no fígado as angiotensinas podem atuar tanto como hormônios sistêmicos (endócrinos) quanto como fatores localmente gerados (parácrinos, autócrinos). Esta observação está em concordância com outros estudos que mostraram uma elevação dos níveis de Ang II plasmática em pacientes cirróticos (GARCIA-PAGAN et al, 1995) e uma expressão periférica aumentada dos receptores AT₁ em tecidos hepáticos fibróticos (PAIZIS et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001; PAIZIS et al, 2002). A discreta redução da ARP pode ser atribuída ao *feed back* negativo pelos níveis aumentados de Ang II plasmática. Outros estudos têm mostrado que o dano hepático apresenta uma grande variação na ARP de acordo com o estado hemodinâmico e balanço hidroeletrólítico (HARDY & KLEINMAN, 1994; ALIAGA et al, 1995; GIRGRAH et al, 2000; LEE et al, 2000).

Quatro semanas após LDB, o perfil do SRA mudou no sentido de ocorrer um aumento global de todos os componentes do SRA circulante medidos neste estudo: ARP, Ang I, Ang II e Ang-(1-7). Esses dados estão associados com uma progressão ainda maior do dano hepático, confirmada pelos achados histológicos, pela medida da hidroxiprolina no tecido hepático e pelas alterações bioquímicas. Os ratos apresentavam ascite, alterações no balanço hídrico e um distúrbio da função renal revelado por retenção de sódio e aumento dos níveis séricos de creatinina. Neste estágio da doença, a ativação do SRA pode ser considerada como causa e/ou conseqüência dos desequilíbrios hemodinâmicos e hidroeletrólíticos produzidos pela doença hepática (BLENDIS & WONG, 2001). A ação primária do SRA consiste na regulação do tônus vascular e da excreção renal de sódio (ICHIKAWA & HARRIS, 1991; HALL et al, 1999; ICHIHARA et al, 2004), entretanto tem sido mostrado

que a Ang II apresenta inúmeros efeitos que independem da pressão arterial, incluindo ações mitogênicas e tróficas (WEBER, 1999; SANTOS et al, 2001; CESARI et al, 2002). A semelhança do que ocorre no rim (KIM & IWAO, 2001; YU et al, 2002; SCHNAPER et al, 2003) e no coração (KIM & IWAO, 2001; UNGER, 2002), vários estudos fornecem evidências para uma provável via, através da qual, a Ang II poderia mediar e exacerbar o dano hepático pela ativação das células estreladas e pelo estímulo do TGF β ₁ (BATALLER et al, 2000; JONSSON et al, 2001; PAIZIS et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001; BISSELL et al, 2001; PAIZIS et al, 2002; YANG et al, 2003).

Após seis semanas de LDB, os ratos mostraram um padrão cirrótico revelado pelos achados histológicos, pelo acúmulo excessivo de colágeno (níveis muito elevados de hidroxiprolina no tecido hepático) e pelo acentuado desequilíbrio metabólico revelado pelas significativas alterações das provas de função hepática e renal. A cirrose hepática evoluiu para um estágio descompensado com características de síndrome hepatorenal, tais como redução de clearance de creatinina e retenção hidrossalina (LANG et al, 1993; BATALLER et al, 1998; SIMÕES e SILVA, 1999; GENTILINI et al, 2002). Neste momento, os níveis circulantes de Ang II e Ang-(1-7) estavam mais elevados do que no início do processo de fibrose hepática, sugerindo a perda de mecanismos homeostáticos de controle.

Analisados em conjunto, esses dados sugerem que os peptídeos angiotensinérgicos exercem um papel na patogênese da falência hepática. A Ang II poderia agir como um mediador pró-fibrótico no tecido hepático (PAIZIS et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001; PAIZIS et al, 2002), à semelhança do que ocorre nos rins, coração e vasos sanguíneos (WEBER, 1999; KIM & IWAO, 2001; YU et al, 2002; UNGER, 2002). Estes achados são corroborados por outros estudos que mostraram uma redução da fibrose hepática após o bloqueio dos receptores AT₁ (PAIZIS et al, 2001; YOSHIJI et al, 2001) e pela inibição da ECA (LEE et al, 2000; JONSSON et al, 2001). Recentemente, BATALLER et al (2005)

mostraram que o aumento da Ang II circulante acentua a fibrose hepática e promove inflamação, estresse oxidativo e eventos trombogênicos em ratos submetidos à LDB. Dessa forma, pode-se postular que níveis aumentados de Ang II circulante podem desencadear a cascata fibrogênica pela ativação de células estreladas através dos receptores AT₁ e estímulo ao TGF- β (BISSEL et al, 2001; JONSSON et al, 2001; PAIZIS et al, 2001; BATALLER & BRENNER, 2005).

Entretanto, existe apenas um estudo recente na literatura que mencionou a possibilidade de formação de Ang-(1-7) na doença hepática (PAIZIS et al, 2005). No referido estudo foi detectado um aumento na expressão da ECA2, que é uma enzima homóloga da ECA responsável pela formação de Ang-(1-7) a partir da Ang II (DONOGHUE et al, 2000; TIPINIS et al, 2000), em fígado de ratos submetidos à LDB e de pacientes cirróticos (PAIZIS et al, 2005). Como já mencionado, a Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang I e da Ang II através da ação de peptidases teciduais, incluindo endopeptidase neutra, oligopeptidase, prolil-carboxipeptidase, prolil-endopeptidase, e, possivelmente por uma via envolvendo a enzima da família das enzimas conversoras denominada ECA2 (SANTOS et al, 2000; SANTOS et al, 2001; ERICSSON et al, 2003; RICE et al, 2004). Baseados nesse achado de aumento da ECA2, PAIZIS et al (2005) hipotetizaram que ocorra uma maior formação de Ang-(1-7) tanto em ratos submetidos à LDB quanto em pacientes cirróticos; e este pode ser um dos fatores responsáveis pela vasodilatação sistêmica presente nas hepatopatias (ALIAGA et al, 1995; BLENDIS & WONG, 2001; BONZON & HUANG, 2001). No entanto, outra possibilidade é que o aumento da síntese de Ang-(1-7) poderia representar uma resposta contrarregulatória geral aos múltiplos efeitos deletérios do aumento da produção local de Ang II.

Corroborando com essa possibilidade, o dado mais significativo desta tese foi a demonstração clara de que o bloqueio do receptor Mas da Ang-(1-7) (SANTOS et al, 2003)

em fases iniciais do processo de fibrose hepática é capaz de acentuar o processo fibrogênico através de um estímulo à deposição de colágeno e à produção de TGF- β pelo fígado. Esses dados sugerem que a Ang-(1-7), através da ligação a seu receptor Mas exerça um papel protetor em relação ao desenvolvimento de fibrose hepática, pois quando seu efeito foi bloqueado pelo uso do antagonista A-779 (SANTOS et al, 1994) houve uma progressão mais acentuada do processo de fibrose hepática. Este dado está de acordo com a observação de que, na maioria das situações, a Ang II e a Ang-(1-7) exercem efeitos opostos, sugerindo que a Ang-(1-7) desempenhe um papel primário de contrarregulação às ações vasculares e proliferativas da Ang II (SANTOS et al, 2000; SANTOS et al, 2001; KUCHAROWICZ et al, 2002; CESARI et al, 2002; REN et al, 2002). Nesse sentido, TALLANT et al (1999, 2003) mostraram que a Ang-(1-7) apresenta efeitos antiproliferativos em músculo liso vascular. Tal observação foi reforçada pelo achado de que a Ang-(1-7) produz antiangiogênese em um modelo de esponja de vaso de camundongo, contrastando com o efeito estimulatório da Ang II (MACHADO et al, 1999). Além disso, KUCHAROWICZ et al (2002) observaram que a Ang-(1-7) pode mediar, pelo menos em parte, os efeitos antitrombóticos do bloqueio do SRA. Mais recentemente, TALLANT et al (2005) mostrou que a Ang-(1-7) é capaz de inibir o crescimento de cardiomiócitos e que esse efeito se dá através da ativação do receptor Mas. Em resumo, a ligação da Ang-(1-7) ao seu receptor Mas promove vasodilatação, efeitos anti-proliferativos, anti-angiogênicos e anti-trombóticos em diferentes preparações biológicas. Dessa forma, nossos achados no tecido hepático sugerem que a Ang-(1-7) também possa exercer tais efeitos no fígado.

Outro aspecto importante deste estudo diz respeito à avaliação da função renal nos animais com LDB de diferentes durações. Como mencionado, ocorre uma alteração progressiva dos mecanismos de reabsorção de sódio e água bem como da filtração glomerular, demonstrados, sobretudo pelas alterações nas osmolalidades sérica e urinária, no clearance de água livre e no

clearance de creatinina. Pode-se aventar a possibilidade de que a Ang-(1-7) também possa estar envolvida no distúrbio homeostático produzido pela hepatopatia, uma vez que essa angiotensina também exerce inúmeras funções no controle do equilíbrio hidroeletrólítico através de efeitos renais complexos, modulando a excreção de sódio e água (SANTOS et al, 1996; SIMÕES e SILVA et al, 1997; SIMÕES e SILVA et al, 1998; BARACHO et al, 1998; MAGALDI et al, 2003; CHAPPELL et al, 2004; FERRARIO & CHAPPEL, 2004; SIMÕES e SILVA et al, 2006). SANTOS et al (1996) mostraram que a Ang-(1-7) pode agir endogenamente como um hormônio antidiurético em ratos submetidos à sobrecarga hídrica através de retenção de água e redução do ritmo de filtração glomerular. O bloqueio às ações da Ang-(1-7) através da infusão crônica de A-779 promove aumento do volume urinário, da excreção de água e do clearance de creatinina (SIMÕES e SILVA et al, 1997; SIMÕES e SILVA et al, 1998). Nesse sentido, foi verificado, *in vitro*, que a Ang-(1-7) promove reabsorção de água em segmentos isolados do túbulo coletor e este efeito envolve uma interação com o receptor V2 da Vasopressina (MAGALDI et al, 2003). Essas ações da Ang-(1-7) podem produzir disfunção renal e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento da síndrome hepatorrenal, como observado nos ratos com seis semanas de LBD. Em contraste, outros estudos verificaram que a Ang-(1-7) produz natriurese e diurese em preparações de rins isolados e perfundidos *in situ* (HANDA, 1999; CHAPPELL et al, 2004; FERRARIO & CHAPPEL, 2004). Neste contexto, a Ang-(1-7) poderia compensar a retenção de fluidos produzida pela Ang II durante a lesão hepática, reforçando a possibilidade de antagonismo aos efeitos fisiológicos da Ang II. Dessa forma, o estado global do equilíbrio de sódio e água e as concentrações circulantes e/ou locais da Ang-(1-7) poderiam influenciar os efeitos observados. Outros estudos são necessários para esclarecer o significado preciso desta elevação da Ang-(1-7) circulante sobre os parâmetros de função renal em modelo experimental de ligadura do ducto biliar.

É importante mencionar ainda que a biópsia hepática continua a ser o padrão ouro para diagnóstico da fibrose hepática. No entanto, este método apresenta como limitações: ser de caráter invasivo, apresentar variabilidade entre observadores, ter natureza estática, e possibilitar erro de amostragem (FRIEDMAN, 2003). Esforços recentes para avaliar marcadores sorológicos da fibrose hepática mostram-se promissores. O objetivo desses exames é permitir a diferenciação entre um processo fibrótico inicial de fases mais avançadas, sem caráter invasivo das biópsias hepáticas. Além disso, exames sorológicos podem permitir uma avaliação dinâmica da fibrogênese, sem variações dependentes do examinador. Baseado nessas idéias e no fato de ter sido observado um aumento progressivo de Ang II e Ang-(1-7) no plasma conforme o estágio de fibrose, pode-se vislumbrar que, no futuro, os níveis circulantes destes mediadores do SRA possam vir a ser utilizados como marcadores sorológicos da doença hepática.

A melhora do entendimento dos mecanismos subjacentes à fibrose hepática torna a terapia antifibrótica efetiva uma realidade iminente. Entretanto, o tratamento ainda continua a ser um desafio e, até o momento, nenhum agente anti-fibrótico foi aprovado para uso em humanos. É importante mencionar ainda que a Ang-(1-7) é rapidamente hidrolizada, sobretudo pela ECA e em presença de inibição da ECA e após administração crônica de bloqueadores AT₁, seus níveis aumentam várias vezes (CAMPBELL et al, 1991; SANTOS et al, 2001; CAMPBELL, 2003), sugerindo que esse heptapeptídeo possa contribuir para os efeitos dos bloqueadores do SRA. Evidências experimentais sugerem que a Ang-(1-7) está envolvida em alguns efeitos benéficos dos bloqueadores dos receptores AT₁ e dos inibidores da ECA e da vasopectidase (FERRARIO et al, 2002; FERRARIO et al, 2004; SANTOS et al, 2005). Dando suporte a esta hipótese, MAIA et al (2004) mostraram que o A-779 atenuou a resposta hipotensora à bradicinina em animais tratados com inibidores da ECA, sugerindo que a Ang-(1-7) participe dos efeitos cardiovasculares desses fármacos. Adicionalmente,

KOSTENIS et al (2005) recentemente demonstraram que o receptor Mas da Ang-(1-7) pode hetero-oligomerizar-se com o receptor AT₁ da Ang II e, através disso, inibir as ações da Ang II. Acredita-se, então, que o receptor Mas atue *in vivo* como um antagonista do receptor AT₁ (FERREIRA & SANTOS, 2005; KOSTENIS et al, 2005; SANTOS et al, 2005; SANTOS et al, 2006; SIMÕES e SILVA et al, 2006). Dessa forma, aventa-se a hipótese de que o SRA atue através de duas vias que apresentam efeitos antagônicos: a primeira, responsável pelas principais ações do sistema é constituída pelo eixo ECA-Ang II-receptor AT₁ e a segunda, a via contrarreguladora, é formada pelo eixo ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas. Neste sentido, pode-se postular que os mecanismos através dos quais os bloqueadores do SRA atenuam a fibrose hepática poderiam ser, não somente pelo antagonismo ao eixo ECA-Ang II-receptor AT₁, mas também através da ativação do eixo ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas (SIMÕES e SILVA et al, 2006). Em síntese, os dados obtidos neste estudo abrem perspectivas para que a modulação do SRA, através do uso de inibidores da ECA, antagonistas dos receptores AT₁ e, quem sabe, agonistas e antagonistas do receptor Mas da Ang-(1-7) podem passar a ser importantes ferramentas para o estudo e, talvez futuramente, para a abordagem terapêutica das hepatopatias.

Finalmente, vale ressaltar que o presente trabalho é apenas o início de uma linha de pesquisa que, por sua relevância, impõe a realização de novos estudos como, por exemplo, a avaliação de possíveis mecanismos para os efeitos antifibróticos da Ang-(1-7) no tecido hepático. Nesse sentido, pretendemos estudar as vias de sinalização intracelular do processo fibrogênico e os mecanismos de apoptose no tecido hepático dos animais submetidos à LDB, tratados ou não com o antagonista A-779 bem como a expressão do receptor Mas e dos receptores AT₁ e AT₂ no tecido hepático desses animais. Outra abordagem interessante pode ser a avaliação, neste mesmo modelo experimental, do efeito do tratamento crônico com agonistas (AVE 0991) e antagonistas da Ang-(1-7) [A-779 e D-Pro], associados ou não aos

antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂ bem como aos inibidores da ECA. Dessa forma, fica claro que este estudo abre caminho para um maior entendimento da fisiopatologia das doenças hepáticas, e, quem sabe, para um avanço no que se refere ao seu tratamento.

Referências Bibliográficas

1. Aliaga L, Zozoya JM, Omar M, Mediavilla JD, Prieto J. Interrelationships between systemic hemodynamics, urinary sodium excretion, and renin-angiotensin system in cirrhosis. *Acta Gastro-Enterol Belg* 1995; 58: 213-221.
2. Baracho NCV, Simões e Silva AC, Khosla MC, Santos RAS. Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1221-1227.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218.
4. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055.
5. Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156.
6. Bataller R, Sort P, Ginès P, Arroyo V. Hepatorenal syndrome: Definition, pathophysiology, clinical features and management. *Kidney Int* 53 (Suppl 66): S47-S53, 1998.
7. Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001; 34 (5): 859-867.
8. Blendis L and Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharmacology & Therapeutics* 2001; 89: 221-31.
9. Bonzon A and Huang YT. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol & Ther* 2001; 89: 255-272.

10. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A and Valentin AJ. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* 1991; 18: 763-773.
11. Campbell DJ. The Renin Angiotensin and Kallikrein Kinin Systems. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 784-791.
12. Cesari M, Rossi GP, Pessina AC. Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: Implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2002; 20: 793-799.
13. Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM. Novel aspects of the renal Renin-Angiotensin System: Angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol* 2004; 143:77-89.
14. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). *Circ Res* 2000; 87:1-9.
15. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for Angiotensin-Converting enzymes. *Curr Biol* 2002; 12: R745-R752.
16. Ferrario CM, Averril DB, Brosnihan B, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 2002; 62: 1349-1357.
17. Ferrario CM, Chapell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2720-2727.
18. Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 499-507.

19. Friedman SL, Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. *Hepatitis annual update* 2003; 13-39.
20. Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodés J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension. *Sem Gastrointest Dis* 1995; 6: 140-147.
21. Gentilini P, Vizzutti F, Gentilini A, Zipoli M, Foschi M, Romanelli RG. Update on ascites and hepatorenal syndrome. *Digest Liver Dis* 2002; 34: 592-605.
22. Girgrah N, Liu P, Collier J, Blendis L, Wong F. Haemodynamic, renal sodium handling and neurohormonal effects of acute administration of low dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in preascitic cirrhosis. *Gut* 2000; 46: 114-120.
23. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation : the overriding dominance of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S258-S265.
24. Handa RK. Angiotensin-(1-7) can interact with rat proximal tubule AT₄ receptor system. *Am J Physiol* 1999; 277: F75-F83.
25. Hardy SC, Kleinman RE. Cirrhosis and chronic liver failure. In: Suchy FJ, ed. *Liver disease in children*. Saint Louis: Mosby 1994: 214-248.
26. Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, Navar LG. Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol* 2004; 143: 117-130.
27. Ichikawa I & Harris RC. Angiotensin actions in the kidney. Renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 1991; 40: 583-596.
28. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn NJ, Adamson MD, Purdie DM, Powell EE. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001; 121: 148-155.
29. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2001; 52: 11-34.

30. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; 111 (14): 1806-1813.
31. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Path* 1984; 65: 305-311.
32. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2002; 40: 774-779.
33. Lang F, Gerok W, Häussinger D. New clues to the pathophysiology of hepatorenal failure. *J Clin Investig* 1993; 71: 93-97.
34. Lee JK, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Effects of single dose of 50 mg captopril in patients with liver cirrhosis and ascitis. *Hepato-Gastroenterol* 2000; 47: 767-770.
35. Machado RDP, Santos RAS, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 1999; 66: 67-76.
36. Magaldi AJ, Cesar KR, Araújo M, Simões e Silva AC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: Evidence for novel involvement of Vasopressin V₂ receptor. *Eur J Physiol* 2003; 447: 223-230.
37. Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, de Carvalho MH, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(5): 685-691.
38. Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the Renin Angiotensin System in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676.

39. Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of Angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385.
40. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, *et al.* Chronic liver injury in rat and man upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme II. *Gut* 2005; 54 (12): 1790-1796.
41. Poo JL, Estanes A, Chaverrí JP, Cruz C, Pérez C, Humberman A, Uribe M. Cronología de hipertensión portal, disminución de excreción de sodio y activación del sistema renina-angiotensina en cirrosis biliar experimental. *Rev Invest Clin* 1997; 49: 15-23.
42. Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of Angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 2002; 39: 799-802.
43. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J* 2004; 383(Pt 1):45-51.
44. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 2000; 91:45-62.
45. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligorne SM, Rodrigues ARV, Gropen Jr C, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): Evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 1994; 35 (4): 293-298.
46. Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in Angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension* 2006; 47 (5): 996-1002.

47. Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14 (8): 1019-1031.
48. Santos RAS, Passaglio KT, Pesquero JB, Bader M, Simões e Silva AC. Interactions between Angiotensin-(1-7), Kinins and Angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 2001; 38: 660-664.
49. Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Cesar KR, Passaglio KT, Baracho NCV. Evidence for a physiological role of Angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996; 27: 875-884.
50. Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100 (14): 8258-8263.
51. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13: 372-374.
52. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, *et al.* TGF β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol* 2003; 84:F243-52.
53. Simões e Silva AC, Baracho NCV, Passaglio KT, Santos RAS. Renal actions of Angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 503-513.
54. Simões e Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, Khosla MC, Santos RAS. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and Hypertensive rats. *Regul Pept* 1998; 74:177-184.

55. Simões e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin Angiotensin System mediator. *Mini-Rev Med Chem* 2006; 6(5):603-609.
56. Simões e Silva AC. Síndrome hepatorenal. In: Penna FJ, Mota JAC, Roquete MLV, Ottoni CMC, eds. *Doenças do fígado e das vias biliares – parte 2*. Rio de Janeiro: Medsi 1999: 243 - 258.
57. Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003; 42: 574-579.
58. Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1999; 34: 950-957.
59. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1560-1566.
60. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of Angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275:33238-33243.
61. Unger T. The role of the Renin Angiotensin System in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89 (suppl): 3A-10A.
62. Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regul Pept* 1999; 82: 1-17.
63. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159.

64. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001; 34: 745-750.
65. Yu L, Nobel NA, Border WA. Therapeutic strategies to halt renal fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 177-181.