

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
CARDIOVASCULARES
DO NOVO AGONISTA DO RECEPTOR
MAS, CGEN-856S**

Sílvia Silveira Quintão Savergnini Maia

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

SÍLVIA SILVEIRA QUINTÃO SAVERGNINI MAIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO NOVO
AGONISTA DO RECEPTOR MAS, CGEN-856S**

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ALVAIR PINTO DE ALMEIDA

BELO HORIZONTE

2011

SÍLVIA SILVEIRA QUINTÃO SAVERGNINI MAIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO NOVO
AGONISTA DO RECEPTOR MAS, CGEN-856S**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ALVAIR PINTO DE ALMEIDA

BELO HORIZONTE

2011

Apoio Financeiro

CNPq

INCT-NanoBioFar

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor da minha vida.

Aos meus pais, Ângelo e Rosane, pelo exemplo de vida, pela dedicação constante aos filhos e por todo o incentivo; aos meus irmãos, Frederico e Maíra, que sempre trazem alegria e motivação. Ao Frederico pelo desenho gráfico de algumas figuras desta tese.

Ao meu esposo, Marcelo, por todo amor, cuidado e suporte em todos os momentos.

Aos meus sogros, Adriel e Mariluse, pelo apoio e orações; aos meus irmãos Adriana, Daniel, Eduardo e Cláudia que, mesmo de longe, demonstram seu carinho.

Ao meu orientador, Prof. Robson Santos, pela confiança, pelo incentivo e por todo o aprendizado que me proporcionou durante estes anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Alvair P. de Almeida, sempre disposto a ajudar, obrigada pelos conselhos e aprendizado.

Ao Prof. Anderson J. Ferreira e Profa. Gerluza A. Silva, pela contribuição e ajuda na realização de parte deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão e do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, especialmente aos que contribuíram diretamente com este trabalho: Danielle, Marilene, Fúlvia, Roberto, Rodrigo e Fabiana. Ao Zezé e Betinha, obrigada pela disposição e ajuda de sempre.

Ao curso de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB/ UFMG, na pessoa do Prof. Frédéric Frezard, e às secretárias Celinha, Cintya e Nilda.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica.

RESUMO

Devido à crescente evidência dos efeitos benéficos promovidos pela Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] via receptor Mas, entre eles vasodilatação, anti-arritmogênese, anti-trombogênese, anti-fibrogênese, facilitação da função erétil e melhora do metabolismo glicêmico e lipídico, o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é, atualmente, um alvo potencial para novas abordagens terapêuticas de doenças cardiovasculares. Recentes avanços em biotecnologia permitiram a descoberta de um potencial agonista do Mas, o CGEN-856S. Isto foi possível através da utilização de uma plataforma biológica computacional, desenvolvida pela empresa de biotecnologia *Compugen*, usada para identificar novos peptídeos ligantes de receptores acoplados à proteína G. A capacidade do CGEN-856S ativar o receptor Mas foi demonstrada pela indução do influxo de cálcio em células CHO-K1 co-transfectadas com o *Mas* (Shemesh *et al.*, 2008). Neste estudo, avaliamos os efeitos cardiovasculares deste novo peptídeo, assim como sua especificidade de ligação ao Mas. Nossos dados mostram que o CGEN-856S induziu um efeito vasodilatador dependente do endotélio e da produção de óxido nítrico, em anéis de aorta de ratos e camundongos. O efeito relaxante do CGEN-856S foi mediado pela interação com o receptor Mas, como indicado pela inibição da resposta vasodilatadora na presença do A-779 e em anéis de aorta de camundongos KO-*Mas*. Nossos dados também mostram o efeito anti-arritmogênico induzido pelo CGEN-856S (0,04 nmol/L) em corações isolados de rato. Este efeito foi seguido de melhora da função cardíaca, observada pela preservação da tensão sistólica e diastólica durante a reperfusão, sem alterações na frequência cardíaca. Através da utilização do modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol, observamos que o CGEN-856S reduziu a deposição de colágeno I, III e fibronectina no coração, além de produzir efeito anti-hipertrófico. Além disso, a administração aguda (i.v.) e crônica (28 dias) do novo agonista do Mas produziu uma redução da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. Ensaio de competição de radioligante mostraram que o CGEN-856S possui baixa afinidade pelos receptores de angiotensina II, AT₁ e AT₂. Interessantemente, o composto CGEN-856S deslocou a ligação da FAM-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas*. Finalmente, o papel cardioprotetor

do novo agonista do Mas, CGEN-856S, foi também observado no modelo de insuficiência cardíaca induzida pela oclusão da artéria coronária esquerda. O tratamento com o novo peptídeo preservou a função cardíaca pós-isquêmica de ratos infartados, além de reduzir a área de infarto. Estes resultados reforçam a crescente evidência de um papel chave do receptor Mas na função cardiovascular. A descoberta do CGEN-856S como um novo agonista do Mas representa um passo importante para a exploração das ações deste receptor e para a validação de seu potencial como alvo terapêutico em patologias cardiovasculares.

ABSTRACT

The increasing evidence of the beneficial effects of Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] through the activation of its receptor Mas, as vasodilation, antiarrhythmogenesis, antitrombogenesis, antifibrogenesis, improvement of erectile dysfunction and lipidic and glycaemic metabolism, raised the possibility to develop new drugs based on the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis. Advances in biotechnology allowed the discovery of a potential Mas agonist, CGEN-856S. This was achieved using a computational biology platform, developed by the biotechnology company *Compugen*, for predicting novel naturally occurring peptides that may activate G protein-coupled receptors. CGEN-856S was found to activate the Mas receptor, in a cell-based system (Shemesh *et al.*, 2008). In this study we evaluated the cardiovascular effects of this potential Mas agonist, intending to clarify its specificity in binding Mas. CGEN-856S induced an endothelium- and NO-dependent vasodilating effect in aorta rings of mice and rats. The relaxing effect of CGEN-856S was mediated by Mas, as indicated by the lack of action in Mas *knockout* aortic rings and inhibition by the Mas antagonist, A-779. Our data also show the antiarrhythmogenic effect of CGEN-856S (0,04 nmol/L) in isolated rat hearts. This effect was followed by an improvement of the systolic and diastolic tension during reperfusion, without alterations on the heart rate. CGEN-856S also produced cardio-protection in the isoproterenol-induced heart remodeling model, as demonstrated by a reduction in collagen I, III and fibronectin staining, as well as an anti-hypertrophic effect. The acute (i.v.) and chronic (28 days) administration of CGEN-856S in spontaneously hypertensive rats produced a marked decrease in mean arterial pressure. Radioligand binding competition assay showed that CGEN-856S did not activate AT₁ or AT₂ Ang II receptors. On the other hand, the CGEN-856S induced an effective displacement of the FAM-Ang-(1-7) binding to CHO *Mas*-transfected cells. Furthermore, infarcted animals treated with the novel Mas agonist, presented an improvement of cardiac function and a reduction in myocardial infarcted area. These results reinforce the increasing evidence of a key role of Mas in the cardiovascular system. The discovery of CGEN-856S as a novel Mas agonist, might have a therapeutic value and represents an important step for exploration of the effects mediated by Mas and of its potential as a cardiovascular drug target.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
A-779	Antagonista seletivo do receptor Mas
ACE	Artéria coronariana esquerda
Ang	Angiotensina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
AT ₁₋₇ Mas	Receptor de angiotensina-(1-7)
AT ₁	Receptor angiotensinérgico subtipo 1
AT ₂	Receptor angiotensinérgico subtipo 2
Bpm	Batimentos por minuto
CEBIO	Centro de bioterismo
CHO	Células ovarianas de hamster
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FE	Fenilefrina
FN	Fibronectina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
i.p	Intraperitoneal
ISA	Índice de severidade das arritmias
ISO	Isoproterenol
i.v.	Intravenosa
Kg	Quilogramas
KO	Camundongo
<i>Knockout</i>	

KO-Mas	Camundongos <i>Knockout</i> para o receptor Mas
KR	Krebs Ringer
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginina Metil Ester
mg	Miligramas
min.	Minutos
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Neuralendopeptidase 24.11
ng	Nanogramas
nmol	Nanomol
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PBS	Tampão fosfato-salino
PCP	Prolilcarboxipeptidase
PEP	Prolilendopeptidase
pH	Concentração hidrogeniônica
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
SD	Sprague-Dawley
Seg	Segundos
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SRA	Sistema renina-angiotensina
TFA	Ácido trifluoroacético
Vs	Versus
WT	Wild Type

ÍNDICE

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Animais.....	29
3.1.2 Equipamentos.....	29
3.1.3 Drogas e reagentes	30
3.2 Métodos	32
3.2.1 Avaliação do efeito dos peptídeos CGEN em anéis de aorta de rato e camundongo.....	32
3.2.1.1 Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato e camundongo.....	32
3.2.1.2 Avaliação do efeito vascular dos peptídeos CGEN em anéis de aorta torácica de rato	33
3.2.1.3 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasodilatador dos peptídeos CGEN em aorta de ratos.....	33
3.2.1.4 Avaliação da participação do óxido nítrico no efeito vasodilatador do peptídeo CGEN-856S em aorta de ratos.....	34
3.2.1.5 Avaliação da participação do receptor Mas no efeito vasodilatador do CGEN-856S em anéis de aorta de rato	34
3.2.1.6 Avaliação da participação do receptor Mas no efeito vasodilatador do CGEN-856S em anéis de aorta de camundongo.....	34
3.2.1.7 Avaliação comparativa do efeito do CGEN-856S e da angiotensina (1-7) em aorta de ratos Wistar.....	37
3.2.2 Avaliação do efeito do CGEN, sobre as arritmias de reperfusão e sobre a função cardíaca em corações isolados de rato.....	35
3.2.2.1 Sistema de Perfusão.....	35

3.2.2.2 Solução Nutridora.....	35
3.2.2.3 Preparação do coração isolado.....	37
3.2.2.4 Canulação.....	37
3.2.2.5 Registros.....	37
3.2.2.6 Procedimento experimental para a isquemia e reperfusão.....	38
3.2.2.7 Protocolo experimental.....	39
3.2.3 Avaliação do efeito do agonistas do Mas, CGEN-856S, sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo Isoproterenol em ratos.....	40
3.2.3.1 Procedimentos para implantação de mini-bomba osmótica.....	40
3.2.3.2 Indução da hipertrofia cardíaca	40
3.2.3.4 Análise histológica.....	41
3.2.3.5 Imunofluorescência e microscopia confocal.....	41
3.2.4 Avaliação do efeito da administração aguda do agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos.....	42
3.2.4.1 Procedimentos para implantação de cânula na artéria e veia femoral.....	42
3.2.4.2 Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes	43
3.2.5 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S em ratos Wistar e SHRs.....	44
3.2.5.1 Procedimentos para implantação de mini-bomba osmótica.....	44
3.2.5.2 Procedimentos para implantação de cânula na artéria femoral.....	44
3.2.5.3 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco e renal em ratos hipertensos.....	44
3.2.5.4 Análise histológica.....	44
3.2.6 Avaliação do efeito do novo agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio em ratos.....	45
3.2.6.1 Procedimentos para a indução do infarto do miocárdio.....	45
3.2.6.2 Implantação de bomba osmótica.....	46
3.2.6.3 Procedimentos para avaliação da função cardíaca.....	46
3.2.6.4 Quantificação do infarto agudo do miocárdio.....	46
3.2.7 Avaliação da afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores da angiotensina II, AT ₁ e AT ₂	47

3.2.8 Avaliação da capacidade de ligação do CGEN-856S em células CHO transfectadas com o <i>Mas</i>	48
3.2.9 Determinação do efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA.....	48
3.2.10 Análise estatística.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Efeito dos peptídeos CGEN em aorta isolada de ratos Wistar, camundongos FVB/N e <i>Knockout</i> para o receptor <i>Mas</i>	51
4.2 Efeito do novo agonista do <i>Mas</i> , CGEN-856S, sobre a função cardíaca e sobre as arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos.....	57
4.3 Efeito do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo Isoproterenol em ratos.....	63
4.4 Avaliação do efeito da administração aguda do agonista do <i>Mas</i> , CGEN-856S, sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos Wistar e SHRs	69
4.5 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S em ratos Wistar e SHRs.....	72
4.6 Efeito do tratamento com CGEN-856S sobre a insuficiência cardíaca induzida pelo infarto agudo do miocárdio em ratos.....	77
4.7 Avaliação da afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores da angiotensina II, AT ₁ e AT ₂	82
4.8 Avaliação da capacidade de ligação do CGEN-856S em células CHO transfectadas com o <i>Mas</i>	84
4.9 Análise do efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA plasmática.....	87
5 DISCUSSÃO.....	88
6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXOS.....	113

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina-Angiotensina

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

Componentes do SRA foram identificados por biologia molecular e técnicas bioquímicas em vários tecidos, incluindo coração e artérias, levando ao conceito do SRA tecidual. Assim, este sistema não é visto somente como um sistema endócrino, mas também como um modulador autócrino e parácrino de funções teciduais (Phillips *et al.*, 1992; Wollert & Drexler, 1999).

Na visão clássica do SRA, seus principais componentes são o angiotensinogênio, a renina, a Angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a Angiotensina II (Ang II) (Figura 1). A renina é uma aspartil protease secretada por células justaglomerulares da arteríola aferente. A secreção da renina é estimulada por queda da pressão de perfusão renal, diminuição da concentração de sódio nos túbulos distais do néfron e por excitação do nervo simpático renal via estimulação β_1 -adrenérgica das células justaglomerulares (Altas *et al.*, 1998).

O angiotensinogênio é uma α_2 -globulina, considerado o único precursor dos peptídeos angiotensinérgicos. O angiotensinogênio é secretado principalmente pelo fígado, embora possa ser sintetizado e secretado em baixas concentrações por outros tecidos, como coração, vasculatura e rim (Altas *et al.*, 1998). A formação dos peptídeos angiotensinérgicos ocorre por meio de proteólise limitada iniciada pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina, formando o decapeptídeo Ang I (Asp¹-Arg²-Val³-Tir⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Fen⁸-His⁹-Leu¹⁰). Outras enzimas são capazes de clivar o angiotensinogênio em Ang I ou em Ang II diretamente. Entretanto, estudos indicam que a renina é a principal enzima que degrada o angiotensinogênio para a formação dos peptídeos angiotensinérgicos (Campbell, 2003; Carey & Siragy, 2003). Campbell (2003) sugere que outras enzimas apresentam um papel nos tecidos, enquanto a renina contribui para a formação dos peptídeos circulantes.

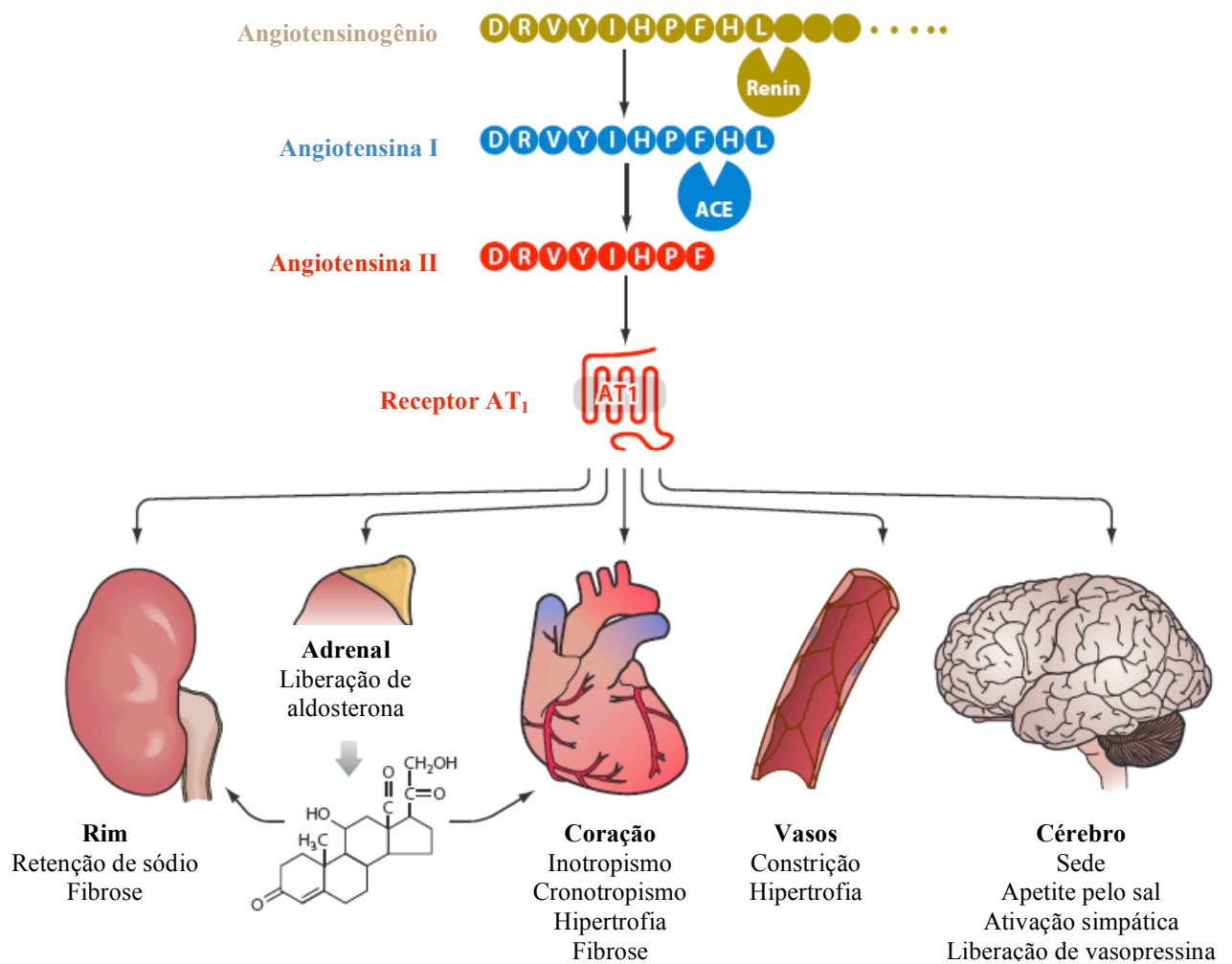


Figura 1 – Ilustração da visão clássica do sistema renina-angiotensina e principais efeitos induzidos pela Ang II através da estimulação do receptor AT₁ (modificado de Bader M, 2010).

A Ang I é um peptídeo biologicamente inativo que, sob ação da ECA é convertida no octapeptídeo Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tir⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Fen⁸). A ECA está presente em vários tecidos, sendo particularmente abundante no endotélio vascular pulmonar e nas membranas com borda em escova dos rins, intestino, placenta e plexo coróide (Wright & Harding, 1995; Turner & Hooper, 2002; Bader *et al.*, 2001). Outras enzimas também podem promover a formação de Ang II a partir da Ang I ou do angiotensinogênio, como a quimase, a tonina e a catepsina G (Belova, 2000).

As ações da Ang II, um dos principais membros ativos do SRA, são mediadas por receptores específicos de membrana, amplamente distribuídos. Existem dois principais subtipos de receptores para a Ang II: o receptor AT₁, bloqueado especificamente pelo Losartan, e o receptor AT₂, bloqueado pelo PD123319. Ambos apresentam sete domínios transmembrana e são acoplados à proteína G (GPCRs) (Kim & Iwao, 2000). Os receptores AT₁ são expressos em diversos tecidos, incluindo vasos sanguíneos, coração, rins, cérebro e pulmões. As principais ações da Ang II são mediadas por esse receptor e incluem potente vasoconstrição, elevação da pressão arterial, aumento da contratilidade cardíaca, retenção do íon sódio e água nos túbulos renais e liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais (Timmermans *et al.*, 1993; Neves *et al.*, 1997), dentre outras. O mecanismo de transdução de sinal do receptor AT₁ envolve a ativação da fosfolipase C e da fosfolipase A₂, seguida pela formação do inositol trifosfato e do diacilglicerol, os quais induzem a mobilização de cálcio citosólico e a ativação da proteína quinase C (PKC), respectivamente. Além disso, a estimulação do receptor AT₁ pode levar à inibição da adenilato ciclase, à abertura de canais de cálcio e à ativação de tirosinas quinases.

Enquanto os receptores AT₁ são amplamente distribuídos, a expressão dos receptores AT₂ é mais limitada. Sabe-se que esses receptores estão presentes principalmente em tecidos fetais em desenvolvimento, o que sugere uma possível participação na morfogênese dos órgãos (Kim & Iwao, 2000). Em adultos, o AT₂ é encontrado no útero, em células granulosas do ovário, na medula adrenal, em diferentes núcleos cerebrais, no coração e em vasos sanguíneos (Matrougui *et al.*, 1999; Kim & Iwao, 2000). Tsutsumi e colaboradores (1999) sugerem que a ativação do receptor AT₂ pode desencadear uma resposta vasodilatadora dependente da formação de cininas, óxido nítrico (NO) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Outros efeitos induzidos pelo AT₂ incluem a inibição da proliferação celular induzida pela ativação do

AT₁ e indução de apoptose (Stoll *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Entretanto, a importância funcional dos receptores AT₂ em humanos e os mecanismos envolvidos na transdução de sinal não estão claramente elucidados (Carey *et al.*, 2001).

Até pouco tempo atrás, a Ang II era considerada o único peptídeo biologicamente ativo do SRA. No entanto, nos últimos anos foram identificadas importantes ações periféricas e centrais induzidas por peptídeos menores, antes considerados fragmentos inativos. A angiotensina (1-7) [Ang-(1-7)], um heptapeptídeo com ausência da fenilalanina na posição 8 do peptídeo Ang II, é considerada, atualmente, um importante componente ativo do SRA, podendo ser gerada a partir da Ang I por via independente da ECA. A Ang-(1-7) possui um papel chave na fisiologia do SRA, atuando de forma contra-reguladora às ações da Ang II (Santos *et al.*, 2000).

Além da Ang-(1-7), novos componentes do SRA foram identificados por técnicas de biologia molecular e bioquímica, incluindo o receptor para a Ang-(1-7), Mas (Santos *et al.*, 2003), o receptor da pró-renina (Nguyen, 2007) e a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000).

A formação da Ang-(1-7) pode ocorrer diretamente a partir da Ang I pela ação da prolil-endopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP) (Welches *et al.*, 1993). Outra via de formação ocorre a partir da Ang II pela ação da PEP e prolil-carboxipeptidase (PCP), ou através da ação da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) (Braszko *et al.*, 1991; Santos & Campagnole-Santos, 1994; Chappell *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2005). A figura 2 ilustra as vias proteolíticas envolvidas na formação da Ang-(1-7).

A ECA2 é uma importante enzima formadora de Ang-(1-7), homóloga à ECA, recentemente identificada em humanos e roedores. Os domínios catalíticos da ECA e ECA2 são idênticos em 42% da sequência de aminoácidos (Donoghue *et al.*, 2000). A ECA 2 está presente principalmente em células endoteliais e artérias, arteríolas e veias do coração e dos rins e não pode ser bloqueada pelos clássicos fármacos inibidores da ECA. A ECA2 catalisa a conversão da Ang I em Ang-(1-9) e degrada a Ang II em Ang-(1-7), prevenindo desta forma, o acúmulo de Ang II enquanto favorece a formação de Ang-(1-7) (Donoghue *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2004) (Figura 2).

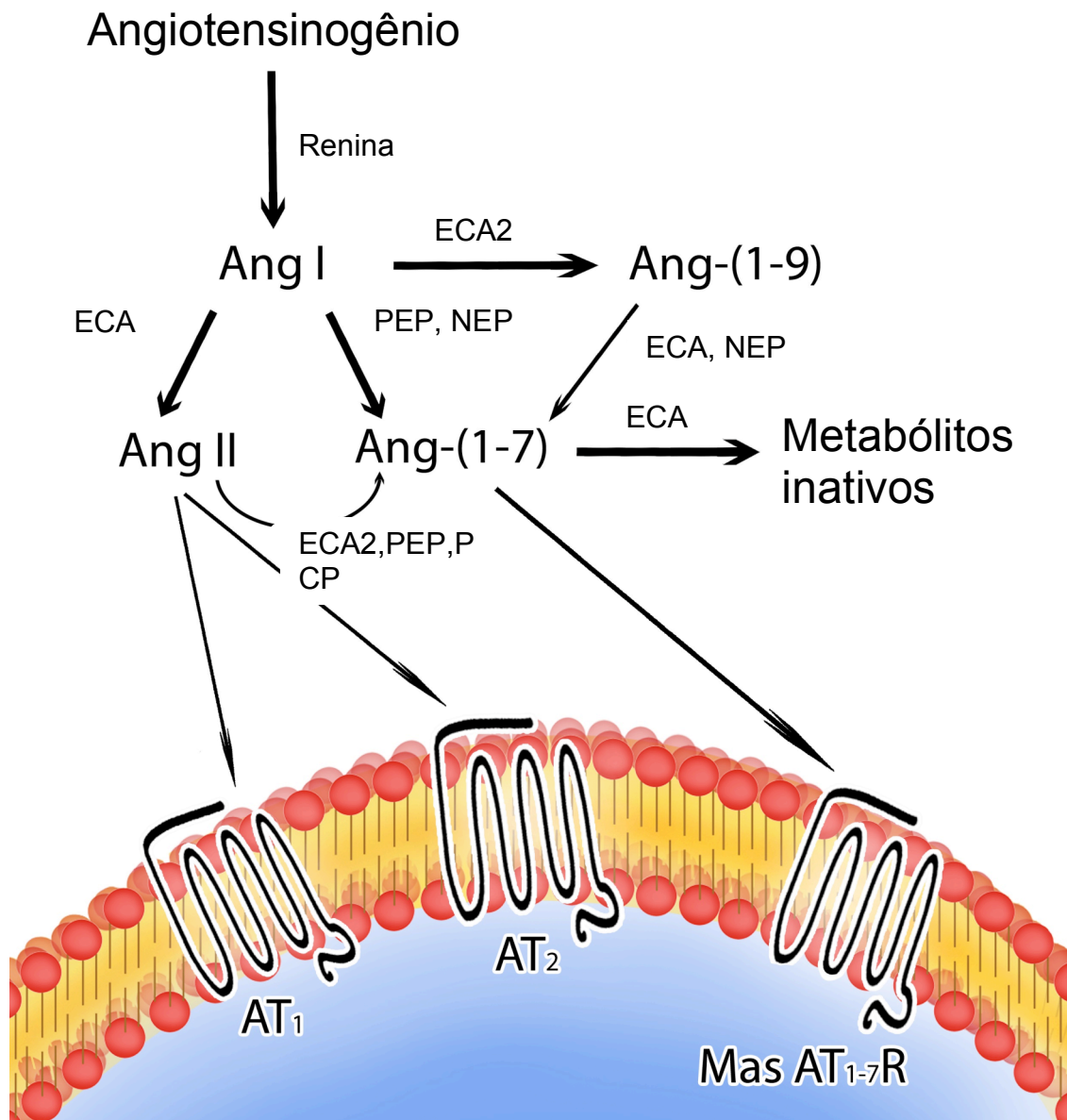


Figura 2 – Ilustração das vias de formação dos peptídeos angiotensinérgicos e dos receptores envolvidos nas ações da Ang II e Ang-(1-7). AT₁: Receptor da Ang II tipo 1; AT₂: Receptor da Ang II tipo 2; ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2; Mas-AT₁₋₇R: Receptor da Ang-(1-7), Mas; NEP: Neutralendopeptidase 24.11; PCP: Prolilcarboxipeptidase; PEP: Prolilendopeptidase. Ilustração: Frederico Severgnini.

Em 2003, Santos e colaboradores identificaram o receptor Mas como um receptor funcional para a Ang-(1-7). O protooncogene Mas é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembrana, altamente expresso nos testículos e cérebro (Metzger *et al.*, 1994; Walther *et al.*, 2000). Os seguintes resultados foram apresentados por Santos e colaboradores (2003): (1) um único sítio específico de ligação para este heptapeptídeo e estudos com o antagonista seletivo da Ang-(1-7), o A-779, indicaram a existência de um receptor distinto da Ang-(1-7), (2) a deleção genética deste receptor aboliu a ligação da Ang-(1-7) em rins de camundongos, (3) camundongos deficientes do receptor Mas perderam completamente a ação antidiurética induzida pela Ang-(1-7) após uma sobrecarga aguda de água, (4) a Ang-(1-7) se liga à célula transfectada com o receptor Mas e promove a liberação de ácido araquidônico e (5) aortas de animais deficientes do receptor Mas perdem a resposta relaxadora induzida pela Ang-(1-7). Estudos indicam que vários efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) podem ser completamente bloqueados pelo antagonista seletivo do receptor Mas, o A-779, sugerindo um papel importante do eixo Ang-(1-7)/Mas no sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2000).

Estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) exerce efeitos fisiológicos que, em sua maioria, são opostos aos efeitos da Ang II, como ilustrado na figura 3. O SRA possui a capacidade de limitar as ações pressoras e proliferativas da Ang II, através de mecanismos que dependem da geração alternativa de Ang-(1-7). Neste contexto, a Ang-(1-7) agiria como peptídeo sinalizador da ativação do mecanismo de *feedback* negativo que limitaria ou contra-regularia os efeitos produzidos pela Ang II através da estimulação de substâncias vasodilatadoras como prostaciclina, óxido nítrico (NO) ou ambos (Ferrario *et al.*, 1997). O estudo de Roks e colaboradores (1999), mostrou que a Ang-(1-7) antagoniza a vasoconstrição induzida pela Ang II em artérias de seres humanos e inibe a ECA plasmática, cardíaca e vascular, sugerindo que a Ang-(1-7) seria um modulador do SRA cardiovascular em humanos.

Outro importante efeito induzido pela Ang-(1-7) foi demonstrado por Ferreira e colaboradores, em 2001. Neste estudo, a Ang-(1-7) na concentração de 0,22 nmol/L produziu efeito anti-arritmogênico em corações isolados perfundidos de ratos, reduzindo a duração e incidência das arritmias de reperfusão. Este efeito cardioprotetor foi bloqueado pelo antagonista específico do receptor da Ang-(1-7), o A-779 [D-Ala⁷-Ang-(1-7)], e pelo pré-tratamento com Indometacina, sugerindo que a liberação de

prostaglandinas endógenas contribuem para os efeitos benéficos da Ang-(1-7). De acordo com Loot e colaboradores (2002), a infusão intravenosa de Ang-(1-7) preservou a função cardíaca, a perfusão coronariana, e a função endotelial aórtica, após a indução do infarto do miocárdio em ratos vivos. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nestas respostas provavelmente está associado à liberação de prostaciclina e/ou de NO. Além disso, a Ang-(1-7) potencializa a vasodilatação induzida pela bradicinina (BK), o que pode ser em parte, responsável pelo efeito cardioprotetor deste peptídeo (Kucharewicz *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2000).

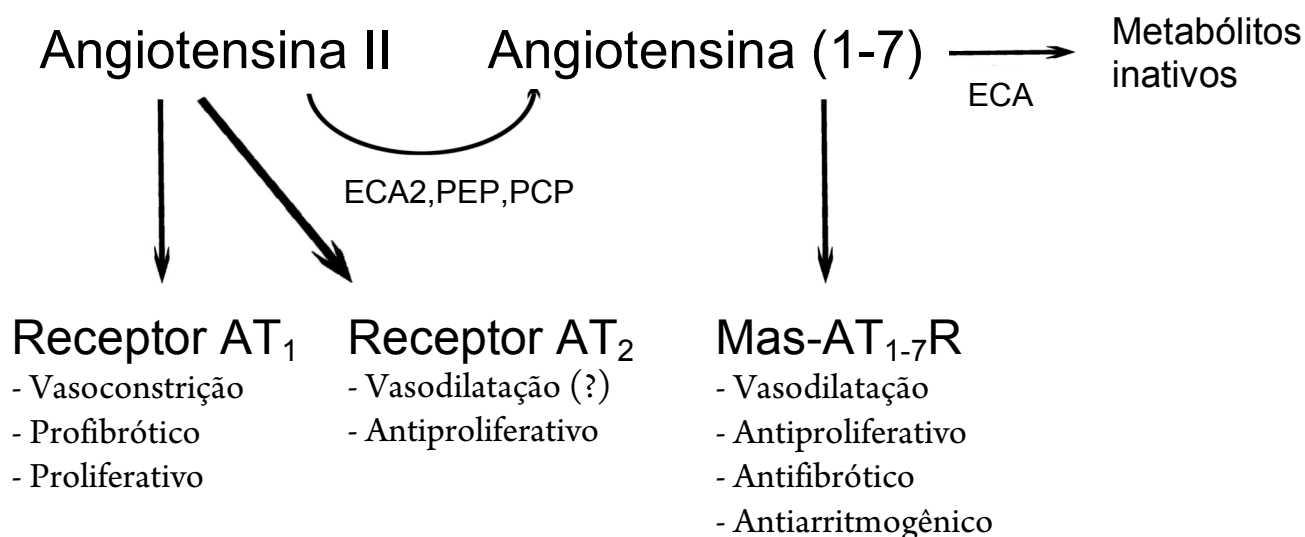


Figura 3 – Alguns efeitos mediados pelos receptores AT₁, AT₂ e Mas. AT₁: Receptor da Ang II tipo 1; AT₂: Receptor da Ang II tipo 2 ; ECA: Enzima conversora da angiotensina; ECA2: Enzima conversora da angiotensina 2; Mas-AT₁₋₇R: Receptor da Ang-(1-7), Mas; NEP: Neutralendopeptidase 24.11; PCP: Prolilcarboxipeptidase; PEP: Prolilendopeptidase. Ilustração: Frederico Severgnini.

A função protetora do Mas no sistema cardiovascular é evidenciada em diversos estudos. Camundongos com deleção genética deste receptor apresentaram função cardíaca prejudicada, caracterizada pela diminuição da fração de encurtamento, além de disfunção endotelial e marcadas alterações no metabolismo lipídico e glicêmico (Santos *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Além disso, Sampaio e colaboradores (2007) mostraram que o receptor Mas está presente no endotélio vascular arterial humano e ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via cascata fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)/Akt, o que contribui para a melhora da função endotelial.

Devido à crescente evidência dos efeitos benéficos promovidos pela Ang-(1-7) via receptor Mas, entre eles vasodilatação, anti-arritmogênese, anti-trombogênese, anti-fibrogênese, facilitação da função erétil e melhora do metabolismo glicêmico e lipídico (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Ferreira & Santos, 2005; Grobe *et al.*, 2006; Da Costa Gonçalves *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008), o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é, atualmente, um alvo potencial para novas abordagens terapêuticas de doenças cardiovasculares.

1.2 Descoberta de novos peptídeos ligantes de GPCRs

Os receptores de sete domínios transmembrana estão entre as mais abundantes famílias de receptores de superfície celular, compreendendo cerca de 800 genes do genoma humano. Tipicamente, a transdução de sinal destes receptores ocorre através de interações com proteínas G heterotriméricas em resposta a uma grande variedade de estímulos, sendo portanto também denominados receptores acoplados à proteína G. Devido à sua vasta expressão e por exercerem um papel central na patofisiologia, os GPCRs são considerados alvos farmacêuticos potenciais (Huang ES, 2005).

Nos últimos anos, um grande esforço tem sido realizado por institutos acadêmicos, empresas de biotecnologia e companhias farmacêuticas para identificar novos ligantes dos GPCRs. Atualmente, o *Projeto Proteoma* tornou-se o centro das atenções nesta área de investigação.

O termo “proteoma” foi proposto por Wilkins e colaboradores (1996) como significando o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma, as quais intervêm nos processos biológicos de uma espécie (Wilkins *et al.*, 1996). Um dos

objetivos primários do *Projeto Proteoma* consiste em selecionar e visualizar o máximo de proteínas possível de uma fonte, permitindo que sejam catalogadas computacionalmente e estudadas por técnicas analíticas (Souza *et al.*, 1999). Dados de análise de diversas proteínas são armazenados em forma de *Mapas de Proteomas* disponíveis na Internet. A existência destes mapas permite que pesquisadores de todo o mundo, trabalhando em diversos assuntos envolvendo expressão de proteínas, tais como efeito de fármacos, condições patológicas, diferenciação celular, comparação de variedades da mesma espécie e respostas celulares a estímulos externos diversos, possam identificar mais facilmente as proteínas expressas ou reprimidas (Souza *et al.*, 1999). O conhecimento da função de uma proteína específica permite explorar seu potencial de utilização na elaboração de determinado medicamento (Lanças *et al.*, 2003).

Uma série de métodos computacionais tem sido aplicada com sucesso para facilitar a descoberta de novas proteínas e seu correspondente receptor. A bioinformática serve como uma ferramenta poderosa, a qual suplementa os esforços experimentais através de uma avaliação computacional preliminar, identificando eficientemente candidatos a ligantes de GPCRs, especialmente peptídeos (Shemesh *et al.*, 2008).

Através de um método computacional desenvolvido recentemente pela empresa de biotecnologia *Compugen Ltd* (Tel Aviv, Israel), foi possível descobrir novos ligantes de GPCRs inseridos no proteoma humano, inclusive ligantes potenciais para o receptor da Ang-(1-7), Mas. Esta plataforma biológica computacional utilizou-se de um programa de algoritmos criados para identificar novos peptídeos clivados a partir de proteínas secretadas (Kliger *et al.*, 2008; Shemesh *et al.*, 2008). Desta forma, os ligantes identificados podem existir endogenamente devido à proteólise natural.

A identificação dos novos peptídeos realizada através desta plataforma computacional, foi baseada nos seguintes passos computacionais: 1) Criação de um conjunto de dados para a identificação de sítios proteolíticos; 2) Criação de um conjunto de dados para a predição do peptidoma humano; 3) Avaliação da probabilidade de cada peptídeo ser um ligante de GPCRs. Cada passo computacional é abordado a seguir.

1.2.1 Criação do conjunto de dados para a identificação de sítios proteolíticos

As proteínas de mamífero conhecidas (totalizando 28.780 proteínas) foram retiradas do banco de dados *Swiss Protein* (Bairoch *et al.*, 2005). Destas, 11.705 foram classificadas como proteínas secretadas ou proteínas de membrana, de acordo com as anotações do banco de dados. Deste grupo, 553 proteínas foram selecionadas por possuírem sítios proteolíticos peptídeo convertase, conforme as anotações da base de dados. Este sub-grupo foi utilizado como controle positivo de aprendizagem para informar o programa de classificação algoritmo de Breiman. O grupo negativo consistiu de proteínas com sítios não-proteolíticos, retiradas do banco de dados *Swiss Protein*, de acordo com as anotações do mesmo.

1.2.3 Criação do conjunto de dados para a predição do peptidoma humano

A segunda etapa do processo consistiu na criação de um secretoma humano, através da análise de proteínas humanas das seguintes fontes: 1) banco de dados *Uniprot/Swiss Protein* e 2) banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (GenBank™ versão 149).

Foram retiradas 29.530 proteínas do banco de dados *NCBI*. As anotações do *Uniprot* foram usadas para selecionar apenas as proteínas que continham peptídeo-sinal. Para cada sequência de proteína precursora, os seguintes procedimentos foram usados para gerar os produtos peptídicos finais: 1) remoção do peptídeo sinal e 2) atribuição de pontos aos sítios de clivagem identificados pelo programa algorítmico. Cada sítio de clivagem foi pontuado com um valor entre 0 e 10, em que “0” representou um sítio de clivagem conhecido e “10” correspondeu a um sítio de clivagem improvável. Foram selecionados apenas os peptídeos que continham sítios de clivagem com pontuação menor ou igual a 4. Alguns critérios foram aplicados para a seleção dos peptídeos, resultando em uma lista final de milhares de peptídeos (o “peptidoma”), os quais foram utilizados como uma fonte de dados para a predição de ligantes de GPCRs.

1.2.3 Predição de peptídeos ligantes de GPCRs

Para selecionar prováveis ligantes de GPCRs, foi implementado um programa computacional de classificação, baseado no algoritmo *Random Forest* (Shemesh *et al.*, 2008). Um grupo conhecido de ligantes de GPCRs foi retirado do banco de dados *Uniprot* e utilizado pelo programa computacional como grupo positivo. Peptídeos não ligantes de GPCRs, selecionados de acordo com as anotações do *Uniprot*, foram utilizados como grupo negativo. Para otimização do processo, um classificador foi programado para avaliar uma série de parâmetros, entre eles a extensão do peptídeo e a frequência de cada aminoácido do peptídeo.

Baseado em parâmetros numéricos, o programa de classificação foi formatado para distinguir entre o grupo de ligantes conhecidos e o grupo negativo. O programa atribuiu uma pontuação para cada peptídeo predito, correspondendo à probabilidade de ser um ligante ativador de GPCR. No final do processo foi gerado um conjunto de 100 peptídeos, os quais receberam as maiores pontuações. Estes foram submetidos a um processo manual de análise e revisão da literatura por diversos pesquisadores. A seleção final dos prováveis ativadores de GPCRs foi baseada em critérios tais como: conservação da sequência e sítios de clivagem do peptídeo na proteína precursora; número de resíduos cisteína e pontes dissulfeto; perfil de expressão e especificidade tecidual do precursor em relação ao receptor. Assim, o processo de seleção manual resultou em um subgrupo de 33 novos peptídeos, indicados como prováveis ligantes GPCRs (Shemesh *et al.*, 2008).

1.2.4 Descoberta de novos peptídeos ligantes do receptor Mas

Os 33 peptídeos descobertos foram avaliados quanto à ativação de 152 GPCRs escolhidos de acordo com a relevância clínica, dentre eles o receptor Mas. A capacidade destes novos peptídeos ativarem o Mas foi investigada em um ensaio de fluxo de cálcio, utilizando células ovarianas de hamster (CHO-K1) co-transfectadas com o *Mas* e $G\alpha_{16}$. Dois dentre os 33 peptídeos induziram o influxo de cálcio nestas células. Estes dois peptídeos foram denominados CGEN-856 e CGEN-857 (sequência de aminoácidos FLGYCIYLNKRRGDPAFKRRLRD e SMCHRWSRAVLFPAAHRP, respectivamente). Ambos não possuem homologia às angiotensinas, a ligantes de GPCRs conhecidos ou um ao outro. Os dois peptídeos contêm um aminoácido cisteína (C) em sua composição e, com o objetivo de evitar a formação de pontes dissulfeto,

duas formas de cada peptídeo foram criadas: 1) as formas monômeras CGEN-856S e CGEN-857V, onde a cisteína foi substituída por serina (S) e valina (V), respectivamente; e 2) as formas dímeras via ligação S-S, denominadas CGEN-856 e CGEN-857.

As formas dímeras e monômeras dos peptídeos CGEN induziram o influxo de cálcio em células CHO-K1 co-transfectadas com o *Mas*, sugerindo serem agonistas do receptor *Mas* (Shemesh *et al.*, 2008). Portanto, os peptídeos CGEN são candidatos a agentes terapêuticos em condições benéficas de aumento da atividade do receptor *Mas*, tal como hipertensão, insuficiência cardíaca, remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio e outras patologias. Neste estudo, o composto peptídico CGEN-856S foi selecionado a partir de testes preliminares para ser investigado em vários modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do novo agonista do receptor Mas, o CGEN-856S, no sistema cardiovascular.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar o efeito dos peptídeos CGEN-856, CGEN-856S, CGEN-857 e CGEN-857V na reatividade vascular em anéis de aorta de ratos.
2. Avaliar a participação do endotélio, bem como do mediador endotelial óxido nítrico no efeito vasodilatador do CGEN-856S em anéis de aorta de ratos.
3. Avaliar a participação do receptor Mas no efeito vasodilatador induzido pelo CGEN-856S em anéis de aorta de ratos e camundongos.
4. Determinar o efeito do CGEN-856S na função cardíaca e nas arritmias de reperfusão em coração isolado de rato.
5. Avaliar o efeito do peptídeo CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo isoproterenol em ratos.
6. Investigar o efeito da administração aguda do CGEN-856S sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos.
7. Investigar o efeito da administração crônica do CGEN-856S sobre a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos.
8. Investigar o efeito da administração crônica do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco e renal em ratos hipertensos.
9. Avaliar o efeito do CGEN-856S na insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio em ratos.
10. Avaliar a afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores da angiotensina II, AT₁ e AT₂.
11. Determinar o efeito do CGEN-856S sobre a atividade da enzima conversora da angiotensina.
12. Avaliar a capacidade de ligação do CGEN-856S ao receptor Mas em células ovarianas de hamster (CHO) transfectadas com o *Mas*.

Material e Métodos

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistars e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs), machos, de 12 a 16 semanas de idade (220-300g), provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Utilizamos também camundongos com deleção do protooncogene *Mas* (KO-Mas) e seu controle Wild Type (WT) da linhagem FVB/N, de 12 a 14 semanas de idade (25-30g), provenientes do biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Os animais foram mantidos engaiolados, em ambiente com controle de temperatura e luz (14 horas luz, das 06 às 20h), e livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 149/10.

3.1.2 Equipamentos

- Sistema de Langendorff para coração isolado
- Sistema de vaso isolado
- Transdutor de força (Biopac System, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA)
- Transdutor de pressão (Biopac System, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA)
- Sistema Biopac, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA.
- Microcomputador contendo o sistema de aquisição de dados Acqknowledge
- Balança analítica PRECISION PR-100 (Spec)
- Balança analítica AM 5500 AUTOMARTE (Marte)
- Bomba de vácuo Q-355 B (Quimis)
- Bomba de perfusão
- Centrífuga refrigerada
- Centrífuga evaporadora (Eppendorf, Alemanha)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Agitador de tubos (Quimis)
- Filtro EXPRESS™ 0.22 µm (Millipore)

- Guilhotina manual
- Microscópio Olympus BX 41
- Estufa incubadora (Function Line, Heraeus Instruments)
- Ph metro
- Banho-Maria
- Centrífugas com velocidades e capacidades diferentes
- Material e instrumental cirúrgico: tesouras, pinças anatômicas, pinça dente de rato, porta agulha e fio de sutura.
- Vidraria e material de laboratório: balões volumétricos, béqueres, provetas, pipetas graduadas, pipetas automáticas, placas de Petri, seringas de plástico, agulhas, tubos de polietileno, ponteiras, cânulas de silicone e cânula de polietileno.

3.1.3 Drogas e reagentes

3.1.3.1 Peptídeos CGEN

Os peptídeos CGEN foram manufacturados pela companhia *Pepscan Inc.* (Holanda). Os compostos foram purificados por cromatografia líquida de alta pressão (>90% de pureza) e confirmado por espectometria de massa. Os compostos apresentam alta hidrossolubilidade (solubilidade em salina estéril, 21,6 mg/mL). Os frascos contendo o peptídeo em pó foram mantidos em freezer -20°C até o momento do experimento. Para a realização dos experimentos, os peptídeos foram diluídos em salina estéril (NaCl 0,9%) imediatamente antes de sua utilização. Informações adicionais sobre os peptídeos encontram-se abaixo.

CGEN-856

Peso molecular: 6027,1 g/mol

Pureza: 95% em ácido trifluoroacético (TFA)

Aparência: pó branco

CGEN-856S

Peso molecular: 2998,4 g/mol

Pureza: 95% em TFA

Aparência: pó branco

CGEN-857

Peso molecular: 4243,0 g/mol

Pureza: 95% em TFA

Aparência: pó branco

CGEN-857V

Peso molecular: 2118,5 g/mol

Pureza: 95% em TFA

Aparência: pó branco

3.1.3.2 Outras drogas e reagentes

- NaHCO₃ PM 84,01 (Synth, Brasil)
- CaCl₂ . 2H₂O PM 147,02 (Nuclear, Brasil)
- KCl PM 74,55 (Synth, Brasil)
- NaCl PM 58,44 (Merck, Alemanha)
- KH₂PO₄ PM 136,09 (Synth, Brasil)
- MgSO₄ . 7H₂O PM 246,47 (Synth, Brasil)
- Dextrose anidra PM 180,16 (Synth, Brasil)
- D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A-779; Sigma)
- Isopropanol (Merck, Alemanha)
- Etanol (Merck, Alemanha)
- Metanol (Merck, Alemanha)
- FAM-Ang-(1-7) (Sigma)
- Captopril (Sigma)
- Benzoginoestril® (SARSA- Hoechst Marion Roussel)
- Salina estéril (0,9% NaCl)
- Tribromoetanol
- Pentobarbital sódico
- Cloridrato de Xilazina (Rompun)
- Cloridrato de Ketamina
- Albumina Bovina (BSA) PM 203,43 (Sigma, USA)
- Heparina (Roche, Brasil)
- Bala de carbogênio (White Martins)

- Fenilefrina (Sigma, St. Louis, USA)
- Acetilcolina (Sigma, St. Louis, USA)
- L-NAME (Sigma, St. Louis, USA)
- Parafina (Paraplast® X-tra Tissue Embedding Medium, Mc Cormick Scientific)
- Hematoxilina-eosina (Sigma)
- Tricromo de Gomori
- Microcâmera JVC TK-1270/RGB
- Sirius Red collagen stain (Sigma)
- Anti-colágeno tipo I humano produzido em coelho (Rockland),
- Anti-colágeno tipo III humano produzido em coelho (Rockland)
- Anti-fibronectina humana produzida em coelho (Rockland).
- Bomba de infusão (Harvard Apparatus, Inc, USA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação do efeito dos peptídeos CGEN em anéis de aorta de rato e camundongo

3.2.1.1 Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato e camundongo

Os anéis de aorta de rato foram montados segundo descrito por Lemos e colaboradores (1999). Os animais foram sacrificados por decapitação e a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. O material biológico foi transferido para uma placa de *Petri* contendo solução nutritora de Krebs-Henseleit (mmol/L): NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,07; CaCl₂ 2,49; KH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51. A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 3-4 mm (ratos) ou 2-3 mm (camundongos). Para obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram acondicionados em cubas de 10 mL, contendo solução de Krebs-Henseleit aerada continuamente com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% de CO₂), mantida à temperatura de 37 ± 1°C e pH de 7,4. Duas hastas metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso. Um dos triângulos foi fixado e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis de aorta de ratos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 g e os anéis de aorta de camundongos foram submetidos a 0,5 g de tensão, regulada na primeira hora do experimento para

estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se evitar o acúmulo de metabólitos, como também a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Os registros experimentais foram obtidos a partir de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. Utilizando-se o programa Windaq (World Precision) para aquisição e análise dos dados experimentais.

Após o período de estabilização, o vaso foi pré-contraído com Fenilefrina (FE; 0,1 μM) (Sigma, St. Louis, USA) e, uma vez que a contração atingiu um platô, a presença do endotélio funcional foi confirmada pela administração de Acetilcolina (ACh; 1 μM em anéis de aorta de ratos ou 10 μM em anéis de aorta de camundongos; Sigma, St. Louis, USA). Os anéis de aorta que apresentarem um relaxamento superior a 70% em relação à contração máxima induzida pela Fenilefrina, foram considerados como contendo endotélio funcional. Quando necessário, a remoção do endotélio foi feita de forma mecânica, com o auxílio de uma haste metálica friccionada delicadamente ao lúmen do vaso. A retirada do endotélio foi confirmada pela ausência de efeito relaxante em resposta a Acetilcolina, nos vasos pré-contraídos com Fenilefrina.

3.2.1.2 Avaliação do efeito vascular dos peptídeos CGEN em anéis de aorta de rato

Após o teste de funcionalidade vascular, os vasos foram lavados com solução de Krebs-Henseleit de 15 em 15 minutos, durante 30 minutos. Após esse período, os vasos foram pré-contraídos com FE (0,1 μM) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com os peptídeos CGEN, na concentração de 0,0001 a 1 μM .

3.2.1.3 Avaliação do papel do endotélio no efeito vasodilatador dos peptídeos CGEN em aorta de ratos

Foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com os peptídeos CGEN (0,0001 – 1 μM) em vasos desprovidos de endotélio funcional, pré-contraídos com FE (0,1 μM).

3.2.1.4 Avaliação da participação do óxido nítrico no efeito vasodilatador do peptídeo CGEN-856S em aorta de ratos

Vasos contendo endotélio funcional foram pré-incubados com 100 μM de N^{G} -Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) (Sigma, St. Louis, USA) e foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com o peptídeo CGEN-856S (0,0001 – 1 μM) após a estabilização da contração induzida pela FE (0,03 μM).

3.2.1.5 Avaliação da participação do receptor Mas no efeito vasodilatador do CGEN-856S em anéis de aorta de rato

Anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional foram pré-incubados com 0,1 μM de [D-Ala⁷]-Ang-(1-7) (A-779) (Bachem, Torrance, USA), 20 minutos antes da pré-contração com FE. Foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com o CGEN-856S (0,0001 - 1 μM).

3.2.1.6 Avaliação da participação do receptor Mas no efeito vasodilatador do CGEN-856S em anéis de aorta de camundongo

Com a finalidade de confirmar a participação do receptor Mas na resposta vasodilatadora do CGEN-856S, avaliamos o efeito deste peptídeo em anéis de aorta de camundongos KO-Mas e seu controle WT. Os vasos foram pré-contraídos com FE (0,1 μM) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com o peptídeo CGEN-856S (0,0001 - 1 μM).

3.2.1.7 Avaliação comparativa do efeito do CGEN-856S e da angiotensina (1-7) em aorta de ratos Wistar

Com a finalidade de comparar o efeito vasodilatador do novo agonista do Mas, CGEN-856S, com o efeito vasodilatador da Ang-(1-7), foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com estes peptídeos em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional, numa mesma preparação. Os vasos foram pré-contraídos com FE (0,1 μM) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com o CGEN-856S ou Ang-(1-7) (0,0001 - 1 μM).

3.2.2 Avaliação do efeito do CGEN, sobre as arritmias de reperfusão e sobre a função cardíaca em corações isolados de rato

3.2.2.1 Sistema de Perfusão

O sistema de perfusão utilizado é uma adaptação do descrito por Goes e colaboradores (1993), o qual é constituído por um tubo de vidro de aproximadamente 12 mm de diâmetro e de 90 cm de altura. Na extremidade inferior, o tubo é conectado a uma agulha de aço inoxidável. O tubo de vidro é ligado a um reservatório de solução nutritora, cujo suporte regulável permite o ajuste da pressão de perfusão, que será mantida constante (65 mmHg) durante todo o experimento. O tubo de vidro é envolto por uma jaqueta de água em circulação aquecida a 37 ± 1 °C. A oxigenação é feita diretamente no interior do tubo, por meio de uma entrada localizada na base deste, a qual é conectada à saída da válvula reguladora do cilindro de carbogênio, possibilitando assim o borbulhamento de mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) na solução nutritora. A figura 4 mostra um esquema ilustrativo do sistema de perfusão.

3.2.2.2 Solução Nutritora

A solução nutritora utilizada na perfusão dos corações foi a Solução de Krebs-Ringer (KR), tendo a composição final apresentada na tabela 1. Cada litro desta solução foi feito a partir de 50 mL de uma solução mãe, 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 2,1 g de glicose, preparado e filtrado antes de cada experimento.

Tabela 1 - Composição final, em mM, da Solução de Krebs-Ringer.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mM
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄	1,17
CaCl ₂	2,51
Dextrose anidra	11,65
NaHCO ₃	26,24

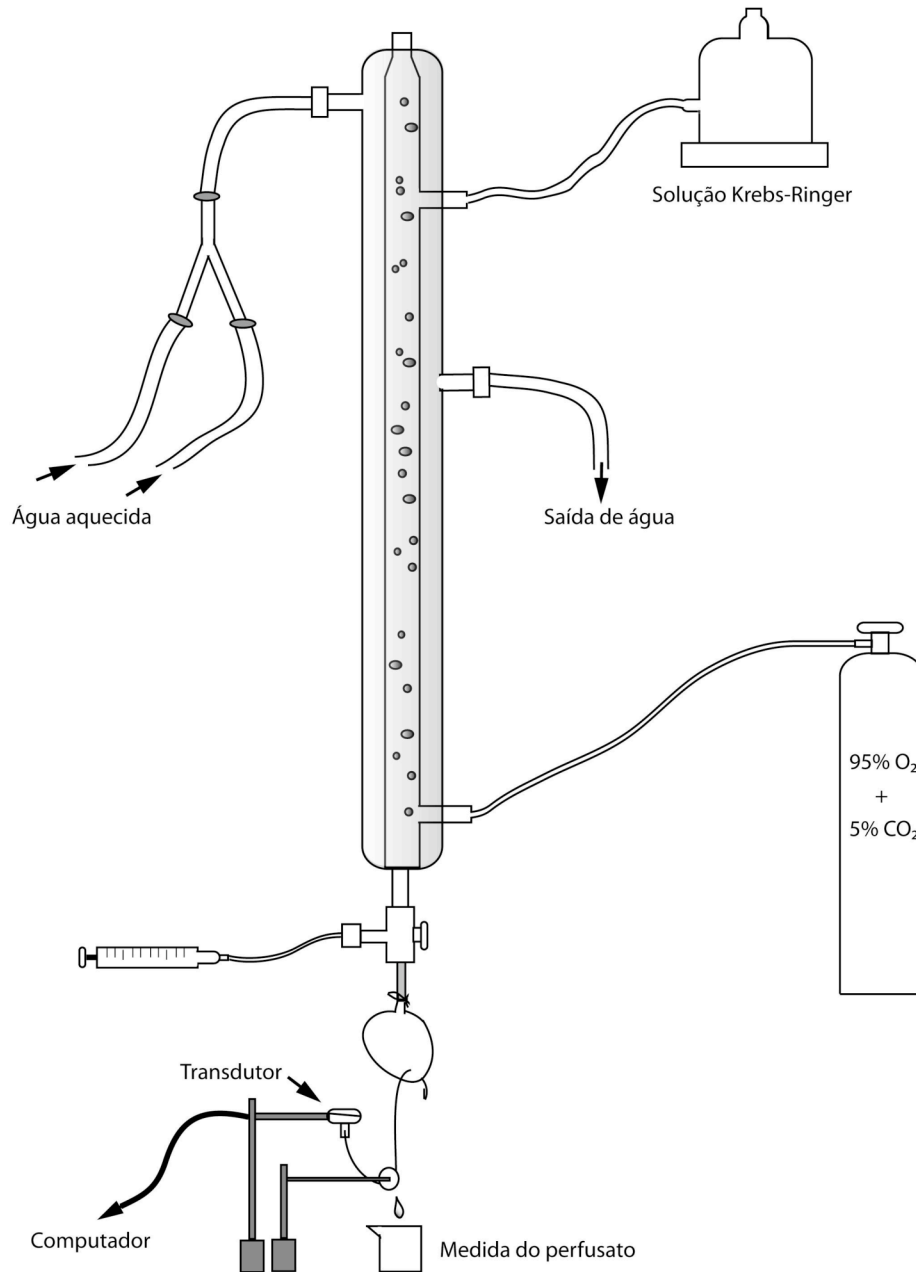


Figura 4 – Esquema ilustrativo do sistema de perfusão por pressão constante do coração isolado (modificado de Murça, 2008).

3.2.2.3 Preparação do coração isolado

Os animais foram heparinizados com 400 U.I. de heparina, i.p., e 10 minutos após, sacrificados por decapitação. Em seguida, procedeu-se a toracotomia. As cartilagens condrocostais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Uma vez que a cavidade torácica foi exposta, seccionou-se sucessivamente a veia cava inferior, a veia cava superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago bem como parte dos pulmões, retirando-se, assim, o coração em bloco. Depois de retirado, o coração foi colocado em uma placa de *Petri* contendo solução nutritiva oxigenada a temperatura de aproximadamente 4 °C. O resfriamento tem por objetivo diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ nos instantes anteriores à canulação do coração. Logo em seguida, os restos de tecido pulmonar e vascular, da traquéia e do esôfago que acompanhavam o coração foram removidos (Ferreira *et al.*, 2001).

3.2.2.4 Canulação

A aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquicefálico) e seu coto foi fixado com linha na ponta da cânula de aço inoxidável “25” acoplada ao sistema de perfusão, visando sempre a integridade da válvula aórtica. Em seguida, os restos de tecidos ainda aderidos ao coração foram cuidadosamente removidos. O tempo gasto do sacrifício até a montagem da preparação foi o menor possível (aproximadamente 3 minutos). Foram aguardados 20 minutos para a estabilização da preparação.

3.2.2.5 Registros

Os seguintes registros foram realizados:

A. Força de Contração

Para o registro da força contrátil, um pequeno gancho de aço inox foi fixado ao ápice do ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor de força por meio de uma linha passada através de uma roldana. Uma tensão de aproximadamente 1,0 ± 0,2 g foi aplicada ao coração (tensão diastólica), a qual foi mantida durante todo o período de estabilização.

B. Atividade Elétrica

A atividade elétrica foi registrada através de um eletrocardiógrafo digital com fios colocados diretamente na superfície do átrio direito e ventrículo esquerdo.

C. Fluxo Coronariano

A medida do fluxo coronariano (mL/min) foi determinada a cada 5 minutos durante todo o experimento, coletando-se o perfusato durante 1 minuto e definindo o volume em mililitros, com auxílio de uma proveta graduada.

A aquisição dos sinais foi realizada por um sistema de conversão análogo-digital. Os sinais foram enviados a um amplificador (*Biopac System*, Santa Bárbara, USA) e em seguida registrados em um computador contendo um *software* de aquisição de dados (*Acknowledge*).

3.2.2.6 Procedimento experimental para a isquemia e reperfusão

Foi utilizada a técnica de isquemia local através da oclusão da artéria coronária esquerda (ACE). Com o auxílio de um porta-agulha, um fio de sutura foi passado ao redor da artéria. No momento da oclusão, um pedaço de palito de madeira foi colocado sobre a ACE e amarrado, pressionando o palito contra a artéria. A queda imediata do fluxo coronariano confirmou o sucesso da oclusão. A isquemia foi mantida durante 15 minutos e a reperfusão foi realizada cortando-se o fio que pressiona o palito contra a artéria (Lubbe *et al.*, 1978). O tempo de duração das arritmias foi cronometrado.

Para quantificar as isquemias de reperfusão foi atribuído um escore correspondente ao tempo em que o coração permaneceu arritmico (Tabela 2), de acordo com Bernauer & Ernenputsch (1988). Quando o escore foi igual a 12, as arritmias foram consideradas irreversíveis (30 minutos). A esse sistema dá-se o nome de Índice de Severidade das Arritmias (ISA).

Tabela 2 – Relação entre o tempo de duração das arritmias e o escore.

DURAÇÃO DAS ARRITMIAS (MIN)	ESCORE (ISA)
Até 3	2
3 a 6	4
6 a 10	6
10 a 15	8
15 a 20	10
20 a 25	11
25 a 30	12 (Irreversíveis)

3.2.2.7 Protocolo experimental

Os corações foram perfundidos por um período inicial de 20 minutos com solução KR (estabilização). Em seguida, os corações foram perfundidos com solução KR contendo: (1) CGEN-856S (0,008 nmo/L); (2) CGEN-856S (0,04 nmol/L); (3) CGEN-856S (0,2nmol/L) e (4) Ang-(1-7) (0,2nmol/L). O grupo controle foi perfundido com solução KR durante todo o experimento. O grupo Ang-(1-7) (0,2nmol/L) foi utilizado para comparar os efeitos do novo agonista do Mas, com a Ang-(1-7).

Após o período basal a ACE foi ligada, como mencionado anteriormente. A ligadura foi liberada após 15 minutos e a reperfusão foi mantida por 30 minutos (Figura 5).

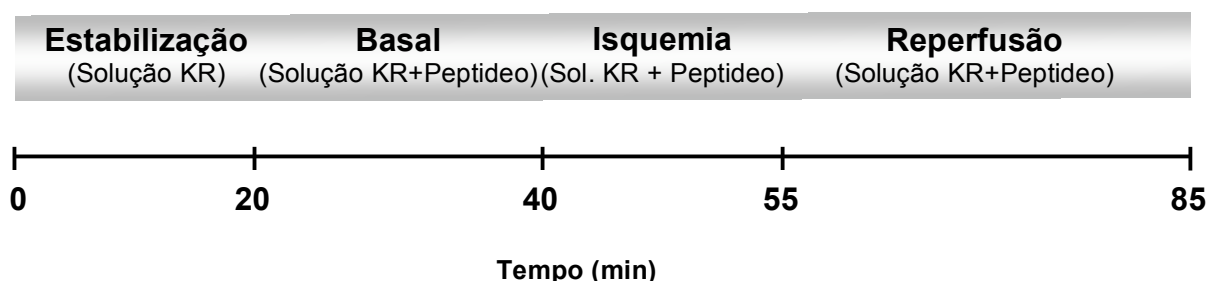


Figura 5 – Diagrama esquematizando o protocolo experimental do coração isolado.

3.2.3 Avaliação do efeito do agonistas do Mas, CGEN-856S, sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo Isoproterenol em ratos

3.2.3.1 Procedimentos para implantação de mini-bomba osmótica

Ratos Wistar foram anestesiados com tribromoetanol 2,5%, via i.p. (1 mL/ 100 g). Uma mini-bomba osmótica (ALZET® 2001), contendo o peptídeo CGEN-856S ou salina, foi implantada subcutaneamente na região interescapular dos animais. Em seguida, foi realizada uma incisão na região interescapular. Com auxílio de uma pinça hemostática, o tecido subcutâneo foi separado, criando-se uma “bolsa”, onde a mini-bomba osmótica foi implantada. A pele foi suturada e, após a recuperação da anestesia, os ratos foram submetidos ao protocolo para indução da hipertrofia cardíaca.

O Losartan foi utilizado como controle positivo, sendo administrado por gavagem na dose de 1 mg/Kg. O volume final utilizado na gavagem e na injeção subcutânea foi de 0,5 mL e 0,1 mL, respectivamente.

3.2.3.2 Indução da hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca foi induzida através de injeções diárias de Isoproterenol (ISO; 2 mg/Kg) diluído em azeite, via subcutânea, durante 7 dias. O grupo controle recebeu injeções diárias de veículo (azeite, 0,1 mL/ 100 g), via subcutânea, durante o mesmo período. A tabela 3 apresenta a descrição dos tratamentos utilizados em cada grupo experimental.

Após o período de 7 dias, os animais foram sacrificados por decapitação. O tórax foi aberto e o coração imediatamente removido. Os átrios e ventrículo direito foram dissecados do ventrículo esquerdo e descartados. O peso molhado do ventrículo esquerdo foi registrado, normalizado para o peso corporal e expresso como índice de massa ventricular (mg/g). O ventrículo esquerdo foi dividido e submetido a análise morfométrica e confocal.

Tabela 3 – Grupos experimentais utilizados na avaliação do efeito dos agonistas do Mas na hipertrofia cardíaca induzida pelo Isoproterenol.

GRUPO	DESCRIÇÃO
1	Controle (injeções de azeite; água por gavagem)
2	ISO (injeções de ISO; água por gavagem)
3	CGEN-856S (injeções de azeite; CGEN-856S 1 µg/h por mini-bomba)
4	ISO+CGEN-856S (injeções de ISO; CGEN-856S 1 µg/h por mini-bomba)
5	Losartan (injeções de azeite; Losartan, 1mg/Kg, por gavagem)
6	ISO+Losartan (injeções de ISO; Losartan, 1mg/kg, por gavagem)

3.2.3.4 Análise histológica

A análise morfométrica dos cardiomiócitos foi utilizada para a avaliação da hipertrofia cardíaca, através da medida do diâmetro dos miócitos cardíacos.

Os ventrículos esquerdos foram mantidos em fixador paraformaldeído 4% por 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram desidratados através de lavagem seqüencial com etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e etanol 100%, e incluídos em parafina (Paraplast® X-tra Tissue Embedding Medium, Mc Cormick Scientific). Cortes transversais de 6 µm foram feitos, iniciando da área de base do ventrículo esquerdo com intervalos de 40 µm. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para morfometria celular. O diâmetro dos cardiomiócitos foi avaliado em cortes de tecidos (3 a 4 para cada animal) utilizando um micrômetro ocular calibrado com um micrômetro de estágio adaptado a um microscópio de luz (BX 60, Olympus) ampliado em 100X e analisado com um *software* de imagem Pro Express. Foram utilizados para análise apenas cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis. O diâmetro de cada cardiomiócito foi medido através da região correspondente ao núcleo. Foram analisados de oitenta a cem cardiomiócitos por animal.

3.2.3.5 Imunofluorescência e microscopia confocal

Imunofluorescência e microscopia confocal quantitativa foram usadas para investigar a distribuição e quantificação de colágenos do tipo I, III e fibronectina presentes no ventrículo esquerdo.

Os corações foram incluídos em *Tissue Tek* (OCT compound, Miles, USA), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cortes com espessura de $7\mu\text{m}$ foram obtidos em criostato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As lâminas foram montadas em cortes fixados com etanol por 10 minutos e secos em temperatura ambiente. Os cortes foram reidratados com PBS por 10 minutos e em seguida incubados em solução bloqueadora (1% BSA e 0,1% Tween 20 em PBS) em temperatura ambiente por 30 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um dos seguintes anticorpos primários: *rabbit anti-human collagen type I* ($5,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 1:100, Rockland), *rabbit antihuman collagen type III* ($5,0\ \mu\text{g}/\text{mL}$; 1:100; Rockland) ou *rabbit anti-human fibronectin* ($2,75\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 1:200; Rockland). Após 4-5 enxagues em PBS, foram adicionados por 1 hora, em ambiente escuro e em temperatura ambiente: *Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG conjugated* (1:200, Molecular Probes) e DRAQ5 (1:1000, Biostatus). Após as lavagens em PBS, os cortes foram preparados em glicerol 25% - PBS 75% e analisados em microscópio confocal (Zeiss 510Meta). A configuração confocal ideal foi determinada no início de cada sessão de imagem e mantida constante durante a análise de todas as amostras. Para a análise quantitativa de colágenos I, III e fibronectina, utilizamos o programa *Image Tool 2.0* para mensurar a intensidade da fluorescência em imagens randomizadamente selecionadas. As imagens foram analisadas em escala de cinza de 0 a 255. A intensidade da fluorescência foi mensurada como a média da área e os valores foram registrados como unidades arbitrárias (escala de cinza, %).

3.2.4 Avaliação do efeito da administração aguda do agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos

3.2.4.1 Procedimentos para implantação de cânula na artéria e veia femoral

Ratos Wistars e SHRs foram anestesiados com tribromoetanol 2,5%, via intraperitonal (1 mL/100g). Para a canulação da artéria femoral, foram utilizadas cânulas confeccionadas a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 à 4 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%) e heparina (100 U.I/ 0,1mL).

Após o posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região inguinal direita do animal. Uma pequena incisão na

pele foi realizada, o feixe vásculo-nervoso femoral foi localizado e a artéria femoral cuidadosamente isolada. A cânula foi introduzida na aorta abdominal através da artéria femoral, sendo utilizada para obtenção do registro dos parâmetros cardiovasculares. Uma segunda cânula, confeccionada a partir da conexão de 15 cm de polietileno PE50 à 2 cm de polietileno PE10, preenchida com solução fisiológica (NaCl 0.9%), foi introduzida na veia femoral para a administração do peptídeo. Após a canulação, os cateteres foram fixados e exteriorizados subcutaneamente, em direção ao dorso do animal, na região cervical. As incisões foram suturadas cuidadosamente e os animais foram colocados em caixas individuais, com livre acesso à água e ração.

3.2.4.2 Registro das variáveis cardiovasculares em animais conscientes

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

Assim, no momento do experimento, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão para início do registro. Após o período de uma hora de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, doses crescentes do peptídeo CGEN-856S (0,3, 3, 30 e 300 ng/Kg/min, 30 minutos cada dose), ou salina no volume de 10 μ L/min foram infundidas via intra-venosa, através de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, Inc, USA). Após a infusão do peptídeo ou salina, os parâmetros cardiovasculares foram monitorados por um período adicional de 60 minutos, chamado de pós-infusão. A figura 6 ilustra o protocolo experimental utilizado.

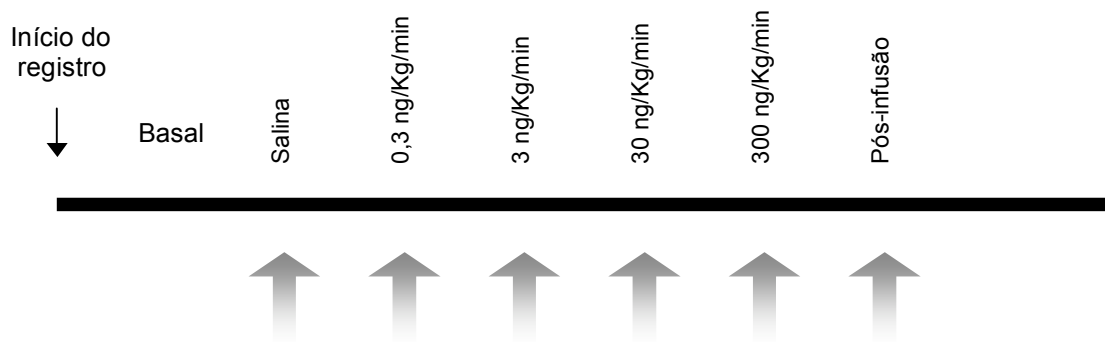


Figura 6 – Ilustração do protocolo experimental - Administração aguda do agonista do receptor Mas, CGEN-856S, sobre a PAM e FC.

3.2.5 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S em ratos Wistar e SHRs

3.2.5.1 Procedimentos para implantação de mini-bomba osmótica

Uma mini-bomba osmótica (ALZET® 2004), contendo o CGEN-856S na dose de 18 µg/Kg/h ou salina estéril (NaCl 0,9%), foi implantada subcutaneamente na região interescapular de ratos Wistar e SHRs. Os procedimentos para a implantação das mini-bombas osmóticas estão descritos anteriormente, no item 3.2.3.1.

3.2.5.2 Procedimentos para implantação de cânula na artéria femoral

Após 27 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5%, via intra-peritoneal (1 mL/100g) e submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cânula na artéria femoral, como detalhado no item 3.2.4.1.

A PAM e FC foram registradas 24 horas após a implantação da cânula, nos animais conscientes. Os parâmetros foram registrados continuamente durante 30 minutos.

3.2.5.3 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco e renal em ratos hipertensos

3.2.5.4 Análise histológica

Após o registro dos parâmetros (PAM e FC), os animais foram sacrificados por overdose de anestésico (xilazina e ketamina). Imediatamente, o tórax foi aberto e o coração removido. O peso molhado do tecido cardíaco foi registrado, normalizado para o peso corporal e expresso como índice de massa ventricular (mg/g).

Em seguida, o coração e rim foram processados para posterior análise histológica. Os tecidos foram mantidos em fixador paraformaldeído 4% por 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram desidratados através de lavagem sequencial com etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e etanol 100%, e incluídos em parafina (Paraplast® X-tra Tissue Embedding Medium, Mc Cormick Scientific). Cortes transversais de 5 μm foram feitos iniciando da área de base do ventrículo esquerdo com intervalos de 40 μm . Em seguida os cortes foram corados com Sirius-Red para avaliação da deposição de fibrose.

A área de deposição de MEC cardíaca e renal foi medida como porcentagem de área analisada. Foi utilizado um microscópio Olympus BX 41 para a captação das imagens. A quantificação da extensão da área de deposição de MEC foi realizada através de um *software* de imagem, "Image J". Uma média de 5 imagens foram avaliadas para cada animal.

Cortes adicionais dos tecidos em questão foram corados com hematoxilina-eosina para morfometria celular. O diâmetro dos cardiomiócitos foi avaliado em cortes de tecidos (3 a 4 para cada animal) utilizando o microscópio de luz Olympus BX 41 ampliado em 40X. As imagens foram analisadas através do *software* de imagem "Image J". Foram utilizados para análise apenas cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis. O diâmetro de cada cardiomiócito foi medido através da região correspondente ao núcleo. Foram analisados cerca de oitenta a cem cardiomiócitos por animal.

3.2.6 Avaliação do efeito do novo agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio em ratos

3.2.6.1 Procedimentos para a indução do infarto do miocárdio

Ratos Wistar foram anestesiados com 10% de ketamina e 2% de xilazina (0,1 mL/100g, i.p.), colocados na mesa cirúrgica na posição supina, traqueostomizados, intubados e ventilados através de um respirador para pequenos roedores (Harvard Apparatus, INC, USA), em ar ambiente. Eletrodos subdérmicos foram posicionados

para determinação do eletrocardiograma. Em seguida, foi realizada a toracotomia à esquerda, no quarto ou quinto espaço intercostal. Para expor o coração, foi utilizado um afastador, o qual manteve as costelas separadas. Após a incisão do pericárdio, o coração foi rapidamente removido da cavidade torácica e levemente rodado para a esquerda para permitir o acesso à artéria descendente anterior esquerda. Um fio de sutura foi passado ao redor da artéria e amarrado, causando a oclusão do vaso. Os animais sham-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, porém a artéria coronária não foi ocluída. Após os procedimentos, foi registrado o ECG para confirmação da isquemia miocárdica, através da visualização da elevação do intervalo ST e aumento da amplitude da onda R.

3.2.6.2 Implantação de bomba osmótica

Imediatamente após a confirmação da isquemia miocárdica, uma bomba osmótica (ALZET® 2002), contendo o peptídeo CGEN-856-S na dose de 3,6 µg/Kg/h ou salina estéril, foi implantada na região dorsal dos animais, como descrito no item 3.2.3.1. O Captopril, administrado por gavagem (1 mg/Kg/dia), foi utilizado como padrão-ouro. O tratamento teve a duração de 14 dias.

3.2.6.3 Procedimentos para avaliação da função cardíaca

Após 14 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação. O sistema de *Langendorff* foi utilizado para avaliação da função cardíaca basal, como descrito anteriormente no item 3.2.2.3 a 3.2.2.5.

3.2.6.4 Quantificação do infarto agudo do miocárdio

Ao final da perfusão, o ventrículo esquerdo foi mantido em Bouin 4% por 24 horas. Os tecidos foram desidratados por lavagens sequenciais com etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e etanol 100% e incluídos em parafina. Secções transversais de 6µm foram cortadas iniciando-se da área de base do ventrículo esquerdo com intervalos de 40µm. Os cortes foram corados com tricromo de Gomori para morfometria celular. As imagens foram capturadas através de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. O software KS300 foi utilizado para a quantificação da área de infarto, usando a função de segmentação de imagem. Os dados foram expressos como porcentagem de área infartada (Ferreira *et al*, 2007).

3.2.7 Avaliação da afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores da angiotensina II, AT₁ e AT₂.

Os efeitos cardiovasculares induzidos pelo CGEN-856S poderiam ser justificados por sua ligação ao receptor AT₁, agindo como um antagonista deste receptor, ou por sua ligação ao receptor AT₂, agindo como um agonista deste receptor. Com a finalidade de investigar esta questão foram realizados, pela *Euroscreen* (Bélgica), os ensaios para avaliação da afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores AT₁ e AT₂.

A afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores AT₁ e AT₂ foi testado através de ensaio de competição radioligante para AT₁ (FAST-015B) e AT₂ (FAST-016B) humanos. Foram utilizadas oito concentrações do peptídeo: 0,3, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 nmol/L, em duplicata. Os ensaios foram realizados pelo laboratório *Euroscreen* (Bélgica).

Membranas de células CHO-K1-AT1 foram descongeladas e diluídas a 0,5 µg/poço em tampão (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 5 mmol/L MgCl₂; Saponine 10 µg/mL; 0,1% Bacitracina). O ligante (Sar¹, Ile⁸) Ang II (Phoenix, 002-21) e o radioligante [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸) Ang II (Perkin Elmer, NEX 248) foram diluídos em tampão. Os seguintes reagentes foram adicionados sucessivamente nos poços em placas de 96 poços: 50 µL de CGEN-856S em concentrações crescentes, 25µL do radioligante (na concentração final de 0,03 nmol/L) e 25µL de extratos de membrana. As amostras foram incubadas por 60 min a 25°C e filtradas (tampão de lavagem 50 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 5 mmol/L MgCl₂; 0,05% BSA por 2h em temperatura ambiente). Após a lavagem dos filtros 6 vezes com 0,5 mL de tampão gelado, 50 µL de Microscint 20 (Packard) foram adicionados e as amostras foram incubadas por 15 min em *skaker* e posteriormente contadas em um TopCount™ por 1 min/poço.

Membranas de células CHO-K1-AT2 foram descongeladas e diluídas a 2,5 µg/poço em tampão (25 mmol/L Hepes pH 7,4; 5 mmol/L MgCl₂; Saponine 10 µg/mL; 0,5% BSA protease). O ligante Ang II e o radioligante [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸) Ang II (Perkin Elmer, NEX 248) foram diluídos em tampão. Os seguintes reagentes foram adicionados sucessivamente nos poços em placas de 96 poços: 50 µL de CGEN-856S em concentrações crescentes, 25µL do radioligante (na concentração final de 0,1 nmol/L) e 25µL de extratos de membrana. As amostras foram incubadas por 60

min a 25°C e filtradas (tampão de lavagem 25 mmol/L Hepes pH 7,4; 5 mmol/L MgCl₂; 0,5% BSA por 2h em temperatura ambiente). Após a lavagem dos filtros 6 vezes com 0,5 mL de tampão gelado, 50 µL de Microscint 20 (Packard) foram adicionados e as amostras foram incubadas por 15 min em *skaker* e posteriormente contadas em um TopCount™ por 1 min/poço.

Em cada dia de experimento, e previamente ao teste do composto, os agonistas foram testados em várias concentrações, em duplicata (n=2) para obtermos uma curva dose-resposta e um EC50 estimado. Os valores de referência obtidos foram comparados aos valores históricos obtidos do mesmo receptor e foram usados para validar o experimento.

3.2.8 Avaliação da capacidade de ligação do CGEN-856S em células CHO transfectadas com o *Mas*

Com a finalidade de investigar a especificidade de ligação do CGEN-856S ao receptor *Mas*, utilizamos o método descrito por Pinheiro e colaboradores (2004).

A Ang-(1-7) fluorescente [FAM-Ang-(1-7)] a 10⁻⁸ mol/L foi incubada em seis poços por 60 minutos a 4°C em 1,5 mL de meio livre de soro (DMEM), suplementado com 0,2% de BSA, 0,005% de bacitracina, 0,1 mol/L de PMSF e 0,5 mol/L de ortofenantrolina com células CHO transfectadas com o *Mas*, na presença ou ausência de Ang-(1-7) (10⁻⁷ mol/L e 10⁻⁶ mol/L) ou CGEN-856S (10⁻⁷ mol/L e 10⁻⁶ mol/L). Após duas lavagens com DMEM gelado, as lâminas foram montadas para avaliação em microscopia confocal. A ligação não-específica foi determinada na presença de 10⁻⁵ mol/L de Ang-(1-7). A fluorescência relativa foi mensurada em um microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META laser scanning, excitação a 488 nm com o laser de íon argônio, objetiva 63X) (Pinheiro *et al.*, 2004).

3.2.9 Determinação do efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA

Para investigar a interferência do CGEN-856S sobre a atividade da ECA plasmática, realizamos o seguinte experimento.

A atividade da ECA foi determinada pelo método fluorimétrico utilizando a Hip-His-Leu como substrato, como descrito previamente (Santos *et al.*, 1985). Duplicatas de plasma de rato (10 µL) foram incubadas com 440 µL de Hip-His-Leu a 1 mmol/L em 0,4 M de tampão borato, pH 8,3, contendo 0,9 mol/L de NaCl por 15 minutos a 37°C. Ang-(1-7) ou CGEN-856S foram adicionados nas concentrações finais de 10⁻⁹

a 10^{-5} mol/L. O Captopril (10^{-9} a 10^{-5} mol/L) foi utilizado como controle positivo. As soluções de peptídeo e captopril foram misturadas ao substrato imediatamente antes da adição do plasma. A reação foi interrompida através da adição de 1,2 mL de NaOH a 0,34 mol/L. Foi adicionado 100 μ L de ortoftaldeído (20 mg/mL, em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente, 200 μ L de HCl a 3 M foi adicionado. Após centrifugação a 800Xg por 5 minutos, a fluorescência da solução sobrenadante foi medida (365 nm de excitação e 495 nm de emissão). Uma curva padrão de 0,5 a 20 nmol de His-Leu/tubo foi preparada em cada ensaio. A atividade da enzima foi calculada como nmol de His-Leu/min/mL.

3.2.10 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizada a análise de variância simples (One-way ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls, ou o test *t* de Student. Foi também utilizada a análise de variância de duas variáveis (Two-way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

Resultados

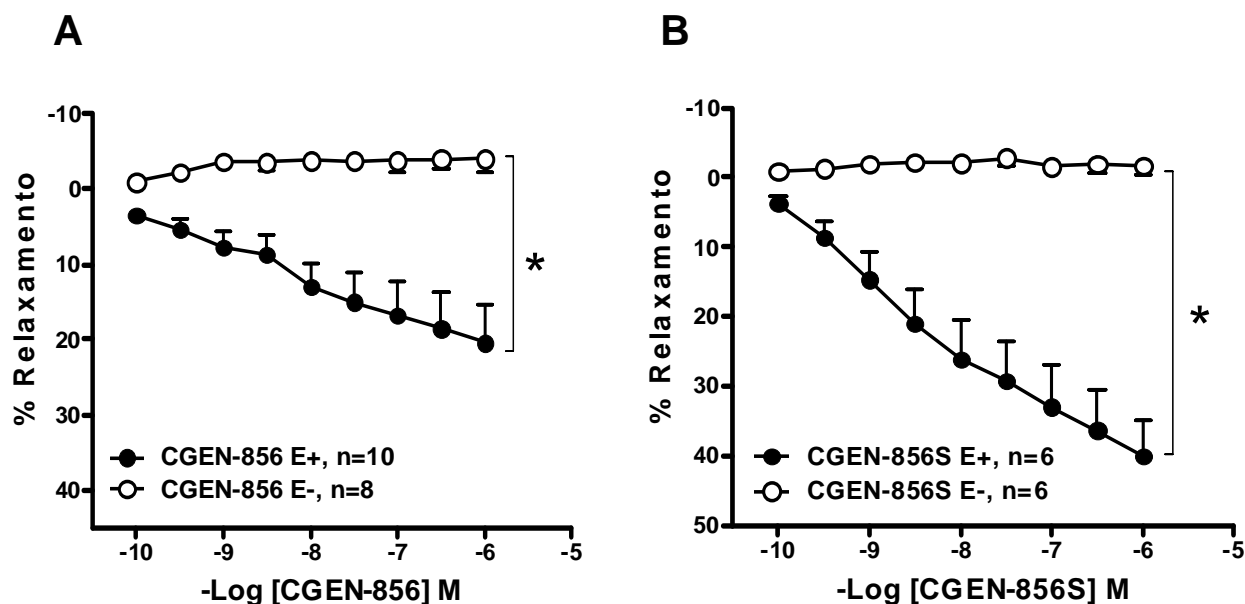
4.0 RESULTADOS

4.1 Efeito dos peptídeos CGEN em aorta isolada de ratos Wistar, camundongos FVB/N e *Knockout* para o receptor Mas

4.1.1 Participação do endotélio na resposta relaxante induzida pelos peptídeos CGEN em aorta de ratos Wistar

A figura 7 (A-D) mostra o efeito relaxante concentração-dependente induzido pelos peptídeos CGEN-856, CGEN-856S, CGEN-857 e CGEN-857V em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional, pré-contraídos com FE.

Em anéis de aorta desprovidos de endotélio funcional, o efeito relaxante dos peptídeos CGEN-856, CGEN-856S, CGEN-857 e CGEN-857V foi abolido (Figura 7 A-D, respectivamente).



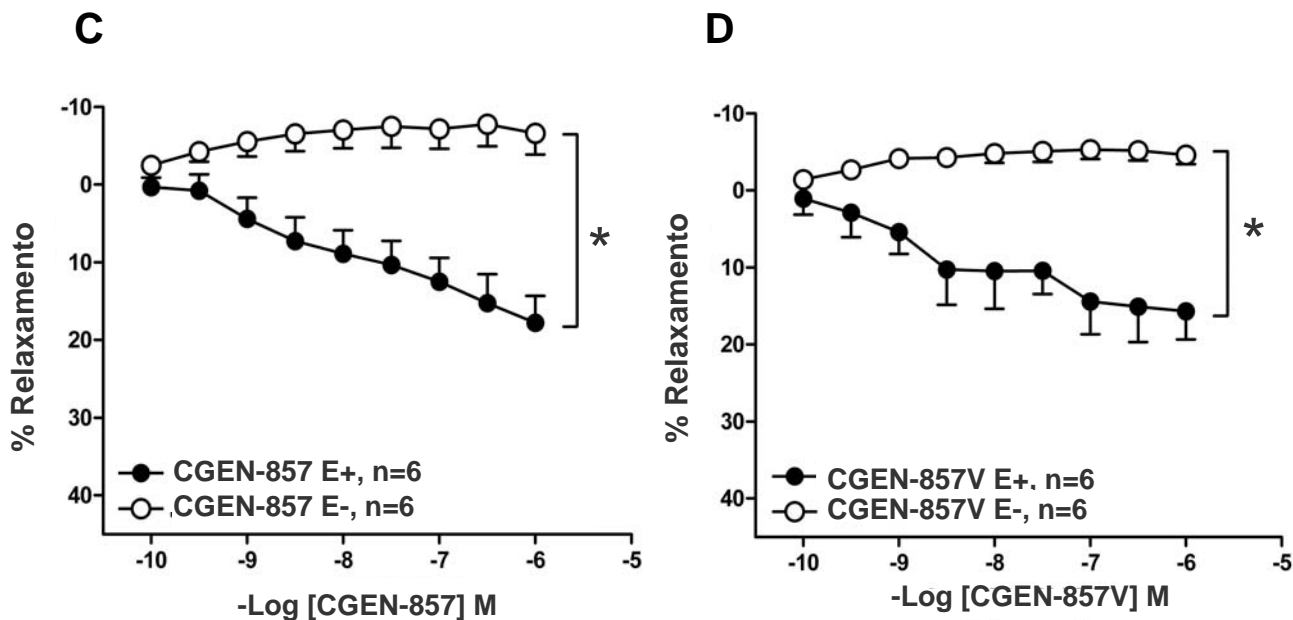


Figura 7 – Efeito induzido pelos peptídeos CGEN-856 (A), CGEN-856S (B), CGEN-857 (C) e CGEN-857V (D) em anéis de aorta de ratos Wistar, contendo (E+) ou não (E-) endotélio funcional. $*p < 0,05$ vs E- (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

4.1.2 Efeito da inibição da produção de óxido nítrico na resposta relaxante induzida pelo CGEN-856S em aorta de ratos Wistar

A figura 8 mostra o efeito do L-NAME sobre a resposta relaxante induzida pelo peptídeo CGEN-856S em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional.

Após a inibição da produção do NO, o efeito relaxante do peptídeo CGEN-856S foi abolido (Figura 8).

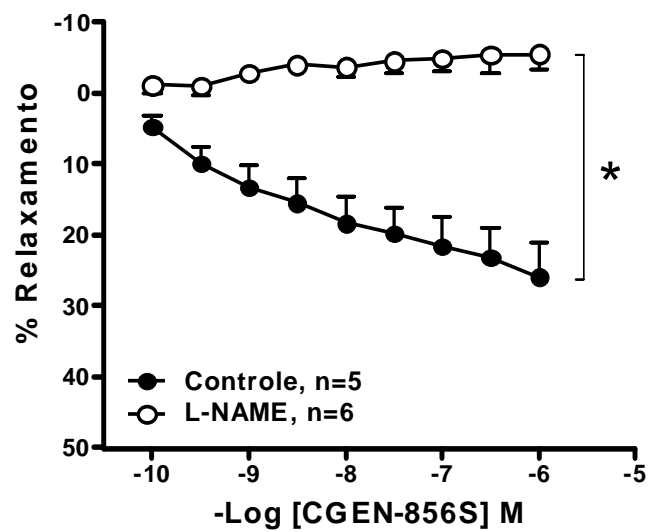


Figura 8 – Efeito induzido pelo peptídeo CGEN-856S em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional, na presença ou ausência de L-NAME. * $p < 0,05$ vs Controle (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

4.1.3 Efeito do bloqueio do receptor Mas sobre a resposta relaxante induzida pelo CGEN-856S em aorta de ratos Wistar

Com a finalidade de investigar a participação do receptor Mas na resposta relaxante induzida pelo CGEN-856S, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com este peptídeo em anéis de aorta de ratos Wistar na presença ou ausência do antagonista do receptor Mas, A-779.

Como mostrado na figura 9, o efeito vasorelaxante induzido pelo CGEN-856S foi inibido na presença do A-779.

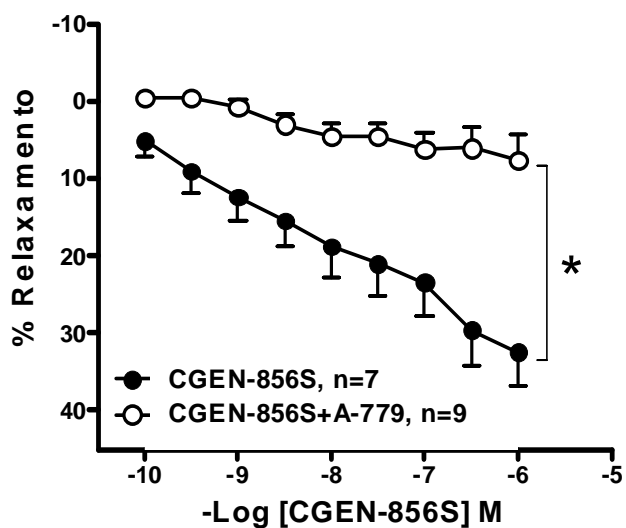


Figura 9 – Efeito induzido pelo CGEN-856S em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional, na presença ou ausência do A-779. * $p < 0,05$ vs Controle (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

4.1.4 Efeito do CGEN-856S em aorta de camundongos *Knockout* para o receptor Mas

Com a finalidade de confirmar a participação do receptor Mas na resposta vasodilatadora do CGEN-856S, avaliamos o efeito deste peptídeo em anéis de aorta de camundongos KO-Mas e seu controle WT.

O efeito vasorelaxante induzido pelo CGEN-856S foi abolido em anéis de aorta de camundongos KO Mas quando comparado com o grupo controle (Mas^{+/+}) (Figura 10).

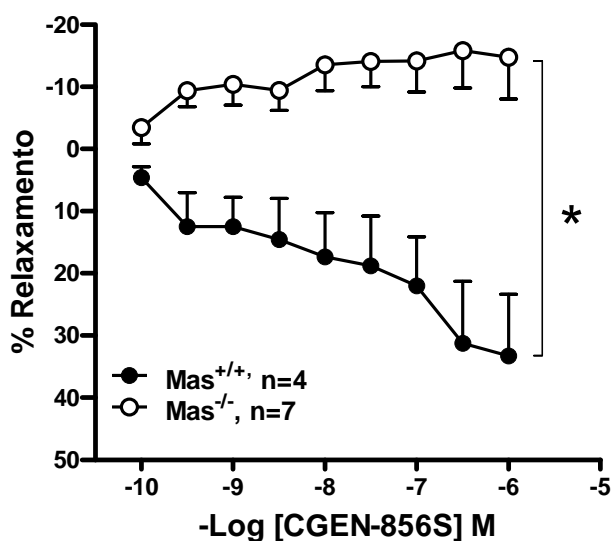


Figura 10 – Efeito induzido pelo peptídeo CGEN-856S em anéis de aorta de camundongos Mas^{+/+} e Mas^{-/-}, contendo endotélio funcional. * $p < 0,05$ vs Mas^{+/+} (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

4.1.5 Efeito do CGEN-856S e da angiotensina (1-7) em aorta de ratos Wistar

Com o objetivo de comparar o efeito vasodilatador do novo agonista do Mas, o CGEN-856S, com o efeito vasodilatador da Ang-(1-7), foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com esses peptídeos em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional, numa mesma preparação.

Como mostra a figura 11, o CGEN-856S induziu um padrão vasorelaxante semelhante ao observado com a Ang-(1-7).

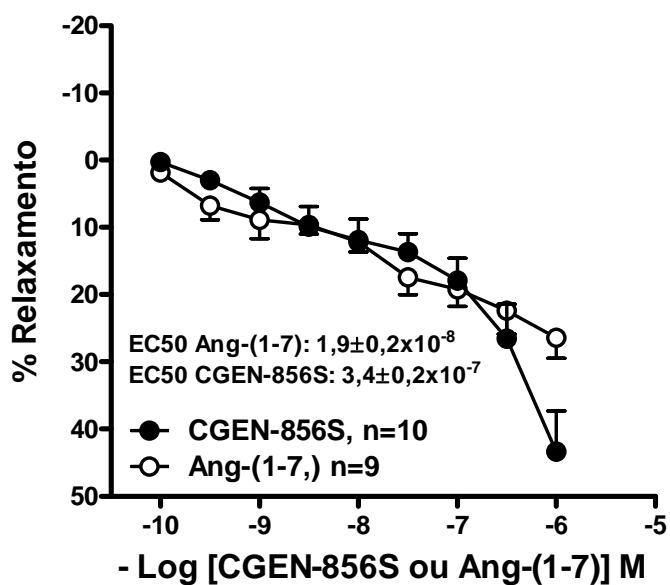


Figura 11 – Efeito relaxante induzido pelos peptídeos CGEN-856S e Ang-(1-7) em anéis de aorta de ratos Wistar contendo endotélio funcional (Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

4.2 Efeito do novo agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a função cardíaca e sobre as arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos

4.2.1 Efeito do CGEN-856S sobre as arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos

A incidência de arritmias de perfusão ocorreu em 100% dos corações isolados após a reperfusão. Entretanto, essas arritmias, extra-sístoles e, taquicardia e/ou fibrilação ventricular, apresentaram variações quanto a sua duração.

Inicialmente avaliamos o efeito do CGEN-856S sobre as arritmias de reperfusão na concentração de 0,2 nM, a qual foi previamente descrita como sendo anti-arritmogênica para a Ang-(1-7) (Ferreira *et al.*, 2001). Nessa concentração, o CGEN-856S não alterou significativamente a duração e incidência das arritmias de reperfusão (ISA= $6,3 \pm 1,1$ para o grupo controle vs $10,2 \pm 1,6$ para o grupo CGEN-856S; Figura 12 A). Entretanto, em uma menor concentração, 0,04 nM, o CGEN-856S diminuiu significativamente a duração das arritmias (ISA= $6,3 \pm 1,1$ para o grupo controle vs $2,0 \pm 0,002$ para o grupo CGEN-856S; Figura 12 A) e aboliu a incidência das arritmias irreversíveis (Figura 12 B). Em uma concentração ainda menor, 0,008 nM, o CGEN-856S não apresentou efeito sobre as arritmias de reperfusão (Figura 12 A e B).

A Ang-(1-7) (0,2 nM), utilizada como padrão-ouro, reduziu significativamente a incidência e duração das arritmias de reperfusão (Figura 13). O ISA do grupo controle e do grupo da Ang-(1-7) foi de $6,3 \pm 1,4$ e $2,3 \pm 0,3$, respectivamente, sendo significativamente diferentes (Figura 13 A).

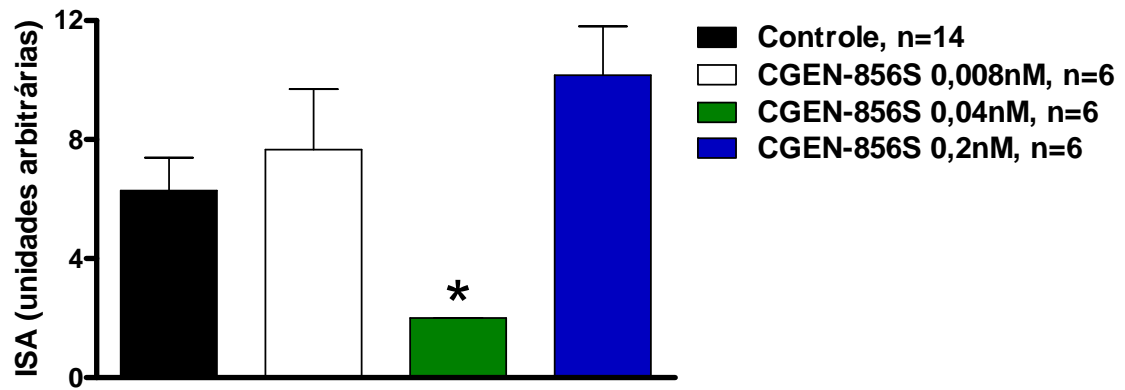
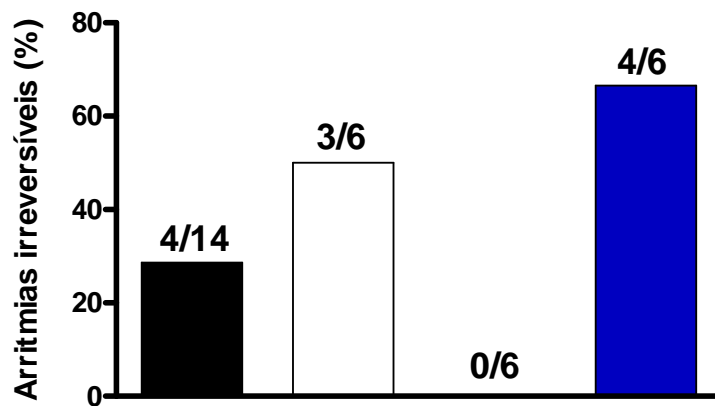
A**B**

Figura 12 – Avaliação do ISA (A) e incidência das arritmias irreversíveis (> 30 minutos) (B) em corações isolados de ratos submetidos a oclusão da ACE. Os corações foram perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo CGEN-856S nas concentrações 0,008nM, 0,04nM e 0,2nM. Números acima das barras indicam a incidência de arritmias irreversíveis. * $p < 0,05$ vs controle (Teste t de Student).

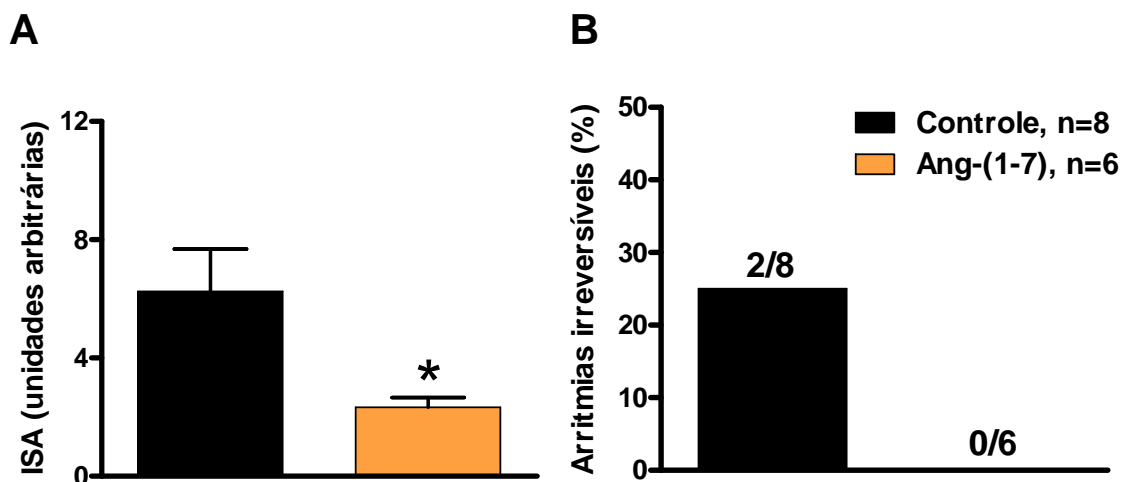


Figura 13 – Avaliação do ISA (A) e incidência de arritmias irreversíveis (> 30 minutos) (B) em corações isolados de ratos submetidos a oclusão da ACE. Os corações foram perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo Ang-(1-7) (0,2nM). Números acima das barras indicam a incidência de arritmias irreversíveis. * $p < 0,05$ vs controle (Teste *t* de Student).

4.2.2 Efeito CGEN-856S sobre a função cardíaca em corações isolados de ratos

O peptídeo CGEN-856S, em sua concentração anti-arritmogênica, produziu efeitos adicionais sobre a função cardíaca de corações isolados. CGEN-856S aumentou significativamente a tensão sistólica pós-isquêmica quando comparado com o grupo controle (Figura 14 A) e induziu um leve aumento, porém significativo, da $-dT/dt$ pós-isquêmica (Figura 15 B). Além disso, foi observado que o CGEN-856S (0,04 nmol/L) preveniu o aumento da tensão diastólica observado em corações perfundidos com solução KR durante o período de reperfusão (Figura 14 B). Nenhum efeito significativo foi observado na $+dT/dt$ (Figura 15 A), na FC (Figura 16) ou no fluxo coronariano (Figura 17).

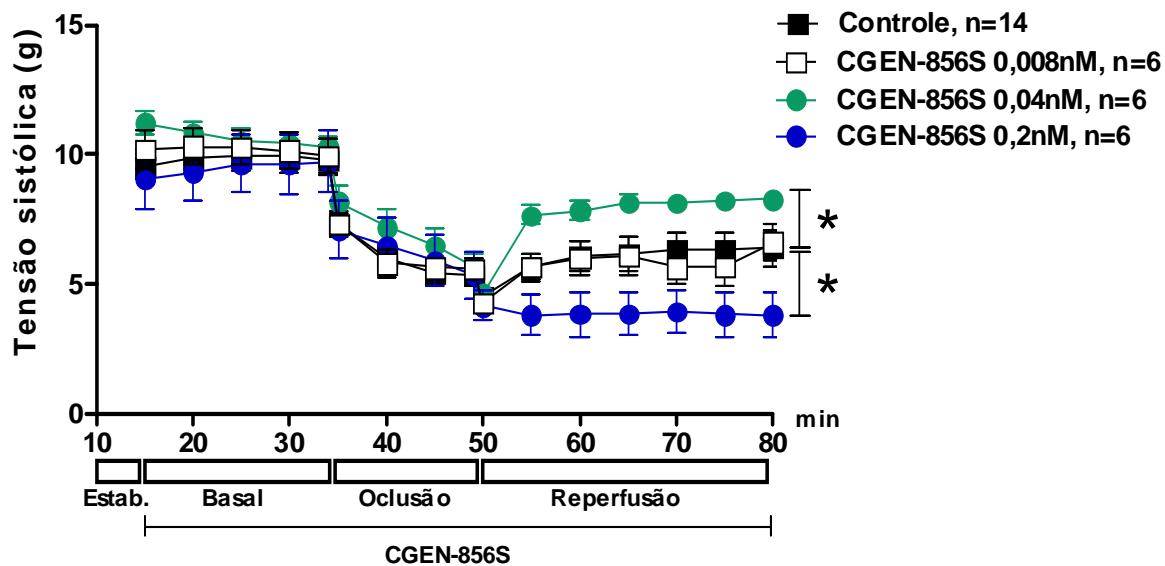
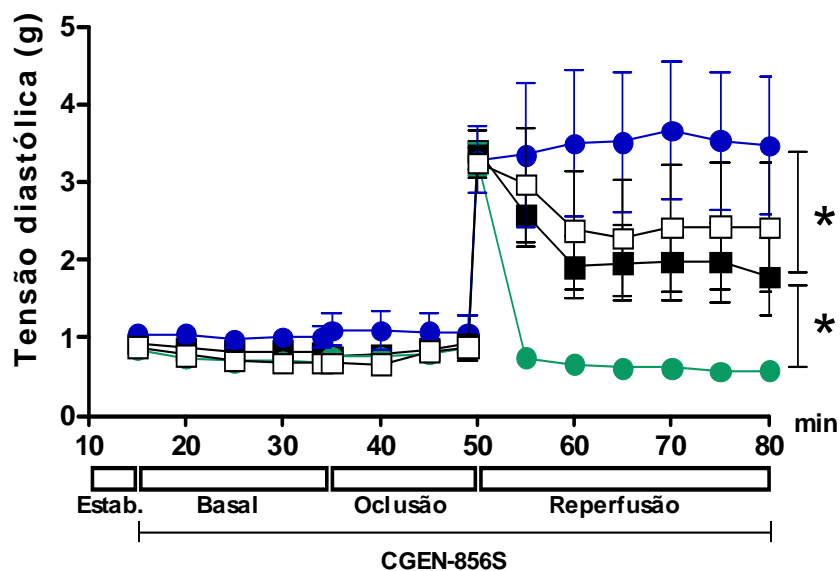
A**B**

Figura 14 – Tensão sistólica (A) e diastólica (B) em corações isolados perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo CGEN-856S (0,008nM, 0,04nM e 0,2nM) e submetidos a oclusão da ACE. Valores coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento. * $p < 0,05$ (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

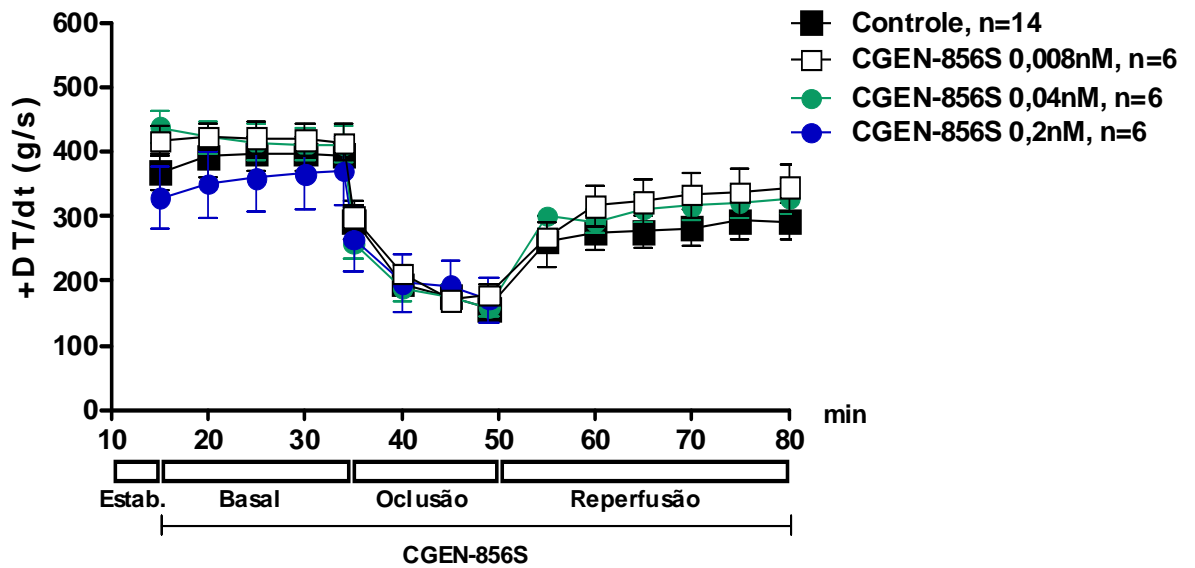
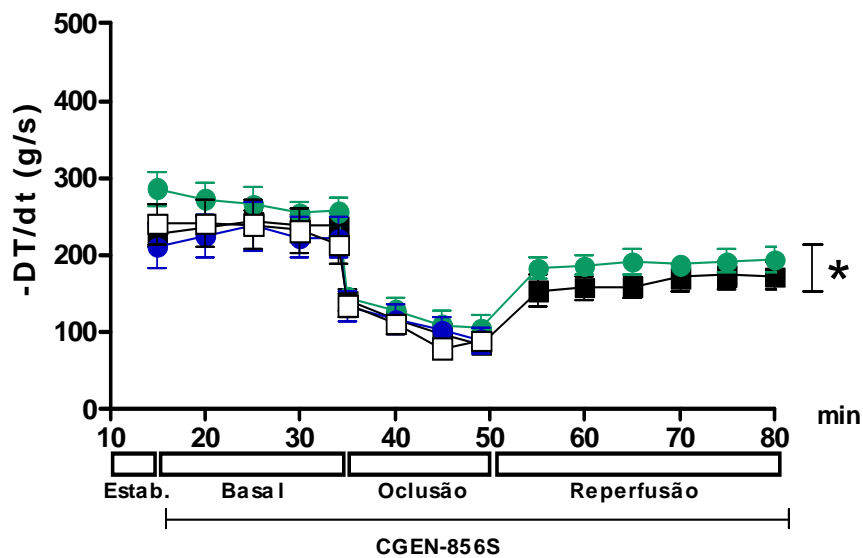
A**B**

Figura 15 – $+DT/dt$ e $-DT/dt$ em corações isolados perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo CGEN-856S (0,008nM, 0,04nM e 0,2nM) e submetidos a oclusão da ACE. Valores coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

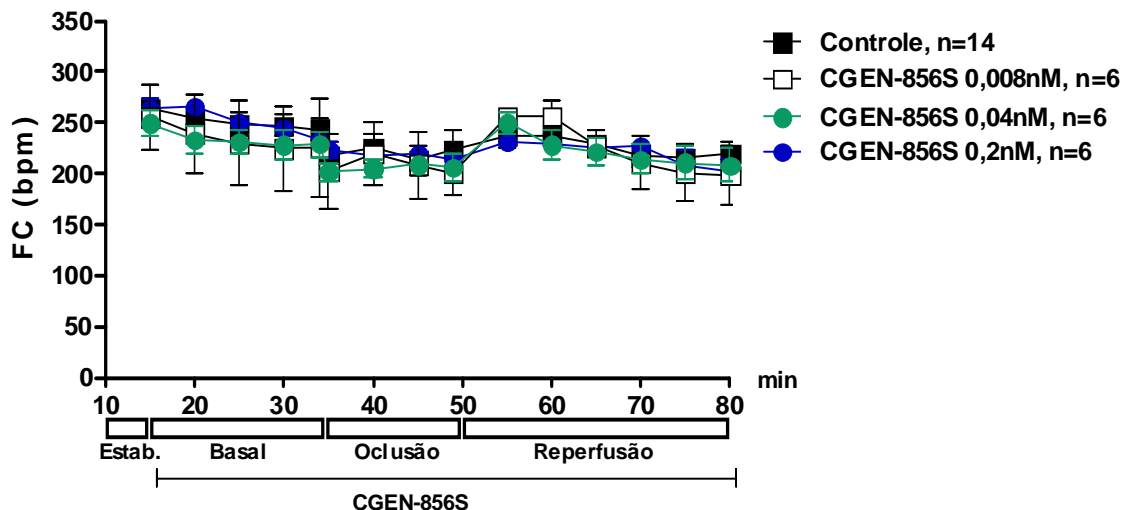


Figura 16 – Frequência cardíaca em corações isolados perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo CGEN-856S (0,008nM, 0,04nM e 0,2nM) e submetidos a oclusão da ACE. Valores coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

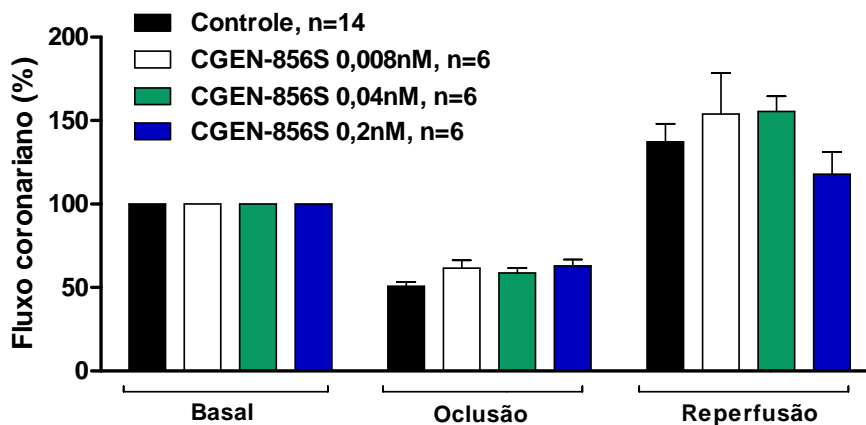


Figura 17 – Fluxo coronariano de corações isolados perfundidos com solução KR (controle) ou KR contendo CGEN-856S (0,008nM, 0,04nM e 0,2nM) e submetidos a oclusão da ACE. Os valores representam porcentagens aos 35 minutos do basal, 5 minutos de oclusão e 5 minutos de reperusão, considerando o período basal como 100% (One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

4.3 Efeito do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo Isoproterenol em ratos

4.3.1 Efeito do CGEN-856S sobre a hipertrofia cardíaca induzida pelo Isoproterenol em ratos

O Isoproterenol, administrado durante 7 dias, aumentou significativamente a massa muscular do VE quando comparado com o tratamento com azeite (Figura 18 e 19). A administração de CGEN-856S reduziu significativamente a massa ventricular esquerda de ratos tratados com azeite quando comparado com o grupo azeite+salina (Figura 18). Nenhuma alteração significativa foi observada no tratamento com ISO+CGEN-856S comparado ao ISO+salina (Figura 18) e no tratamento com ISO+Losartan comparado ao ISO+salina (Figura 19).

O Isoproterenol induziu um aumento significativo do diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado com o tratamento com azeite (Figuras 20 e 21). O tratamento com o CGEN-856S atenuou significativamente este aumento (Figura 20). Como esperado, o tratamento com ISO+Losartan reduziu significativamente o diâmetro dos cardiomiócitos em relação ao grupo ISO+salina (Figura 21).

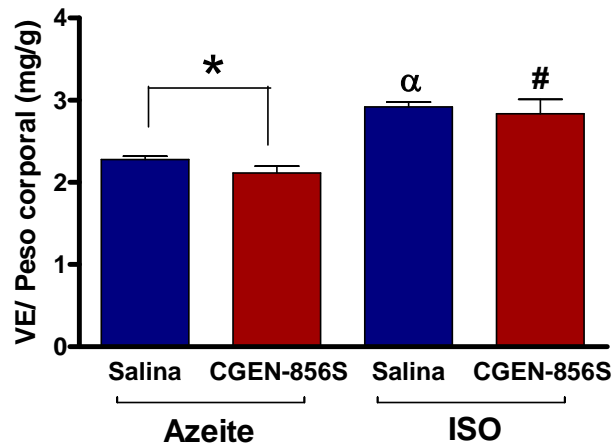


Figura 18 – Quantificação da massa do VE de ratos portadores ou não de insuficiência cardíaca tratados com CGEN-856S ou salina. Ratos Wistar receberam injeções diárias de Isoproterenol (2 mg/Kg, s.c.) ou veículo (azeite, 0,1 mL, s.c.) por 7 dias. CGEN-856S (1 µg/h) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica durante o mesmo período. Os dados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; α $p < 0,05$ vs azeite+salina; # $p < 0,05$ vs azeite+CGEN-856S (One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

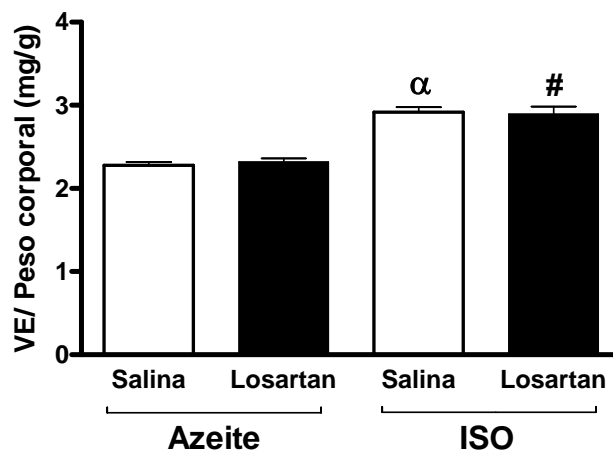


Figura 19 – Quantificação da massa do VE de ratos portadores ou não de insuficiência cardíaca tratados com CGEN-856S ou salina. Ratos Wistar receberam injeções diárias de Isoproterenol (2 mg/Kg, s.c.) ou veículo (azeite, 0,1 mL, s.c.) por 7 dias. CGEN-856S (1 µg/h) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica durante o mesmo período. Os dados estão expressos como média ± EPM. α $p < 0,05$ vs azeite+salina; # $p < 0,05$ vs azeite+Losartan (One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

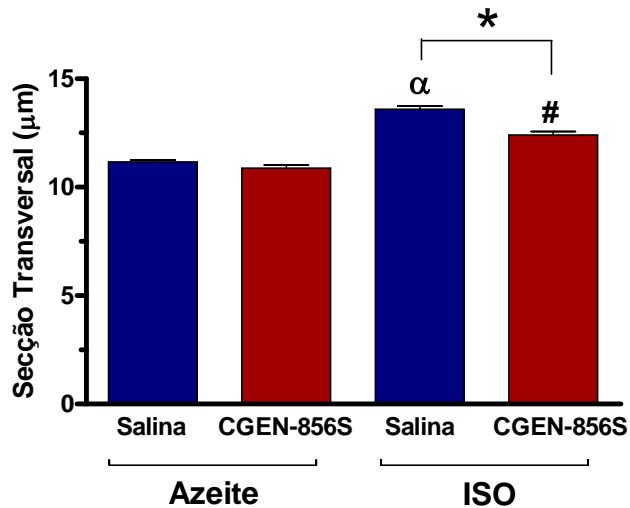


Figura 20 – Quantificação do diâmetro dos cardiomiócitos de ratos portadores ou não de insuficiência cardíaca tratados com CGEN-856S ou salina. * $p < 0,05$; α $p < 0,05$ vs azeite+salina; # $p < 0,05$ vs azeite+CGEN-856S (One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

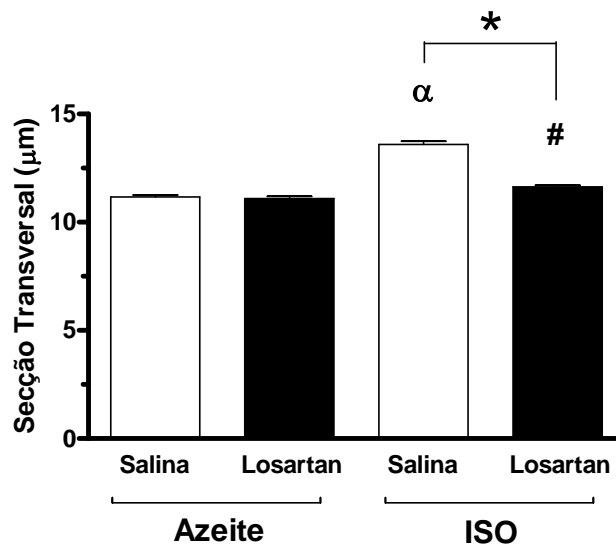


Figura 21 – Quantificação do diâmetro dos cardiomiócitos de ratos portadores ou não de insuficiência cardíaca tratados com Losartan ou salina. * $p < 0,05$; α $p < 0,05$ vs azeite+salina; # $p < 0,05$ vs azeite+Losartan (One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.3.2 Efeito do CGEN-856S sobre o aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular induzido pelo isoproterenol em corações de ratos

O Isoproterenol, administrado por 7 dias, induziu um aumento significativo da deposição de colágeno I, III e fibronectina no VE dos animais (Figura 22 e 23). O tratamento com o CGEN-856S reduziu significativamente a expressão de colágeno I ($30,6 \pm 3,0$ vs $60,6 \pm 5,5$ para o ISO+salina), colágeno III ($45,3 \pm 2,9$ vs $63,5 \pm 4,8$ para o ISO+salina) e fibronectina ($29,9 \pm 4,5$ vs $55,3 \pm 5,8$ para o ISO+salina) no VE de ratos tratados com Isoproterenol (Figura 22).

O tratamento com Losartan reduziu significativamente a expressão de colágeno I ($35,9 \pm 4,4$ vs $52,5 \pm 5,1$ para o ISO+salina), colágeno III ($48,2 \pm 3,8$ vs $70,2 \pm 4,4$ para o ISO+salina) e fibronectina ($21,2 \pm 3,1$ vs $53,2 \pm 5,6$ para o ISO+salina) no VE de ratos tratados com Isoproterenol (Figura 23).

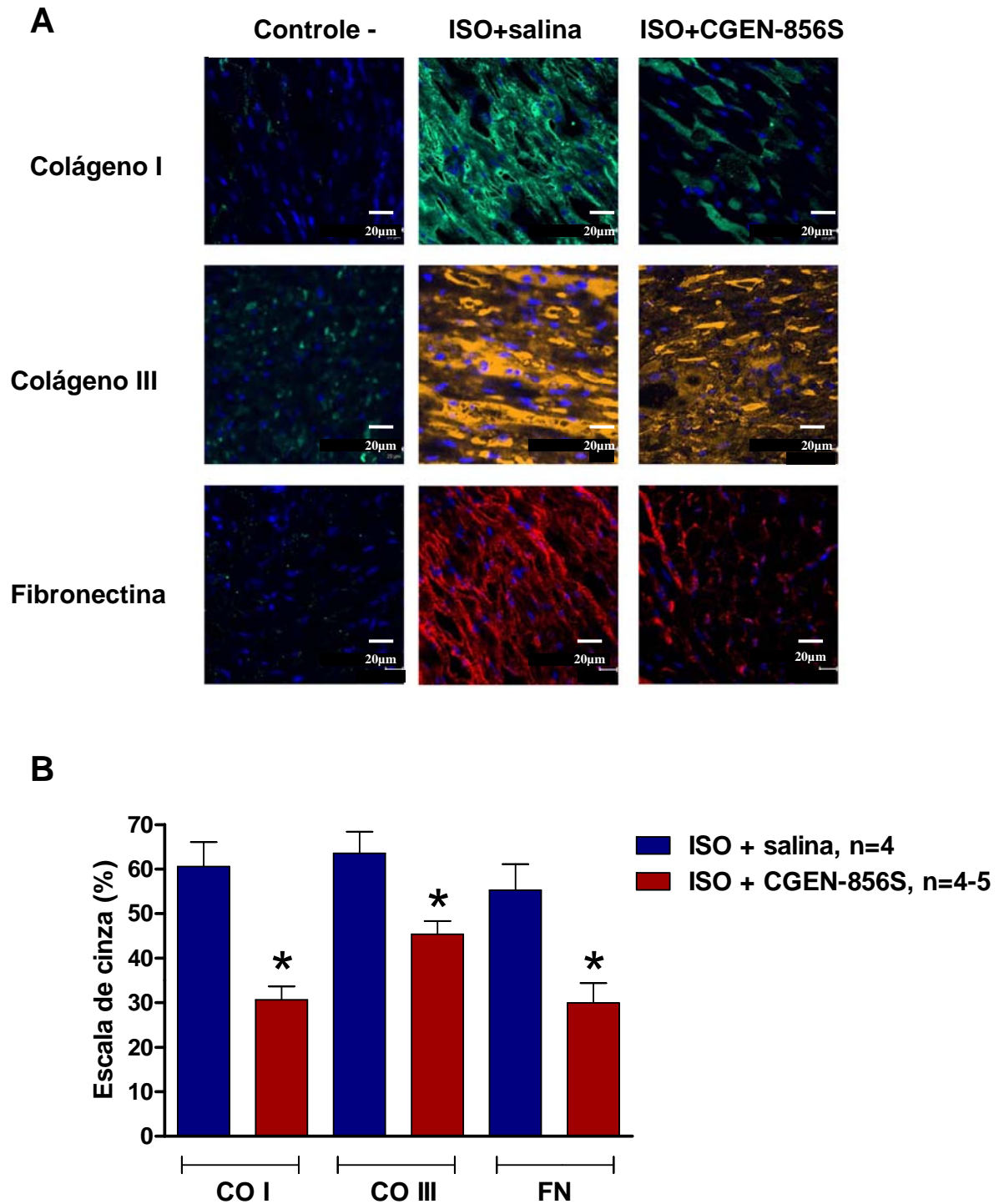


Figura 22 – Quantificação da expressão de proteínas da matriz extracelular do VE de ratos portadores de insuficiência cardíaca tratados com CGEN-856S. Microfotografia confocal (A) e quantificação das proteínas de matriz extracelular (B). * $p < 0,05$ vs ISO+salina (Teste t de student).

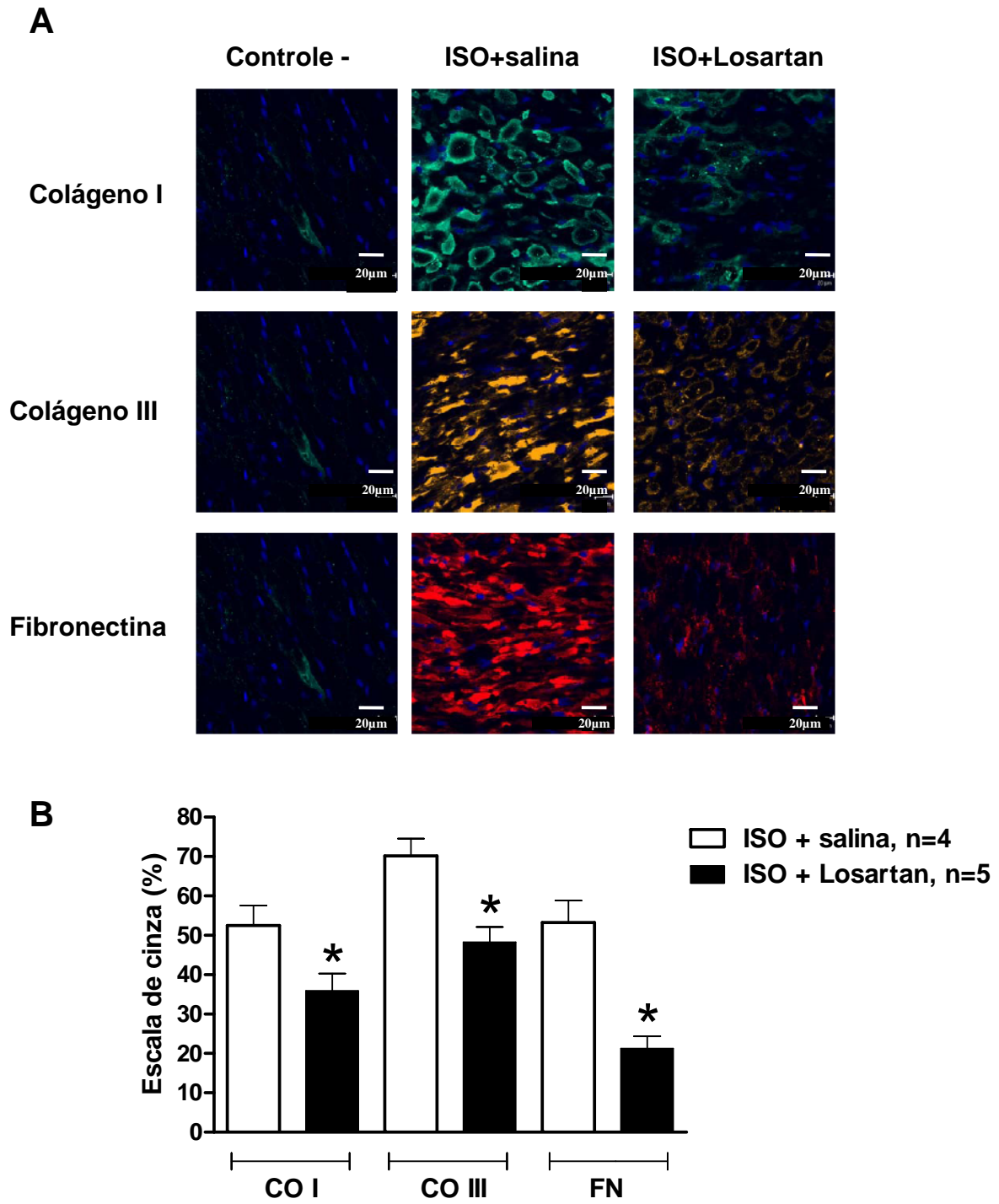


Figura 23 – Quantificação da expressão de proteínas da matriz extracelular do VE de ratos portadores de insuficiência cardíaca tratados com Losartan. Microfotografia confocal (A) e quantificação das proteínas de matriz extracelular (B). * $p < 0,05$ vs ISO+salina (Teste t de student).

4.4 Avaliação do efeito da administração aguda do agonista do Mas, CGEN-856S, sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos Wistar e SHRs

A administração aguda de CGEN-856S (0,3 a 300ng/Kg/min) em ratos Wistar conscientes produziu uma diminuição significativa da pressão arterial média (PAM), de maneira dose-dependente (Figura 24). Durante a infusão de CGEN-856S, a redução da PAM na maior dose utilizada (300 ng/Kg/min) foi de $-6,2 \pm 2,3$ mmHg. Interessantemente, pós a interrupção da infusão do peptídeo, a PAM continuou a diminuir, atingindo a redução máxima (Δ : $-8,1 \pm 1,6$ mmHg) (Figura 24). Os valores basais da PAM dos animais foram: $97,6 \pm 6,3$ mmHg para o grupo controle e $97,4 \pm 6,3$ mmHg para o grupo CGEN-856S.

CGEN-856S não alterou significativamente a FC de ratos Wistar (Figura 25). Os valores basais da FC desses animais foram: $370,6 \pm 4,9$ bpm para o grupo controle e $376,1 \pm 7,7$ bpm para o grupo CGEN-856S.

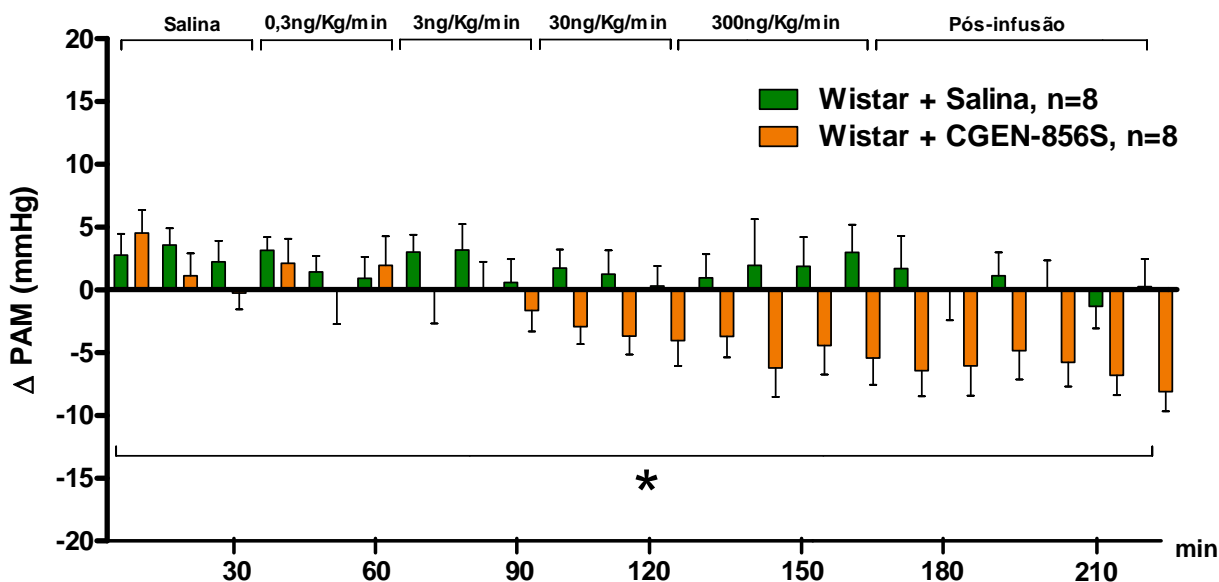


Figura 24 – Variação da PAM de ratos Wistar conscientes durante e 60 minutos após a infusão de doses crescentes de CGEN-856S ou salina. As barras representam valores obtidos a cada 10 min de infusão. * $p < 0,05$ CGEN-856S vs Salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

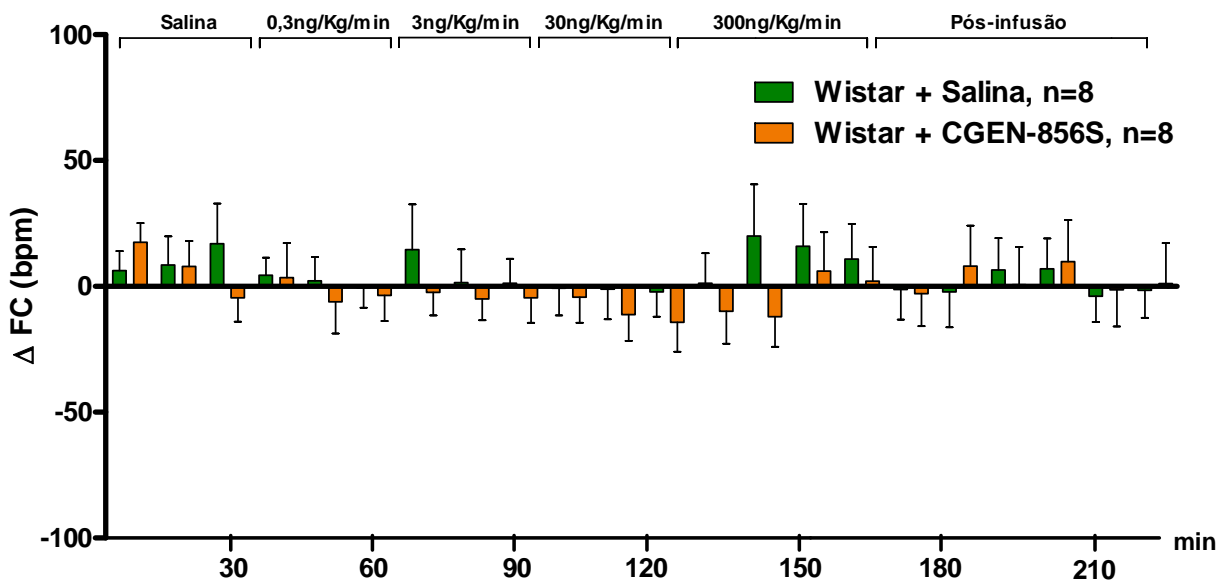


Figura 25 – Variação da FC de ratos Wistar conscientes durante e 60 minutos após a infusão de doses crescentes de CGEN-856S ou salina. As barras representam valores obtidos a cada 10 min de infusão. * $p < 0,05$ CGEN-856S vs Salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

A infusão de CGEN-856S em SHRs conscientes produziu uma diminuição significativa da PAM, de maneira dose-dependente (Figura 26). Contudo, a magnitude da alteração da PAM induzida pelo CGEN-856S foi consideravelmente maior nos animais hipertensos quando comparados aos animais normotensos. A redução da PAM foi significativa a partir da dose de 3 ng/Kg/min (Δ : $-5,9 \pm 2,3$ mmHg) (Figura 26). A queda máxima da PAM durante a infusão do CGEN-856S foi observada na maior dose (300 ng/Kg/min; Δ : $-9,7 \pm 3,7$ mmHg). Semelhantemente ao efeito observado em ratos Wistar, a pressão arterial continuou a reduzir no período de pós-infusão, atingindo a queda máxima aos 60 minutos (Δ : $-16,6 \pm 2,3$ mmHg). A infusão de salina não alterou a PAM (Figura 26). Os valores basais da PAM dos animais foram: $141,0 \pm 3,9$ mmHg para o grupo controle e $147,3 \pm 1,2$ mmHg para o grupo CGEN-856S.

Uma pequena e transitória, porém significativa, redução da FC foi induzida pelo CGEN-856S em SHRs (Figura 27). Os valores basais da FC nestes animais foram: $335,0 \pm 21,4$ bpm para o grupo controle e $399,1 \pm 15,18$ bpm para o grupo CGEN-856S.

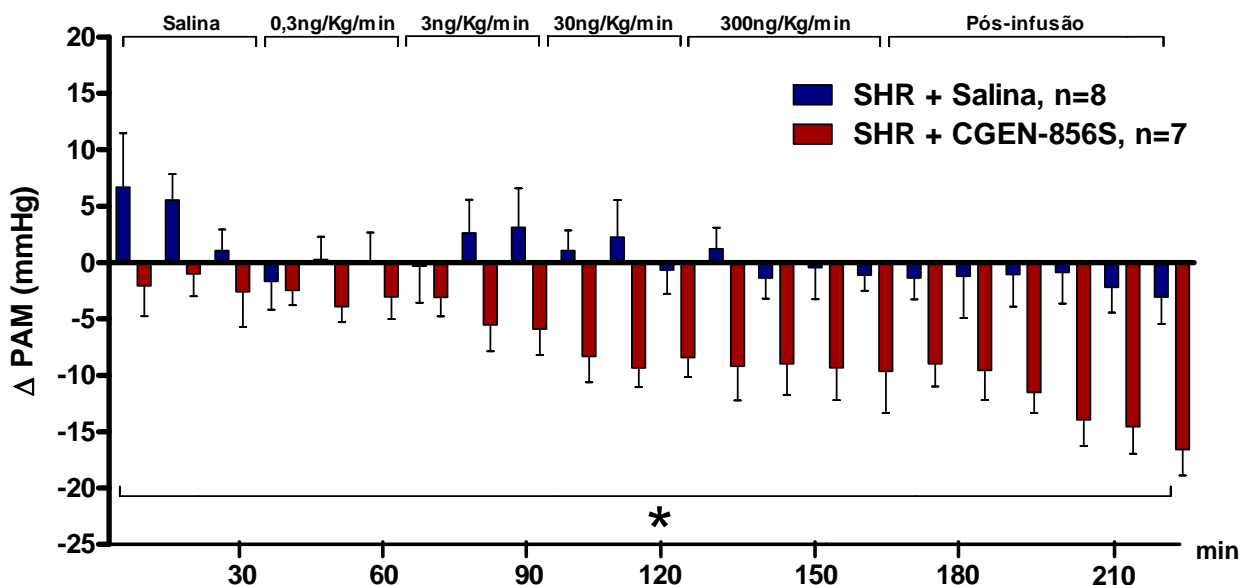


Figura 26 – Variação da PAM de SHRs conscientes durante e 60 minutos após a infusão de doses crescentes de CGEN-856S ou salina. As barras representam valores obtidos a cada 10 min de infusão. * $p < 0,05$ CGEN-856S vs Salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

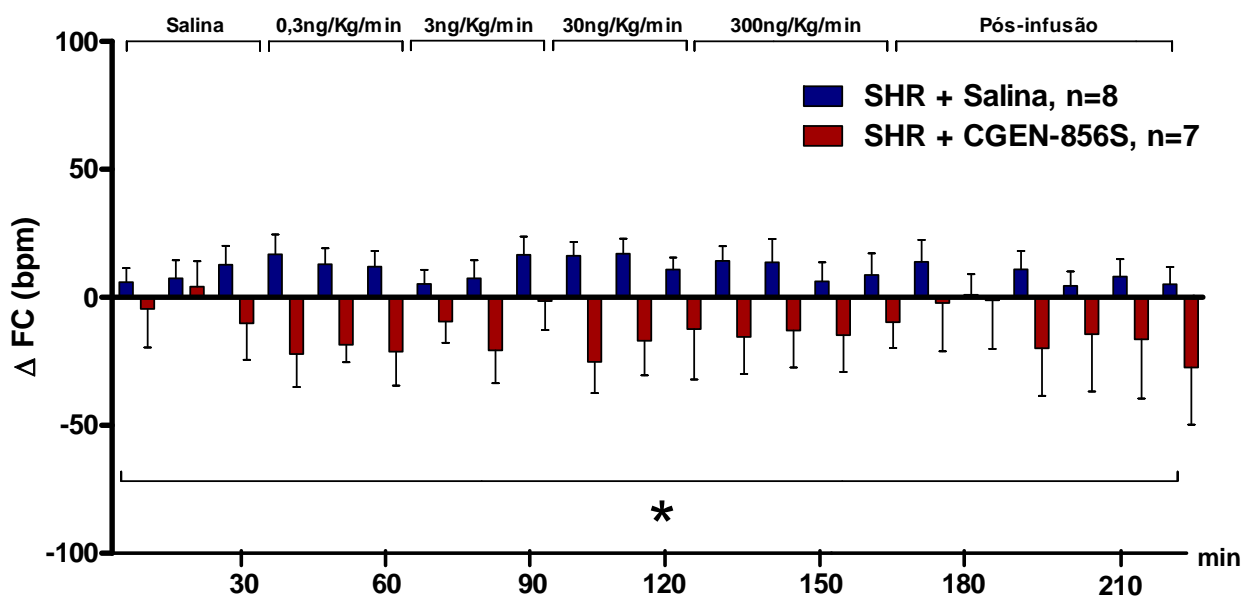


Figura 27 – Variação da FC de SHRs conscientes durante e 60 minutos após a infusão de doses crescentes de CGEN-856S ou salina. As barras representam valores obtidos a cada 10 min de infusão. * $p < 0,05$ CGEN-856S vs Salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.5 Avaliação dos efeitos da administração crônica do CGEN-856S em ratos Wistar e SHRs

4.5.1 Efeito do tratamento crônico com CGEN-856S sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos

Ratos Wistar submetidos ao tratamento crônico (28 dias) com o CGEN-856S apresentaram valores de pressão arterial média e frequência cardíaca semelhantes aos animais Wistar controle (Figura 28).

Entretanto, o tratamento com o CGEN-856S reduziu significativamente a pressão arterial dos animais SHRs (PAM=150,5 ± 4,9 mmHg para o grupo CGEN-856S vs 169,2 ± 3,3 mmHg para o grupo controle), além de reduzir significativamente a frequência cardíaca (FC= 293,3 ± 7,7 bpm para o grupo CGEN-856S vs 333,9 ± 9,7 bpm para o grupo controle), como mostrado na figura 29.

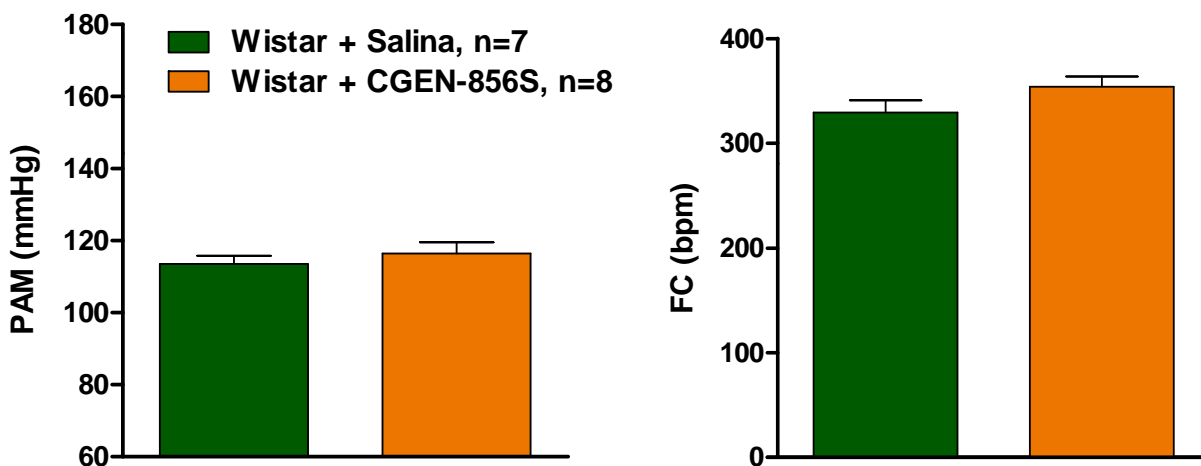


Figura 28 – Valores de pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos Wistar tratados com CGEN-856S (18 µg/Kg/h) ou salina durante 28 dias. Os parâmetros foram medidos nos animais conscientes (Teste *t* de student).

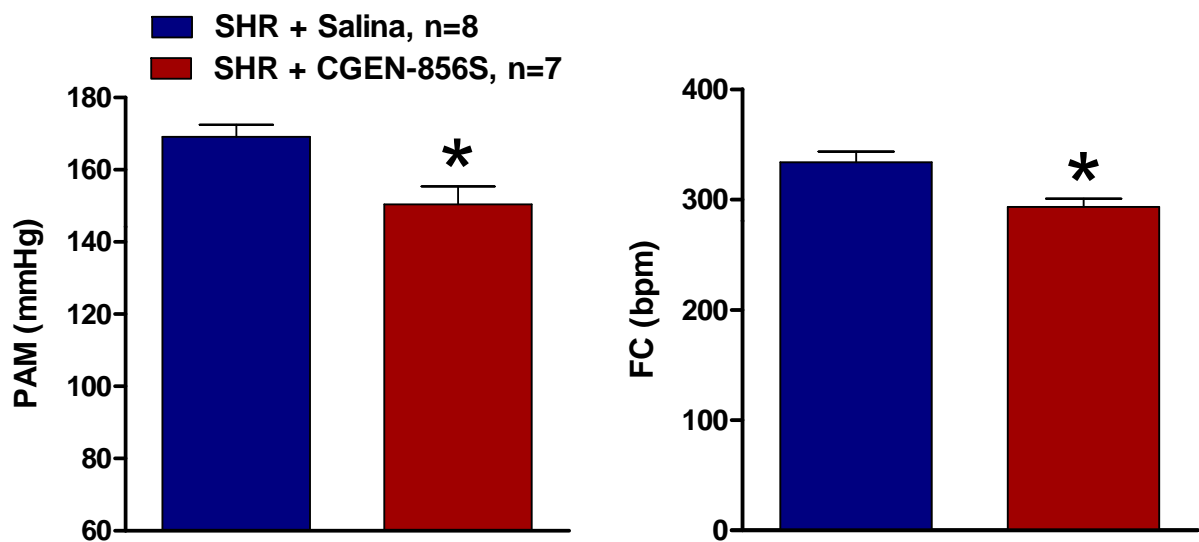


Figura 29 – Valores de pressão arterial média e frequência cardíaca de SHRs tratados com CGEN-856S (18 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{h}$) ou salina durante 28 dias. Os parâmetros foram medidos nos animais conscientes * $p < 0,05$ vs Salina (Teste t de student).

4.5.2 Efeito do tratamento crônico com CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco e renal de ratos normotensos e hipertensos

Como esperado, os SHRs apresentaram um aumento significativo da massa muscular cardíaca quando comparados aos animais Wistar (Figura 30). O tratamento crônico com o CGEN-856S atenuou significativamente este aumento de massa cardíaca, como mostrado na figura 30. Nenhuma alteração significativa foi observada nos animais Wistar tratados com o peptídeo (Figura 30). Apesar da redução do peso do coração induzido pelo CGEN-856S, medidas do diâmetro do cardiomiócitos mostraram valores semelhantes entre o grupo SHR+CGEN-856S e SHR+salina (Figura 31).

A análise da quantificação da deposição de matriz extracelular no coração e no rim dos animais hipertensos mostrou um aumento significativo da deposição de MEC nestes tecidos em relação ao grupo controle (Figura 32 e 33). De maneira interessante, o tratamento crônico com o CGEN-856S reduziu significativamente a deposição de MEC no tecido cardíaco e renal dos SHRs (Figura 32 e 33).

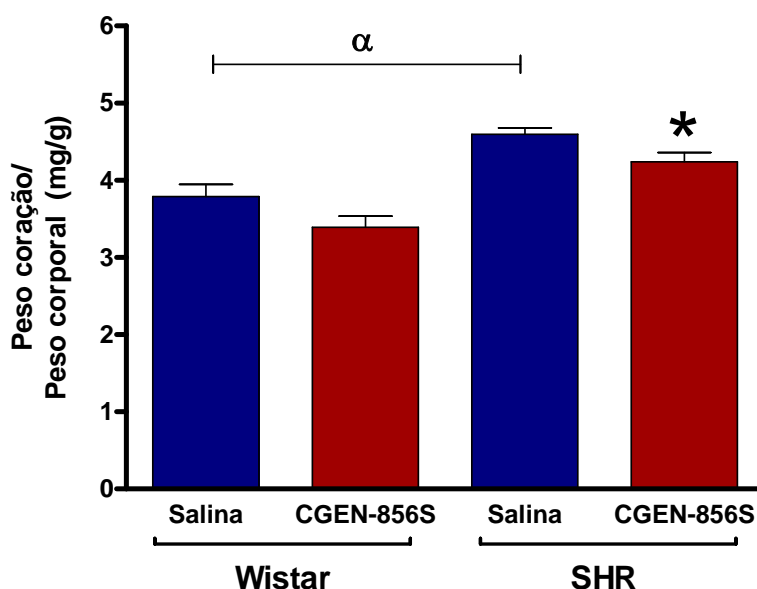


Figura 30 – Quantificação da massa muscular cardíaca de ratos Wistar ou SHRs tratados com CGEN-856S ou salina. CGEN-856S (18 μ g/Kg/h) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica, durante 28 dias (n=7-8). * p <0,05 vs SHR+salina; α p <0,05 (Teste t de student).

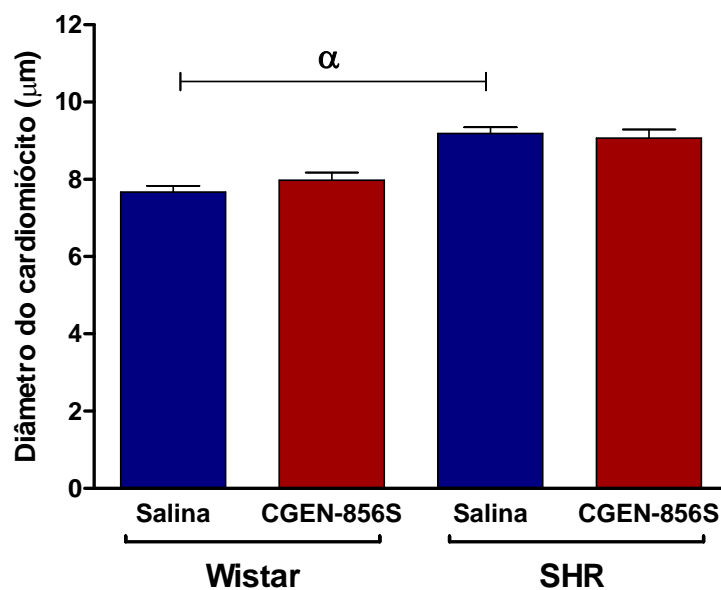


Figura 31 – Medida do diâmetro dos cardiomiócios de ratos Wistar ou SHRs tratados com CGEN-856S ou salina durante 28 dias. CGEN-856S (18 µg/Kg/h) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica (n=4-7). α $p < 0,05$ (Teste t de student).

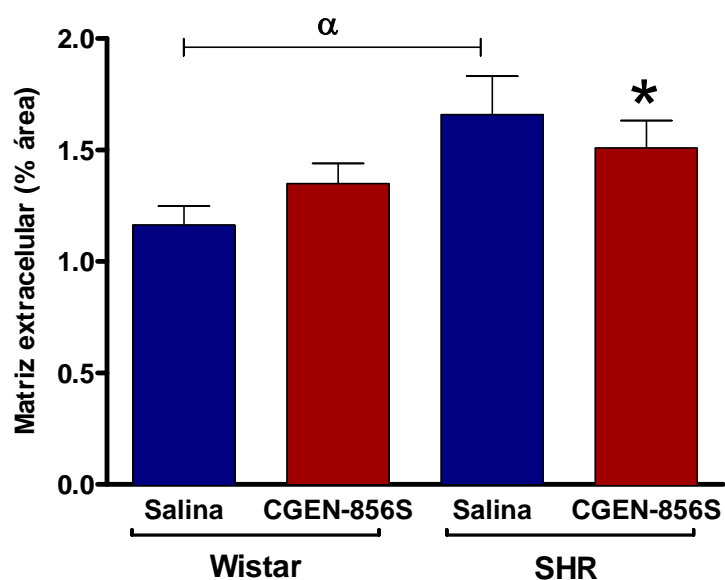


Figura 32 – Quantificação da matriz extracelular no coração de ratos Wistar ou SHRs tratados com CGEN-856S ou salina durante 28 dias. CGEN-856S (18 µg/Kg/h) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica (n=5). α $p < 0,05$ (Teste t de student).

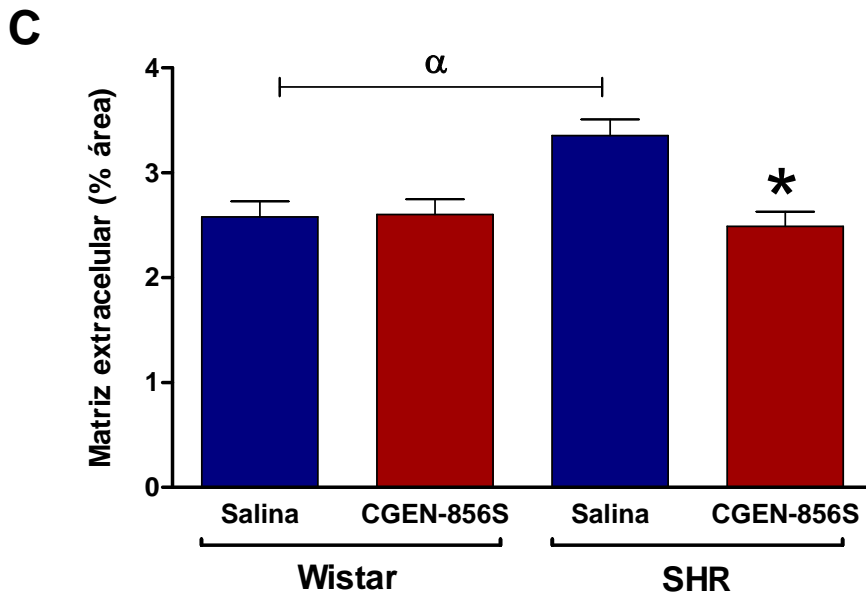
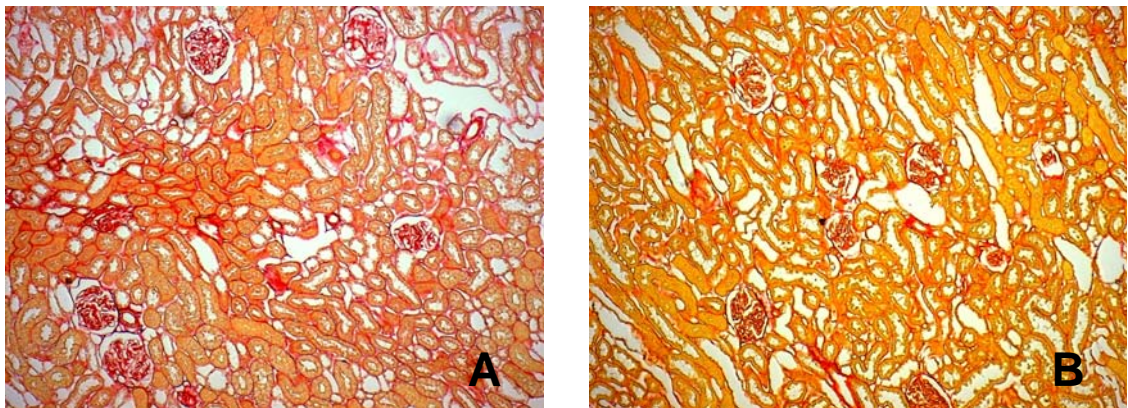


Figura 33 – Microfotografias representativas das lâminas de tecido renal coradas com Sirius-Red (aumento 10X) do grupo SHR tratado com salina (A) e SHR tratado com o CGEN-856S (B). Quantificação da matriz extracelular renal de ratos Wistar ou SHRs tratados com o CGEN-856S ou salina (C). CGEN-856S (18 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{h}$) ou salina foram administrados através de mini-bomba osmótica durante 28 dias (n=5). * $p < 0,05$ vs SHR+salina; $\alpha < 0,05$ (Teste t de student).

4.6 Efeito do tratamento com CGEN-856S sobre a insuficiência cardíaca induzida pelo infarto agudo do miocárdio em ratos

4.6.1 Efeito do tratamento com CGEN-856S sobre a função cardíaca de ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio

Ratos Wistar submetidos ao infarto do miocárdio (IM) e tratados com veículo apresentaram redução significativa da tensão sistólica, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ quando comparados aos animais sham-operados (Figuras 34 e 35, respectivamente).

De maneira interessante, o tratamento com o CGEN-856S durante 14 dias atenuou significativamente a redução da tensão sistólica ($10,8 \pm 0,1$ vs $6,2 \pm 0,2$ g para o IAM+veículo; Figura 34), $+dT/dt$ ($269,5 \pm 2,5$ vs $206,8 \pm 1,8$ g/s para o IM+salina; Figura 35) e $-dT/dt$ ($214,0 \pm 2,3$ vs $138,5 \pm 4,1$ g/s para o IM+salina; Figura 35) induzida pelo infarto do miocárdio.

Nenhuma alteração significativa foi observada na tensão diastólica (Figura 34), fluxo coronariano e FC (Figura 36).

De maneira semelhante, o Captopril, utilizado como padrão-ouro, preservou a tensão sistólica e atenuou a redução da $+dT/dt$ e $-dT/dt$ quando comparado com o grupo IM+salina.

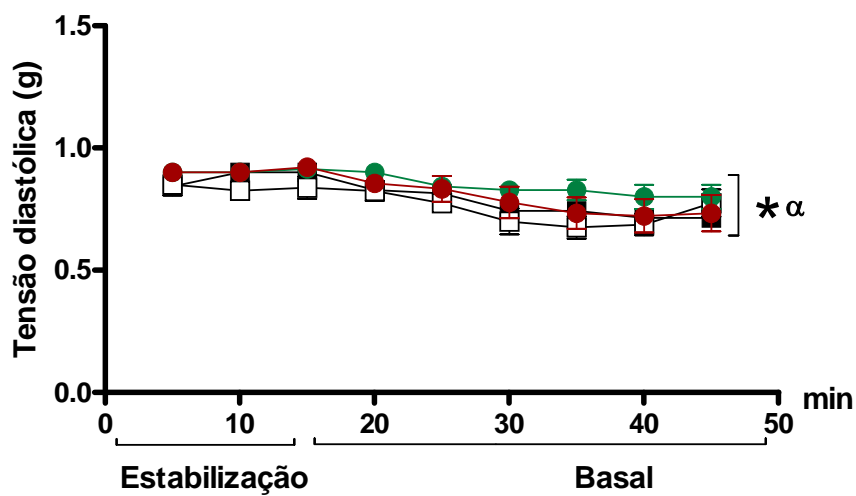
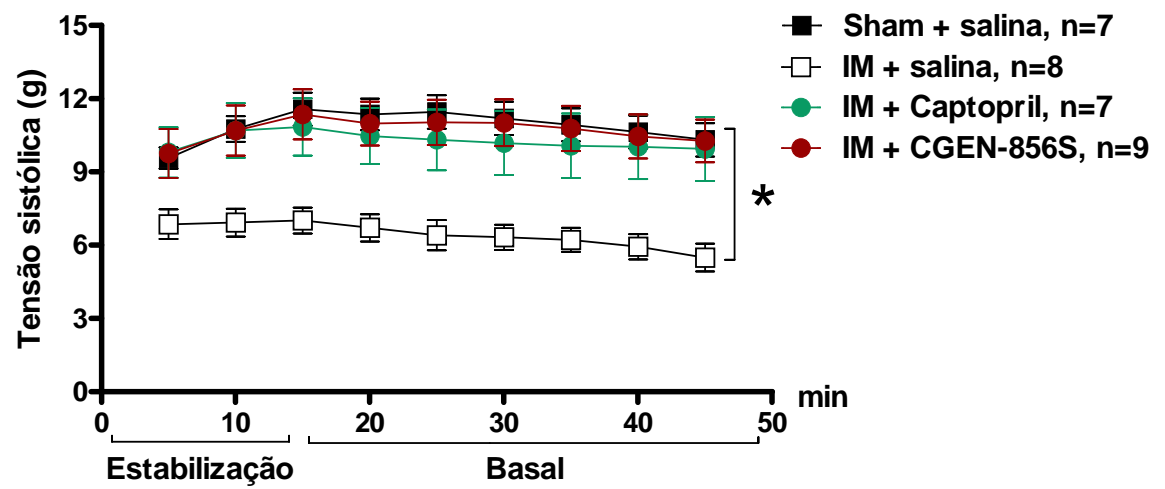


Figura 34 – Tensão sistólica e diastólica de corações isolados de ratos sham-operados ou infartados tratados com salina, Captopril (1 mg/Kg/dia) ou CGEN-856S (3,6 μ g/Kg/h). Os dados foram coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento. α $p < 0,05$ vs sham+veículo; * $p < 0,05$ vs IM+salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

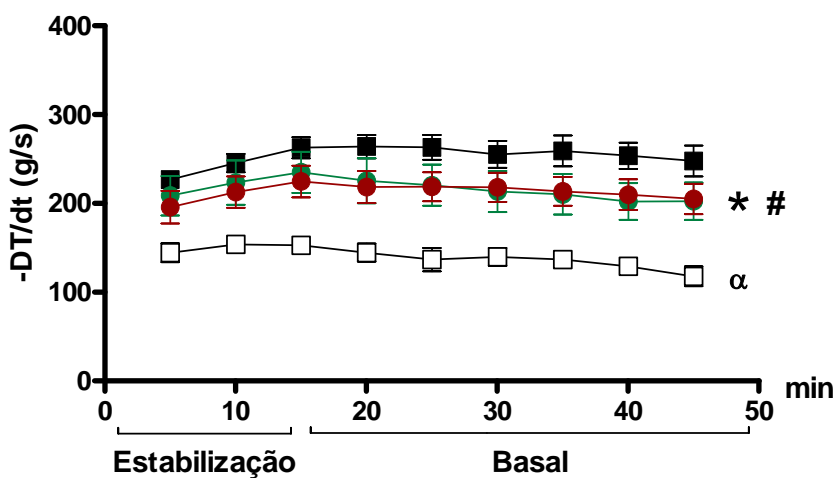
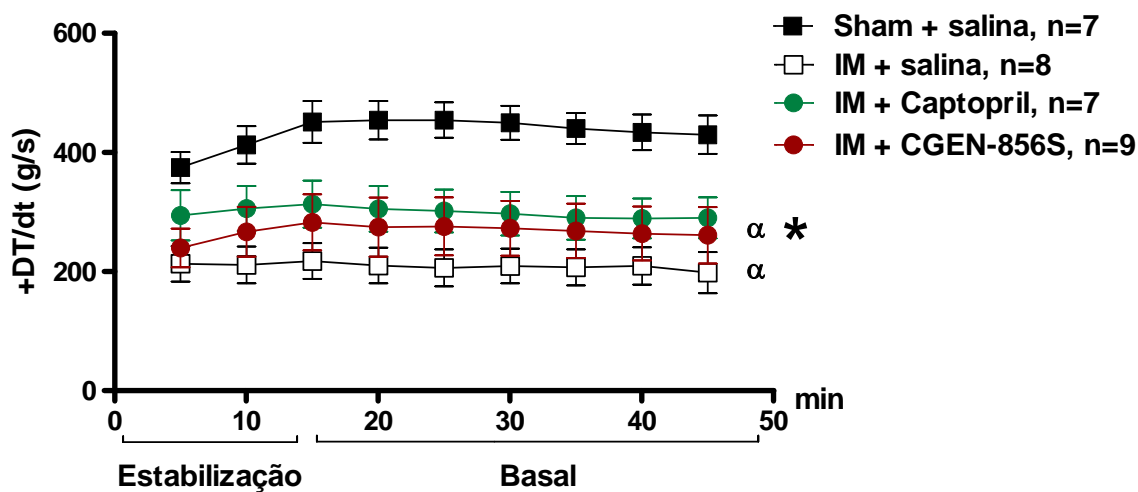


Figura 35 – DT/dt positiva e negativa de corações isolados de ratos sham-operados ou infartados tratados com salina, Captopril (1 mg/Kg/dia) ou CGEN-856S (3,6 μ g/Kg/h). Os dados foram coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento. α $p < 0,05$ vs sham+salina; α^* $p < 0,05$ IM+CGEN-856S e IM+Captopril vs IM+salina; $\#$ $p < 0,05$ IM+CGEN-856S e IM+Captopril vs sham (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

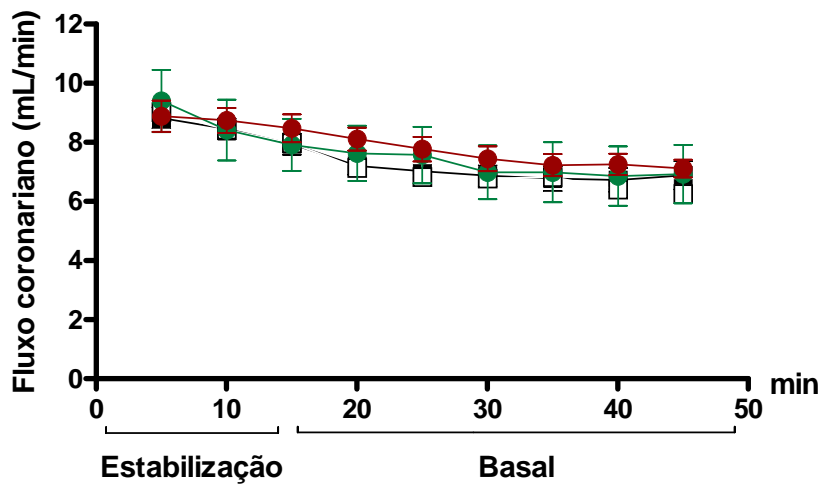
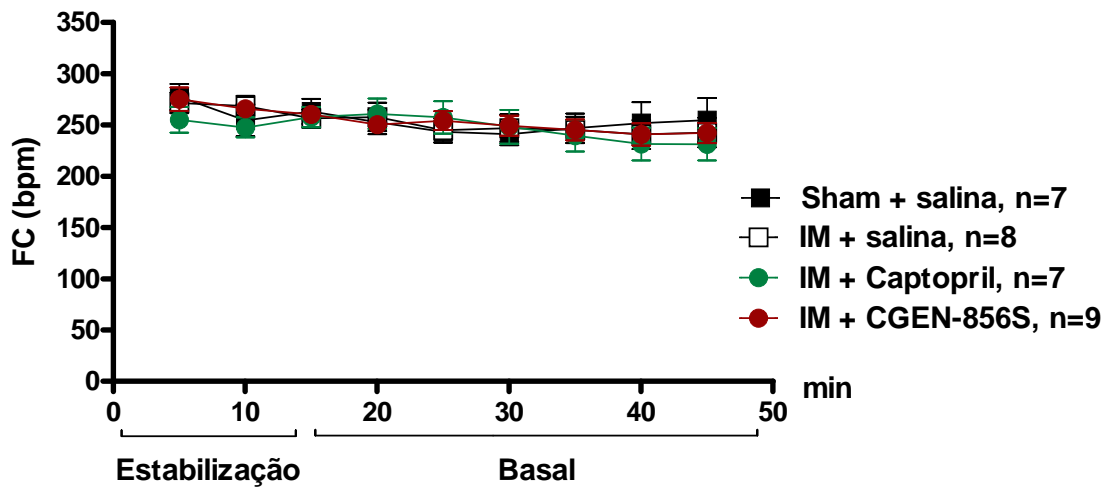


Figura 36 – Frequência cardíaca e fluxo coronariano de corações isolados de ratos sham-operados ou infartados tratados com salina, Captopril (1 mg/Kg/dia) ou CGEN-856S (3,6 µg/Kg/h). Os dados foram coletados a cada 5 minutos durante todo o experimento (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.6.2 Efeito do tratamento com CGEN-856S sobre a área de infarto em corações de ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio

A área de infarto cardíaco foi significativamente maior nos animais infartados tratados com salina quando comparados aos animais sham ($23,7 \pm 1,9$ vs $0,7 \pm 0,3$ % para o sham) (Figura 37). O tratamento com o CGEN-856S diminuiu significativamente a área de infarto ($15,7 \pm 3,2$ vs $23,7 \pm 1,9$ % para o IM+salina) (Figura 37). Ratos infartados tratados com Captopril não apresentaram diferença significativa na área de infarto quando comparados com o grupo IM+salina ($18,01 \pm 3,6$ vs $23,7 \pm 1,9$ % para o IM+salina; Figura 37).

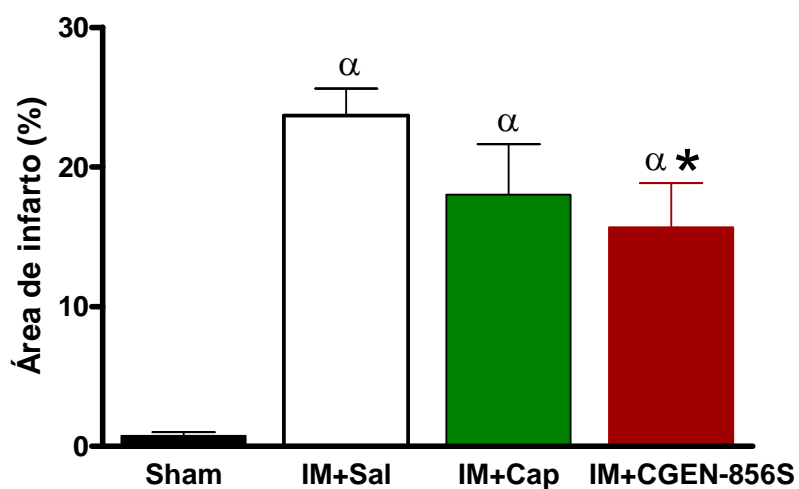


Figura 37 – Quantificação da área de infarto (%) em corações de ratos sham-operados ou infartados tratados com salina, Captopril (1 mg/Kg/dia) ou CGEN-856S (3,6 μ g/Kg/h). α $p < 0,05$ vs Sham; $*p < 0,05$ vs IM+salina (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.7 Avaliação da especificidade de ligação do CGEN-856S nos receptores da angiotensina II, AT₁ e AT₂

Os efeitos cardiovasculares do CGEN-856S observados até o momento, poderiam ser justificados pela ligação deste composto ao receptor AT₁ (agindo como um antagonista deste receptor) ou por sua ligação ao receptor AT₂ (agindo como um agonista deste receptor).

Entretanto, a avaliação da afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores AT₁ e AT₂ revelou que, não houve evidência para uma ligação significativa do CGEN-856S ao receptor AT₁ (Figura 38). Além disso, a afinidade de ligação do CGEN-856S ao receptor AT₂ se mostrou 1000 vezes menor quando comparada à afinidade da Ang II (IC₅₀=4.957,2 nM vs 4,1 nM para a Ang II) (Figura 39).

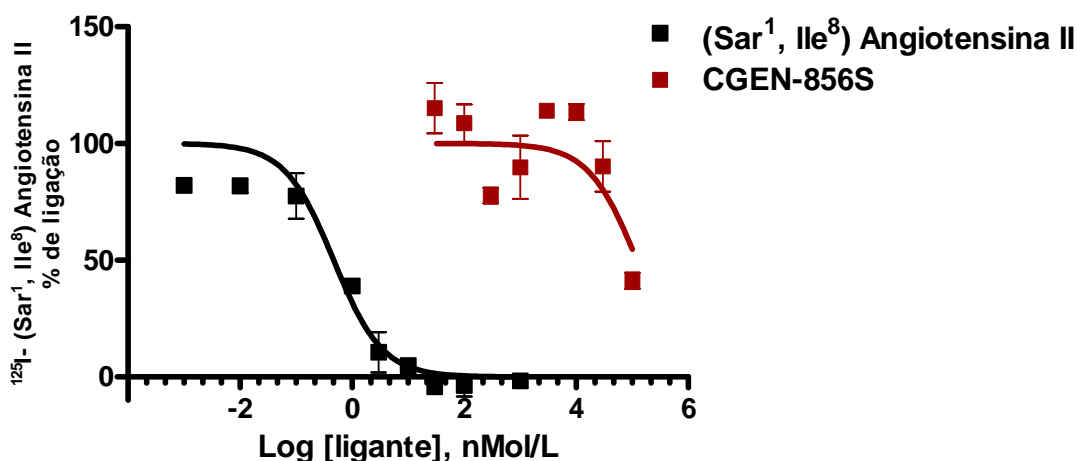


Figura 38 – Inibição competitiva da ligação do radioligante ¹²⁵I [Sar¹,Ile⁸] Ang II ao receptor AT₁ pela Ang II ou CGEN-856S. N= 2, em duplicata.

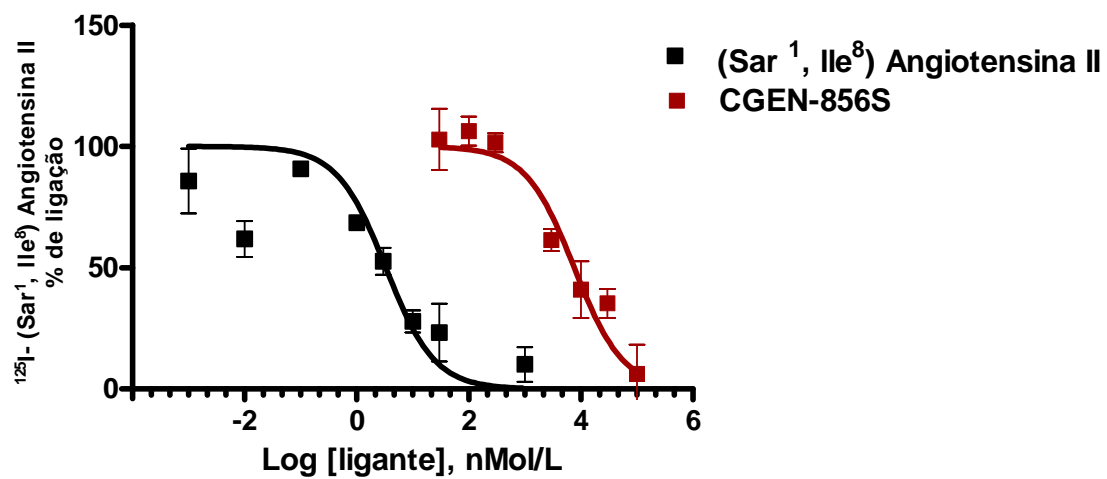


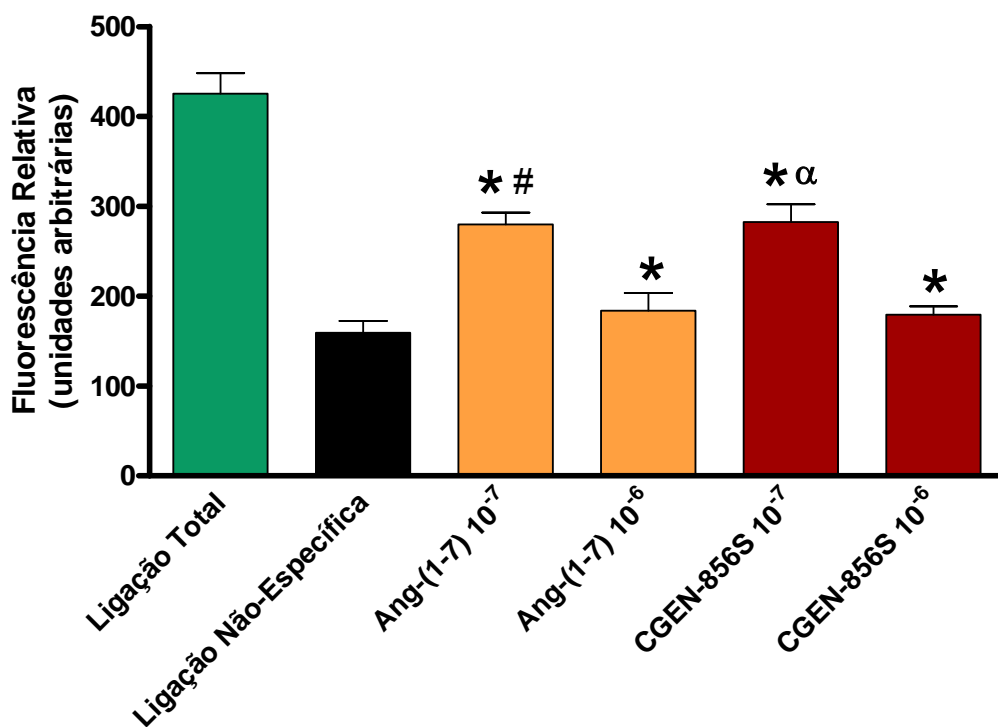
Figura 39 – Inibição competitiva da ligação do radioligante ¹²⁵I [Sar¹,Ile⁸] Ang II ao receptor AT₂ pela Ang II ou CGEN-856S. N= 2, em duplicata.

4.8 Avaliação da capacidade de ligação do CGEN-856S em células CHO transfectadas com o *Mas*

Com o propósito de investigar a capacidade de ligação do CGEN-856S ao receptor da Ang-(1-7), *Mas*, realizamos o ensaio descrito por Pinheiro e colaboradores (2004).

O CGEN-856S deslocou significativamente a ligação da Ang-(1-7) fluorescente em células CHO transfectadas com o *Mas* (Figura 40 A e B). A extensão do deslocamento foi similar ao observado para a Ang-(1-7) (Figura 40 B). Imagens de microscopia confocal mostrando a ligação da FAM-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas* estão representadas na figura 41.

A



B

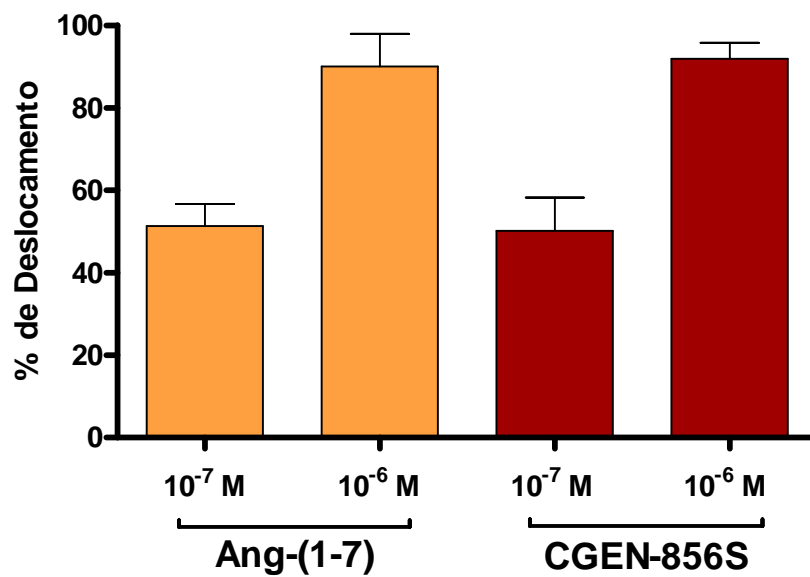


Figura 40 – Deslocamento da ligação da FAM-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas* (A, B). Fluorescência relativa capturada em microscopia confocal (A) e porcentagem de deslocamento da FAM-Ang-(1-7) pelo CGEN-856S e Ang-(1-7) (B). * $P < 0,05$ vs ligação total; # $P < 0,05$ vs Ang-(1-7) 10^{-6} M ; α $P < 0,05$ vs CGEN-856S 10^{-6} M (One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

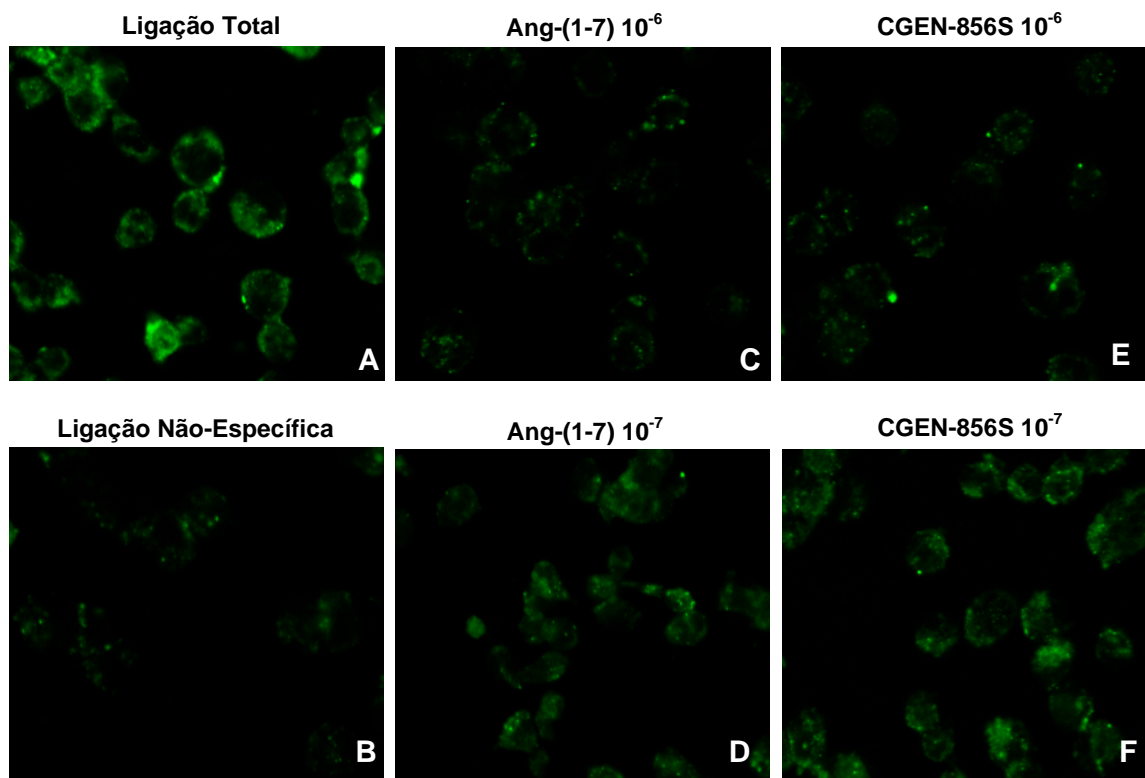


Figura 41 – Microfotografia confocal da ligação da FAM-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas*. Ligação total da FAM-Ang-(1-7) a 10^{-8} M (A); Ligação não-específica (B); Deslocamento da FAM-Ang-(1-7) pela Ang-(1-7), como controle positivo (C,D); Deslocamento da FAM-Ang-(1-7) pelo CGEN-856S (E,F).

4.9 Análise do efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA plasmática

Para investigar se os efeitos do CGEN-856S ocorriam devido à interferência com a atividade da ECA, determinamos o efeito deste peptídeo sobre a atividade da ECA plasmática.

O CGEN-856S não inibiu a atividade da ECA nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M, em contraste com a inibição induzida pela Ang-(1-7) (~60% de inibição a 10^{-5} M, $IC_{50}=2,58 \times 10^{-6}$ M). Nas mesmas condições do ensaio, o Captopril, um conhecido inibidor da ECA, aboliu significativamente a atividade desta enzima a 10^{-5} M ($IC_{50}=2,51 \times 10^{-8}$ M). Os resultados estão apresentados na figura 42.

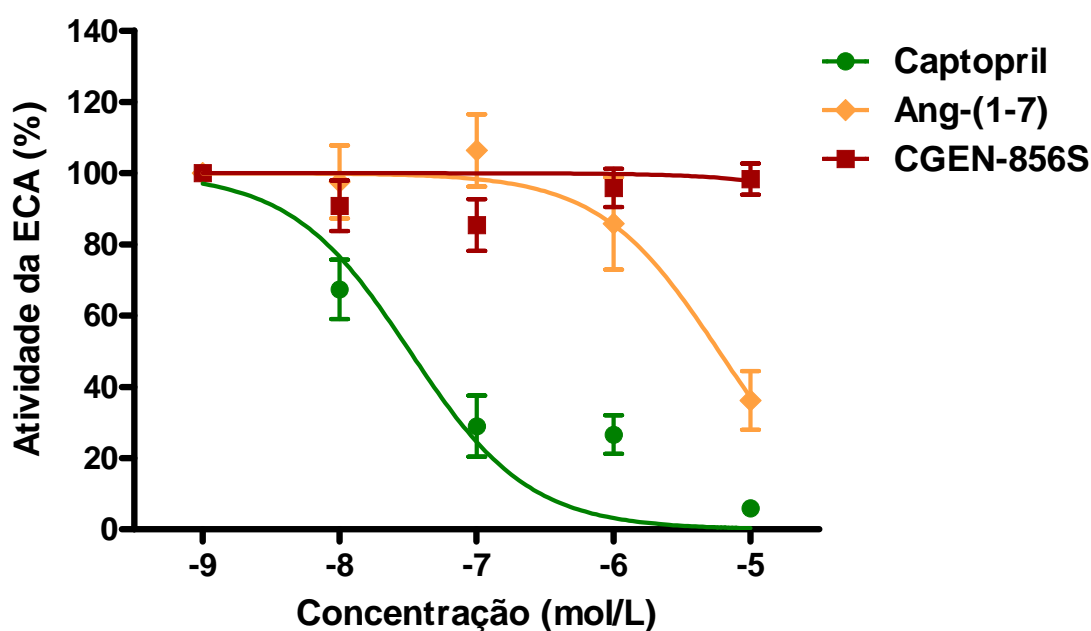


Figura 42 – Determinação do efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA plasmática. Concentrações finais de 10^{-9} a 10^{-5} M foram utilizadas para cada peptídeo. O Captopril foi utilizado como controle positivo (10^{-9} a 10^{-5} M). N=3 por grupo, em duplicata.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos cardiovasculares de um novo peptídeo agonista do Mas. A identificação deste composto ocorreu através da utilização de uma plataforma biológica computacional descrita por Shemesh *et al.* (2008).

O método desenvolvido pela empresa de biotecnologia *Compugen Ltd* permitiu a descoberta de novos ligantes de GPCRs inseridos no proteoma humano, inclusive ligantes potenciais para o receptor da Ang-(1-7), Mas. A identificação dos novos peptídeos foi baseada nos seguintes passos computacionais: 1) Criação de um conjunto de dados para a identificação de sítios proteolíticos; 2) Criação de um conjunto de dados para a predição do peptidoma humano; 3) Avaliação da probabilidade de cada peptídeo ser um ligante de GPCRs (Klioger *et al.*, 2008; Shemesh *et al.*, 2008).

Desta forma, os dímeros CGEN-856 e CGEN-857 foram descobertos e suas formas monômeras CGEN-856S e CGEN-857V foram criadas, através da substituição da cisteína pela serina e valina, respectivamente. Um estudo preliminar mostrou que tanto as formas monômeras quanto dímeras dos compostos CGEN estimularam o influxo de cálcio em células CHO transfectadas com o *Mas*, sugerindo serem ligantes deste receptor (Shemesh *et al.*, 2008).

Por terem sido desenvolvidos e indicados como agonistas do Mas há relativamente pouco tempo (Klioger *et al.*, 2008; Shemesh *et al.*, 2008), poucos experimentos com os peptídeos CGEN foram realizados até o momento.

Os principais achados do presente estudo foram: 1) O peptídeo CGEN-856S produziu efeito vasorelaxante em aorta de ratos; 2) O efeito vasodilatador induzido pelo CGEN-856S foi dependente do endotélio, da produção de NO e mediado pelo receptor Mas; 3) CGEN-856S reduziu as arritmias de reperfusão em corações isolados de rato; 4) CGEN-856S reduziu a hipertrofia e fibrose cardíacas induzidas pelo isoproterenol; 5) A administração aguda e crônica do CGEN-856S reduziu a PA em ratos hipertensos; 6) O tratamento crônico com o CGEN-856S também reduziu a fibrose renal em ratos hipertensos; 7) O tratamento com o CGEN-856S melhorou a função cardíaca de ratos infartados.

Em nossa primeira sequência de experimentos, encontramos que os quatro peptídeos CGEN produziram efeito relaxante concentração-dependente em anéis de aorta de rato e camundongo. O composto CGEN-856S, particularmente, induziu um efeito vasodilatador importante e de maneira similar à resposta da Ang-(1-7). A

vasodilatação induzida por este composto foi dependente da presença de endotélio funcional e abolida pelo tratamento com o inibidor da NOS, o L-NAME. Estas características conferem ao CGEN-856S uma semelhança com aquelas descritas para a Ang-(1-7) (Le Tran *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2007) e para o agonista não peptídico do Mas, o AVE 0991 (Lemos *et al.*, 2005; Santos & Ferreira, 2006).

O bloqueio da atividade da NOS pelo L-NAME sugere a participação do NO derivado do endotélio na resposta vasodilatadora induzida pelo novo agonista do Mas, CGEN-856S. De fato, várias linhas de evidência relacionam o receptor Mas à geração de NO na vasculatura e em outros tecidos (Pinheiro *et al.*, 2004; Da Costa *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2007; Dias-Peixoto *et al.*, 2008). O estudo de Pinheiro e colaboradores (2004) foi o primeiro a relatar uma interação entre o Mas e a liberação de NO. Tanto a Ang-(1-7) quanto o agonista não peptídico do receptor da Ang-(1-7), AVE 0991, induziram um aumento na produção de NO em células CHO transfectadas com o Mas (Pinheiro *et al.*, 2004). Este efeito foi bloqueado pelo A-779 mas não pelos antagonistas do receptor AT₁ ou AT₂ (Pinheiro *et al.*, 2004). Além disso, Da Costa e colaboradores (2007) demonstraram que a liberação de NO no corpo cavernoso de ratos foi potencializado pela Ang-(1-7). Este aumento da liberação de NO foi completamente inibido em camundongos KO-Mas (Da Costa *et al.*, 2007). O tratamento com Ang-(1-7) também aumentou a produção de NO em cardiomiócitos ventriculares de camundongos, efeito que foi abolido pelo pré-tratamento com A-779 e em camundongos KO-Mas (Dias-Peixoto *et al.*, 2008). Estas evidências mostram fortemente uma interação entre a ativação do Mas e a produção de NO, como também observado no presente estudo.

A Ang-(1-7), através da ativação do Mas, libera NO em cultura de células endoteliais humanas por uma via de sinalização da cascata da PI3K/Akt Ca⁺²-independente (Sampaio *et al.*, 2007). Se a PI3K/Akt é um componente chave da cascata de sinalização estimulada pelo CGEN-856S, permanece para ser investigado. Entretanto, as vias de sinalização intracelulares envolvidas nos efeitos da Ang-(1-7) podem diferir daquelas ativadas pelo composto CGEN-856S, provavelmente devido a uma interação diferente com o receptor. De fato, diferentes ligantes podem ativar vias de sinalização distintas ao estimular um mesmo receptor, termo conhecido como *biased agonism* (Schulte *et al.*, 2007; Violin *et al.*, 2007).

Apesar dessas possíveis diferenças, nossos dados, comparando o efeito da Ang-(1-7) e do CGEN-856S em anéis de aorta de rato numa mesma preparação, mostraram um padrão de relaxamento similar entre esses dois peptídeos. Além disso, a infusão aguda de CGEN-856S em SHR produziu um efeito anti-hipertensivo equivalente ao observado para a Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2009), o que será melhor discutido posteriormente.

O efeito vasodilatador induzido pelo peptídeo CGEN-856S foi abolido na presença de A-779 e em anéis de aorta de camundongos KO-Mas. Esses dados sugerem que, assim como o efeito da Ang-(1-7), a vasodilatação induzida pelo CGEN-856S é dependente da interação com o receptor específico da Ang-(1-7). Outro dado que corrobora esta hipótese é a capacidade do CGEN-856S deslocar a ligação da FAM-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas*, indicando que este peptídeo compete pelo mesmo sítio de ligação da Ang-(1-7). Mais uma vez, o resultado obtido com o CGEN-856S foi comparável ao resultado obtido com o AVE 0991, o qual deslocou a ligação da Ang-(1-7) em cultura de células CHO transfectadas com o *Mas* (Pinheiro *et al.*, 2004).

A partir dos resultados desta avaliação preliminar, selecionamos o peptídeo CGEN-856S para ser melhor investigado quanto a seus efeitos cardiovasculares *in vitro* e *in vivo*.

Um importante efeito produzido pela estimulação do Mas, claramente descrito na literatura, é o efeito anti-arritmogênico induzido pela Ang-(1-7) (Ferreira *et al.*, 2001). Portanto, foi nosso objetivo avaliar o efeito do novo agonista do Mas nas arritmias cardíacas, através do modelo experimental de isquemia e reperfusão.

Nossos dados mostram o efeito anti-arritmogênico induzido pelo CGEN-856S na concentração de 0,04 nmol/L em corações isolados de rato. Este efeito foi seguido de melhora da função cardíaca, observada pela preservação da tensão sistólica e diastólica durante a reperfusão, sem alterações na FC. Nossos achados estão de acordo com trabalhos que mostram o envolvimento do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas na manutenção ou preservação da função cardíaca pós-isquêmica (Brosnihan *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

A Ang-(1-7), em baixa concentração (0,2 nmol/L), apresentou efeito anti-arritmogênico (Ferreira *et al.*, 2001) e melhorou a função miocárdica pós-isquêmica (Ferreira *et al.*, 2002), através de mecanismo dependente do receptor Mas. Castro e

colaboradores (2006) demonstraram que corações isolados de camundongos WT tratados com A-779 e camundongos KO-Mas apresentaram diminuição da tensão sistólica, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ após isquemia global e reperfusão. A importância do Mas na manutenção da função cardíaca também foi mostrada através do ecocardiograma em animais KO-Mas, o qual revelou uma diminuição da fração de encurtamento, da espessura da parede posterior e do septo interventricular na sístole e diástole, entre outras alterações (Santos *et al.*, 2006). Desta forma, a cardioproteção induzida pelo CGEN-856S (0,04 nmol/L) vai de encontro aos efeitos mediados pelo Mas, indicando seu importante papel na preservação da função cardíaca.

A ausência de efeito do CGEN-856S sobre as arritmias de reperfusão na concentração de 0,2 nmol/L foi similar aos dados prévios observados com a Ang-(1-7). Neves e colaboradores (1997) relataram que a Ang-(1-7) a 27 nmol/L produziu um aumento significativo nas arritmias de reperfusão em corações isolados de rato. Entretanto, Ferreira e colaboradores (2001) mostraram que, na concentração de 0,2 nmol/L, a Ang-(1-7) apresenta um efeito anti-arritmogênico, o qual foi reproduzido no presente estudo. Assim, a Ang-(1-7) apresenta uma clara tendência a uma curva dose-resposta em forma de sino ou a um efeito bifásico (De Mello, 2009; Ferreira *et al.*, 2010). Estes dados apóiam os achados do presente estudo, o qual mostra o efeito bifásico e dependente da concentração do CGEN-856S nas arritmias de reperfusão.

Uma vez conhecida a ação vasodilatadora do CGEN-856S em anéis de aorta, avaliamos o efeito deste peptídeo sobre as variáveis cardiovasculares basais em animais normotensos e hipertensos. Nossos resultados mostram que a administração aguda (curva dose-resposta) e crônica (28 dias) do CGEN-856S produz efeito anti-hipertensivo em SHRs. Estes dados estão de acordo com estudos em andamento em nosso laboratório, utilizando a Ang-(1-7) em animais hipertensos (Santos *et al.*, 2009; Anexo C) e com relatos prévios (Benter *et al.*, 2006; Giani *et al.*, 2009), sugerindo que a estimulação do Mas pode ser uma estratégia para o tratamento da hipertensão arterial.

Entretanto, o efeito da Ang-(1-7) sobre a pressão arterial parece depender diretamente de alguns fatores, tais como o tipo de administração (aguda *versus* crônica), o modelo experimental utilizado e a pressão arterial basal do animal.

Neste sentido, diversos estudos relatam ausência de efeito da Ang-(1-7) sobre a pressão arterial de animais normotensos. Strawn e colaboradores (1999)

mostraram que a infusão crônica de Ang-(1-7) não alterou a pressão arterial sistólica, diastólica e a FC em ratos normotensos. Por outro lado, a Ang-(1-7) apresenta potente efeito na distribuição do fluxo sanguíneo e hemodinâmica sistêmica em ratos normotensos. A infusão de Ang-(1-7) em doses baixas (110 fmol/min) em ratos normotensos produz importantes alterações no fluxo sanguíneo regional, diminuindo a resistência periférica vascular em diferentes territórios (mesentério, cérebro, pele e rins) (Sampaio *et al.*, 2003). Apesar destes efeitos, nenhuma alteração na pressão arterial foi observada (Sampaio *et al.*, 2003). Considera-se que o aumento concomitante do débito cardíaco poderia mascarar a diminuição na resistência periférica total (RPT) produzida pela Ang-(1-7), impedindo que alterações na pressão sanguínea sejam observadas.

Medidas de telemetria mostraram que animais TGR(A1-7)3292, um modelo de rato transgênico que expressa uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7), apresentam pressão arterial similar aos seus controles Sprague Dawley (SD) (Santos *et al.*, 2004). A avaliação da distribuição do fluxo sanguíneo regional nestes animais revelou aumentos importantes da condutância vascular nos rins, pulmões, adrenal, fígado, cérebro, testículos e tecido adiposo marrom (Botelho *et al.*, 2007). Estes animais também apresentaram aumento do débito cardíaco em relação aos seus controles (Botelho *et al.*, 2007), o que, mais uma vez, poderia explicar a ausência de efeito substancial na pressão arterial em resposta à Ang-(1-7).

Ao contrário das observações em animais normotensos, a estimulação do Mas através da Ang-(1-7) produziu redução da pressão arterial em animais hipertensos. Benter e colaboradores (1995) relataram uma diminuição da pressão arterial no segundo dia de tratamento com Ang-(1-7) em SHR. Em outro estudo, a administração de Ang-(1-7) por um período acima de 7 dias reduziu a pressão arterial de SHR nos dias 4 e 5 de tratamento (Widdop *et al.*, 1999). Recentemente, Santos e colaboradores (2009) mostraram que a infusão de Ang-(1-7) (0,003-3nmol/Kg/min) em ratos hipertensos induziu uma redução dose-dependente da pressão arterial. De modo semelhante, Benter e colaboradores (2006) relataram que a Ang-(1-7) atenuou o desenvolvimento da hipertensão e a lesão de órgãos-alvo em SHR com disfunção endotelial induzida pelo tratamento com L-NAME. Santiago e colaboradores (2010) também mostraram que ratos TGR(A1-7)3292, após hipertensão induzida pelo modelo de DOCA-sal, apresentam atenuação da elevação da pressão arterial.

Outras evidências da importante função do Mas na homeostase cardiovascular foram apresentadas recentemente. A deleção genética do *Mas* em camundongos FVB/N produziu um aumento significativo da pressão arterial associado à disfunção endotelial (Xu *et al.*, 2008). Além disso, um aumento da resistência vascular em diversos órgãos e uma importante disfunção endotelial também foram observados em camundongos C57BL/6 *Mas*^{-/-} (Botelho-Santos *et al.*, 2008; Rabelo *et al.*, 2008).

Desta forma, estes e o presente estudo confirmam que a estimulação do Mas, através do CGEN-856S ou de outros agonistas, pode ser uma estratégia para o tratamento da hipertensão arterial. Entretanto, devido à complexidade das alterações hemodinâmicas induzidas pela ativação do Mas em ratos normotensos e hipertensos, faz-se necessário um maior esclarecimento dos aspectos envolvidos na regulação da pressão arterial através deste receptor.

Apenas uma redução transitória e dose-independente da FC foi observada através da infusão do CGEN-856S em SHRs. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que relatam um efeito bradicárdico da Ang-(1-7). Castro e colaboradores (2008) demonstraram que ratos TGR(A1-7)3292 apresentam menor FC comparados aos seus controles. Além disso, a infusão de Ang-(1-7) durante 7 dias induziu um pequeno, porém significativo, efeito bradicárdico em ratos Wistar (Braga *et al.*, 2002). Entretanto, o papel do receptor Mas sobre a FC permanece controverso, uma vez que alguns estudos relatam ausência de ação no ritmo cardíaco (Strawn *et al.*, 1999) ou até mesmo um aumento da FC (Ferreira *et al.* 2004; Castro *et al.*, 2008). Diferenças entre as espécies de animais e a duração do tratamento podem contribuir para estes achados discrepantes. O mecanismo do efeito seletivo do CGEN-856S sobre a FC em SHRs permanece para ser investigado.

Em nosso estudo, o efeito anti-hipertensivo induzido pelo CGEN-856S poderia ser justificado pela interferência deste peptídeo sobre a atividade da ECA ou poderia ser mediado pelos receptores da Ang II. Neste último caso, agindo como um antagonista do receptor AT₁ ou como um agonista do receptor AT₂. Para investigar esta hipótese, realizamos os ensaios de afinidade de ligação do CGEN-856S aos receptores da Ang II e determinamos o efeito do CGEN-856S sobre a atividade da ECA.

Nossos resultados mostraram que o CGEN-856S não inibiu a atividade da ECA e não apresentou afinidade pelo receptor AT₁. A baixa afinidade desse peptídeo pelo receptor AT₂ (1000 vezes menor que a afinidade da Ang II), juntamente com relatos da ausência de efeito de puros agonistas do AT₂ na pressão arterial em SHR acordados (Gelosa *et al.*, 2009), sugere fortemente a ausência de envolvimento do receptor AT₂ nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo CGEN-856S.

Dados da literatura demonstraram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é um componente essencial na cardioproteção ao remodelamento cardíaco (Santos *et al.*, 2004; Nadu *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010). Neste estudo investigamos o efeito dos novos agonistas do Mas sobre a hipertrofia cardíaca e o aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular induzidos pela estimulação β-adrenérgica. Nossos dados mostraram que a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pelo isoproterenol foi significativamente menor nos animais tratados com CGEN-856S. Além disso, a deposição de proteínas da matriz extracelular foi reduzida pelo tratamento com o peptídeo. O aumento da deposição de colágenos da matriz extracelular no coração, como observado em diversas patologias hipertensivas, como cardiomiopatia isquêmica e hipertrófica, leva ao acúmulo de tecido fibroso, comprometendo a função cardíaca (Schnee & Hsueh, 2000).

A participação da Ang-(1-7) e do seu receptor na proteção ao remodelamento cardíaco foi relatada previamente em diferentes estudos (Santos *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007; Mercure *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010). Gava (2006) demonstraram que animais KO-Mas apresentaram expressão aumentada de colágeno do tipo I, III e fibronectina, sugerindo que a interação Ang-(1-7)/Mas pode promover importantes efeitos anti-fibróticos no coração. Ratos transgênicos com níveis plasmáticos aumentados de Ang-(1-7), os TGR(A1-7)3292, apresentaram atenuação da hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol (Santos *et al.*, 2004). Além da Ang-(1-7), o agonista não peptídico do Mas, AVE 0991, também preveniu a hipertrofia e fibrose cardíacas induzidas pelo Isoproterenol, seguido por uma melhora da função cardíaca (Ferreira *et al.*, 2007).

Até o momento, os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos da estimulação do Mas no coração não estão completamente esclarecidos. Sabemos que fatores secundários, tais como prostanóides e NO (Muthalif *et al.*, 1998), são responsáveis por importantes efeitos da Ang-(1-7), como vasodilatação, efeitos

hipotensores, antiarritmogênicos e potenciação do efeito da bradicinina (Paula *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2001). Assim, o NO e as prostaglandinas podem ser os mediadores anti-fibróticos em resposta à ativação do Mas pelo CGEN-856S.

Outro mecanismo que pode participar do efeito anti-fibrótico induzido pela Ang-(1-7) é através da regulação da atividade e/ou expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores. O tratamento com inibidores de ECA e antagonistas do receptor AT₁ diminuíram a fibrose cardíaca, efeito que foi associado ao aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Chappell *et al.*, 1998) e um aumento dos níveis de metaloproteinases (Laviades *et al.*, 1998), indicando uma relação entre os níveis de Ang-(1-7) e a atividade ou expressão de metaloproteinases de matriz.

Nosso estudo mostrou que o tratamento crônico com o CGEN-856S por 28 dias preveniu o aumento da fibrose cardíaca e renal em SHR, o que contribuiu para um menor comprometimento funcional destes órgãos. Efeito semelhante foi observado por Grobe e colaboradores (2006 e 2007), que mostraram que a infusão de Ang-(1-7) durante 4 semanas preveniu a fibrose cardíaca em dois modelos de hipertensão, um induzido pela infusão crônica de Ang II (Grobe *et al.*, 2007) e outro em modelo DOCA-sal (Grobe *et al.*, 2006). Entretanto, o efeito anti-hipertrófico da Ang-(1-7) foi observado apenas no modelo tratado com Ang II, o que sugere uma diferença no mecanismo cardioprotetor da Ang-(1-7) nos processos fibróticos e hipertróficos (Grobe *et al.*, 2007).

A hipertrofia cardíaca pode resultar da resposta a um número de estímulos, incluindo hormônios, citocinas e *stress* biomecânico. Todos estes resultam em aumento da sinalização da MAPK nos cardiomiócitos e, através da ativação da cascata de cinases, levam à fosforilação de cinases terminais, tal como ERK, p38 e JNK cinases (Heineke & Molkenin, 2006). Estas, por sua vez, regulam a expressão de genes dos cardiomiócitos através da fosforilação seletiva do fator de transcrição. Mercure e colaboradores (2008) demonstraram que a Ang-(1-7) modula algumas (c-Src e p-38 MAPK) mas não todas (ERK1/2) as vias de sinalização de crescimento no coração em resposta à hipertensão, evidenciando um efeito direto da Ang-(1-7) nos cardiomiócitos. Iwata e colaboradores (2005) relataram que a Ang-(1-7) se acopla a fibroblastos cardíacos de ratos adultos e regula negativamente a síntese de colágeno. Este mecanismo foi avaliado pela incorporação da prolina [³H] e expressão de mRNA de fatores de crescimento em fibroblastos.

Desta forma, a prevenção da hipertrofia cardíaca e da deposição de colágeno observada em animais tratados com o CGEN-856S poderia ser uma consequência da ação direta desse agonista do Mas no coração. Entretanto, é interessante notar que um provável efeito indireto do CGEN-856S sobre o remodelamento cardíaco não pode ser descartado, uma vez que esses peptídeos promoveram um efeito vasodilatador *in vitro* e uma redução significativa da pressão arterial *in vivo*, como melhor discutido a seguir.

As possíveis vias de sinalização envolvidas nas respostas ao CGEN-856S é um tópico para futuras investigações. Apesar do presente estudo ser fenomenológico, nossos dados demonstram de forma clara o envolvimento do NO na resposta ao CGEN-856S, e a especificidade deste novo composto ao receptor Mas. Estes achados vão de encontro a diversos estudos que investigam os possíveis mecanismos envolvidos na resposta à ativação do Mas.

O papel cardioprotetor do agonista do Mas, CGEN-856S, também foi claramente observado no modelo de insuficiência cardíaca induzida pela oclusão da artéria coronária esquerda. O tratamento com o novo agonista preservou a função cardíaca pós-isquêmica, como observado pela atenuação da diminuição da tensão sistólica e da velocidade de relaxamento e contração miocárdica. Este resultado está de acordo com nossos dados apresentados anteriormente, os quais mostraram a ação cardioprotetora do CGEN-856S nos efeitos deletérios da isquemia e reperfusão em corações isolados de rato.

Achados prévios também demonstraram que o tratamento com o AVE 0991 durante 7 dias, melhorou significativamente a função miocárdica e diminuiu a área infartada induzida pela oclusão da artéria coronária esquerda em ratos (Ferreira *et al.*, 2007). Semelhantemente, a infusão de Ang-(1-7) (24 µg/Kg/h) durante 8 semanas, em ratos submetidos ao infarto do miocárdio, melhorou a função endotelial aórtica, a perfusão coronariana e preservou a função cardíaca (Loot *et al.*, 2002).

Um dos possíveis mecanismos para os efeitos benéficos do CGEN-856S sobre a função cardíaca após o infarto baseia-se em experimentos, mostrando que este peptídeo, assim como outros agonistas do Mas, atenuam as arritmias de reperfusão e melhoram a função cardíaca pós-isquêmica em corações isolados de ratos (Ferreira *et al.*, 2001; Benter *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento com CGEN-856S produziu vasodilatação, sugerindo seu efeito benéfico na vasculatura coronariana e, conseqüentemente, na perfusão do miocárdio. Outro achado do

presente estudo que também corrobora a melhora da função miocárdica induzida pelo CGEN-856S após o infarto, é seu efeito anti-fibrótico, discutido anteriormente, o qual contribui para a preservação da função cardíaca.

A redução da área de infarto em ratos tratados com o CGEN-856S explica em parte os efeitos funcionais benéficos encontrados no coração desses animais. Outra explicação para a melhora da função cardíaca está relacionada à maior viabilidade do miocárdio. Como a pressão arterial destes animais não foi mensurada, não podemos eliminar a participação de alterações nesse parâmetro, levando aos efeitos benéficos observados na função cardíaca após o infarto. O fato de que a administração aguda e crônica do CGEN-856S reduziu significativamente a PAM de ratos normotensos e hipertensos, como discutido anteriormente, favorece essa possibilidade. A figura 43 ilustra os principais efeitos induzidos pelo peptídeo CGEN-856S encontrados neste estudo.

Sumarizando, o presente estudo explora os aspectos fisiológicos cardiovasculares e o potencial terapêutico de um novo peptídeo agonista do receptor Mas. Nossos resultados se assemelham aos dados previamente relatados com a Ang-(1-7) e AVE 0991, reforçando a crescente evidência de um importante papel do Mas na função cardiovascular. O desenvolvimento deste novo agonista do Mas representa um passo importante para a exploração das ações deste receptor e para a validação de seu potencial como alvo terapêutico em patologias cardiovasculares.

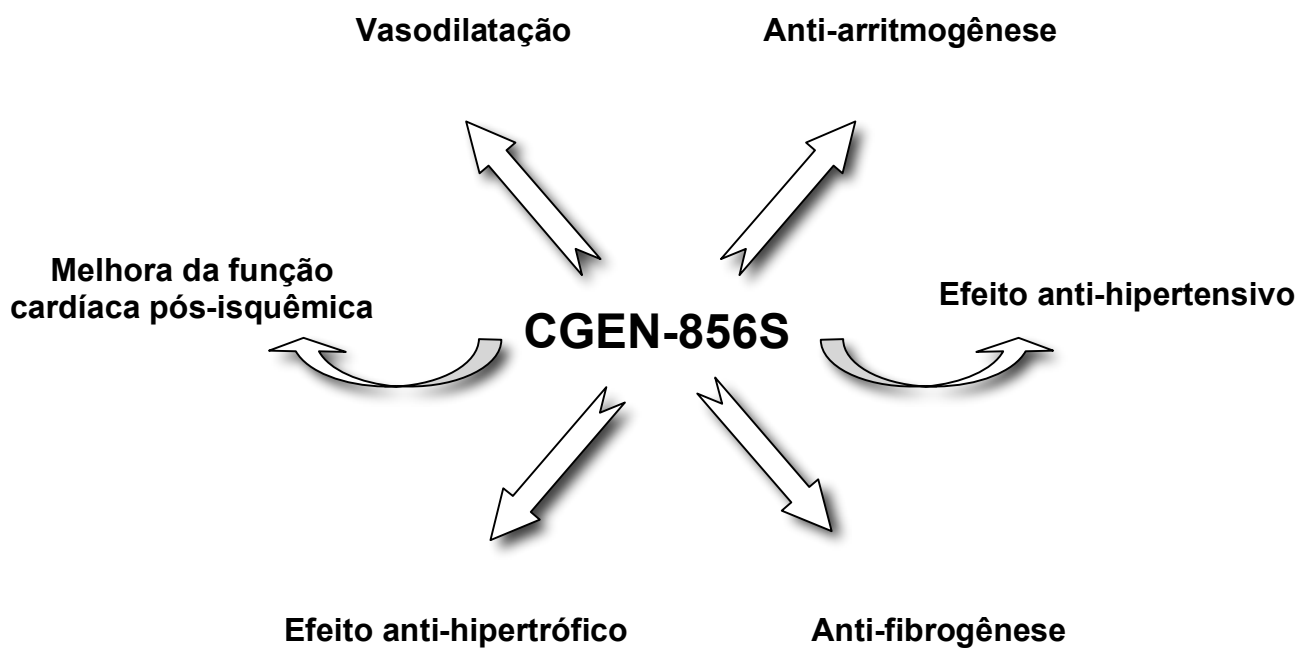


Figura 43 - Ilustração esquemática dos principais efeitos induzidos pelo CGEN-856S no coração e vasos de roedores.

Sumário e Conclusão

6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- O novo agonista do Mas, CGEN-856S, induziu efeito vasodilatador dependente da produção de óxido nítrico endotelial tanto na aorta de camundongo quanto na aorta de rato.
- O efeito relaxante do CGEN-856S foi mediado pela estimulação do receptor Mas, tanto na aorta de camundongo quanto na aorta de rato.
- O peptídeo CGEN-856 induziu efeito anti-arritmogênico e melhorou a função cardíaca pós-isquêmica em corações isolados de rato.
- Ratos tratados com CGEN-856S apresentaram redução da hipertrofia cardíaca e da deposição de proteínas de matriz extracelular induzidas pelo Isoproterenol.
- Ratos espontaneamente hipertensos apresentaram redução da pressão arterial média durante e após a administração aguda do CGEN-856S.
- O tratamento crônico com CGEN-856S reduziu a pressão arterial e a fibrose cardíaca e renal de ratos espontaneamente hipertensos.
- O tratamento com CGEN-856S por 14 dias melhorou a função cardíaca de ratos submetidos ao infarto do miocárdio.
- CGEN-856S apresentou baixa afinidade de ligação aos receptores da angiotensina II, AT₁ e AT₂.
- CGEN-856S competiu pelo mesmo sítio de ligação da Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o *Mas*.

Estes resultados reforçam a crescente evidência de um importante papel do Mas na função cardiovascular. A descoberta do CGEN-856S como um novo agonista do Mas representa um passo importante para a exploração das ações deste receptor e

para a validação de seu potencial como alvo terapêutico em patologias cardiovasculares.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA AP, FÁBREGAS BC, MADUREIRA MM, SANTOS RJ, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SANTOS RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 709-13, 2000.

ATLAS SA. The rennin-angiotensin system revisited: classical and nonclassical pathways of angiotensin formation. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 65(2): 87-96, 1998.

BADER M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50: 439-65, 2010.

BADER M, PETERS J, BALATU O, MULLER DN, LUFT FC, GANTEN D. Tissue reninangiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine*, 79: 76-102, 2001.

BELOVA LA. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry*, 65(12): 1337-45, 2000.

BENTER IF, DIZ DI, FERRARIO CM. Pressor and reflex sensitivity is altered in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 26: 1138-44, 1995.

BENTER IF, YOUSIF MH, ANIM JT, COJOCEL C, DIZ DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 290: H684-91, 2006.

BERNAUER W, ERNENPUTSCH I. Antagonistic effects of alpha-adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme released and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 338: 88-95, 1988.

BOTELHO-SANTOS GA, BADER M, SANTOS RA. Altered Regional Blood Flow Distribution in Mas-Deficient Mice. *Hypertension*, 52: 91, 2008. Abstract.

BOTELHO-SANTOS GA, SAMPAIO WO, REUDELHUBER TL, BADER M, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SOUZA DOS SANTOS RA. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 292(5): H2485-90, 2007.

BRAGA AN, DA SILVA LEMOS M, DA SILVA JR, FONTES WR, DOS SANTOS RA. Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 282: R1663-71, 2002.

BRASZKO J. J., WLASIENKO J., KOZIOLKIEWIEZ W., JANECKA A., WISNIEWSKI K. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive properties. *Brain Research*, 554: 49-54, 1991.

BROSNIHAN KB, LI P, FERRARIO CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, 27: 523-528, 1996.

CAMPBELL DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol.*, 35(6): 784-91, 2003.

CAREY RM, JIN XH, SIRAGY HM. Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *American Journal of Hypertension*, 14(6 Pt 2): 98S-102S, 2001.

CAREY RM, SIRAGY HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.*, 24(3): 261-71, 2003.

CASTRO CH. Avaliação dos efeitos da angiotensina-(1-7) e do seu receptor Mas no controle da função cardíaca utilizando animais geneticamente modificados. Belo Horizonte. Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, 114f, 2008.

CASTRO CH, SANTOS RA, FERREIRA AJ, BADER M, ALENINA N, ALMEIDA AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Science*, 23: 264-8, 2006.

CHAPPELL MC, PIRRO NT, SYKES A, FERRARIO CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, 31(1 Pt 2): 362-7, 1998.

DA COSTA GONÇALVES AC, LEITE R, FRAGA-SILVA RA, PINHEIRO SV, REIS AB, REIS FM, TOUYZ RM, WEBB RC, ALENINA N, BADER M, SANTOS RAS. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 293: 2588-2596, 2007.

DE MELLO WC. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on impulse propagation, excitability and cardiac arrhythmias. Is the overexpression of ACE2 arrhythmogenic? *Regulatory Peptides*, 153: 7-10, 2009.

DIAS-PEIXOTO MF, SANTOS RA, GOMES ER, ALVES MN, ALMEIDA PW, GRECO L, ROSA M, FAULER B, BADER M, ALENINA N, GUATIMOSIM S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*, 52: 542-8, 2008.

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. *Circulation Research*, 87(5): E1-9, 2000.

FERRARIO CM, CHAPPELL MC, TALLANT EA, BROSNIHAN KB, DIZ DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 30(2): 535-541, 1997.

FERREIRA AJ (2004). Caracterização a nível genômico, bioquímico e fisiológico de um modelo de rato transgênico que superexpressa angiotensina-(1-7). In *Departamento de Morfologia, ICB, UFMG*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FERREIRA AJ, CASTRO CH, GUATIMOSIM S, ALMEIDA PW, GOMES ER, DIAS-PEIXOTO MF, ALVES MN, FAGUNDES-MOURA CR, RENTZSCH B, GAVA E, ALMEIDA AP, GUIMARÃES AM, KITTEN GT, REUDELHUBER T, BADER M, SANTOS RA. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Disease*, 55: 207-213, 2010.

FERREIRA AJ, JACOBY BA, ARAÚJO CA, MACEDO FA, SILVA GA, ALMEIDA AP, CALIARI MV, SANTOS RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 292:H1113-9, 2007.

FERREIRA AJ, OLIVEIRA TL, CASTRO MC, ALMEIDA AP, CASTRO CH, CALIARI MV, GAVA E, KITTEN GT, SANTOS RA. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Science*, 81: 916-923, 2007.

FERREIRA AJ, SANTOS RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 499-507, 2005.

FERREIRA AJ, SANTOS RA, ALMEIDA AP. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Hypertension*, 38: 665-668, 2001.

FERREIRA AJ, SANTOS RA, ALMEIDA AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(9): 1083-90, 2002.

GAVA E. Efeito da deleção genética do receptor da angiotensina-(1-7), Mas, na morfologia e expressão de proteínas da matriz extracelular rem corações de camundongos adultos e neonatais. Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

GELOSA P, PIGNIERI A, FÄNDRIKS L, DE GASPARO M, HALLBERG A, BANFI C, CASTIGLIONI L, TUROLO L, GUERRINI U, TREMOLI E, SIRONI L. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *Journal of Hypertension*, 27: 2444-51, 2009.

GOES S, FREIRE-MAIA L, ALMEIDA AP. Effects of anesthetics on the incidence and duration of reperfusion arrhythmias in isolated rat heart *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(10): 1091-5, 1993.

GIANI JF, MAYER MA, MUÑOZ MC, SILBERMAN EA, HÖCHT C, TAIRA CA, GIRONACCI MM, TURYN D, DOMINICI FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 296: E262-71, 2009.

GROBE JL, MECCA AP, LINGIS M, SHENOY V, BOLTON TA, MACHADO JM, SPETH RC, RAIZADA MK, KATOVICH MJ. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 292(2): H736-42, 2007.

GROBE JL, MECCA AP, MAO H, KATOVICH M. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 290: H2417–H2423, 2006.

HEINEKE J, MOLKENTIN JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 589-600, 2006.

HUANG ES. Predicting ligands for orphan GPCRs. *Drug Discovery Today*, 10(1): 69-73, 2005.

IWATA M, COWLING RT, GURANTZ D, MOORE C, ZHANG S, YUAN JX, GREENBERG BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 289: H2356-63, 2005.

KIM S, IWAO H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews*, 52(1): 11-34, 2000.

KLIGER Y, GOFER E, WOOL A, TOPORIK A, APATOFF A, OLSHANSKY M. Predicting proteolytic sites in extracellular proteins: only halfway there. *Bioinformatics*, 24(8): 1049-55, 2008.

KUCHAREWICZ I, PAWLAK R, MATYS T, CHABIELSKA E, BUCZKO W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 53: 533-40, 2002.

LANÇAS FM, BENASSI, MN, SILVA JCR, BICUDO RC. A Química Analítica do Proteoma. *Revista Analytica*, 2(6): 60-66. 2003.

LAVIADES C, VARO N, FERNÁNDEZ J, MAYOR G, GIL MJ, MONREAL I, DÍEZ J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*, 98(6): 535-40, 1998.

LE TRAN Y, FORSTER C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 30(5): 676-82, 1997.

LEMOS VS, FREITAS MR, MULLER B, LINO YD, QUEIROGA CE, CÔRTEZ SF. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *European Journal of Pharmacology*, 386: 41-6, 1999.

LEMOS VS, SILVA DM, WALTHER T, ALENINA N, BADER M, SANTOS RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(3): 274-9, 2005.

LOOT AE, ROKS AJM, HENNING RH, TIO RA, SUURMEIJER AJH, BOOMSMA F, GILST WH. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, 105: 1548-1550, 2002.

LUBBE WF, DARIES PS, OPIE LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovascular Research*, 12(4): 212-20, 1978.

MATROUGUI K, LOUFRANI L, HEYMES C, LÉVY BI, HENRION D. Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension*, 34(4 Pt 1): 659-65, 1999.

MERCURE C, YOGI A, CALLERA GE, ARANHA AB, BADER M, FERREIRA AJ, SANTOS RAS, WALTHER T, TOUYZ RM, REUDELHUBER TL. Angiotensin(1-7) Blunts Hypertensive Cardiac Remodeling by a Direct Effect on the Heart. *Circulation Research*. 103: 1319-1326, 2008.

METZGER R, BADER M, LUDWIG T, BERBERICH C, BUNNEMANN B, GANTEN D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters*, 357: 27-32, 1994.

MURÇA, TM. Avaliação de parâmetros cardiorrespiratórios basais e de mecanismos reflexos do controle da pressão arterial e da ventilação em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, 179 f, 2008.

MUTHALIF MM, BENTER IF, UDDIN MR, HARPER JL, MALIK KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(1): 388-98, 1998.

NADU AP, FERREIRA AJ, REUDELHUBER TL, BADER M, SANTOS RAS. Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR(A1-7)3292 rats. *Journal of the American Society Hypertension*, 2: 341-348, 2008.

NEVES LAA, ALMEIDA AP, KHOSLA MC, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, SANTOS RAS. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 801-809, 1997.

NGUYEN G. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16(2): 129-33, 2007.

PAULA RD, LIMA CV, KHOSLA MC, SANTOS RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, 26(6 Pt 2): 1154-9, 1995.

PEACH MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological Reviews*, 57(2): 313-70, 1977.

PHILLIPS MI, SPEAKMEN EA, KIMURA B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin-angiotensin system. *Regulatory Peptides*, 143: 1-20, 1992.

PINHEIRO SV, SIMÕES E SILVA AC, SAMPAIO WO, DE PAULA RD, MENDES EP, BONTEMPO ED, PESQUERO JB, WALTHER T, ALENINA N, BADER M, BLEICH M, SANTOS RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, 44: 490-6, 2004.

RABELO LA, XU P, TODIRAS M, SAMPAIO WO, BUTTGEREIT J, BADER M, SANTOS RAS, ALENINA N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Hypertension*, 2: 418-424, 2008.

ROCKS AJM, VAN GEEL PP, PINTO YM, BUIKEMA H, HENNIN RH, ZEEUW D, VAN GILST WH. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension*, 34: 296-301, 1999.

SAMPAIO WO, NASCIMENTO AA, SANTOS RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*, 284(6): H1985-94, 2003.

SAMPAIO WO, SOUZA DOS SANTOS RA, FARIA-SILVA R, DA MATA MACHADO LT, SCHIFFRIN EL, TOUYZ RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, 49: 185-192, 2007.

SANTIAGO NM, GUIMARÃES PS, SIRVENTE RA, OLIVEIRA LA, IRIGOYEN MC, SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*, 55(4): 889-96, 2010.

SANTOS RA, CASTRO CH, GAVA E, PINHEIRO SV, 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*, 47: 996-1002, 2006.

SANTOS RA, FERREIRA AJ. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovascular Drug Reviews*, 24(3-4):239-46, 2006.

SANTOS RA, FERREIRA AJ, SIMÕES E SILVA AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin(1–7)–Mas axis. *Experimental Physiology*, 93: 519–527, 2008.

SANTOS RA, FERREIRA AJ, NADU AP, BRAGA AN, DE ALMEIDA AP, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, BALTATU O, ILIESCU R, REUDELHUBER TL, BADER M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiological Genomics*, 17: 292-299, 2004.

SANTOS RA, FRÉZARD F, FERREIRA AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Current Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 3: 383-91, 2005.

SANTOS RA, KRIEGER EM, GREENE LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*, 7: 244-52, 1985.

SANTOS RA, SAVERGNINI SQ, LAUTNER RQ, BRAGA AN, CASTRO CH. Olmesartan Potentiates the Vasorelaxation and Anti-hypertensive Effect of Angiotensin(1–7). *Circulation*, 120: S1014, 2009. Abstract.

SANTOS RA, SIMOES E SILVA AC, MARIC C, SILVA DM, MACHADO RP, DE BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO SV, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8258-63, 2003.

SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 1033-1047, 1994.

SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, 91: 45-62, 2000.

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 Opinion on Investigational Drugs*, 14: 1019-1031, 2005.

SANTOS SH, FERNANDES LR, MARIO EG, FERREIRA AV, PÔRTO LC, ALVAREZ-LEITE JI, BOTION LM, BADER M, ALENINA N, SANTOS RA. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, 57: 340-7, 2008.

SCHNEE JM, HSUEH WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovascular Research*, 46(2): 264-8, 2000.

SCHULTE G, LEVY FO. Novel aspects of G-protein-coupled receptor signalling – different ways to achieve specificity. *Acta Physiology*, 190: 33-38, 2007.

SHEMESH R, TOPORIK A, LEVINE Z, HECHT I, ROTMAN G, WOOL A, DAHARY D, GOFER E, KLIGER Y, SOFFER MA, ROSENBERG A, ESHEL D, COHEN Y. Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 283: 34643-9, 2008.

SOUZA MV, FONTES W, RICART CAO. Análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2: 12-14, 1999.

STRAWN WB, FERRARIO CM, TALLANT EA. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*, 33: 207-11, 1999.

STOLL M, STECKELINGS UM, PAUL M, BOTTARI SP, METZGER R, UNGER T. J The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Clinical Investigation*, 95(2): 651-7, 1995.

TANAKA M, OHNISHI J, OZAWA Y, SUGIMOTO M, USUKI S, NARUSE M, MURAKAMI K, MIYAZAKI H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 207(2): 593-8, 1995.

TIMMERMANS PB, BENFIELD P, CHIU AT, HERBLIN WF, WONG PC, SMITH RD. Angiotensin II receptors and functional correlates. *American Journal of Hypertension*, 5(12 Pt 2): 221S-235S, 1992.

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. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43): 33238-43, 2000.

TSUTSUMI Y, MATSUBARA H, MASAKI H, KURIHARA H, MURASAWA S, TAKAI S, MIYAZAKI M, NOZAWA Y, OZONO R, NAKAGAWA K, MIWA T, KAWADA N, MORI Y, SHIBASAKI Y, TANAKA Y, FUJIYAMA S, KOYAMA Y, FUJIYAMA A, TAKAHASHI H, IWASAKA T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*, 104(7): 925-35, 1999.

TURNER AJ, HOOPER NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(4): 177-83, 2002.

VIOLIN JD, LEFKOWITZ RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28: 416-22, 2007.

WALTHER T, WESSEL N, KANG N, SANDER A, TCHOPRE C, MALBERF H, BADER M, VOSS A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the *Mas* protooncogene. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 33: 1-9, 2000.

WELCHES WR, BROSNIHAN KB, FERRARIO CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Science*, 52: 1461-80, 1993.

WIDDOP RE, SAMPEY DB, JARROTT B. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34: 964-968, 1999.

WILKINS MR, PASQUALI C, APPEL RD, OU K, GOLAZ O, SANCHEZ JC, YAN JX, GOOLEY AA, HUGHES G, HUMPHERY-SMITH I, WILLIAMS KL, HOCHSTRASSER DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14(1): 61-5, 1996.

WOLLERT KC, DREXLER H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular Research*, 43(4): 838-49, 1999.

WRIGHT JW, HARDING JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2 and AT4 and their functions. *Regulatory Peptides*, 59: 269-295, 1995.

XU P, COSTA-GONCALVES AC, TODIRAS M, RABELO LA, SAMPAIO WO, MOURA MM, SANTOS SS, LUFT FC, BADER M, GROSS V, ALENINA N, SANTOS RA. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*, 51: 574-80, 2008.

YE M, WYSOCKI J, NAAZ P, SALABAT MR, LAPOINTE MS, BATLE D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension*, 43: 1120-1125, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo publicado:

Savergnini SQ, Beiman M, Lautner RQ, de Paula-Carvalho V, Allahdadi K, Pessoa DC, Costa-Fraga FP, Fraga-Silva RA, Cojocarú G, Cohen Y, Bader M, de Almeida AP, Rotman G, Santos RA. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*, 2010 56(1): 112-20.

ANEXO B – Artigo submetido:

Silvia Quintão Savergnini; Danielle Ianzer; Mariana Braga L. Carvalho; Anderson José Ferreira; Gerluza A. Silva; Fúlvia Dias Marques; Merav Beiman; Gady Cojocarú; Yossi Cohen; Alvair Pinto de Almeida; Galit Rotman; Robson Augusto Souza dos Santos. The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*.

ANEXO C – Figura de estudo em andamento no Laboratório de Hipertensão do ICB/UFMG.

Anexo A

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



*Learn and Live*SM

Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor

Silvia Quintão Savergnini, Merav Beiman, Roberto Queiroga Lautner, Vanice de Paula-Carvalho, Kyan Allahdadi, Dalton Caires Pessoa, Fabiana Pereira Costa-Fraga, Rodrigo Araújo Fraga-Silva, Gady Cojocar, Yossi Cohen, Michael Bader, Alvaír Pinto de Almeida, Galit Rotman and Robson Augusto Souza Santos

Hypertension 2010;56:112-120; originally published online May 17, 2010;

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152942

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2010 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/56/1/112>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/HYPERTENSIONAHA.110.152942/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor

Silvia Quintão Savergnini, Merav Beiman, Roberto Queiroga Lautner, Vanice de Paula-Carvalho, Kyan Allahdadi, Dalton Caires Pessoa, Fabiana Pereira Costa-Fraga, Rodrigo Araújo Fraga-Silva, Gady Cojocar, Yossi Cohen, Michael Bader, Alvair Pinto de Almeida, Galit Rotman, Robson Augusto Souza Santos

Abstract—Mas stimulation with angiotensin (Ang)-(1-7) produces cardioprotective effects and vasorelaxation. Using a computational discovery platform for predicting novel naturally occurring peptides that may activate G protein–coupled receptors, we discovered a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S. An endothelium- and NO-dependent vasodilating effect was observed for CGEN-856S in thoracic aorta rings of rats (maximal value for the relaxant effect: $39.99 \pm 5.034\%$), which was similar to that produced by Ang-(1-7) (10^{-10} to 10^{-6} mol/L). In addition, the vasodilator activity of this peptide depended on a functional Mas receptor, because it was abolished in aorta rings of Mas-knockout mice. CGEN-856S appears to bind the Mas receptor at the same binding domain as Ang-(1-7), as suggested by the blocking of its vasorelaxant effect with the Ang-(1-7) analogue D-Ala⁷-Ang-(1-7), and by its competitive inhibition of Ang-(1-7) binding to *Mas*-transfected cells. The effect of CGEN-856S on reperfusion arrhythmias and cardiac function was studied on ischemia reperfusion of isolated rat hearts. We found that picomolar concentration of CGEN-856S (0.04 nmol/L) had an antiarrhythmogenic effect, as demonstrated by a reduction in the incidence and duration of reperfusion arrhythmias. Furthermore, acute infusion of CGEN-856S produced a shallow dose-dependent decrease in mean arterial pressure of conscious spontaneously hypertensive rats. The maximum change during infusion was observed at the highest dose. Strikingly, blood pressure continued to drop in the postinfusion period. The results presented here indicate that the novel Mas agonist, CGEN-856S, might have a therapeutic value, because it induces vasorelaxing, antihypertensive, and cardioprotective effects. (*Hypertension*. 2010;56:112-120.)

Key Words: Mas1 ■ angiotensin (1-7) ■ hypertension ■ reperfusion arrhythmias

Angiotensin-(1-7) (Ang-[1-7]) is a biologically active component of the renin-angiotensin system (RAS).¹⁻³ The identification of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in 2000,⁴ and years later of Mas as a receptor for Ang-(1-7),⁵ allowed researchers to build up a new concept of the RAS. In this novel concept, the result of the limited proteolysis processing starting with the hydrolysis of angiotensinogen by renin can be divided in 2 major functional arms, one represented by ACE/angiotensin II (Ang II)/Ang II type 1 (AT₁) receptors and the other composed of ACE2/Ang-(1-7)/Mas.¹ These 2 arms have some similar effects in the brain.^{6,7} However, in the periphery most of the actions of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas oppose many of the deleterious effects elicited by Ang II acting on AT₁ receptors.^{1,8,9}

Genetic ablation of Mas leads to impairment of many cardiovascular and metabolic functions supporting the con-

cept that the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis has an important physiological and physiopathological role.¹⁰ Effects described for Ang-(1-7) acting through Mas include vasodilation, antiarrhythmogenesis, antifibrogenesis, antitrombogenesis, facilitation of erectile function, and improvement of glycidic and lipidic metabolism.^{1,8,10,11}

The growing evidence supporting the beneficial effects of the Mas/Ang-(1-7) pathway prompted us to search for novel peptide ligands for Mas. This was achieved using a computational biology discovery platform, which we developed recently, that uses machine learning algorithms designed to predict novel G protein–coupled receptor (GPCR) peptide ligands cleaved from secreted proteins (extracted from the Swiss-Prot protein database) by convertase proteolysis, as described previously.^{12,13} The ligands identified might, therefore, exist endogenously because of naturally occurring

Received March 5, 2010; first decision March 22, 2010; revision accepted April 13, 2010.

From the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT-Nanobiofar) (S.Q.S., R.Q.L., V.P.-C., K.A., D.C.P., F.P.C.-F., R.A.F.-S., A.P.A., R.A.S.S.), Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Compugen Ltd (M.Be., G.C., Y.C., G.R.), Tel Aviv, Israel; Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (M.Ba.), Berlin-Buch, Germany.

Correspondence to Robson Augusto Souza Santos, Departamento de Fisiologia e Biofísica-ICB/UFMG, Av Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail robsonsant@gmail.com

© 2010 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152942

proteolysis. The predicted peptide ligands were synthesized and screened for activation of 152 GPCRs by calcium flux and cAMP assays.¹² Two novel peptides, designated CGEN-856 and CGEN-857, displayed high specificity for the Mas receptor, eliciting calcium influx in Chinese hamster ovary (CHO) cells overexpressing Mas. Both peptides did not show activation of AT₁ or Ang II type 2 (AT₂),¹² Ang II receptors that are known to be weakly activated by Ang-(1-7). In this study we report on the vasodilating, cardioprotective, and antihypertensive activities of a derivative of one of these peptides, CGEN-856S.

Methods

Animals

Male Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs) weighing 240 to 300 g were obtained from the animal facility of the Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais. Mas-knockout FVB/N (Mas^{-/-}) mice and FVB/N (Mas^{+/+}) mice were obtained from the transgenic animal facilities of the Laboratory of Hypertension, Federal University of Minas Gerais. All of the experimental protocols were performed in accordance with the guidelines for the human use of laboratory animals of our institute and approved by local authorities.

Discovery of Novel Mas Agonistic Peptides

Novel Mas-agonistic peptides were discovered using a new computational discovery platform aimed at discovering novel GPCR ligands encrypted in the human proteome.¹² Predicted peptides were screened for activation of 152 selected GPCRs using calcium flux assays, as described previously.¹² Two peptides, P61 and P33, were shown to induce calcium flux in Mas-transfected CHO cells.¹² These peptides, designated CGEN-856 and CGEN-857 (amino acid sequence FLGYCIYLNRRKRRGDPAFKRRLLRD and SMCHRWSRAVLFPAAHRP, respectively), have no significant homology to angiotensins, to known GPCR ligands, or to each other.¹² Both peptides contain a cysteine, and, thus, 3 forms of each peptide were synthesized, a monomer where the sulfhydryl moiety of the cysteine was protected with the acetamidomethyl group to avoid dimerization and a monomer in which the cysteine was substituted with serine or valine to create the monomeric forms CGEN-856S and CGEN-857V, respectively. In addition, a dimer via S-S bond was synthesized to create the dimeric forms CGEN-856D and CGEN-857D. The monomeric peptides and their dimeric forms elicited calcium flux in CHO cells cotransfected with the Mas receptor and Gα16 (Reference 12 and data not shown). The monomeric and dimeric forms of CGEN-856 and CGEN-857 also elicited vasodilative properties in an aortic ring assay (data not shown).

Further evaluation of the forms that seemed most active indicated additional Mas-agonistic activities in several experimental models. In this study, we describe the vasodilating, cardioprotective, and antihypertensive activities of one peptide, CGEN-856S.

Rat and Mouse Aortic Ring Preparation and Mounting

Rat and mouse aortic ring preparations and mounting are described in the online Data Supplement, available at <http://hyper.ahajournals.org>.

Isolated Heart Preparation

Wistar rats were decapitated 10 to 15 minutes after IP injection of 400 IU of heparin. The thorax was opened, and the heart was carefully dissected and perfused with Krebs-Ringer solution (KRS) containing (in millimoles per liter): NaCl 118.4, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.2, CaCl₂·2H₂O 2.5, glucose 11.7, and NaHCO₃ 26.5. The perfusion fluid was maintained at 37±1°C, with a pressure of 65 mm Hg and constant oxygenation (5% CO₂-95% O₂). A force transducer was attached through a heart clip to the apex of the ventricles to record the contractile force (tension, grams) on a

computer, by a data-acquisition system (Biopac System). A diastolic tension of 1.0±0.2 g was applied to the hearts. Electric activity was recorded with an ECG (Nihon Kohden) with the aid of 2 cotton wicks placed directly on the surface of the right atrium and left ventricle. Coronary flow was measured every 5 minutes by collecting and determining the volume of heart effluent during a 1-minute interval.

The hearts were perfused for an initial 15-minute period with KRS. After this period, the hearts were perfused for an additional 20 minutes (equilibration period) with KRS (control; n=14) or KRS containing CGEN-856S (0.008 nmol/L; n=6), CGEN-856S (0.04 nmol/L; n=6), or CGEN-856S (0.2 nmol/L; n=6). To compare the effect of CGEN-856S with Ang-(1-7) on reperfusion arrhythmias, hearts were perfused with Ang-(1-7) (0.2 nmol/L; n=6) in the same setup condition. After the equilibration period, the left anterior descending coronary artery was ligated by the method described by Lubbe et al¹⁴ beneath the left auricular appendage together with the adjacent veins. The ligature was released after 15 minutes, and reperfusion with KRS (in the absence or presence of various doses of CGEN-856S or Ang-[1-7], as described above) was performed for an additional 30 minutes. Cardiac arrhythmias were defined as the presence of ventricular tachycardia and/or ventricular fibrillation after the ligature of the coronary artery was released. To obtain a quantitative measurement, the arrhythmias were graded arbitrarily by their duration as follows: the occurrence of cardiac arrhythmias for 0 to 3 minutes was assigned the factor 2; 3 to 6 minutes was assigned the factor 4; 6 to 10 minutes was assigned the factor 6; 10 to 15 minutes was assigned the factor 8; 15 to 20 minutes was assigned the factor 10; 20 to 25 minutes was assigned the factor 11; and 25 to 30 minutes was assigned the factor 12. A value of 0 to 12 was, thus, obtained in each experiment and is denoted as arrhythmia severity index (ASI).¹⁵ An arrhythmia with a 30-minute duration was considered irreversible.

Acute Blood Pressure Measurement

Experiments were performed in 12- to 14-week-old male Wistar rats and SHRs. Twenty-four hours before the experiments, polyethylene catheters were implanted into the abdominal aorta for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements and in the femoral vein for intravenous infusions. Different doses of CGEN-856S (0.3, 3.0, 30.0 and 300.0 ng/kg per minute; n=7 and 8 for SHR and Wistar rats, respectively) or saline (n=8 for both groups) were infused (30 minutes for each dose). After the drug infusion, blood pressure and HR were monitored for an additional 60-minute period.

ACE Activity Assay

Measurement of ACE activity is described in the online Data Supplement.

Radioligand Binding Competition Assay at Human AT₁ and AT₂ Receptors

Radioligand binding competition assay at human AT₁ and AT₂ receptors is described in the online Data Supplement.

Fluorescent Binding on Mas-Transfected Cells

Binding of CGEN-856S in Mas-transfected cells was performed using a method described previously.^{16,17} CHO cells were stably transfected with rat Mas cDNA driven by a cytomegalovirus promoter and selected by neomycin.^{5,18} Fluorescent Ang-(1-7) (at 10⁻⁸ mol/L) was incubated in 6-well plates for 60 minutes at 4°C in 1.5 mL of serum-free medium (DMEM) supplemented with 0.2% BSA, 0.005% bacitracin, 0.1 mol/L of PMSF, and 0.5 mol/L of orthophenanthroline with Mas-transfected CHO cells in the presence or absence of Ang-(1-7) or CGEN-856S (both at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L). After 2 washes with ice-cold serum-free DMEM, the slides were mounted for evaluation by confocal microscopy. Nonspecific binding was determined in the presence of 10⁻⁵ mol/L of Ang-(1-7). Relative fluorescence measurements were performed on a Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscope excited at 488 nm with an argon-ion laser (oil-immersion objective lens: ×63).

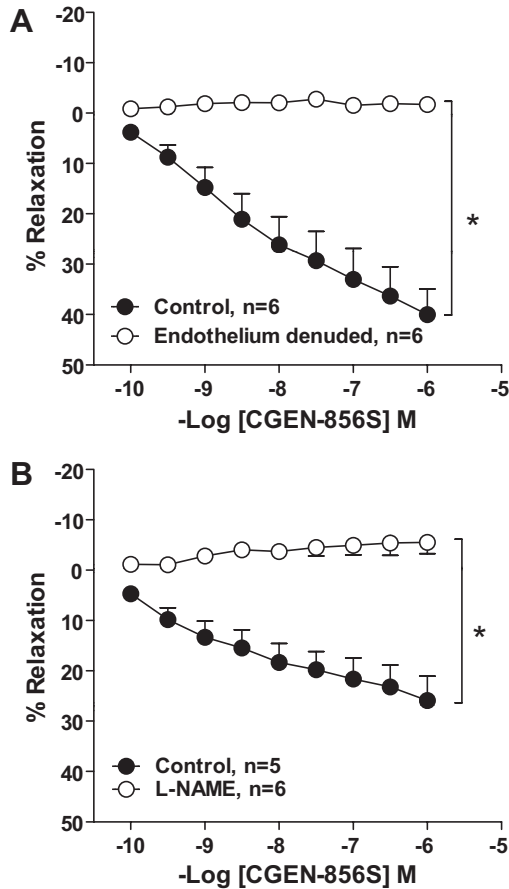


Figure 1. Vasodilator effect of CGEN-856S. A, Aortic rings from Wistar rats containing (control) or lacking functional endothelium. B, Aortic rings from Wistar rats in the absence or presence of L-NAME (100 μ mol/L). Each point represents the mean \pm SEM generated from 5 to 6 separated experiments; * P <0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by the 1-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test or by 2-way ANOVA followed by the Bonferroni test. The vasodilator effects were expressed as the percentage decrease of the maximal contraction induced by phenylephrine. Experimental values were considered statistically significant when P <0.05.

Results

CGEN-856S Induced NO- and Mas-Dependent Vasorelaxation in Isolated Aortic Rings

CGEN-856S produced a concentration-dependent vasodilator effect in endothelium-containing aortic rings precontracted with phenylephrine, which was abolished in endothelium-denuded vessels (Figure 1A). Maximal value for the relaxant effect of CGEN-856S in vessels with endothelium was $39.990 \pm 5.034\%$. In the presence of the NO synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the vasodilator effect of CGEN-856S was also abolished, indicating the participation of NO in this effect (Figure 1B).

To further ascertain whether the vasorelaxation produced in aortic rings by CGEN-856S was because of a specific effect on the Mas receptor, we initially used the Ang-(1-7)/Mas antagonist D-Ala⁷-Ang-(1-7), named A-779. As shown in

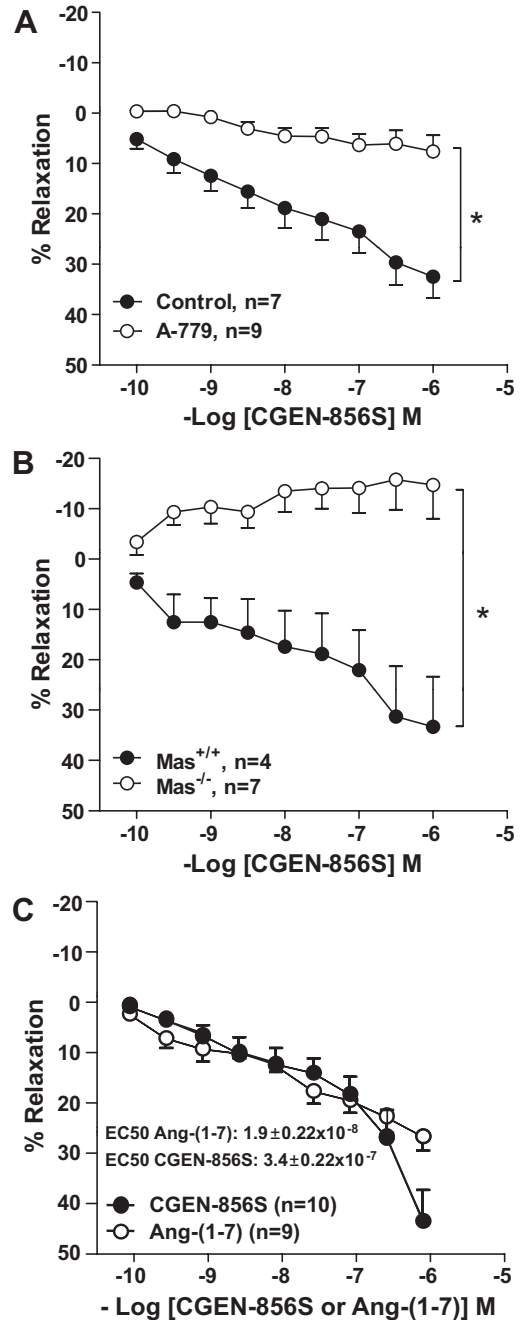


Figure 2. Vasodilator effect of CGEN-856S on inhibition or absence of functional Mas. A, Inhibition of the vasodilator effect of CGEN-856S in aorta rings of Wistar rats in the absence or presence of the Ang-(1-7) antagonist A-779 (10⁻⁶ mol/L). B, Vasodilator effect of CGEN-856S in aorta rings taken from Mas^{+/+} or Mas^{-/-} mice. C, Vasodilator effect of CGEN-856S and Ang-(1-7) in aorta rings of Wistar rats containing functional endothelium. Each point represents the mean \pm SEM generated from 4 to 10 separate experiments; * P <0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Figure 2A, the vasorelaxation produced by CGEN-856S was inhibited by the Ang-(1-7) antagonist. We next used thoracic aortic rings taken from Mas-knockout FVB/N (Mas^{-/-}) and Mas^{+/+} FVB/N mice. As shown in Figure 2B, CGEN-856S induced vasorelaxation in aortic rings from Mas^{+/+} mice, whereas this effect was absent in aortic rings from Mas^{-/-} mice.

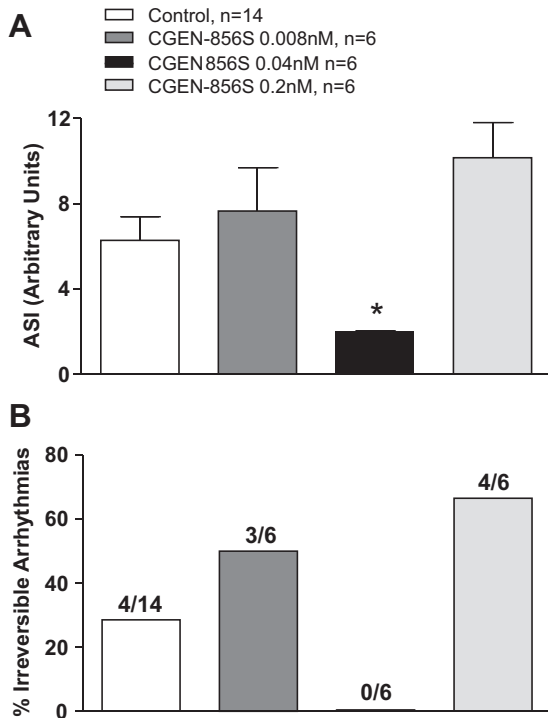


Figure 3. Effect of CGEN-856S on ischemia/reperfusion arrhythmias in isolated hearts. Arrhythmias were produced by 15-minute occlusion of the left anterior descending coronary artery in isolated rat hearts, followed by reperfusion. The hearts were perfused with KRS in the absence or presence of CGEN-856S (at 0.008, 0.040, or 0.200 nmol/L). A, Averaged ASI. B, Percentage of irreversible reperfusion arrhythmias. Numbers above the bars indicate the incidence of irreversible arrhythmias (>30 minutes) during the reperfusion period. * $P < 0.05$ vs control group (1-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

As shown in Figure 2C, the vasorelaxation produced by CGEN-856S resembled that produced by Ang-(1-7); however, the EC_{50} for Ang-(1-7) was lower ($EC_{50} = 1.89 \times 10^{-8} \pm 0.22$ mol/L for Ang-(1-7) versus $3.4 \times 10^{-7} \pm 0.22$ mol/L for CGEN-856S), whereas the maximal value for the relaxant effect was higher for CGEN-856S (24.40% for Ang-[1-7] versus 54.62% for CGEN-856S).

CGEN-856S Decreased Ischemia/Reperfusion Arrhythmias in Isolated Hearts

The antiarrhythmic effect of CGEN-856S was evaluated in isolated rat hearts. We initially tested CGEN-856S at a concentration (0.2 nmol/L), which has been described previously as antiarrhythmic for Ang-(1-7).¹⁹ At this concentration, CGEN-856S produced no significant effect in the duration and incidence of reperfusion arrhythmias (ASI: 10.17 ± 1.64 versus 6.28 ± 1.11 for the control group; $P = 0.068$). However, at a lower concentration, 0.04 nmol/L, CGEN-856S decreased the duration of arrhythmias (ASI: 2.000 ± 0.002 versus 6.280 ± 1.110 for the control group; Figure 3A) and abolished the occurrence of irreversible arrhythmias (Figure 3B), as observed for Ang-(1-7) at 0.2 nmol/L (Figure S1, in the online Data Supplement). At a lower concentration, 0.008 nmol/L, the peptide had no effect on the arrhythmias (Figure 3A and 3B).

CGEN-856S produced additional effects in the isolated hearts at its effective antiarrhythmic concentration. It increased the postischemic systolic tension in comparison with the KRS perfused hearts and showed a slight increase in the coronary flow at 5 minutes of reperfusion (Figure 4A and 4E, respectively). CGEN-856S also prevented the increase of diastolic tension observed in untreated hearts during the reperfusion period (Figure 4B). A slight but significant effect on postischemic $-dT/dt$ was also observed (189.00 ± 1.72 versus 164.50 ± 3.50 g/s, for the control group; Figure 4D). No significant effect was observed on the $+dT/dt$ (Figure 4C) and baseline or postischemic HR (Figure 4F).

CGEN-856S Decreased MAP in SHR

In keeping with its vasorelaxing effect on rat aortic rings, acute infusion of CGEN-856S in conscious SHR produced a dose-dependent decrease in MAP (Figure 5A). The reduction in MAP started to be significant at a dose of 3 ng/kg per minute (maximum change: -5.9 ± 2.3 mm Hg; Figure 5A). The maximum change in MAP during infusion was observed at the highest dose (300 ng/kg per minute; Δ : -9.7 ± 3.7 mm Hg). Strikingly, the blood pressure continued to drop in the postinfusion period. The maximum change was observed at the end of the observation period (60 minutes postinfusion; Δ : -16.6 ± 2.3 mm Hg). Vehicle infusion in SHR did not alter MAP (Figure 5A). A small and transient but significant reduction in HR was induced by CGEN-856S in SHR (Figure S2A). However, no clear dose-related effect was observed for the HR changes.

CGEN-856S also produced a decrease in the MAP of normotensive Wistar rats (Figure 5B); however, the magnitude of the MAP change was considerably smaller than in SHR. During CGEN-856S infusion in Wistar rats the change in MAP observed at the highest dose (300 ng/kg per minute) was -6.2 ± 2.3 mm Hg. The maximum reduction in MAP was also observed in the postinfusion period (Δ : -8.1 ± 1.6 mm Hg). In Wistar rats there was no significant effect of CGEN-856S on HR (Figure S2B).

To address whether the effect of CGEN-856S could be because of interference with ACE activity or binding to Ang II receptors, we next tested the effect of the peptide on rat ACE activity and on the binding of Ang II to AT_1 and AT_2 receptors. CGEN-856S did not inhibit rat ACE activity at concentrations $\leq 10^{-5}$ mol/L, in contrast to the inhibition observed for Ang-(1-7) ($\approx 60\%$ inhibition at 10^{-5} mol/L; $IC_{50} = 2.58 \times 10^{-6}$ mol/L; Figure S3). In the same assay conditions, captopril, a known ACE inhibitor, essentially abolished ACE activity at 10^{-5} mol/L ($IC_{50} = 2.51 \times 10^{-8}$ mol/L; Figure S3). As observed for ACE activity, no evidence was obtained for significant binding of CGEN-856S to the AT_1 receptor (Figure S4A), whereas it displayed a 1000-fold lower affinity for the AT_2 receptor than Ang II ($IC_{50} = 4957.2$ versus 4.1 nmol/L for Ang II; Figure S4B). In contrast, CGEN-856S efficiently displaced the binding of fluorescent Ang-(1-7) to CHO Mas-transfected cells to a similar extent to that observed for Ang-(1-7) (Figure 6).

Discussion

In this study we tested the vascular and cardiac effects of a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S, identified using a

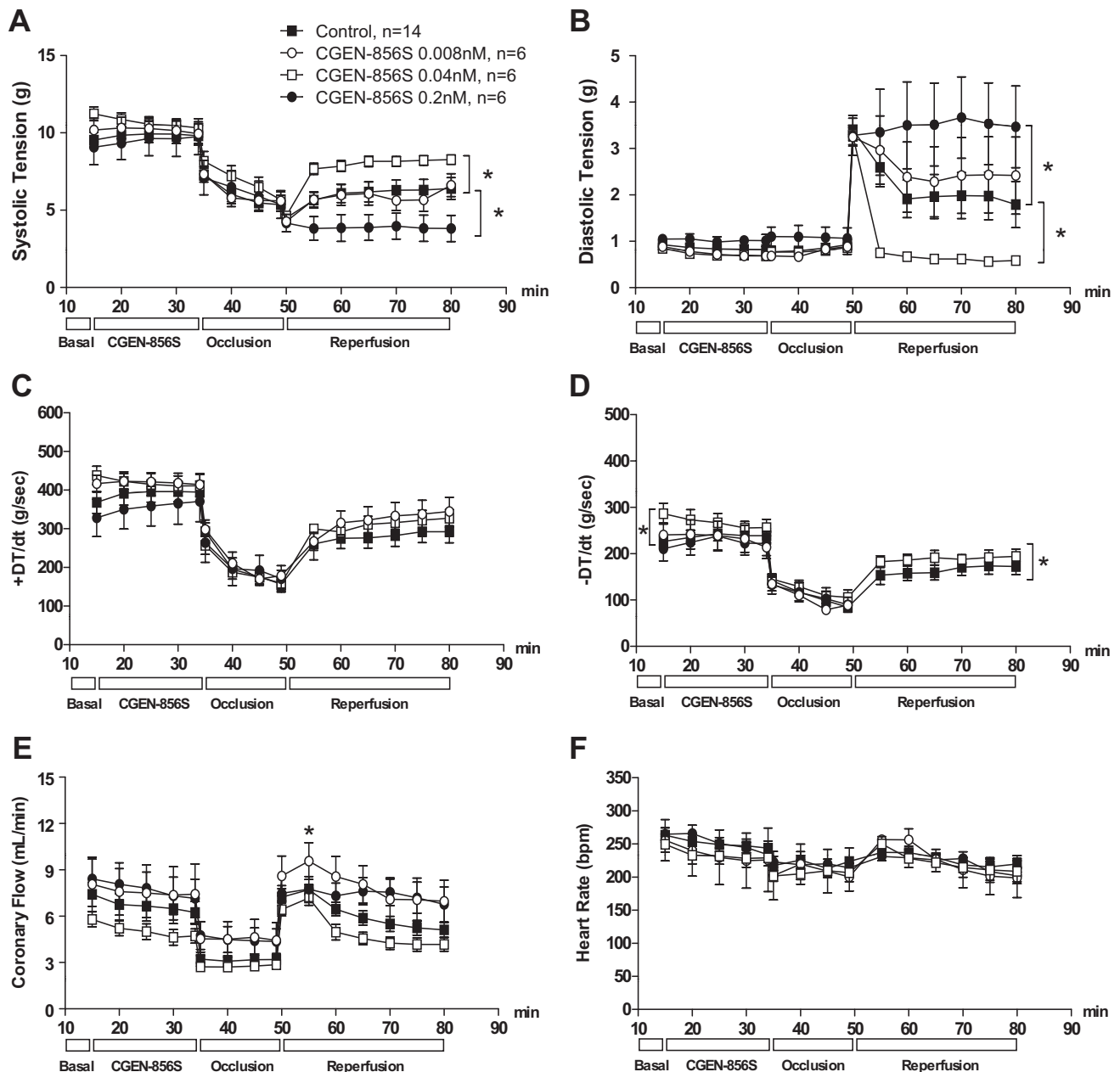


Figure 4. Time course of systolic tension (A), diastolic tension (B), rate of tension rise (+dT/dt; C), rate of tension fall (−dT/dt; D), coronary flow (E), and HR (F) in isolated perfused rat hearts during basal, left anterior descending coronary artery occlusion, and reperfusion periods. Isolated hearts were perfused with KRS in the absence or presence of CGEN-856S (at 0.008, 0.040, or 0.200 nmol/L). * $P < 0.05$ compared with control group (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

computational biology discovery platform.¹² The amino acid sequence of CGEN-856S is unrelated to that of angiotensins. The data obtained for this peptide clearly validate this *in silico* strategy for identifying GPCR ligands. Furthermore, the results obtained with this novel Mas agonist peptide resembled those reported previously with Ang-(1-7)^{1,8,19–21} and another putative small molecule Mas agonist, AVE 0991,²² reinforcing the growing evidence for an important role of Mas in cardiovascular function.

CGEN-856S produced a vasodilating effect in thoracic aortic rings of mice and rats that resembled that produced by Ang-(1-7). The vasorelaxation produced by CGEN-856S was absent in endothelium-denuded vessels and was abolished by

treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME. These characteristics of the vasorelaxation induced by CGEN-856S are similar to those described for Ang-(1-7) and indicate the involvement of endothelium-derived NO in the response. Indeed, several lines of evidence linked Mas to the generation of NO in the vasculature and other tissues.^{21,23,24} As shown previously for Ang-(1-7), the vasodilating effect of CGEN-856S was mediated by Mas, as demonstrated by its abolishment in Mas-knockout aortic rings and inhibition by the Ang-(1-7) antagonist A-779. It should be noted that similar vasodilating effects were observed also for the monomeric form of CGEN-857 and for the dimeric forms of CGEN-856 and CGEN-857 (data not shown).

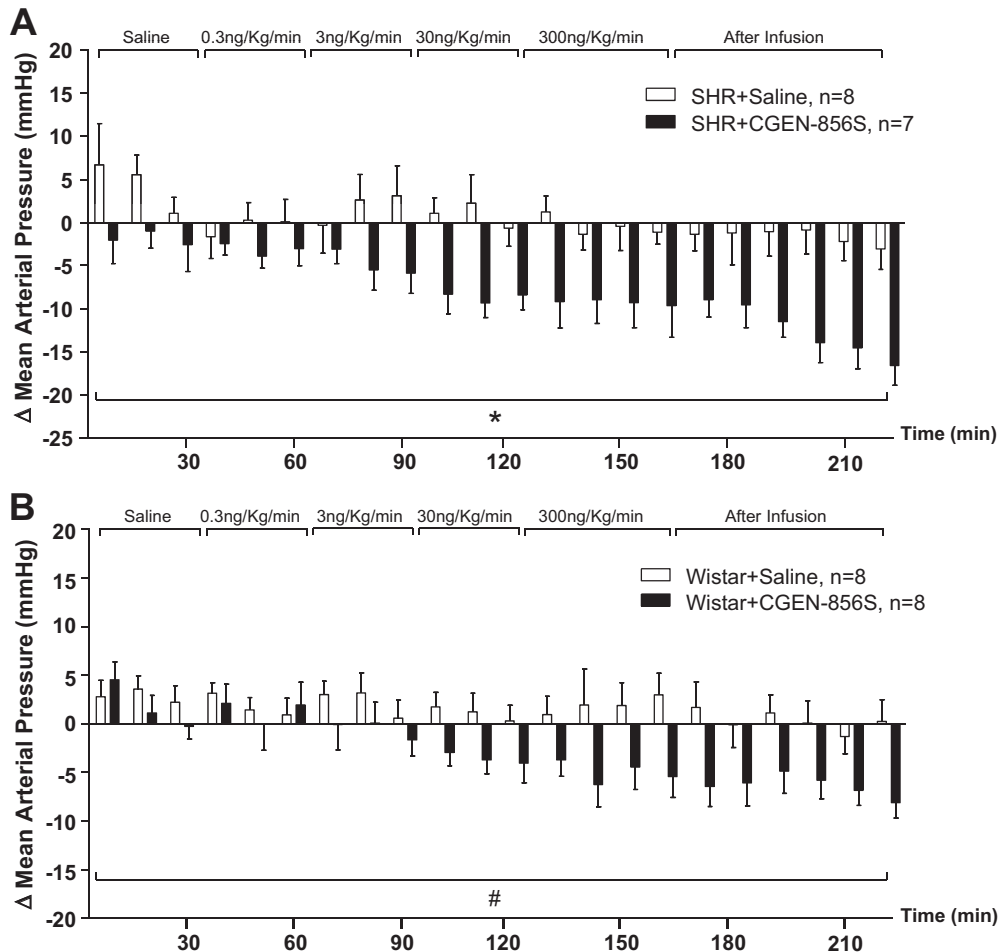


Figure 5. Changes in MAP produced by acute infusion of graded doses of CGEN-856S (0.3, 3.0, 30.0, and 300.0 ng/kg per minute) in conscious hypertensive rats, SHRs (A), and in conscious Wistar rats (B). Baseline values for SHRs: 147.3 ± 1.2 mm Hg for the CGEN-856S group and 141.0 ± 3.9 mm Hg for the control group; baseline values for Wistar rats: 97.4 ± 6.3 mm Hg for the CGEN-856S group and 97.6 ± 6.2 mm Hg for the control group. Bars represent values obtained every 10 minutes of infusion. * $P < 0.05$ SHR+CGEN-856S vs SHR+saline; # $P < 0.05$ Wistar+CGEN-856S vs Wistar+saline (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Ang-(1-7) and CGEN-856S appear to bind the Mas receptor at the same binding domains, as suggested by the observation that the vasorelaxant effect of CGEN-856S can be blocked with the Ang-(1-7) analogue D-Ala⁷-Ang-(1-7), A-779, and by the effective displacement of the fluorescent Ang-(1-7) binding to CHO *Mas*-transfected cells.

As observed before for Ang-(1-7) and AVE 0991,^{25,26} the vasodilating effect of the CGEN-856S peptide in rat aortic rings was endothelium dependent and involved NO production, as evidenced by the blockade of endothelial NO synthase with L-NAME. However, unlike Ang-(1-7), CGEN-856S showed induction of calcium flux in *Mas*-transfected cells.¹² It has been described previously that Ang-(1-7), through activation of the Mas receptor, releases NO from cultured human aortic endothelial cells by the Ca⁺⁺-independent signaling cascade phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.²¹ Whether the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is also a key component of the signaling cascades stimulated by CGEN-856S remains to be clarified. The initial events triggering the intracellular pathways involved in the effect of Ang-(1-7) may differ from those triggered by CGEN-856S because of a different interaction with the

receptor (biased agonism).^{27,28} Despite these possible differences, our data comparing Ang-(1-7) with CGEN-856S in aortic rings showed a similar pattern of relaxation for the 2 peptides. Similarly, acute infusion of CGEN-856S in SHRs produced an antihypertensive effect equivalent to that observed with Ang-(1-7).²⁹

We also examined the antiarrhythmogenic effect of CGEN-856S in an ischemia/reperfusion model of isolated hearts. As shown before for Ang-(1-7),¹⁹ a low concentration of CGEN-856S (0.04 nmol/L) reduced the incidence and duration of cardiac arrhythmias in isolated rat hearts. In addition, as reported previously for Ang-(1-7),³⁰ CGEN-856S, at its effective antiarrhythmic concentration, improved myocardial function by increasing the postischemic systolic tension and coronary flow after reperfusion, without changing HR. The absence of effect of CGEN-856S at a higher concentration on the reperfusion arrhythmias is similar to previous reports concerning Ang-(1-7). Neves et al³¹ previously reported that Ang-(1-7) at 27 nmol/L produced a significant enhancement of reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. However, Ferreira et al¹⁹ and our current data (Figure S1) showed that, at a lower concentration of 0.2

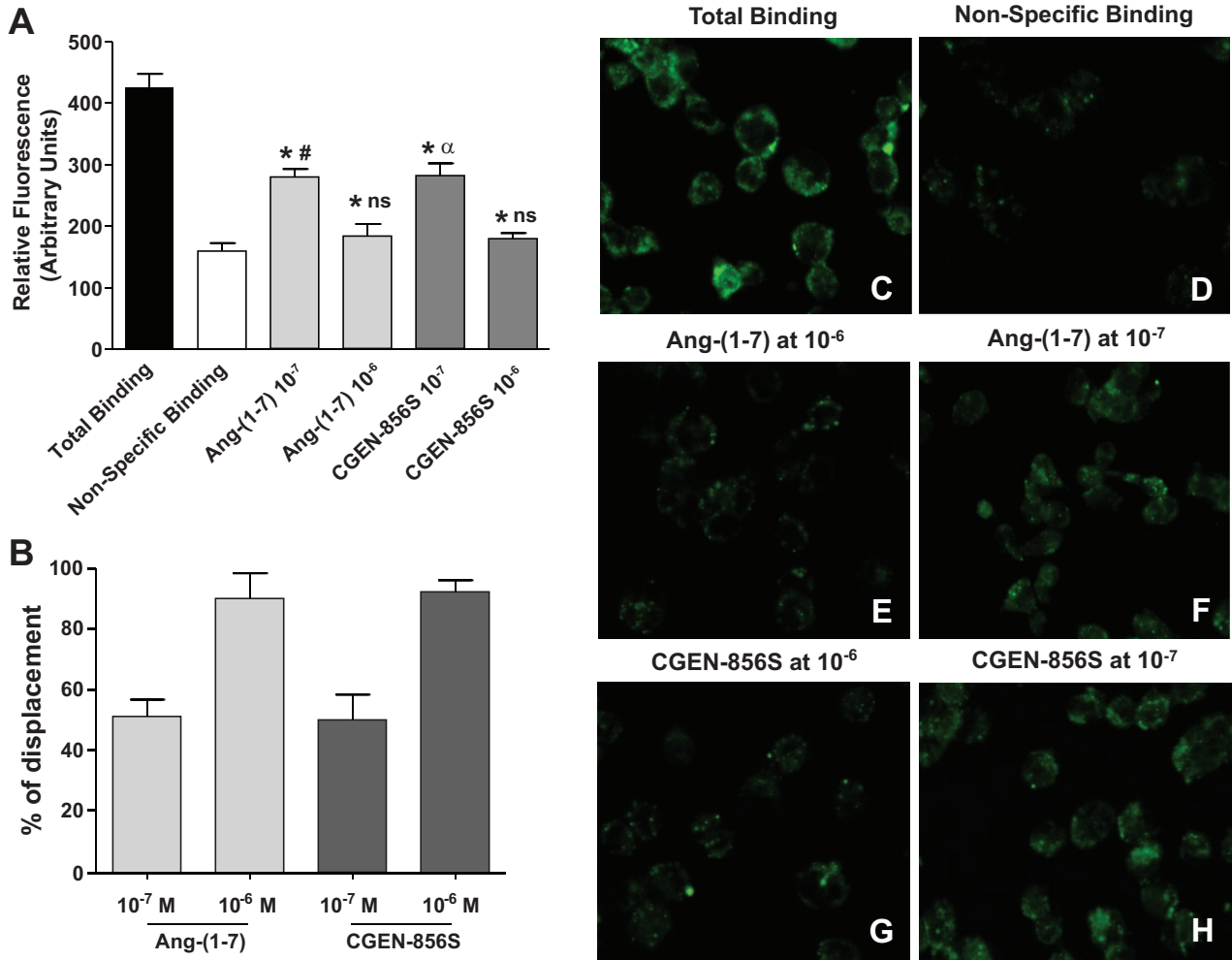


Figure 6. Binding assay on the Mas receptor. CGEN-856S at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L and Ang(1-7) at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L displaced binding of FAM-Ang(1-7) at 10⁻⁸ mol/L on Mas-transfected CHO cells (A and B). Graphs show the relative fluorescence captured on confocal microscopy (A) and the percentage of FAM-Ang(1-7) displacement by CGEN-856S and Ang(1-7) (B). Confocal microphotographs of the FAM-Ang(1-7) binding on Mas-transfected CHO cells (C through H); C, total binding of FAM-Ang(1-7) at 10⁻⁸ mol/L; D, nonspecific binding; E and G, Ang(1-7) displacement of the FAM-Ang(1-7) as a positive control; F and H, CGEN-856S displacement of the FAM-Ang(1-7). Each column represents the mean ± SEM; *P < 0.001, significantly different from total binding; #P < 0.05, significantly different comparing Ang(1-7) at 10⁻⁷ mol/L with Ang(1-7) at 10⁻⁶ mol/L; αP < 0.001, significantly different comparing CGEN-856S at 10⁻⁷ mol/L with CGEN-856S at 10⁻⁶ mol/L (1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test).

nmol/L, Ang(1-7) presents an antiarrhythmogenic effect. Ang(1-7) thus displays a clear tendency for a bell-shaped dose-response curve or biphasic effect.^{32,33} Taken together, these findings suggest that the effect of Mas agonists on reperfusion arrhythmias in vitro is biphasic and concentration dependent. On the other hand, no evidence for a proarrhythmogenic effect of CGEN-856S (this study) or Ang(1-7) was obtained in vivo.^{3,34}

We have also observed an antihypertensive effect of CGEN-856S in SHR. This observation is in accordance with ongoing studies in our laboratory using Ang(1-7)²⁹ and with previous reports by others, suggesting that Mas stimulation could be a strategy to treat hypertension.³⁵ Indeed, we have shown recently that genetic deletion of Mas in FVB/N mice produced a significant increase in blood pressure associated with endothelium dysfunction.³⁶ An increase of vascular resistance in many organs³⁷ and a marked endothelium dysfunction³⁸ was also observed in Mas^{-/-} C57BL/6 mice.

The absence of an increase of blood pressure in this strain may be related to an impairment of heart function.³⁹ Infusion of CGEN-856S did not change HR in normotensive rats, whereas in SHR only transient and dose-independent slight changes in HR were observed. The mechanism(s) of this selective effect in SHR remain to be clarified.

One may argue that the antihypertensive effect of CGEN-856S could be because of interference with ACE activity or could be mediated by an Ang II receptor, acting as an AT₁ receptor antagonist or AT₂ receptor agonist. However, our results show that CGEN-856S did not inhibit ACE activity and did not significantly bind the AT₁ receptor. The very low affinity of this peptide for the AT₂ receptor (1000-fold lower than Ang II), together with the lack of effect of pure AT₂ agonists on the blood pressure of awake SHR,⁴⁰ strongly suggest the absence of AT₂ receptor involvement in the cardiovascular action of CGEN-856S.

One important point that should be considered is related to the similarities and differences among CGEN-856S, Ang(1-

7), and AVE 0991.^{16,22} These 3 Mas agonists display different properties and applications. The peptide CGEN-856S (amino acid sequence: FLGYSIYLNKRRRGDPAFKRRLRD) is apparently more stable than Ang-(1-7) and has no ACE inhibitory activity. Because of its hydrophobicity, AVE 0991 could cross the blood-brain barrier producing central effects. Because some central effects of Ang-(1-7) are opposite to those evoked peripherally, the possibility that some peripheral effects of AVE 0991 could be masked by its central actions should be evaluated. On the other hand, Ang-(1-7) is endogenous and has quite well-characterized Mas-dependent actions.

In summary, in the current study we have identified a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S, and further validated our bioinformatic platform for identifying novel GPCR ligands. Importantly, we present considerable evidence for antihypertensive and cardioprotective effects for CGEN-856S.

Perspectives

The RAS is a key target for treating cardiovascular and renal diseases. The current therapy to block the activity of the RAS includes ACE inhibitors, AT₁ receptors antagonists, and direct renin inhibitors. The accumulating evidence that stimulation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis produces cardioprotection and antihypertensive effects^{8,19,35,39} raises the possibility of development of a next generation of RAS-related drugs aimed to increase the activity of this axis.^{34,41} The results presented here, using CGEN-856S, in addition to reinforcing the concept that Mas stimulation produces beneficial cardiovascular effects, illustrates the potential of this novel therapeutic strategy for treating cardiovascular diseases.

Acknowledgments

We are grateful to José Roberto da Silva and Marilene Luzia de Oliveira for their helpful technical assistance.

Sources of Funding

S.Q.S. was supported by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and R.Q.L. was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais. This study was supported by a Compugen Grant and by Ministério de Ciência e Tecnologia/Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-INCT-NanoBiofar, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/Programa de Apoio a Núcleos de Excelência.

Disclosures

R.A.S.S. is a consultant of Compugen Ltd. M.B., G.C., Y.C., and G.R. are employees of Compugen Ltd.

References

1. Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Res.* 2005;38:499–507.
2. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med.* 2008;86:663–671.
3. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RAS, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL. Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008;103:1319–1326.
4. 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.
5. Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, 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 U S A.* 2003;100:8258–8263.
6. Fontes MA, Martins Pinge MC, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, Santos RA. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res.* 1997;750:305–310.
7. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol.* 1989;257:H324–H329.
8. Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008;93:519–527.
9. Bindom SM, Lazartigues E. The sweeter side of ACE2: physiological evidence for a role in diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:193–202.
10. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Pôrto LC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RA. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes.* 2008;57:340–347.
11. Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA, Gironacci MM, Turyn D, Dominici FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E262–E271.
12. Shemesh R, Toporik A, Levine Z, Hecht I, Rotman G, Wool A, Dahary D, Gofer E, Kliger Y, Soffer MA, Rosenberg A, Eshel D, Cohen Y. Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2008;283:34643–34649.
13. Kliger Y, Gofer E, Wool A, Toporik A, Apatoff A, Olshansky M. Predicting proteolytic sites in extracellular proteins: only halfway there. *Bioinformatics.* 2008;24:1049–1055.
14. Lubbe WF, Daries PS, Opie LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antiarrhythmic action of antiarrhythmic agents. *Cardiovasc Res.* 1978;12:212–220.
15. Bernauer W, Ernenputsch I. Antagonistic effects of α -adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme released and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;338:88–95.
16. Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 2004;44:490–496.
17. Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Gonçalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* 2008;14:28–35.
18. Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva ACM, Ganten D, Bader M. Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene: evidence for alternative splicing. *J Biol Chem.* 1994;269:26920–26925.
19. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension.* 2001;38:665–668.
20. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16:122–128.
21. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 2007;49:185–192.
22. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, Caliar MV, Santos RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1113–H1119.
23. Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension.* 2008;52:542–548.
24. Da Costa Gonçalves AC, Leite R, Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Reis AB, Reis FM, Touyz RM, Webb RC, Alenina N, Bader M, Santos RAS. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an

- important role in erectile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:2588–2596.
25. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:274–279.
 26. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996;27:523–528.
 27. Violin JD, Lefkowitz RJ. β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:416–422.
 28. Schulte G, Levy FO. Novel aspects of G-protein-coupled receptor signalling: different ways to achieve specificity. *Acta Physiol*. 2007;190:33–38.
 29. Santos RA, Savergnini SQ, Lautner RQ, Braga AN, Castro CH. Olmesartan potentiates the vasorelaxation and anti-hypertensive effect of angiotensin(1-7) [abstract]. *Circulation*. 2009;120:S1014.
 30. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1083–1090.
 31. Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:801–809.
 32. De Mello WC. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on impulse propagation, excitability and cardiac arrhythmias: is the overexpression of ACE2 arrhythmogenic? *Regulatory Peptides*. 2009;153:7–10.
 33. Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Summers C, Katovich MJ, Raizada MK. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2010;55:207–213.
 34. Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PW, Gomes ER, Dias-Peixoto MF, Alves MN, Fagundes-Moura CR, Rentzsch B, Gava E, Almeida AP, Guimarães AM, Kitten GT, Reudelhuber T, Bader M, Santos RA. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4:83–96.
 35. Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H684–H691.
 36. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N, Santos RA. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*. 2008;51:574–580.
 37. Botelho-Santos GA, Bader M, Santos RA. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice [abstract]. *Hypertension*. 2008;52:91.
 38. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M, Santos RAS, Alenina N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*. 2008;2:418–424.
 39. Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3:383–391.
 40. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens*. 2009;27:2444–2451.
 41. Santos RA, 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;14:1019–1031.

ONLINE SUPPLEMENT

VASCULAR RELAXATION, ANTI-HYPERTENSIVE EFFECT AND CARDIO-PROTECTION OF A NOVEL PEPTIDE AGONIST OF THE MAS RECEPTOR

Silvia Quintão Savergnini;¹ Merav Beiman;² Roberto Queiroga Lautner;¹ Vanice de Paula-Carvalho;¹ Kyan Allahdadi;¹ Dalton Caires Pessoa;¹ Fabiana Pereira Costa-Fraga;¹ Rodrigo Araújo Fraga-Silva;¹ Gady Cojocarú;² Yossi Cohen;² Michael Bader;³ Alvaír Pinto de Almeida;¹ Galit Rotman;² Robson Augusto Souza dos Santos.¹

¹ Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ² Compugen Ltd., Tel Aviv, Israel; ³ Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin-Buch, Germany.

Running title: Anti-hypertensive effect of a novel Mas agonist.

Corresponding Author: Robson Augusto Souza dos Santos, MD, PhD
Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha
Belo Horizonte, MG, Brasil - 31 270-901
Phone: (55-31) 3409-2956
Fax : (55-31) 3409-2928
E-mail: robsonsant@gmail.com

METHODS

Rat Aortic Rings Preparation and Mounting

Rings (3-4 mm) from the descending thoracic aorta, free of adipose and connective tissue, were set up in gassed (5% CO₂-95% O₂) Krebs-Henseleit solution (mmol/L): NaCl 110.8, KCl 5.9, NaHCO₃ 25.0, MgSO₄ 1.07, CaCl₂ 2.49, NaH₂PO₄ 2.33 and glucose 11.51, at 37°C, under a tension of 1.0 g, for 1 hour to equilibrate. The presence of functional endothelium was assessed by the ability of Acetylcholine (1 μmol/L) to induce more than 70% relaxation of vessels pre-contracted with phenylephrine (0.1 μmol/L). When necessary, the endothelium was removed by rubbing the intimal surface with a wooden stick. Mechanical activity, recorded isometrically by a force transducer, was fed to an amplifier-recorder (Powerlab 4/20, ADInstruments, Inc.) and to a personal computer equipped with an analogue-to-digital converter board (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.), using CVMS data acquisition/recording software (World Precision Instruments, Inc.).

The vasorelaxant activity of the peptide was measured in rat vessels with or without functional endothelium pre-contracted to the same tension level (approximately 1.5 g of tension) induced by submaximal concentration of phenylephrine (10⁻⁷ mol/L). CGEN-856S was added in increasing cumulative concentrations (0.0001 to 1 μmol/L) once the response to phenylephrine had stabilized. The effect of the Ang-(1-7)/Mas antagonist, A-779, was tested by adding this compound at 10⁻⁶ mol/L, 3 minutes prior to the addition of cumulative concentration of CGEN-856S. In order to verify the participation of endothelium-derived NO in the relaxant effect of peptides, experiments were performed in the presence of 100 μmol/L L-NAME (*N*ω-nitro-L-arginine methyl ester), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. In these experiments, vessels were pre-contracted with 0.03 μmol/L of phenylephrine, to achieve the same tension level as the others. L-NAME was added to the bath 20 min prior to the addition of phenylephrine. As a control for all the above-mentioned protocols, another vessel segment from each rat was simultaneously monitored for effects of the peptide alone.

The vasorelaxant activity of the peptides CGEN-856S and Ang-(1-7) were compared in isolated aortic rings with functional endothelium, pre-contracted to the same tension level (approximately 1.5 g of tension) induced by submaximal concentration of phenylephrine (10⁻⁷ mol/L). CGEN-856S or Ang-(1-7) was added in increasing cumulative concentrations (0.0001 to 1 μmol/L) once the response to phenylephrine stabilized.

Mouse Aortic Rings Preparation and Mounting

Rings (2-3 mm) from the descending thoracic aorta of Mas^{+/+} and Mas^{-/-} mice, free of adipose and connective tissue, were set up in gassed (5% CO₂-95% O₂) Krebs-Henseleit solution, at 37°C, under a tension of 0.5 g, for 1 hour to equilibrate. The presence of functional endothelium was assessed by the ability of acetylcholine (10 μmol/L) to induce more than 70% relaxation of vessels pre-contracted with phenylephrine (0.1 μmol/L). CGEN-856S was added in increasing

cumulative concentrations (0.0001 to 1 $\mu\text{mol/L}$) once the response to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ phenylephrine had stabilized. Mechanical activity, recorded isometrically by a force transducer, was fed to an amplifier-recorder (Powerlab 4/20, ADInstruments, Inc.) and to a personal computer equipped with an analogue-to-digital converter board (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.), using CVMS data acquisition/recording software (World Precision Instruments, Inc.).

Angiotensin-converting Enzyme (ACE) activity assay

Plasma ACE activity was measured by a fluorometric method utilizing Hip-His-Leu as substrate as described previously.¹ Duplicate aliquots of a pool of rat plasma (10 μL) were incubated with 440 μL of 1 mmol/L Hip-His-Leu in 0.4 mol/L sodium borate buffer, pH 8.3, containing 0.9 mol/L NaCl for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 1.2 mL 0.34 mol/L NaOH, 100 μL of orthophthaldehyde (20 mg/mL in methanol) was added and after 10 min at room temperature, 200 μL of 3 N HCl was added. After centrifugation at 800 \times g for 5 min, fluorescence of the supernatant solution (365 nm excitation and 495 nm emission) was measured against water. Blanks were prepared by inverting the order of addition of rat plasma and NaOH. A standard curve of 0.5 to 20 nmol His-Leu/ tube was prepared for each assay. Enzyme activity was calculated as nmol His-Leu/ min/ mL. The specificity of the assay was demonstrated by 98% inhibition with 5 $\mu\text{mol/L}$ enalaprilat. To test for ACE inhibitory activity of Ang-(1-7) and CGEN-856S, final concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} mol/L were used for each peptide. Captopril was used as a positive control (10^{-9} to 10^{-5} mol/L). In all assays the peptide solutions were mixed with the substrate solution immediately before addition of the rat plasma.

Radioligand Binding Competition Assay at Human AT1 and AT2 receptors.

CGEN-856S was tested in competitive radioligand binding assays at the human AT1 and AT2 Ang II receptors, at eight concentrations: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol/L}$, in duplicate. The assays were performed at Euroscreen (Belgium).

Recombinant chinese hamster ovary (CHO)-K1-AT1 membranes were thawed on ice and diluted at 0.5 $\mu\text{g/well}$ in assay buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 5 mmol/L MgCl_2 , Saponine 10 $\mu\text{g/mL}$, 0.1% Bacitracin). The ligand (Sar^1 , Ile^8) Angiotensin II, and the radioligand [^{125}I]-(Sar^1 , Ile^8) Angiotensin II were diluted in assay buffer. The following reagents were successively added in the wells of a 96 well plate: 50 μL of test compound at increasing concentrations, 25 μL of radioligand (at a final concentration of 0.03 nmol/L) and 25 μL of membrane extracts. The samples were incubated 60 min at 25°C and filtered over filter plate (presoaked in washing buffer 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.05% BSA for 2h at RT) with a Filtermate Harvester (Perkin Elmer). After wash of the filters 6 times with 0.5 mL of ice-cold washing buffer, 50 μL of Microscint 20 (Packard) were added and the samples were incubated 15 min on an orbital shaker and then counted with a TopCountTM for 1 min/well.

Recombinant CHO-K1-AT2 membranes thawed on ice and diluted at 2.5 µg/well in assay buffer (25 mmol/L Hepes pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, Saponine 10 µg/mL, 0.5% BSA protease). The ligand, Angiotensin II and the radioligand: [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸) Angiotensin II were diluted in assay buffer. The following reagents were successively added in the wells of a 96 well plate: 50 µL of test compound at increasing concentrations, 25 µL of radioligand (at a final concentration of 0.1 nmol/L) and 25 µL of membrane extracts. The samples were incubated 60 min at 25°C and filtered over filter plate (presoaked in washing buffer 25 mmol/L Hepes pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5% PEI for 2h at RT) with a Filtermate Harvester (Perkin Elmer). After wash of the filters 6 times with 0.5 mL of ice-cold washing buffer, 50 µL of Microscint 20 (Packard) were added and the samples were incubated 15 min on an orbital shaker and then counted with a TopCount™ for 1 min/well.

On each day of experimentation and prior to the testing of compounds, reference agonist was tested at several concentrations in duplicate (n=2) to obtain a dose-response curve and an estimated EC₅₀. Reference values thus obtained for the test were compared to historical values obtained from the same receptor and used to validate the experimental session.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to José Roberto da Silva and Marilene Luzia de Oliveira for their helpful technical assistance.

SOURCES OF FUNDING

Silvia Savergnini was supported by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Roberto Lautner was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). This study was supported by a Compugen Grant and by Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT)/FAPEMIG/CNPq-INCT-NanoBiofar, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and CNPq/FAPEMIG/PRONEX (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência).

DISCLOSURES

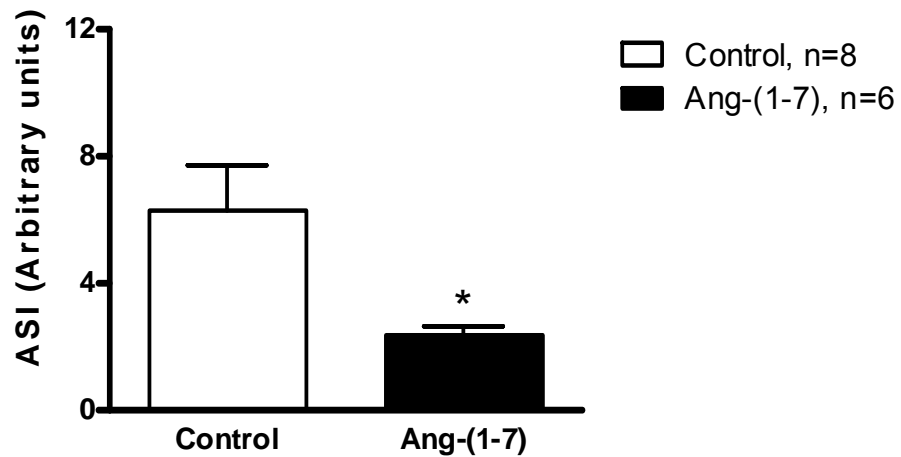
Robson A. S. Santos is a consultant of Compugen Ltd.
Merav Beiman, Gady Cojocar, Yossi Cohen and Galit Rotman are employees of Compugen Ltd.

REFERENCE

1. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985;7:244-252.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1

A



B

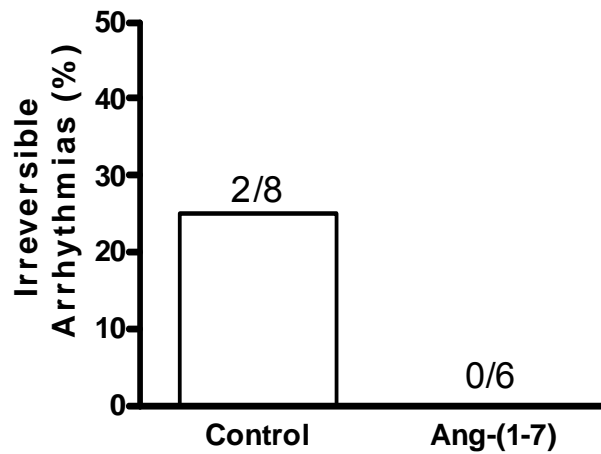
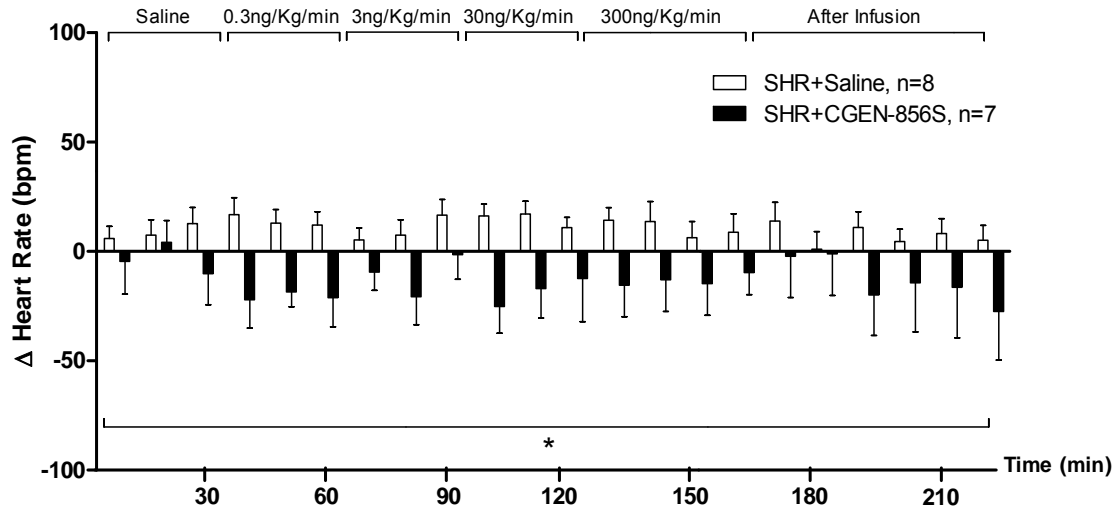


Figure S1 - Effect of Ang-(1-7) on ischemia/ reperfusion arrhythmias in isolated hearts. Arrhythmias were produced by 15 minutes occlusion of the LAD in isolated rat hearts, followed by reperfusion. The hearts were perfused with KRS in the absence or presence of Ang-(1-7) (0.2 nmol/L). (A) Averaged ASI (arrhythmia severity index). (B) Percentage of irreversible reperfusion arrhythmias. Numbers above the bars indicate the incidence of irreversible arrhythmias (>30 min) during the reperfusion period. * $P < 0.05$ vs control group (Student's t test).

SUPPLEMENTAL FIGURE 2

A



B

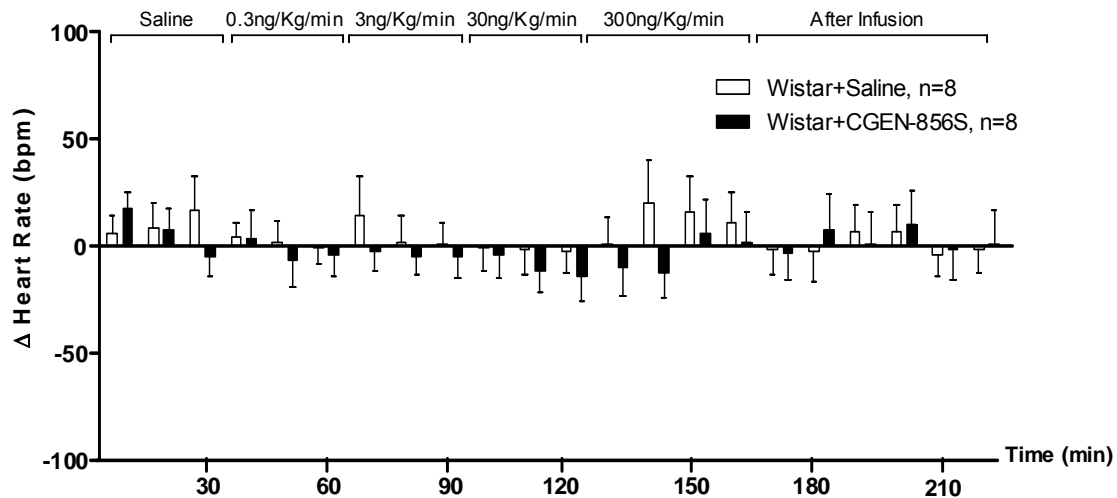


Figure S2 - Changes in heart rate (HR) produced by acute infusion of graded doses of CGEN-856S (0.3, 3, 30 and 300 ng/Kg/min) in conscious SHR (A) and in conscious Wistar rats (B). Bars represent values obtained every 10 min of infusion. * $P < 0.05$ SHR+CGEN-856S vs SHR+Saline group (Two-Way ANOVA followed by Bonferroni test).

SUPPLEMENTAL FIGURE 3

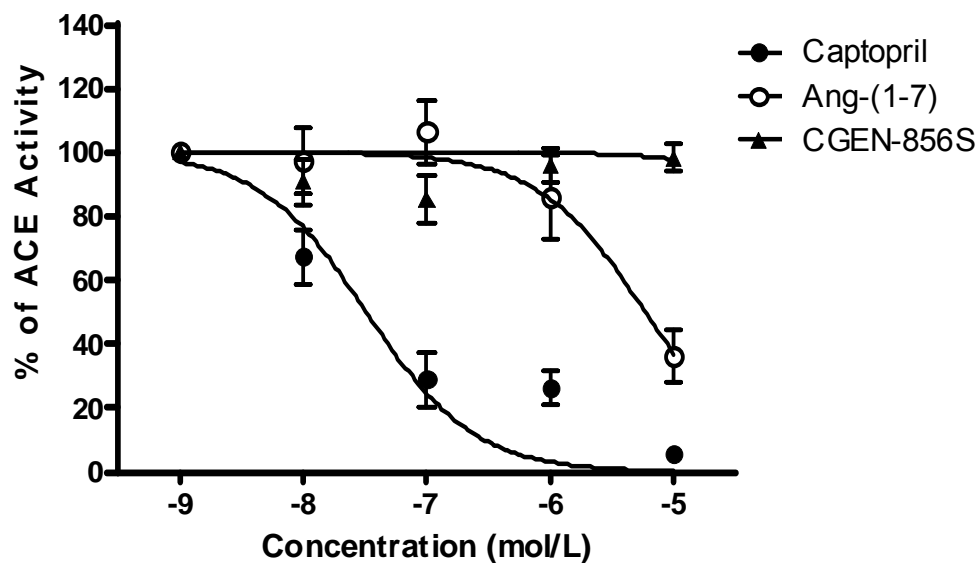
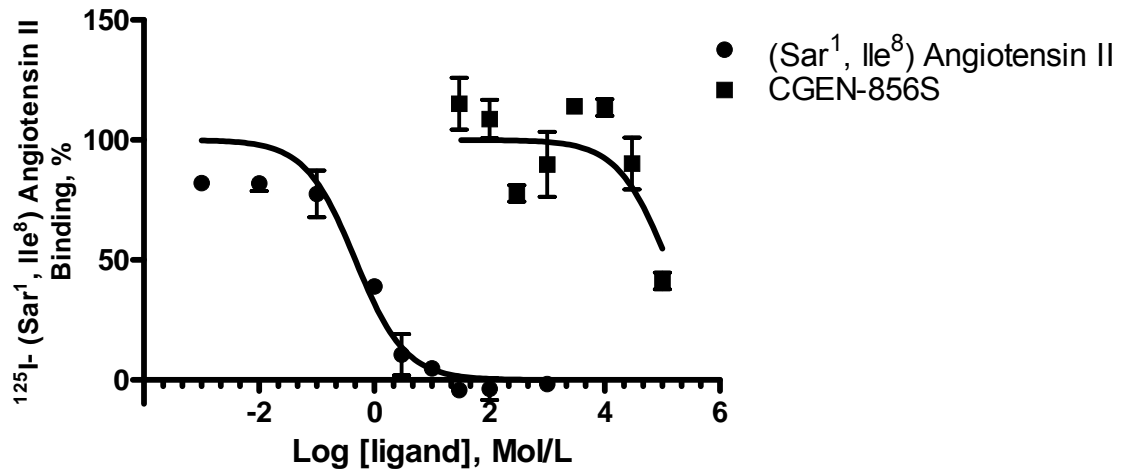


Figure S3 - Effect of CGEN-856S and Ang-(1-7) on plasma ACE activity. Final concentrations ranging from 10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L were used for each peptide. Captopril was used as a positive control (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L). Each point represents the mean ± SEM generated from 3 separate experiments.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4

A



B

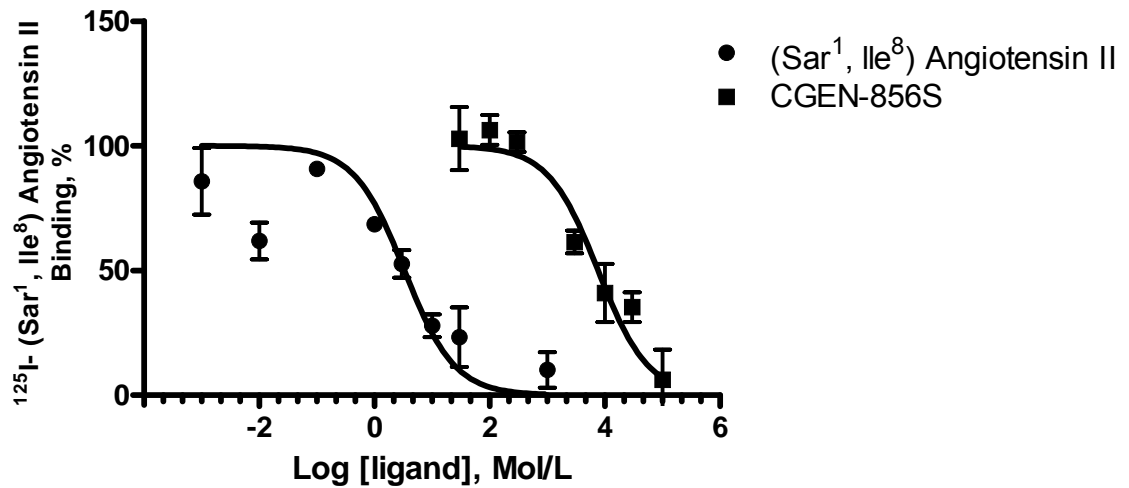


Figure S4 - Binding assays on the Ang II receptors AT1 and AT2. Competitive inhibition of AT1 binding of the radioligand ^{125}I [Sar⁻¹,Ile⁻⁸] Ang II by Ang II or CGEN-856S (A). Competitive inhibition of AT2 binding of the radioligand ^{125}I [Sar⁻¹,Ile⁻⁸] Ang II by Ang II or CGEN-856S (B).

Anexo B

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



*Learn and Live*SM

Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor

Silvia Quintão Savergnini, Merav Beiman, Roberto Queiroga Lautner, Vanice de Paula-Carvalho, Kyan Allahdadi, Dalton Caires Pessoa, Fabiana Pereira Costa-Fraga, Rodrigo Araújo Fraga-Silva, Gady Cojocarú, Yossi Cohen, Michael Bader, Alvaír Pinto de Almeida, Galit Rotman and Robson Augusto Souza Santos

Hypertension 2010;56:112-120; originally published online May 17, 2010;

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152942

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2010 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/56/1/112>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/HYPERTENSIONAHA.110.152942/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor

Silvia Quintão Savergnini, Merav Beiman, Roberto Queiroga Lautner, Vanice de Paula-Carvalho, Kyan Allahdadi, Dalton Caires Pessoa, Fabiana Pereira Costa-Fraga, Rodrigo Araújo Fraga-Silva, Gady Cojocar, Yossi Cohen, Michael Bader, Alvair Pinto de Almeida, Galit Rotman, Robson Augusto Souza Santos

Abstract—Mas stimulation with angiotensin (Ang)-(1-7) produces cardioprotective effects and vasorelaxation. Using a computational discovery platform for predicting novel naturally occurring peptides that may activate G protein–coupled receptors, we discovered a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S. An endothelium- and NO-dependent vasodilating effect was observed for CGEN-856S in thoracic aorta rings of rats (maximal value for the relaxant effect: $39.99 \pm 5.034\%$), which was similar to that produced by Ang-(1-7) (10^{-10} to 10^{-6} mol/L). In addition, the vasodilator activity of this peptide depended on a functional Mas receptor, because it was abolished in aorta rings of Mas-knockout mice. CGEN-856S appears to bind the Mas receptor at the same binding domain as Ang-(1-7), as suggested by the blocking of its vasorelaxant effect with the Ang-(1-7) analogue D-Ala⁷-Ang-(1-7), and by its competitive inhibition of Ang-(1-7) binding to Mas-transfected cells. The effect of CGEN-856S on reperfusion arrhythmias and cardiac function was studied on ischemia reperfusion of isolated rat hearts. We found that picomolar concentration of CGEN-856S (0.04 nmol/L) had an antiarrhythmogenic effect, as demonstrated by a reduction in the incidence and duration of reperfusion arrhythmias. Furthermore, acute infusion of CGEN-856S produced a shallow dose-dependent decrease in mean arterial pressure of conscious spontaneously hypertensive rats. The maximum change during infusion was observed at the highest dose. Strikingly, blood pressure continued to drop in the postinfusion period. The results presented here indicate that the novel Mas agonist, CGEN-856S, might have a therapeutic value, because it induces vasorelaxing, antihypertensive, and cardioprotective effects. (*Hypertension*. 2010;56:112-120.)

Key Words: Mas1 ■ angiotensin (1-7) ■ hypertension ■ reperfusion arrhythmias

Angiotensin-(1-7) (Ang-[1-7]) is a biologically active component of the renin-angiotensin system (RAS).¹⁻³ The identification of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in 2000,⁴ and years later of Mas as a receptor for Ang-(1-7),⁵ allowed researchers to build up a new concept of the RAS. In this novel concept, the result of the limited proteolysis processing starting with the hydrolysis of angiotensinogen by renin can be divided in 2 major functional arms, one represented by ACE/angiotensin II (Ang II)/Ang II type 1 (AT₁) receptors and the other composed of ACE2/Ang-(1-7)/Mas.¹ These 2 arms have some similar effects in the brain.^{6,7} However, in the periphery most of the actions of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas oppose many of the deleterious effects elicited by Ang II acting on AT₁ receptors.^{1,8,9}

Genetic ablation of Mas leads to impairment of many cardiovascular and metabolic functions supporting the con-

cept that the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis has an important physiological and physiopathological role.¹⁰ Effects described for Ang-(1-7) acting through Mas include vasodilation, antiarrhythmogenesis, antifibrogenesis, antitrombogenesis, facilitation of erectile function, and improvement of glycidic and lipidic metabolism.^{1,8,10,11}

The growing evidence supporting the beneficial effects of the Mas/Ang-(1-7) pathway prompted us to search for novel peptide ligands for Mas. This was achieved using a computational biology discovery platform, which we developed recently, that uses machine learning algorithms designed to predict novel G protein–coupled receptor (GPCR) peptide ligands cleaved from secreted proteins (extracted from the Swiss-Prot protein database) by convertase proteolysis, as described previously.^{12,13} The ligands identified might, therefore, exist endogenously because of naturally occurring

Received March 5, 2010; first decision March 22, 2010; revision accepted April 13, 2010.

From the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT-Nanobiofar) (S.Q.S., R.Q.L., V.P.-C., K.A., D.C.P., F.P.C.-F., R.A.F.-S., A.P.A., R.A.S.S.), Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Compugen Ltd (M.Be., G.C., Y.C., G.R.), Tel Aviv, Israel; Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (M.Ba.), Berlin-Buch, Germany.

Correspondence to Robson Augusto Souza Santos, Departamento de Fisiologia e Biofísica-ICB/UFMG, Av Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail robsonsant@gmail.com

© 2010 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.152942

proteolysis. The predicted peptide ligands were synthesized and screened for activation of 152 GPCRs by calcium flux and cAMP assays.¹² Two novel peptides, designated CGEN-856 and CGEN-857, displayed high specificity for the Mas receptor, eliciting calcium influx in Chinese hamster ovary (CHO) cells overexpressing Mas. Both peptides did not show activation of AT₁ or Ang II type 2 (AT₂),¹² Ang II receptors that are known to be weakly activated by Ang-(1-7). In this study we report on the vasodilating, cardioprotective, and antihypertensive activities of a derivative of one of these peptides, CGEN-856S.

Methods

Animals

Male Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs) weighing 240 to 300 g were obtained from the animal facility of the Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais. Mas-knockout FVB/N (Mas^{-/-}) mice and FVB/N (Mas^{+/+}) mice were obtained from the transgenic animal facilities of the Laboratory of Hypertension, Federal University of Minas Gerais. All of the experimental protocols were performed in accordance with the guidelines for the human use of laboratory animals of our institute and approved by local authorities.

Discovery of Novel Mas Agonistic Peptides

Novel Mas-agonistic peptides were discovered using a new computational discovery platform aimed at discovering novel GPCR ligands encrypted in the human proteome.¹² Predicted peptides were screened for activation of 152 selected GPCRs using calcium flux assays, as described previously.¹² Two peptides, P61 and P33, were shown to induce calcium flux in Mas-transfected CHO cells.¹² These peptides, designated CGEN-856 and CGEN-857 (amino acid sequence FLGYCIYLNRRKRRGDPAFKRRLLRD and SMCHRWSRAVLFPAAHRP, respectively), have no significant homology to angiotensins, to known GPCR ligands, or to each other.¹² Both peptides contain a cysteine, and, thus, 3 forms of each peptide were synthesized, a monomer where the sulfhydryl moiety of the cysteine was protected with the acetamidomethyl group to avoid dimerization and a monomer in which the cysteine was substituted with serine or valine to create the monomeric forms CGEN-856S and CGEN-857V, respectively. In addition, a dimer via S-S bond was synthesized to create the dimeric forms CGEN-856D and CGEN-857D. The monomeric peptides and their dimeric forms elicited calcium flux in CHO cells cotransfected with the Mas receptor and Gα16 (Reference 12 and data not shown). The monomeric and dimeric forms of CGEN-856 and CGEN-857 also elicited vasodilative properties in an aortic ring assay (data not shown).

Further evaluation of the forms that seemed most active indicated additional Mas-agonistic activities in several experimental models. In this study, we describe the vasodilating, cardioprotective, and antihypertensive activities of one peptide, CGEN-856S.

Rat and Mouse Aortic Ring Preparation and Mounting

Rat and mouse aortic ring preparations and mounting are described in the online Data Supplement, available at <http://hyper.ahajournals.org>.

Isolated Heart Preparation

Wistar rats were decapitated 10 to 15 minutes after IP injection of 400 IU of heparin. The thorax was opened, and the heart was carefully dissected and perfused with Krebs-Ringer solution (KRS) containing (in millimoles per liter): NaCl 118.4, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.2, CaCl₂·2H₂O 2.5, glucose 11.7, and NaHCO₃ 26.5. The perfusion fluid was maintained at 37±1°C, with a pressure of 65 mm Hg and constant oxygenation (5% CO₂-95% O₂). A force transducer was attached through a heart clip to the apex of the ventricles to record the contractile force (tension, grams) on a

computer, by a data-acquisition system (Biopac System). A diastolic tension of 1.0±0.2 g was applied to the hearts. Electric activity was recorded with an ECG (Nihon Kohden) with the aid of 2 cotton wicks placed directly on the surface of the right atrium and left ventricle. Coronary flow was measured every 5 minutes by collecting and determining the volume of heart effluent during a 1-minute interval.

The hearts were perfused for an initial 15-minute period with KRS. After this period, the hearts were perfused for an additional 20 minutes (equilibration period) with KRS (control; n=14) or KRS containing CGEN-856S (0.008 nmol/L; n=6), CGEN-856S (0.04 nmol/L; n=6), or CGEN-856S (0.2 nmol/L; n=6). To compare the effect of CGEN-856S with Ang-(1-7) on reperfusion arrhythmias, hearts were perfused with Ang-(1-7) (0.2 nmol/L; n=6) in the same setup condition. After the equilibration period, the left anterior descending coronary artery was ligated by the method described by Lubbe et al¹⁴ beneath the left auricular appendage together with the adjacent veins. The ligature was released after 15 minutes, and reperfusion with KRS (in the absence or presence of various doses of CGEN-856S or Ang-[1-7], as described above) was performed for an additional 30 minutes. Cardiac arrhythmias were defined as the presence of ventricular tachycardia and/or ventricular fibrillation after the ligature of the coronary artery was released. To obtain a quantitative measurement, the arrhythmias were graded arbitrarily by their duration as follows: the occurrence of cardiac arrhythmias for 0 to 3 minutes was assigned the factor 2; 3 to 6 minutes was assigned the factor 4; 6 to 10 minutes was assigned the factor 6; 10 to 15 minutes was assigned the factor 8; 15 to 20 minutes was assigned the factor 10; 20 to 25 minutes was assigned the factor 11; and 25 to 30 minutes was assigned the factor 12. A value of 0 to 12 was, thus, obtained in each experiment and is denoted as arrhythmia severity index (ASI).¹⁵ An arrhythmia with a 30-minute duration was considered irreversible.

Acute Blood Pressure Measurement

Experiments were performed in 12- to 14-week-old male Wistar rats and SHRs. Twenty-four hours before the experiments, polyethylene catheters were implanted into the abdominal aorta for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) measurements and in the femoral vein for intravenous infusions. Different doses of CGEN-856S (0.3, 3.0, 30.0 and 300.0 ng/kg per minute; n=7 and 8 for SHR and Wistar rats, respectively) or saline (n=8 for both groups) were infused (30 minutes for each dose). After the drug infusion, blood pressure and HR were monitored for an additional 60-minute period.

ACE Activity Assay

Measurement of ACE activity is described in the online Data Supplement.

Radioligand Binding Competition Assay at Human AT₁ and AT₂ Receptors

Radioligand binding competition assay at human AT₁ and AT₂ receptors is described in the online Data Supplement.

Fluorescent Binding on Mas-Transfected Cells

Binding of CGEN-856S in Mas-transfected cells was performed using a method described previously.^{16,17} CHO cells were stably transfected with rat Mas cDNA driven by a cytomegalovirus promoter and selected by neomycin.^{5,18} Fluorescent Ang-(1-7) (at 10⁻⁸ mol/L) was incubated in 6-well plates for 60 minutes at 4°C in 1.5 mL of serum-free medium (DMEM) supplemented with 0.2% BSA, 0.005% bacitracin, 0.1 mol/L of PMSF, and 0.5 mol/L of orthophenanthroline with Mas-transfected CHO cells in the presence or absence of Ang-(1-7) or CGEN-856S (both at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L). After 2 washes with ice-cold serum-free DMEM, the slides were mounted for evaluation by confocal microscopy. Nonspecific binding was determined in the presence of 10⁻⁵ mol/L of Ang-(1-7). Relative fluorescence measurements were performed on a Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscope excited at 488 nm with an argon-ion laser (oil-immersion objective lens: ×63).

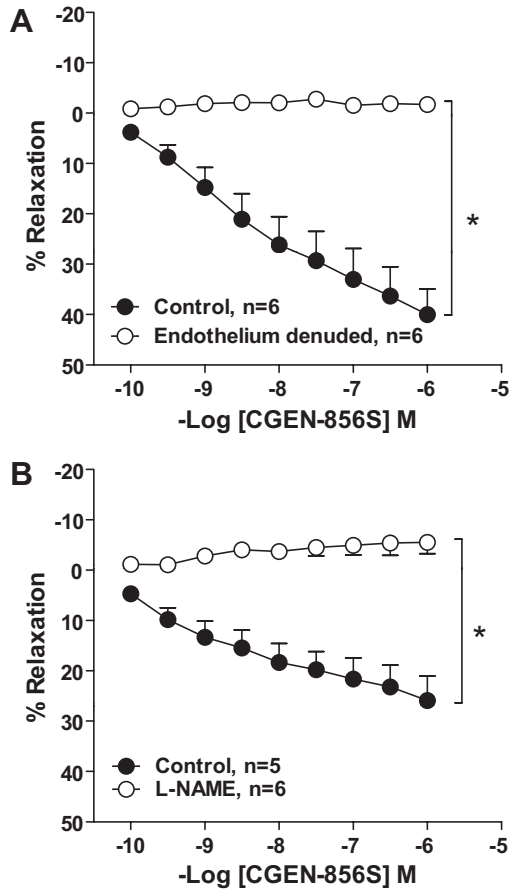


Figure 1. Vasodilator effect of CGEN-856S. A, Aortic rings from Wistar rats containing (control) or lacking functional endothelium. B, Aortic rings from Wistar rats in the absence or presence of L-NAME (100 μ mol/L). Each point represents the mean \pm SEM generated from 5 to 6 separated experiments; * P <0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by the 1-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test or by 2-way ANOVA followed by the Bonferroni test. The vasodilator effects were expressed as the percentage decrease of the maximal contraction induced by phenylephrine. Experimental values were considered statistically significant when P <0.05.

Results

CGEN-856S Induced NO- and Mas-Dependent Vasorelaxation in Isolated Aortic Rings

CGEN-856S produced a concentration-dependent vasodilator effect in endothelium-containing aortic rings precontracted with phenylephrine, which was abolished in endothelium-denuded vessels (Figure 1A). Maximal value for the relaxant effect of CGEN-856S in vessels with endothelium was $39.990 \pm 5.034\%$. In the presence of the NO synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the vasodilator effect of CGEN-856S was also abolished, indicating the participation of NO in this effect (Figure 1B).

To further ascertain whether the vasorelaxation produced in aortic rings by CGEN-856S was because of a specific effect on the Mas receptor, we initially used the Ang-(1-7)/Mas antagonist D-Ala⁷-Ang-(1-7), named A-779. As shown in

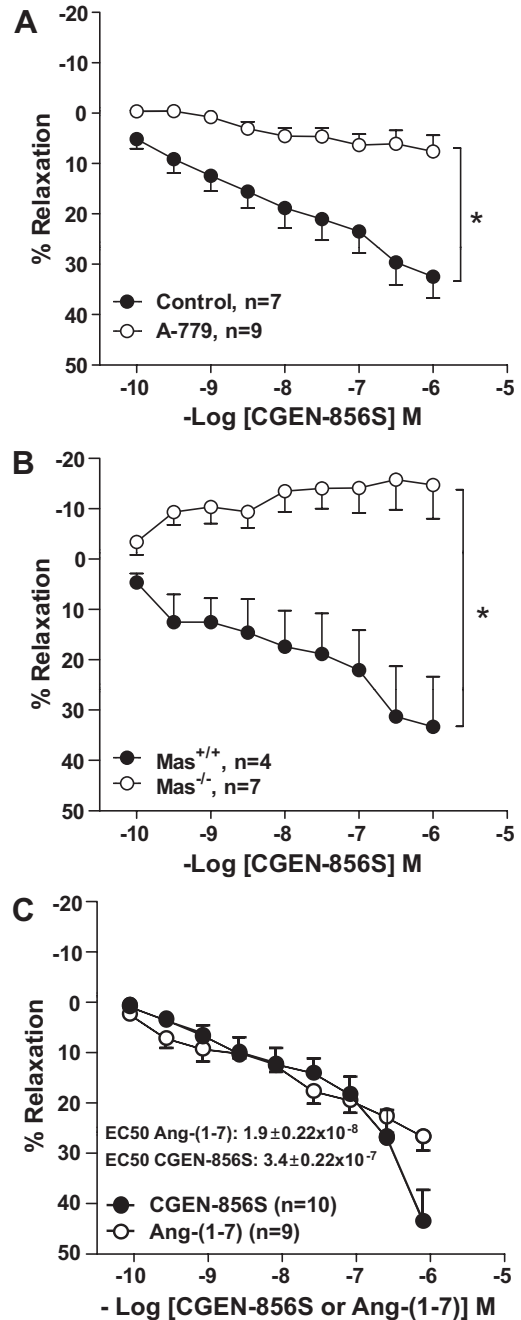


Figure 2. Vasodilator effect of CGEN-856S on inhibition or absence of functional Mas. A, Inhibition of the vasodilator effect of CGEN-856S in aorta rings of Wistar rats in the absence or presence of the Ang-(1-7) antagonist A-779 (10^{-6} mol/L). B, Vasodilator effect of CGEN-856S in aorta rings taken from Mas^{+/+} or Mas^{-/-} mice. C, Vasodilator effect of CGEN-856S and Ang-(1-7) in aorta rings of Wistar rats containing functional endothelium. Each point represents the mean \pm SEM generated from 4 to 10 separate experiments; * P <0.05 (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Figure 2A, the vasorelaxation produced by CGEN-856S was inhibited by the Ang-(1-7) antagonist. We next used thoracic aortic rings taken from Mas-knockout FVB/N (Mas^{-/-}) and Mas^{+/+} FVB/N mice. As shown in Figure 2B, CGEN-856S induced vasorelaxation in aortic rings from Mas^{+/+} mice, whereas this effect was absent in aortic rings from Mas^{-/-} mice.

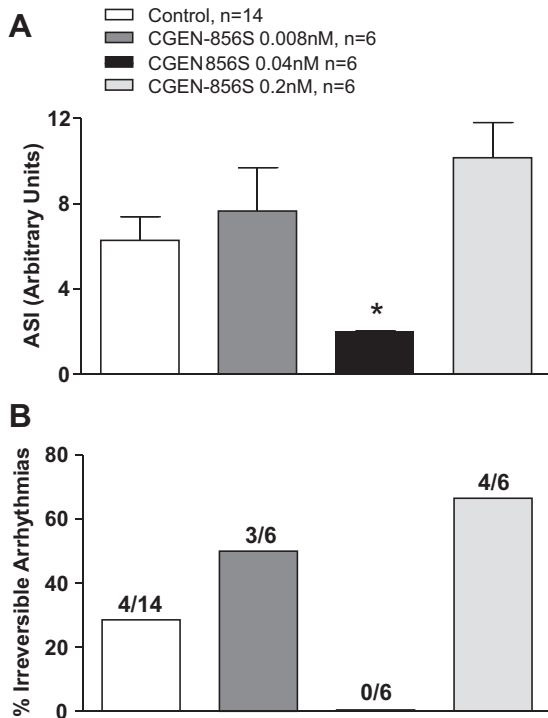


Figure 3. Effect of CGEN-856S on ischemia/reperfusion arrhythmias in isolated hearts. Arrhythmias were produced by 15-minute occlusion of the left anterior descending coronary artery in isolated rat hearts, followed by reperfusion. The hearts were perfused with KRS in the absence or presence of CGEN-856S (at 0.008, 0.040, or 0.200 nmol/L). A, Averaged ASI. B, Percentage of irreversible reperfusion arrhythmias. Numbers above the bars indicate the incidence of irreversible arrhythmias (>30 minutes) during the reperfusion period. * $P < 0.05$ vs control group (1-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

As shown in Figure 2C, the vasorelaxation produced by CGEN-856S resembled that produced by Ang-(1-7); however, the EC_{50} for Ang-(1-7) was lower ($EC_{50} = 1.89 \times 10^{-8} \pm 0.22$ mol/L for Ang-(1-7) versus $3.4 \times 10^{-7} \pm 0.22$ mol/L for CGEN-856S), whereas the maximal value for the relaxant effect was higher for CGEN-856S (24.40% for Ang-[1-7] versus 54.62% for CGEN-856S).

CGEN-856S Decreased Ischemia/Reperfusion Arrhythmias in Isolated Hearts

The antiarrhythmogenic effect of CGEN-856S was evaluated in isolated rat hearts. We initially tested CGEN-856S at a concentration (0.2 nmol/L), which has been described previously as antiarrhythmogenic for Ang-(1-7).¹⁹ At this concentration, CGEN-856S produced no significant effect in the duration and incidence of reperfusion arrhythmias (ASI: 10.17 ± 1.64 versus 6.28 ± 1.11 for the control group; $P = 0.068$). However, at a lower concentration, 0.04 nmol/L, CGEN-856S decreased the duration of arrhythmias (ASI: 2.000 ± 0.002 versus 6.280 ± 1.110 for the control group; Figure 3A) and abolished the occurrence of irreversible arrhythmias (Figure 3B), as observed for Ang-(1-7) at 0.2 nmol/L (Figure S1, in the online Data Supplement). At a lower concentration, 0.008 nmol/L, the peptide had no effect on the arrhythmias (Figure 3A and 3B).

CGEN-856S produced additional effects in the isolated hearts at its effective antiarrhythmic concentration. It increased the postischemic systolic tension in comparison with the KRS perfused hearts and showed a slight increase in the coronary flow at 5 minutes of reperfusion (Figure 4A and 4E, respectively). CGEN-856S also prevented the increase of diastolic tension observed in untreated hearts during the reperfusion period (Figure 4B). A slight but significant effect on postischemic $-dT/dt$ was also observed (189.00 ± 1.72 versus 164.50 ± 3.50 g/s, for the control group; Figure 4D). No significant effect was observed on the $+dT/dt$ (Figure 4C) and baseline or postischemic HR (Figure 4F).

CGEN-856S Decreased MAP in SHR

In keeping with its vasorelaxing effect on rat aortic rings, acute infusion of CGEN-856S in conscious SHR produced a dose-dependent decrease in MAP (Figure 5A). The reduction in MAP started to be significant at a dose of 3 ng/kg per minute (maximum change: -5.9 ± 2.3 mm Hg; Figure 5A). The maximum change in MAP during infusion was observed at the highest dose (300 ng/kg per minute; Δ : -9.7 ± 3.7 mm Hg). Strikingly, the blood pressure continued to drop in the postinfusion period. The maximum change was observed at the end of the observation period (60 minutes postinfusion; Δ : -16.6 ± 2.3 mm Hg). Vehicle infusion in SHR did not alter MAP (Figure 5A). A small and transient but significant reduction in HR was induced by CGEN-856S in SHR (Figure S2A). However, no clear dose-related effect was observed for the HR changes.

CGEN-856S also produced a decrease in the MAP of normotensive Wistar rats (Figure 5B); however, the magnitude of the MAP change was considerably smaller than in SHR. During CGEN-856S infusion in Wistar rats the change in MAP observed at the highest dose (300 ng/kg per minute) was -6.2 ± 2.3 mm Hg. The maximum reduction in MAP was also observed in the postinfusion period (Δ : -8.1 ± 1.6 mm Hg). In Wistar rats there was no significant effect of CGEN-856S on HR (Figure S2B).

To address whether the effect of CGEN-856S could be because of interference with ACE activity or binding to Ang II receptors, we next tested the effect of the peptide on rat ACE activity and on the binding of Ang II to AT_1 and AT_2 receptors. CGEN-856S did not inhibit rat ACE activity at concentrations $\leq 10^{-5}$ mol/L, in contrast to the inhibition observed for Ang-(1-7) ($\approx 60\%$ inhibition at 10^{-5} mol/L; $IC_{50} = 2.58 \times 10^{-6}$ mol/L; Figure S3). In the same assay conditions, captopril, a known ACE inhibitor, essentially abolished ACE activity at 10^{-5} mol/L ($IC_{50} = 2.51 \times 10^{-8}$ mol/L; Figure S3). As observed for ACE activity, no evidence was obtained for significant binding of CGEN-856S to the AT_1 receptor (Figure S4A), whereas it displayed a 1000-fold lower affinity for the AT_2 receptor than Ang II ($IC_{50} = 4957.2$ versus 4.1 nmol/L for Ang II; Figure S4B). In contrast, CGEN-856S efficiently displaced the binding of fluorescent Ang-(1-7) to CHO Mas-transfected cells to a similar extent to that observed for Ang-(1-7) (Figure 6).

Discussion

In this study we tested the vascular and cardiac effects of a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S, identified using a

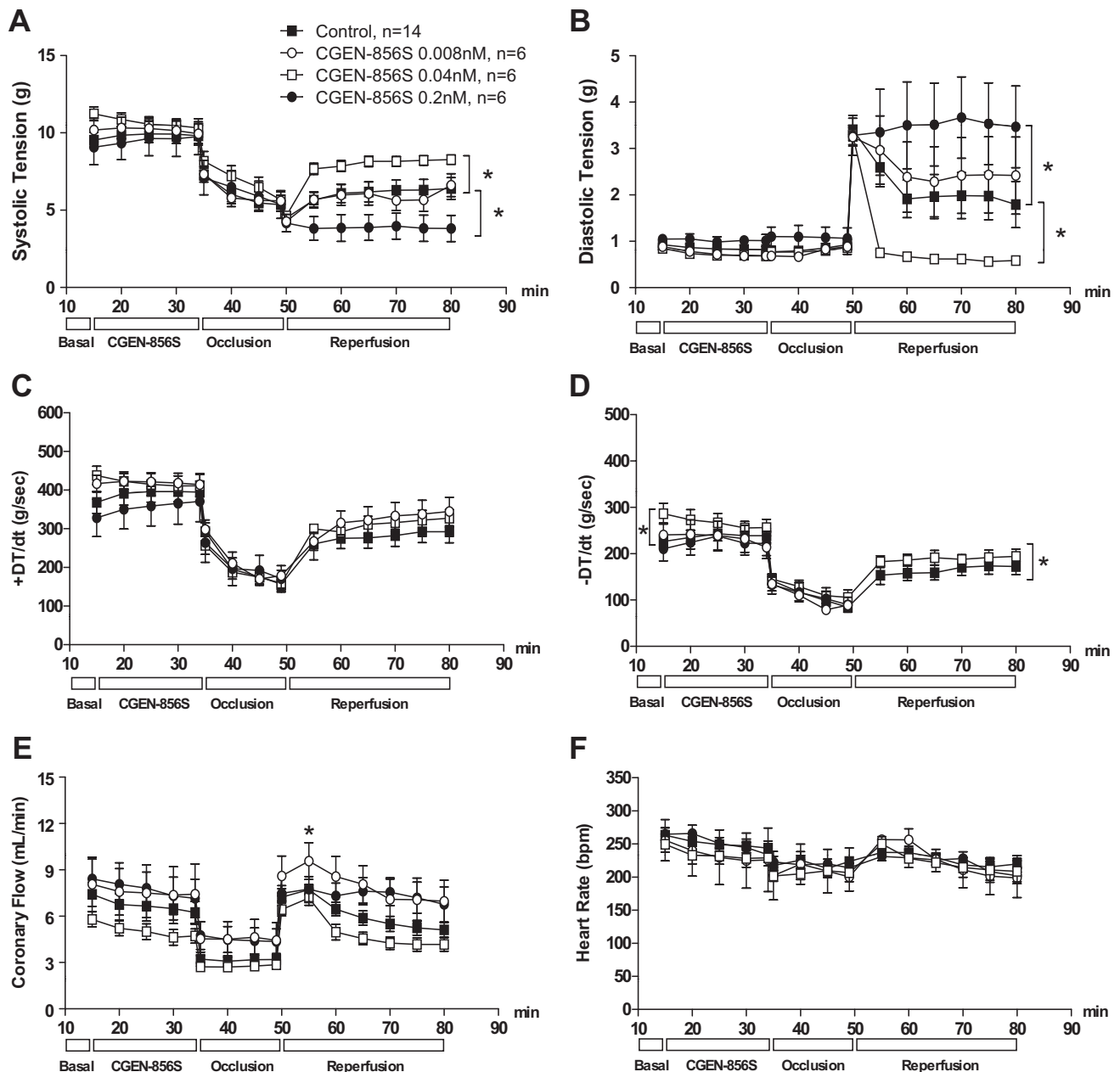


Figure 4. Time course of systolic tension (A), diastolic tension (B), rate of tension rise (+dT/dt; C), rate of tension fall (–dT/dt; D), coronary flow (E), and HR (F) in isolated perfused rat hearts during basal, left anterior descending coronary artery occlusion, and reperfusion periods. Isolated hearts were perfused with KRS in the absence or presence of CGEN-856S (at 0.008, 0.040, or 0.200 nmol/L). * $P < 0.05$ compared with control group (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

computational biology discovery platform.¹² The amino acid sequence of CGEN-856S is unrelated to that of angiotensins. The data obtained for this peptide clearly validate this *in silico* strategy for identifying GPCR ligands. Furthermore, the results obtained with this novel Mas agonist peptide resembled those reported previously with Ang-(1-7)^{1,8,19–21} and another putative small molecule Mas agonist, AVE 0991,²² reinforcing the growing evidence for an important role of Mas in cardiovascular function.

CGEN-856S produced a vasodilating effect in thoracic aortic rings of mice and rats that resembled that produced by Ang-(1-7). The vasorelaxation produced by CGEN-856S was absent in endothelium-denuded vessels and was abolished by

treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME. These characteristics of the vasorelaxation induced by CGEN-856S are similar to those described for Ang-(1-7) and indicate the involvement of endothelium-derived NO in the response. Indeed, several lines of evidence linked Mas to the generation of NO in the vasculature and other tissues.^{21,23,24} As shown previously for Ang-(1-7), the vasodilating effect of CGEN-856S was mediated by Mas, as demonstrated by its abolishment in Mas-knockout aortic rings and inhibition by the Ang-(1-7) antagonist A-779. It should be noted that similar vasodilating effects were observed also for the monomeric form of CGEN-857 and for the dimeric forms of CGEN-856 and CGEN-857 (data not shown).

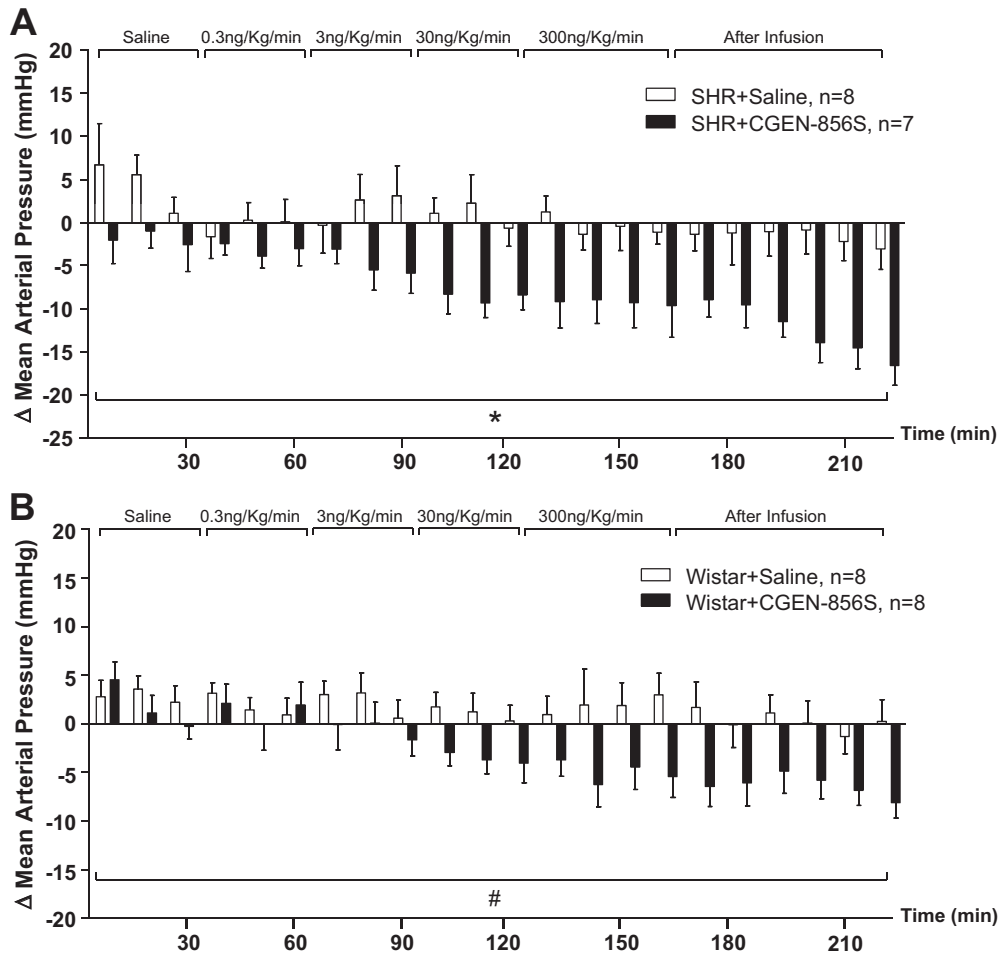


Figure 5. Changes in MAP produced by acute infusion of graded doses of CGEN-856S (0.3, 3.0, 30.0, and 300.0 ng/kg per minute) in conscious hypertensive rats, SHRs (A), and in conscious Wistar rats (B). Baseline values for SHRs: 147.3±1.2 mm Hg for the CGEN-856S group and 141.0±3.9 mm Hg for the control group; baseline values for Wistar rats: 97.4±6.3 mm Hg for the CGEN-856S group and 97.6±6.2 mm Hg for the control group. Bars represent values obtained every 10 minutes of infusion. * $P < 0.05$ SHR+CGEN-856S vs SHR+saline; # $P < 0.05$ Wistar+CGEN-856S vs Wistar+saline (2-way ANOVA followed by Bonferroni test).

Ang-(1-7) and CGEN-856S appear to bind the Mas receptor at the same binding domains, as suggested by the observation that the vasorelaxant effect of CGEN-856S can be blocked with the Ang-(1-7) analogue D-Ala⁷-Ang-(1-7), A-779, and by the effective displacement of the fluorescent Ang-(1-7) binding to CHO *Mas*-transfected cells.

As observed before for Ang-(1-7) and AVE 0991,^{25,26} the vasodilating effect of the CGEN-856S peptide in rat aortic rings was endothelium dependent and involved NO production, as evidenced by the blockade of endothelial NO synthase with L-NAME. However, unlike Ang-(1-7), CGEN-856S showed induction of calcium flux in *Mas*-transfected cells.¹² It has been described previously that Ang-(1-7), through activation of the Mas receptor, releases NO from cultured human aortic endothelial cells by the Ca⁺⁺-independent signaling cascade phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.²¹ Whether the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is also a key component of the signaling cascades stimulated by CGEN-856S remains to be clarified. The initial events triggering the intracellular pathways involved in the effect of Ang-(1-7) may differ from those triggered by CGEN-856S because of a different interaction with the

receptor (biased agonism).^{27,28} Despite these possible differences, our data comparing Ang-(1-7) with CGEN-856S in aortic rings showed a similar pattern of relaxation for the 2 peptides. Similarly, acute infusion of CGEN-856S in SHRs produced an antihypertensive effect equivalent to that observed with Ang-(1-7).²⁹

We also examined the antiarrhythmogenic effect of CGEN-856S in an ischemia/reperfusion model of isolated hearts. As shown before for Ang-(1-7),¹⁹ a low concentration of CGEN-856S (0.04 nmol/L) reduced the incidence and duration of cardiac arrhythmias in isolated rat hearts. In addition, as reported previously for Ang-(1-7),³⁰ CGEN-856S, at its effective antiarrhythmic concentration, improved myocardial function by increasing the postischemic systolic tension and coronary flow after reperfusion, without changing HR. The absence of effect of CGEN-856S at a higher concentration on the reperfusion arrhythmias is similar to previous reports concerning Ang-(1-7). Neves et al³¹ previously reported that Ang-(1-7) at 27 nmol/L produced a significant enhancement of reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. However, Ferreira et al¹⁹ and our current data (Figure S1) showed that, at a lower concentration of 0.2

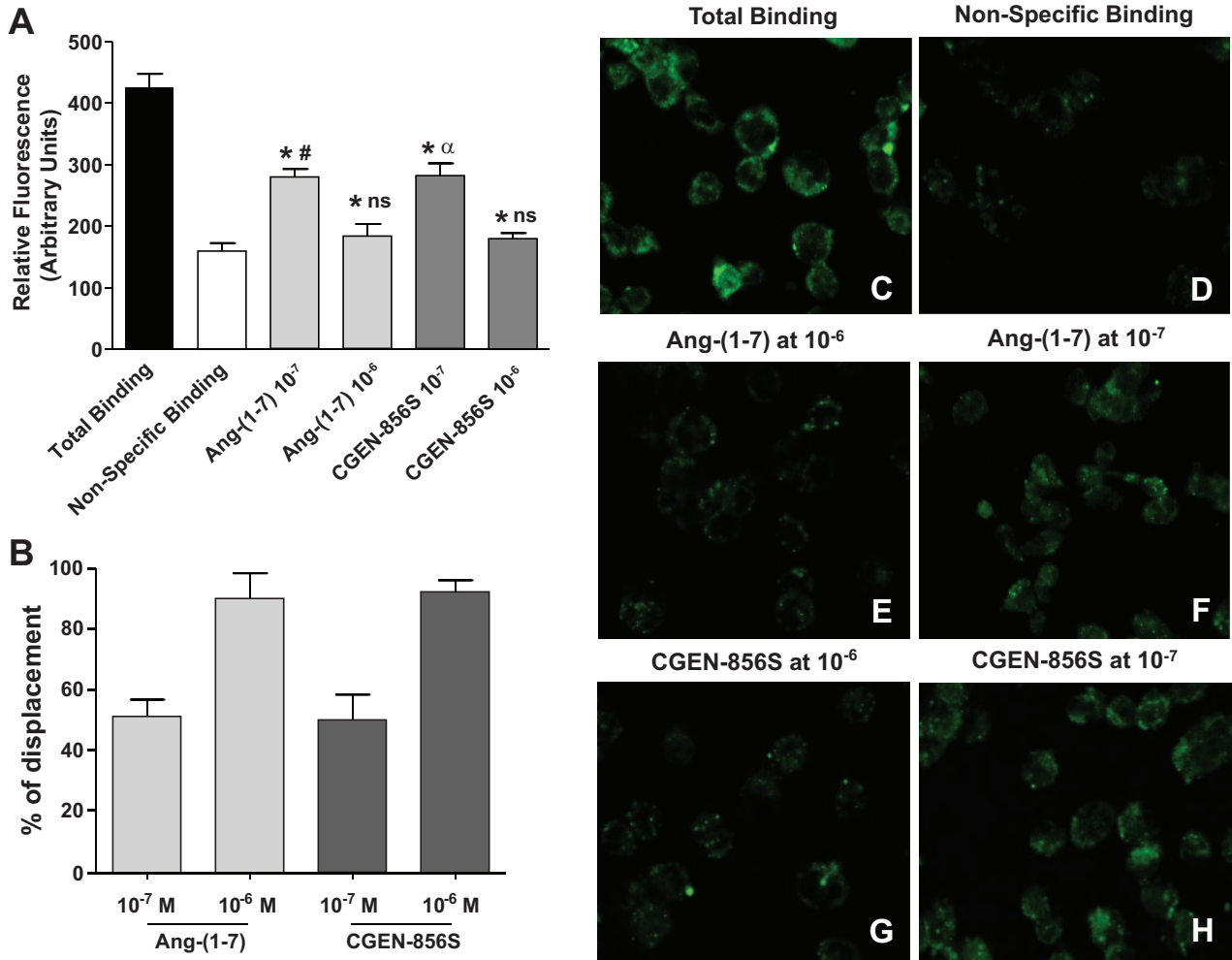


Figure 6. Binding assay on the Mas receptor. CGEN-856S at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L and Ang(1-7) at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ mol/L displaced binding of FAM-Ang(1-7) at 10⁻⁸ mol/L on Mas-transfected CHO cells (A and B). Graphs show the relative fluorescence captured on confocal microscopy (A) and the percentage of FAM-Ang(1-7) displacement by CGEN-856S and Ang(1-7) (B). Confocal microphotographs of the FAM-Ang(1-7) binding on Mas-transfected CHO cells (C through H); C, total binding of FAM-Ang(1-7) at 10⁻⁸ mol/L; D, nonspecific binding; E and G, Ang(1-7) displacement of the FAM-Ang(1-7) as a positive control; F and H, CGEN-856S displacement of the FAM-Ang(1-7). Each column represents the mean ± SEM; *P < 0.001, significantly different from total binding; #P < 0.05, significantly different comparing Ang(1-7) at 10⁻⁷ mol/L with Ang(1-7) at 10⁻⁶ mol/L; αP < 0.001, significantly different comparing CGEN-856S at 10⁻⁷ mol/L with CGEN-856S at 10⁻⁶ mol/L (1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test).

nmol/L, Ang(1-7) presents an antiarrhythmogenic effect. Ang(1-7) thus displays a clear tendency for a bell-shaped dose-response curve or biphasic effect.^{32,33} Taken together, these findings suggest that the effect of Mas agonists on reperfusion arrhythmias in vitro is biphasic and concentration dependent. On the other hand, no evidence for a proarrhythmogenic effect of CGEN-856S (this study) or Ang(1-7) was obtained in vivo.^{3,34}

We have also observed an antihypertensive effect of CGEN-856S in SHR. This observation is in accordance with ongoing studies in our laboratory using Ang(1-7)²⁹ and with previous reports by others, suggesting that Mas stimulation could be a strategy to treat hypertension.³⁵ Indeed, we have shown recently that genetic deletion of Mas in FVB/N mice produced a significant increase in blood pressure associated with endothelium dysfunction.³⁶ An increase of vascular resistance in many organs³⁷ and a marked endothelium dysfunction³⁸ was also observed in Mas^{-/-} C57BL/6 mice.

The absence of an increase of blood pressure in this strain may be related to an impairment of heart function.³⁹ Infusion of CGEN-856S did not change HR in normotensive rats, whereas in SHR only transient and dose-independent slight changes in HR were observed. The mechanism(s) of this selective effect in SHR remain to be clarified.

One may argue that the antihypertensive effect of CGEN-856S could be because of interference with ACE activity or could be mediated by an Ang II receptor, acting as an AT₁ receptor antagonist or AT₂ receptor agonist. However, our results show that CGEN-856S did not inhibit ACE activity and did not significantly bind the AT₁ receptor. The very low affinity of this peptide for the AT₂ receptor (1000-fold lower than Ang II), together with the lack of effect of pure AT₂ agonists on the blood pressure of awake SHR,⁴⁰ strongly suggest the absence of AT₂ receptor involvement in the cardiovascular action of CGEN-856S.

One important point that should be considered is related to the similarities and differences among CGEN-856S, Ang(1-

7), and AVE 0991.^{16,22} These 3 Mas agonists display different properties and applications. The peptide CGEN-856S (amino acid sequence: FLGYSIYLNKRRRGDPAFKRRLRD) is apparently more stable than Ang-(1-7) and has no ACE inhibitory activity. Because of its hydrophobicity, AVE 0991 could cross the blood-brain barrier producing central effects. Because some central effects of Ang-(1-7) are opposite to those evoked peripherally, the possibility that some peripheral effects of AVE 0991 could be masked by its central actions should be evaluated. On the other hand, Ang-(1-7) is endogenous and has quite well-characterized Mas-dependent actions.

In summary, in the current study we have identified a novel Mas agonist peptide, CGEN-856S, and further validated our bioinformatic platform for identifying novel GPCR ligands. Importantly, we present considerable evidence for antihypertensive and cardioprotective effects for CGEN-856S.

Perspectives

The RAS is a key target for treating cardiovascular and renal diseases. The current therapy to block the activity of the RAS includes ACE inhibitors, AT₁ receptors antagonists, and direct renin inhibitors. The accumulating evidence that stimulation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis produces cardioprotection and antihypertensive effects^{8,19,35,39} raises the possibility of development of a next generation of RAS-related drugs aimed to increase the activity of this axis.^{34,41} The results presented here, using CGEN-856S, in addition to reinforcing the concept that Mas stimulation produces beneficial cardiovascular effects, illustrates the potential of this novel therapeutic strategy for treating cardiovascular diseases.

Acknowledgments

We are grateful to José Roberto da Silva and Marilene Luzia de Oliveira for their helpful technical assistance.

Sources of Funding

S.Q.S. was supported by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and R.Q.L. was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais. This study was supported by a Compugen Grant and by Ministério de Ciência e Tecnologia/Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-INCT-NanoBiofar, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/Programa de Apoio a Núcleos de Excelência.

Disclosures

R.A.S.S. is a consultant of Compugen Ltd. M.B., G.C., Y.C., and G.R. are employees of Compugen Ltd.

References

1. Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Res.* 2005;38:499–507.
2. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med.* 2008;86:663–671.
3. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RAS, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL. Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008;103:1319–1326.
4. 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.
5. Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, 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 U S A.* 2003;100:8258–8263.
6. Fontes MA, Martins Pinge MC, Naves V, Campagnole-Santos MJ, Lopes OU, Khosla MC, Santos RA. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res.* 1997;750:305–310.
7. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol.* 1989;257:H324–H329.
8. Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008;93:519–527.
9. Bindom SM, Lazartigues E. The sweeter side of ACE2: physiological evidence for a role in diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:193–202.
10. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Pôrto LC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RA. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes.* 2008;57:340–347.
11. Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA, Gironacci MM, Turyn D, Dominici FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E262–E271.
12. Shemesh R, Toporik A, Levine Z, Hecht I, Rotman G, Wool A, Dahary D, Gofer E, Kliger Y, Soffer MA, Rosenberg A, Eshel D, Cohen Y. Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2008;283:34643–34649.
13. Kliger Y, Gofer E, Wool A, Toporik A, Apatoff A, Olshansky M. Predicting proteolytic sites in extracellular proteins: only halfway there. *Bioinformatics.* 2008;24:1049–1055.
14. Lubbe WF, Daries PS, Opie LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antiarrhythmic action of antiarrhythmic agents. *Cardiovasc Res.* 1978;12:212–220.
15. Bernauer W, Ernenputsch I. Antagonistic effects of α -adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme released and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;338:88–95.
16. Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 2004;44:490–496.
17. Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Gonçalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* 2008;14:28–35.
18. Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva ACM, Ganten D, Bader M. Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene: evidence for alternative splicing. *J Biol Chem.* 1994;269:26920–26925.
19. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension.* 2001;38:665–668.
20. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16:122–128.
21. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 2007;49:185–192.
22. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, Caliar MV, Santos RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1113–H1119.
23. Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension.* 2008;52:542–548.
24. Da Costa Gonçalves AC, Leite R, Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Reis AB, Reis FM, Touyz RM, Webb RC, Alenina N, Bader M, Santos RAS. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an

- important role in erectile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:2588–2596.
25. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:274–279.
 26. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996;27:523–528.
 27. Violin JD, Lefkowitz RJ. β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:416–422.
 28. Schulte G, Levy FO. Novel aspects of G-protein-coupled receptor signalling: different ways to achieve specificity. *Acta Physiol*. 2007;190:33–38.
 29. Santos RA, Savergnini SQ, Lautner RQ, Braga AN, Castro CH. Olmesartan potentiates the vasorelaxation and anti-hypertensive effect of angiotensin(1-7) [abstract]. *Circulation*. 2009;120:S1014.
 30. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:1083–1090.
 31. Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30:801–809.
 32. De Mello WC. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on impulse propagation, excitability and cardiac arrhythmias: is the overexpression of ACE2 arrhythmogenic? *Regulatory Peptides*. 2009;153:7–10.
 33. Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Summers C, Katovich MJ, Raizada MK. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2010;55:207–213.
 34. Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PW, Gomes ER, Dias-Peixoto MF, Alves MN, Fagundes-Moura CR, Rentzsch B, Gava E, Almeida AP, Guimarães AM, Kitten GT, Reudelhuber T, Bader M, Santos RA. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4:83–96.
 35. Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H684–H691.
 36. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N, Santos RA. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*. 2008;51:574–580.
 37. Botelho-Santos GA, Bader M, Santos RA. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice [abstract]. *Hypertension*. 2008;52:91.
 38. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M, Santos RAS, Alenina N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*. 2008;2:418–424.
 39. Santos RA, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3:383–391.
 40. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens*. 2009;27:2444–2451.
 41. Santos RA, 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;14:1019–1031.

ONLINE SUPPLEMENT

VASCULAR RELAXATION, ANTI-HYPERTENSIVE EFFECT AND CARDIO-PROTECTION OF A NOVEL PEPTIDE AGONIST OF THE MAS RECEPTOR

Silvia Quintão Savergnini;¹ Merav Beiman;² Roberto Queiroga Lautner;¹ Vanice de Paula-Carvalho;¹ Kyan Allahdadi;¹ Dalton Caires Pessoa;¹ Fabiana Pereira Costa-Fraga;¹ Rodrigo Araújo Fraga-Silva;¹ Gady Cojocarú;² Yossi Cohen;² Michael Bader;³ Alvaír Pinto de Almeida;¹ Galit Rotman;² Robson Augusto Souza dos Santos.¹

¹ Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ² Compugen Ltd., Tel Aviv, Israel; ³ Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin-Buch, Germany.

Running title: Anti-hypertensive effect of a novel Mas agonist.

Corresponding Author: Robson Augusto Souza dos Santos, MD, PhD
Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha
Belo Horizonte, MG, Brasil - 31 270-901
Phone: (55-31) 3409-2956
Fax : (55-31) 3409-2928
E-mail: robsonsant@gmail.com

METHODS

Rat Aortic Rings Preparation and Mounting

Rings (3-4 mm) from the descending thoracic aorta, free of adipose and connective tissue, were set up in gassed (5% CO₂-95% O₂) Krebs-Henseleit solution (mmol/L): NaCl 110.8, KCl 5.9, NaHCO₃ 25.0, MgSO₄ 1.07, CaCl₂ 2.49, NaH₂PO₄ 2.33 and glucose 11.51, at 37°C, under a tension of 1.0 g, for 1 hour to equilibrate. The presence of functional endothelium was assessed by the ability of Acetylcholine (1 μmol/L) to induce more than 70% relaxation of vessels pre-contracted with phenylephrine (0.1 μmol/L). When necessary, the endothelium was removed by rubbing the intimal surface with a wooden stick. Mechanical activity, recorded isometrically by a force transducer, was fed to an amplifier-recorder (Powerlab 4/20, ADInstruments, Inc.) and to a personal computer equipped with an analogue-to-digital converter board (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.), using CVMS data acquisition/recording software (World Precision Instruments, Inc.).

The vasorelaxant activity of the peptide was measured in rat vessels with or without functional endothelium pre-contracted to the same tension level (approximately 1.5 g of tension) induced by submaximal concentration of phenylephrine (10⁻⁷ mol/L). CGEN-856S was added in increasing cumulative concentrations (0.0001 to 1 μmol/L) once the response to phenylephrine had stabilized. The effect of the Ang-(1-7)/Mas antagonist, A-779, was tested by adding this compound at 10⁻⁶ mol/L, 3 minutes prior to the addition of cumulative concentration of CGEN-856S. In order to verify the participation of endothelium-derived NO in the relaxant effect of peptides, experiments were performed in the presence of 100 μmol/L L-NAME (*N*ω-nitro-L-arginine methyl ester), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. In these experiments, vessels were pre-contracted with 0.03 μmol/L of phenylephrine, to achieve the same tension level as the others. L-NAME was added to the bath 20 min prior to the addition of phenylephrine. As a control for all the above-mentioned protocols, another vessel segment from each rat was simultaneously monitored for effects of the peptide alone.

The vasorelaxant activity of the peptides CGEN-856S and Ang-(1-7) were compared in isolated aortic rings with functional endothelium, pre-contracted to the same tension level (approximately 1.5 g of tension) induced by submaximal concentration of phenylephrine (10⁻⁷ mol/L). CGEN-856S or Ang-(1-7) was added in increasing cumulative concentrations (0.0001 to 1 μmol/L) once the response to phenylephrine stabilized.

Mouse Aortic Rings Preparation and Mounting

Rings (2-3 mm) from the descending thoracic aorta of Mas^{+/+} and Mas^{-/-} mice, free of adipose and connective tissue, were set up in gassed (5% CO₂-95% O₂) Krebs-Henseleit solution, at 37°C, under a tension of 0.5 g, for 1 hour to equilibrate. The presence of functional endothelium was assessed by the ability of acetylcholine (10 μmol/L) to induce more than 70% relaxation of vessels pre-contracted with phenylephrine (0.1 μmol/L). CGEN-856S was added in increasing

cumulative concentrations (0.0001 to 1 $\mu\text{mol/L}$) once the response to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ phenylephrine had stabilized. Mechanical activity, recorded isometrically by a force transducer, was fed to an amplifier-recorder (Powerlab 4/20, ADInstruments, Inc.) and to a personal computer equipped with an analogue-to-digital converter board (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.), using CVMS data acquisition/recording software (World Precision Instruments, Inc.).

Angiotensin-converting Enzyme (ACE) activity assay

Plasma ACE activity was measured by a fluorometric method utilizing Hip-His-Leu as substrate as described previously.¹ Duplicate aliquots of a pool of rat plasma (10 μL) were incubated with 440 μL of 1 mmol/L Hip-His-Leu in 0.4 mol/L sodium borate buffer, pH 8.3, containing 0.9 mol/L NaCl for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 1.2 mL 0.34 mol/L NaOH, 100 μL of orthophthaldehyde (20 mg/mL in methanol) was added and after 10 min at room temperature, 200 μL of 3 N HCl was added. After centrifugation at $800 \times g$ for 5 min, fluorescence of the supernatant solution (365 nm excitation and 495 nm emission) was measured against water. Blanks were prepared by inverting the order of addition of rat plasma and NaOH. A standard curve of 0.5 to 20 nmol His-Leu/ tube was prepared for each assay. Enzyme activity was calculated as nmol His-Leu/ min/ mL. The specificity of the assay was demonstrated by 98% inhibition with 5 $\mu\text{mol/L}$ enalaprilat. To test for ACE inhibitory activity of Ang-(1-7) and CGEN-856S, final concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} mol/L were used for each peptide. Captopril was used as a positive control (10^{-9} to 10^{-5} mol/L). In all assays the peptide solutions were mixed with the substrate solution immediately before addition of the rat plasma.

Radioligand Binding Competition Assay at Human AT1 and AT2 receptors.

CGEN-856S was tested in competitive radioligand binding assays at the human AT1 and AT2 Ang II receptors, at eight concentrations: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{mol/L}$, in duplicate. The assays were performed at Euroscreen (Belgium).

Recombinant chinese hamster ovary (CHO)-K1-AT1 membranes were thawed on ice and diluted at 0.5 $\mu\text{g/well}$ in assay buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 5 mmol/L MgCl_2 , Saponine 10 $\mu\text{g/mL}$, 0.1% Bacitracin). The ligand (Sar^1 , Ile^8) Angiotensin II, and the radioligand [^{125}I]-(Sar^1 , Ile^8) Angiotensin II were diluted in assay buffer. The following reagents were successively added in the wells of a 96 well plate: 50 μL of test compound at increasing concentrations, 25 μL of radioligand (at a final concentration of 0.03 nmol/L) and 25 μL of membrane extracts. The samples were incubated 60 min at 25°C and filtered over filter plate (presoaked in washing buffer 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.05% BSA for 2h at RT) with a Filtermate Harvester (Perkin Elmer). After wash of the filters 6 times with 0.5 mL of ice-cold washing buffer, 50 μL of Microscint 20 (Packard) were added and the samples were incubated 15 min on an orbital shaker and then counted with a TopCountTM for 1 min/well.

Recombinant CHO-K1-AT2 membranes thawed on ice and diluted at 2.5 µg/well in assay buffer (25 mmol/L Hepes pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, Saponine 10 µg/mL, 0.5% BSA protease). The ligand, Angiotensin II and the radioligand: [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸) Angiotensin II were diluted in assay buffer. The following reagents were successively added in the wells of a 96 well plate: 50 µL of test compound at increasing concentrations, 25 µL of radioligand (at a final concentration of 0.1 nmol/L) and 25 µL of membrane extracts. The samples were incubated 60 min at 25°C and filtered over filter plate (presoaked in washing buffer 25 mmol/L Hepes pH 7.4, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5% PEI for 2h at RT) with a Filtermate Harvester (Perkin Elmer). After wash of the filters 6 times with 0.5 mL of ice-cold washing buffer, 50 µL of Microscint 20 (Packard) were added and the samples were incubated 15 min on an orbital shaker and then counted with a TopCount™ for 1 min/well.

On each day of experimentation and prior to the testing of compounds, reference agonist was tested at several concentrations in duplicate (n=2) to obtain a dose-response curve and an estimated EC₅₀. Reference values thus obtained for the test were compared to historical values obtained from the same receptor and used to validate the experimental session.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to José Roberto da Silva and Marilene Luzia de Oliveira for their helpful technical assistance.

SOURCES OF FUNDING

Silvia Savergnini was supported by a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Roberto Lautner was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). This study was supported by a Compugen Grant and by Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT)/FAPEMIG/CNPq-INCT-NanoBiofar, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and CNPq/FAPEMIG/PRONEX (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência).

DISCLOSURES

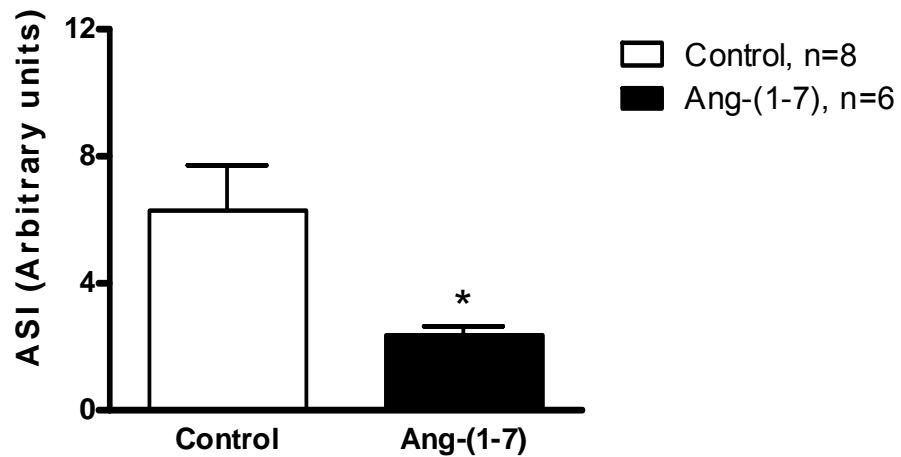
Robson A. S. Santos is a consultant of Compugen Ltd.
Merav Beiman, Gady Cojocar, Yossi Cohen and Galit Rotman are employees of Compugen Ltd.

REFERENCE

1. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985;7:244-252.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1

A



B

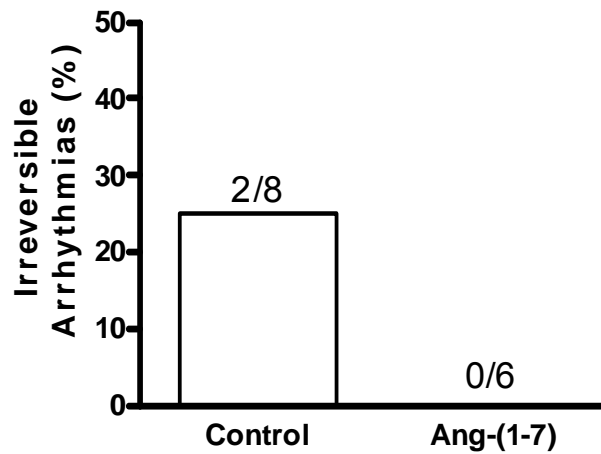
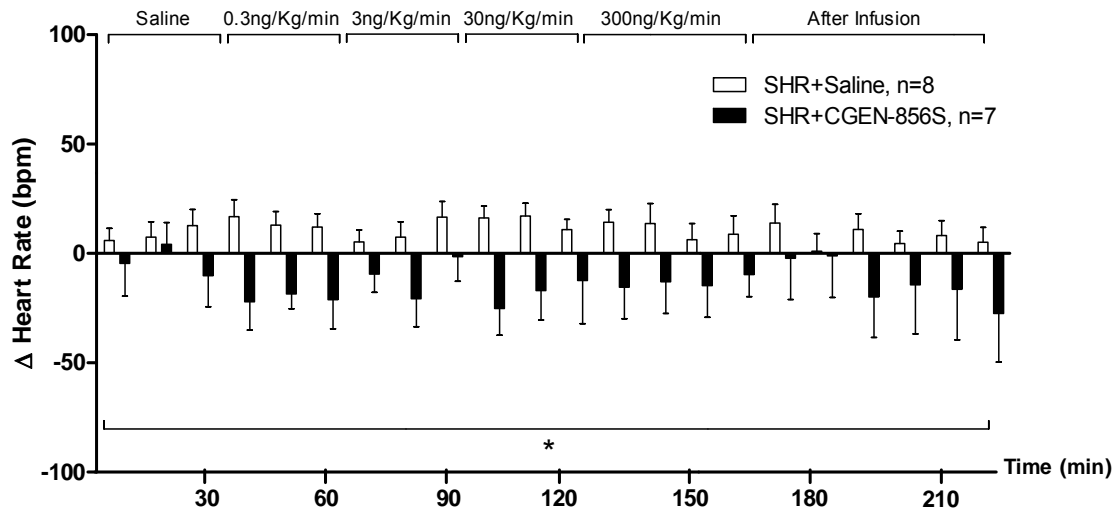


Figure S1 - Effect of Ang-(1-7) on ischemia/ reperfusion arrhythmias in isolated hearts. Arrhythmias were produced by 15 minutes occlusion of the LAD in isolated rat hearts, followed by reperfusion. The hearts were perfused with KRS in the absence or presence of Ang-(1-7) (0.2 nmol/L). (A) Averaged ASI (arrhythmia severity index). (B) Percentage of irreversible reperfusion arrhythmias. Numbers above the bars indicate the incidence of irreversible arrhythmias (>30 min) during the reperfusion period. * $P < 0.05$ vs control group (Student's *t* test).

SUPPLEMENTAL FIGURE 2

A



B

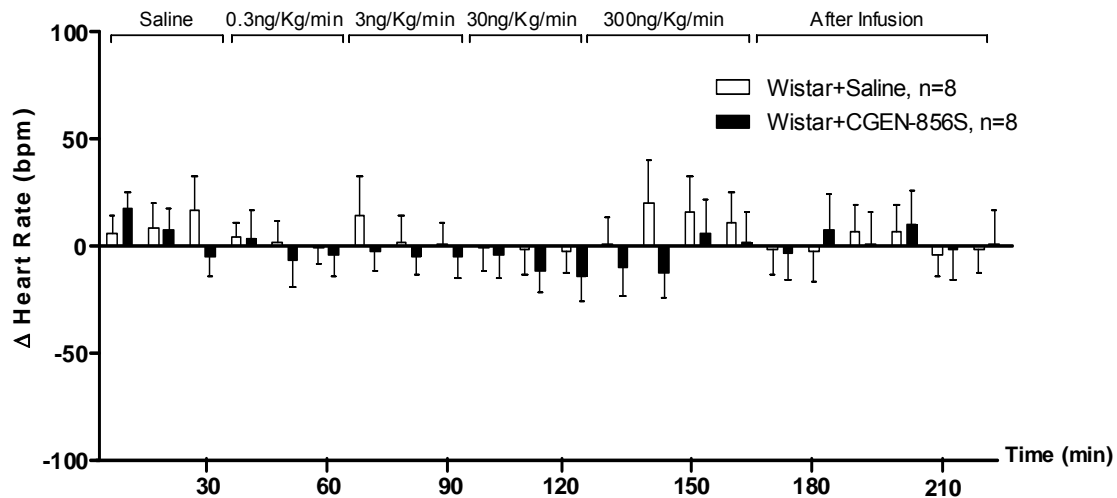


Figure S2 - Changes in heart rate (HR) produced by acute infusion of graded doses of CGEN-856S (0.3, 3, 30 and 300 ng/Kg/min) in conscious SHR (A) and in conscious Wistar rats (B). Bars represent values obtained every 10 min of infusion. * $P < 0.05$ SHR+CGEN-856S vs SHR+Saline group (Two-Way ANOVA followed by Bonferroni test).

SUPPLEMENTAL FIGURE 3

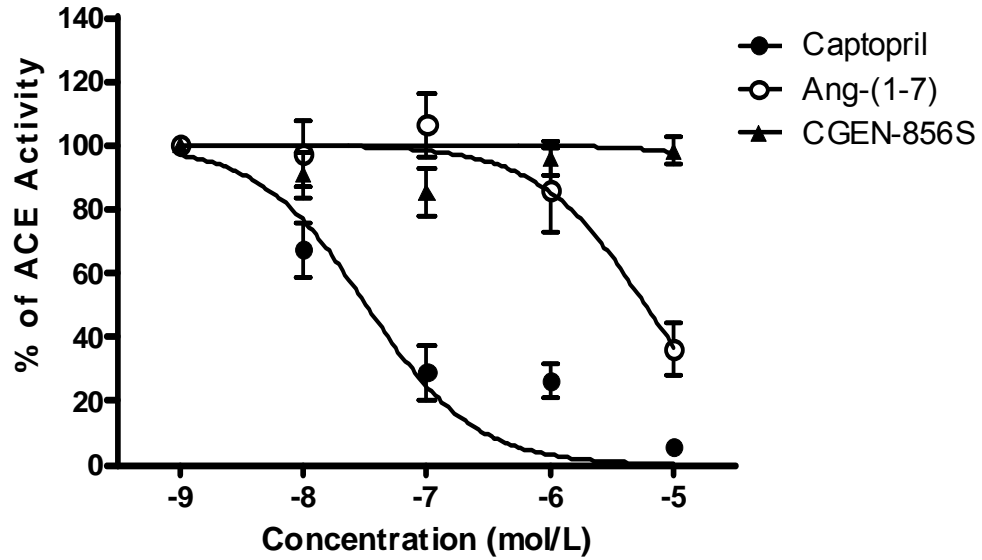
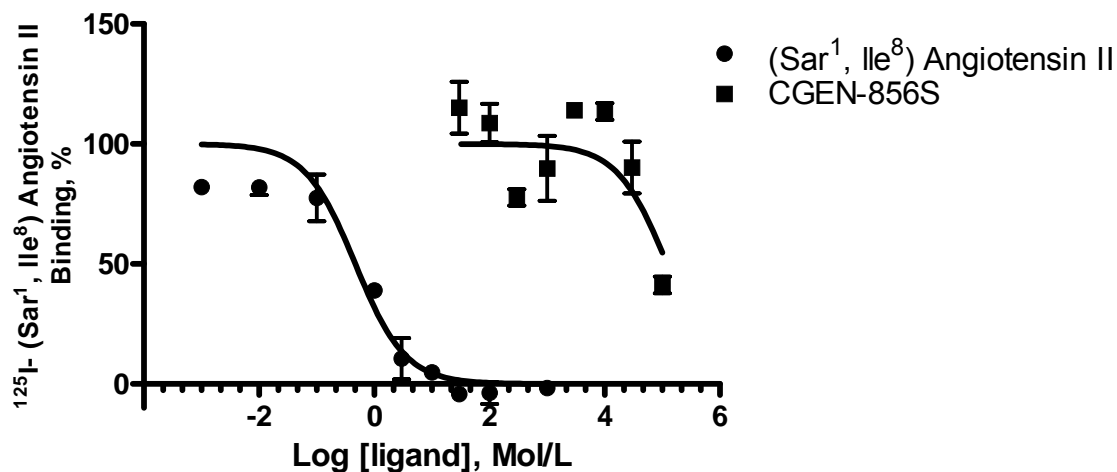


Figure S3 - Effect of CGEN-856S and Ang-(1-7) on plasma ACE activity. Final concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} mol/L were used for each peptide. Captopril was used as a positive control (10^{-9} to 10^{-5} mol/L). Each point represents the mean \pm SEM generated from 3 separate experiments.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4

A



B

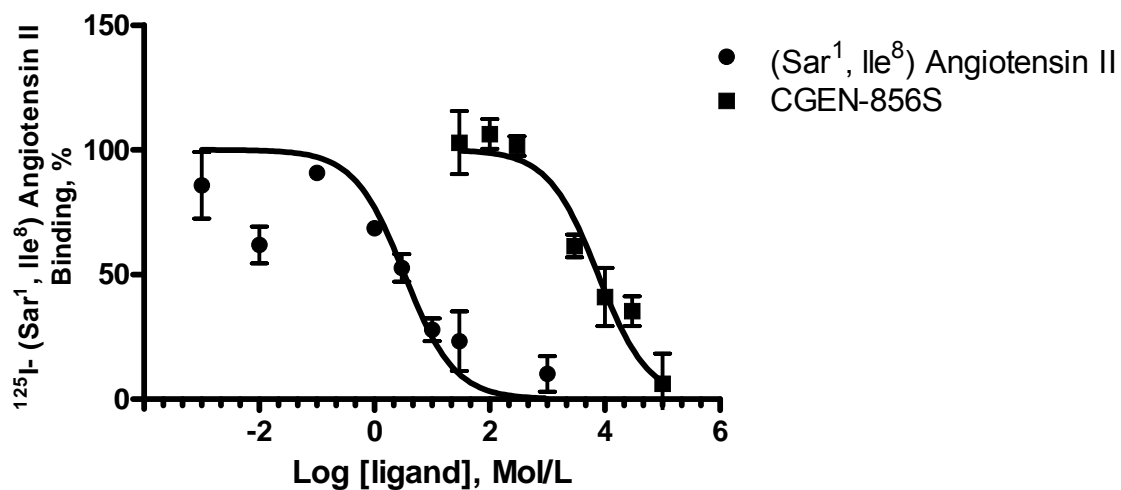


Figure S4 - Binding assays on the Ang II receptors AT1 and AT2. Competitive inhibition of AT1 binding of the radioligand ^{125}I [Sar⁻¹,Ile⁻⁸] Ang II by Ang II or CGEN-856S (A). Competitive inhibition of AT2 binding of the radioligand ^{125}I [Sar⁻¹,Ile⁻⁸] Ang II by Ang II or CGEN-856S (B).

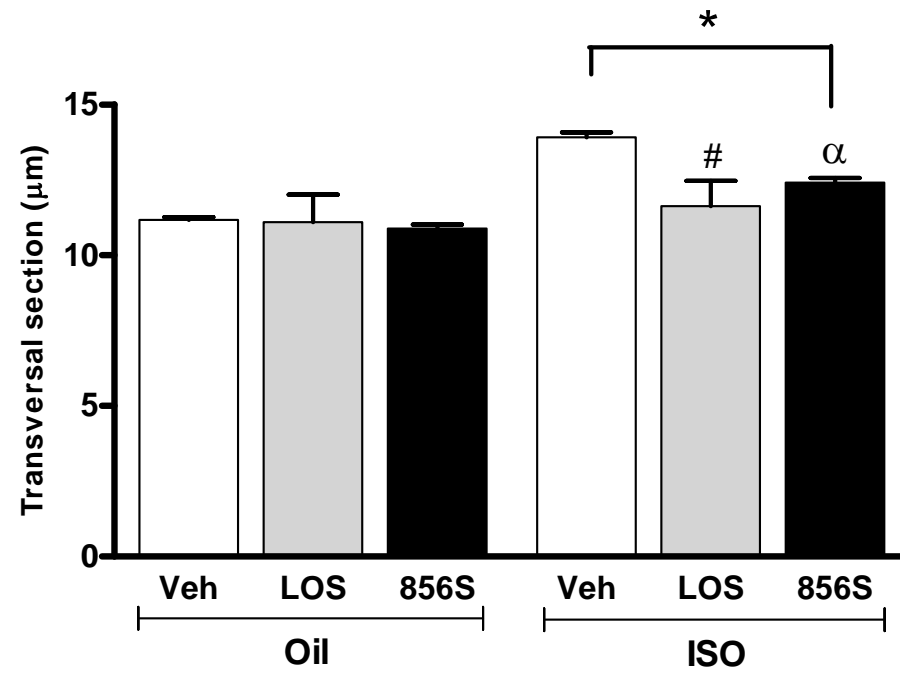


Figure 1

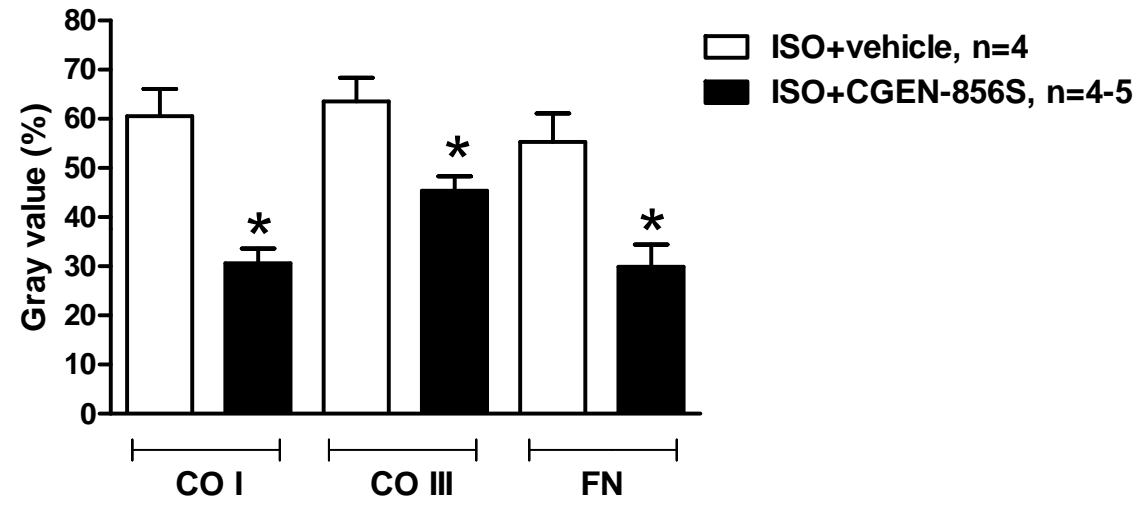
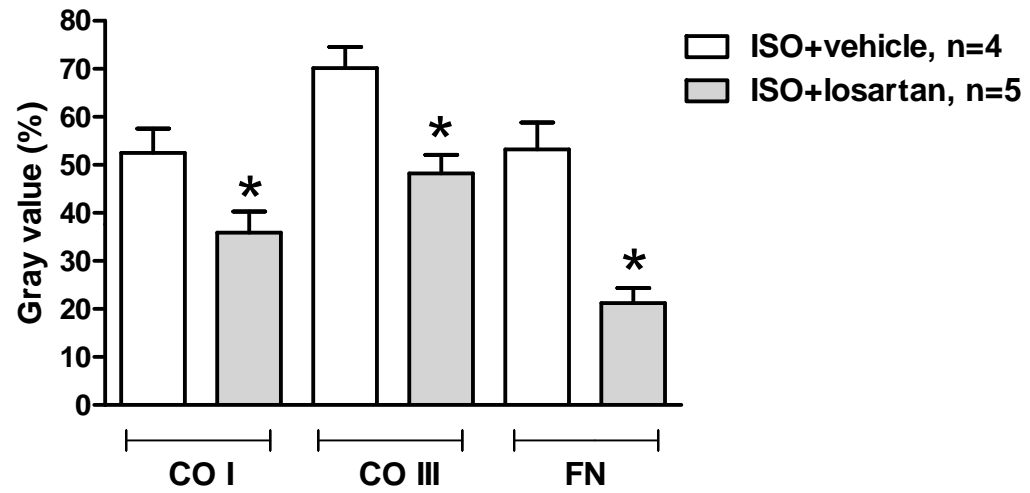
A**B**

Figure 2

C

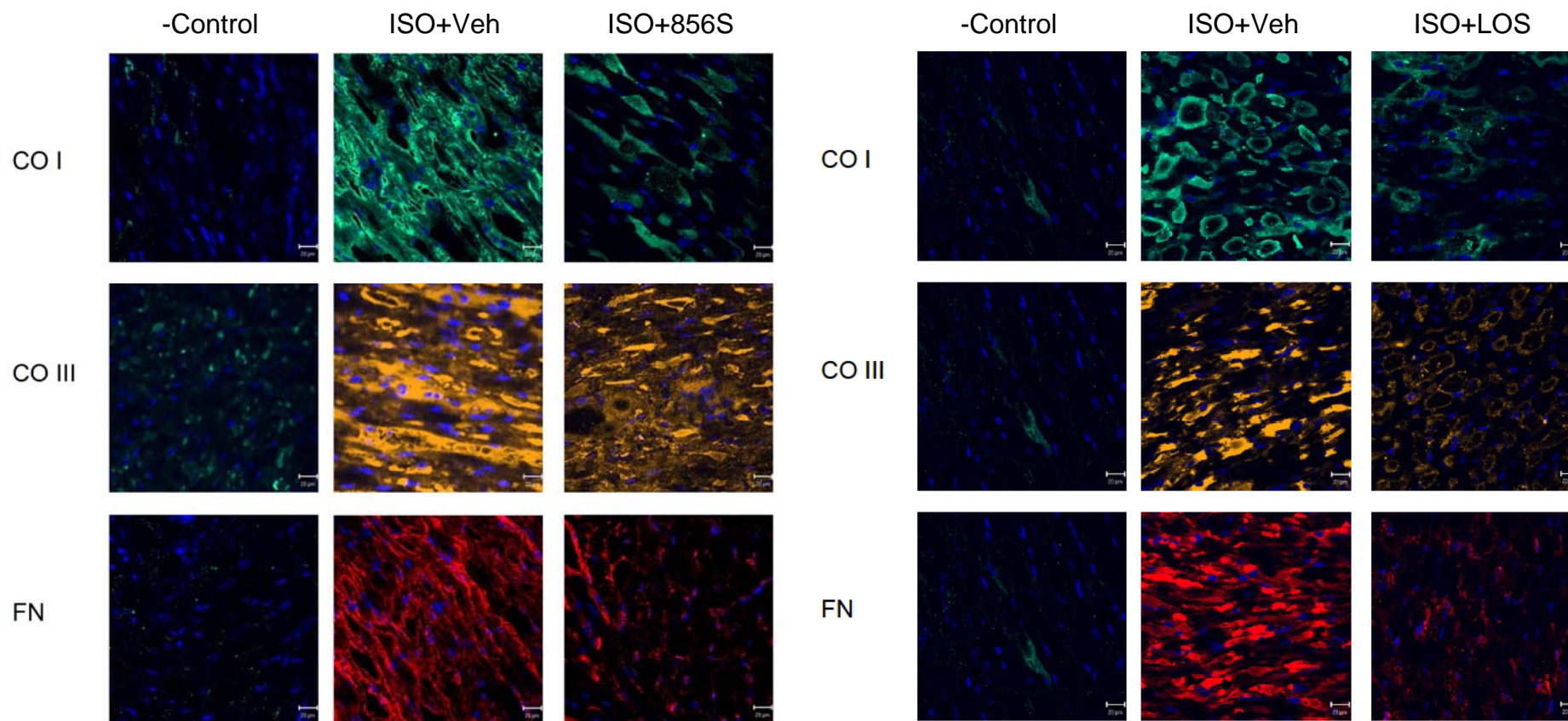


Figure 2

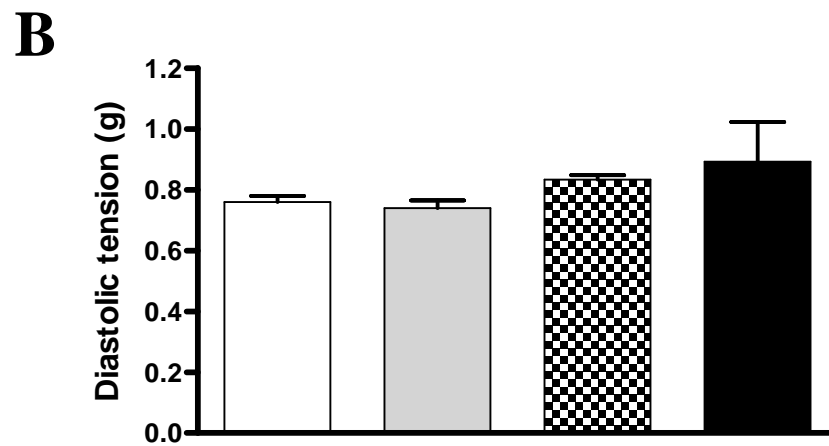
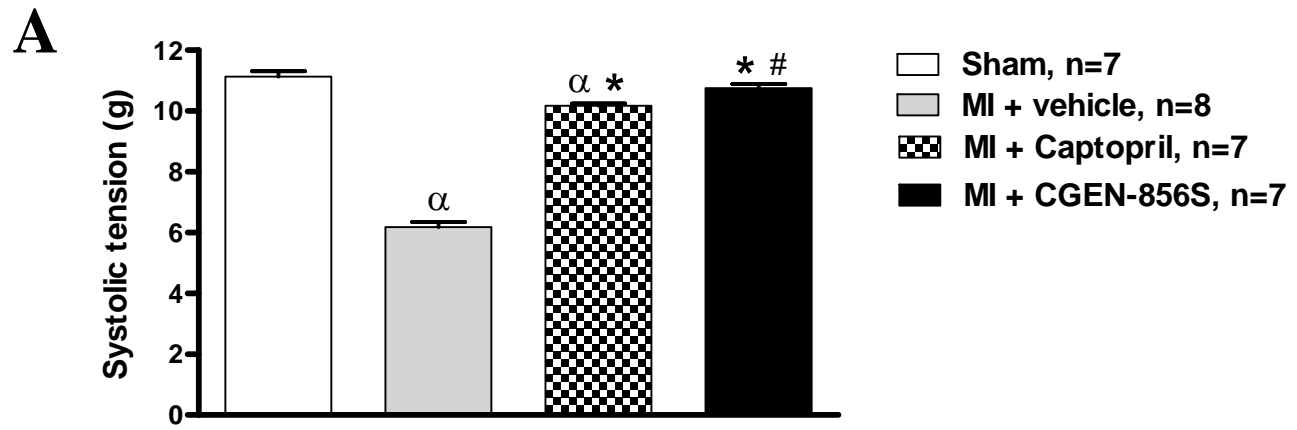


Figure 3

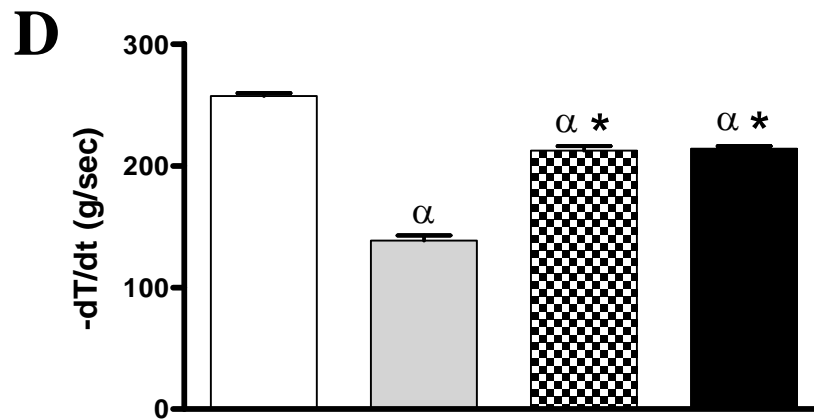
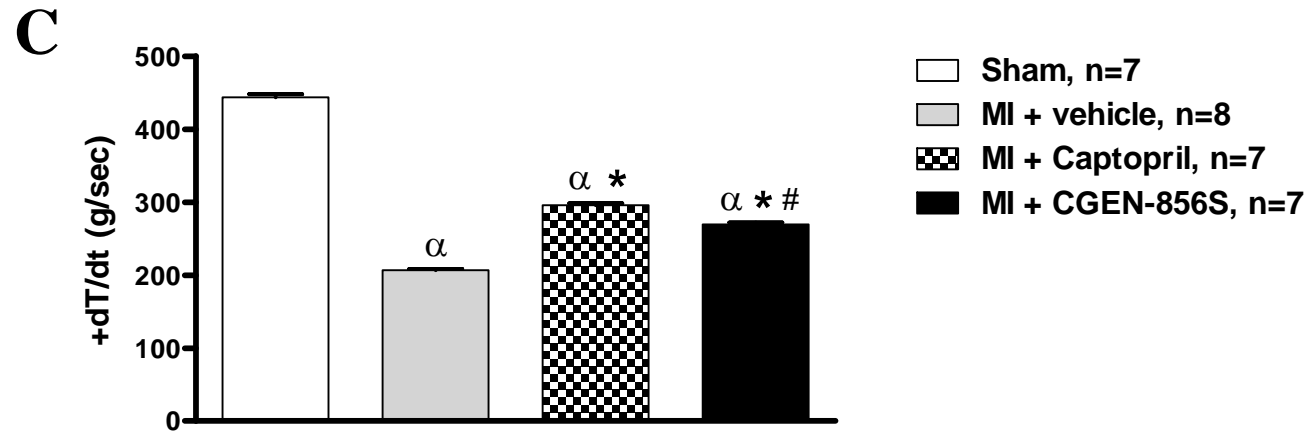
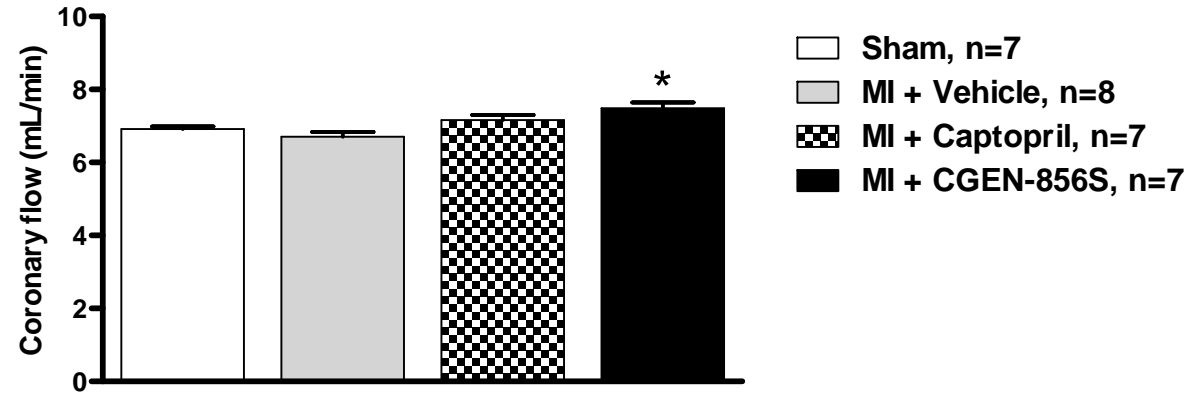


Figure 3

E



F

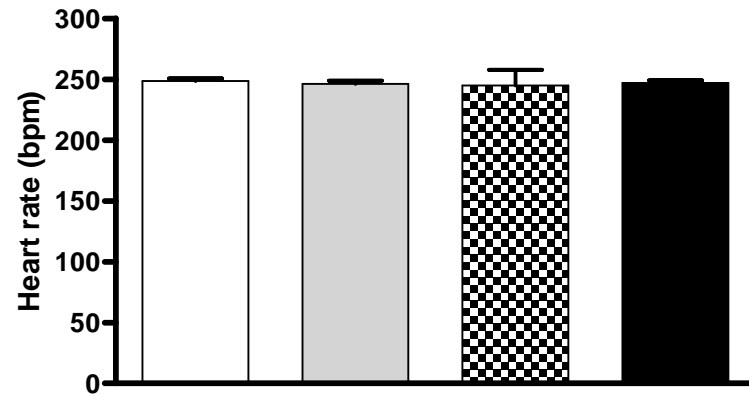


Figure 3

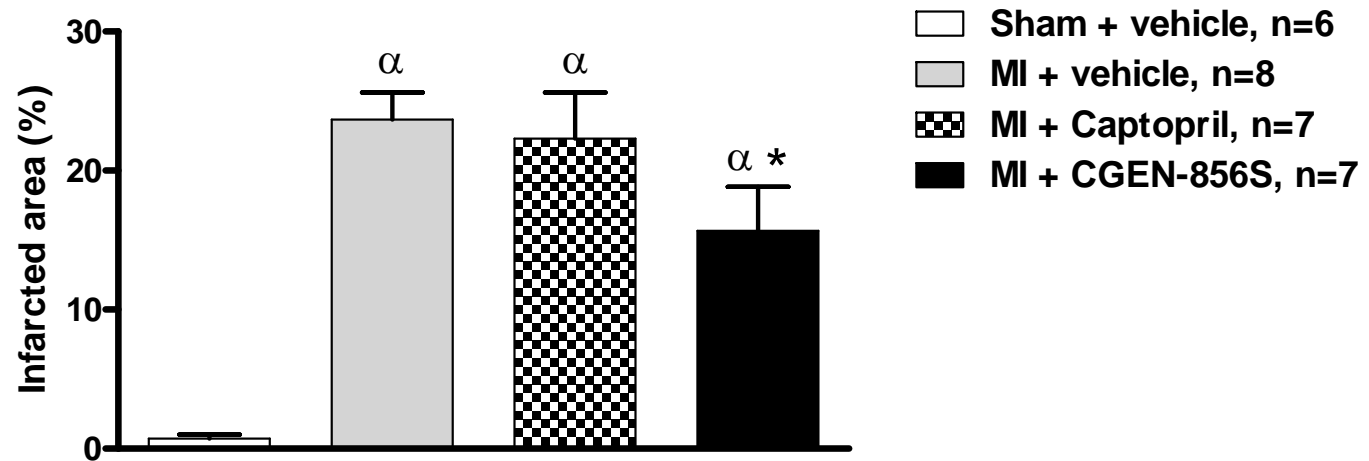


Figure 4

Anexo C

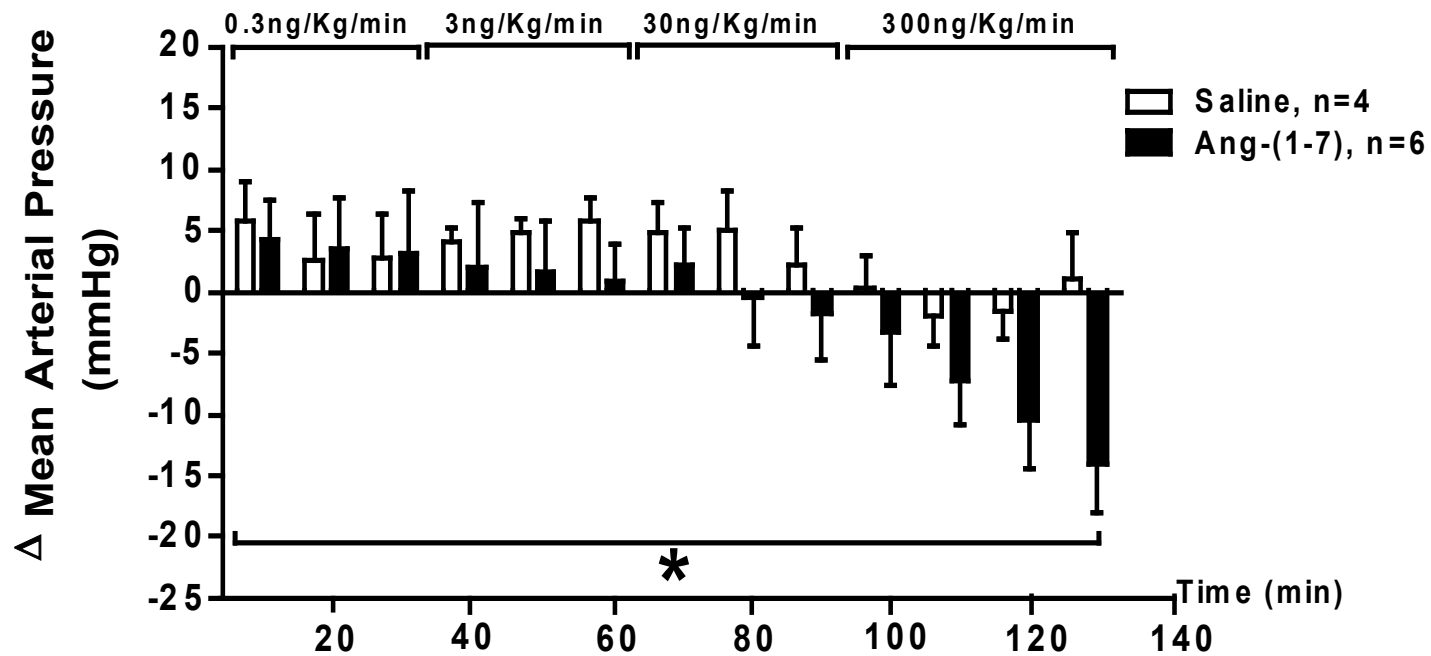


Figura - Variação da pressão arterial média de ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) conscientes durante a infusão de doses crescentes de Angiotensina-(1-7) ou salina (0,3 a 300 ng/Kg/min). As barras representam valores obtidos a cada 10 min de infusão. * $P < 0,05$ CGEN-856S vs Salina (Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).