

# AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO ANG-(1-7) / MAS NO CONTROLE DA RESISTÊNCIA VASCULAR SISTÊMICA E REGIONAL DE ANIMAIS ANESTESIADOS

**GIANCARLA APARECIDA BOTELHO SANTOS** 

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

## **GIANCARLA APARECIDA BOTELHO SANTOS**

# AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO ANG-(1-7) / MAS NO CONTROLE DA RESISTÊNCIA VASCULAR SISTÊMICA E REGIONAL DE ANIMAIS ANESTESIADOS

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pósgraduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

BELO HORIZONTE MINAS GERAIS – BRASIL 2008

# DEDICATÓRIA

Ao meu amigo e amado marido, companheiro de vindas e idas incansáveis. Obrigada por ter acreditado em meus sonhos e objetivos de vida. Sem sua ajuda, paciência, apoio e amor incondicional, não teria conseguido.

Amo-te muito.

À minha filhinha, que me ajudou a enxergar a vida de uma maneira diferente, a acreditar mais em meus sonhos e a ver que tudo nesta vida vale a pena. Que me abençoou com sua presença e que tornou meus dias mais alegres.

Amo-te muito também.

Vocês dois são partes importantes dessa vitória. Que Deus os abençoem.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e por ter estado ao meu lado sempre, e principalmente, nos momentos em que sentia não ter mais forças.

Agradeço a meu Mentor Espiritual por ser essa alma tão bondosa e paciente. Obrigada por não ter desistido de mim.

Agradeço a meu orientador e amigo Robson por ter acreditado em minha capacidade e vontade de ser cada dia melhor. Por ter aberto tantas portas apenas com seu nome. Por ter me ajudado a crescer e não apresentar obstáculos a esse crescimento. Muito obrigada, sua participação foi e sempre será fundamental.

Agradeço a minha mãe pelo apoio. Pelas horas que deixou seus afazeres e seu lar para possibilitar seguir em meus sonhos e objetivos. Sem sua ajuda, também, não teria conseguido.

Agradeço pela oportunidade de ter conhecido pessoas especiais e ter tido a oportunidade de compartilhar momentos tão agradáveis: Maria da Glória, Andréia Haibara, Marco Antônio, Marilene, Cândido, Edson, Priscila, Alvair, Quênia, Kyan, Renata Dutra e etc.

Agradeço à Maria José pela paciência e por toda a ajuda que deu desde o primeiro momento em que coloquei os pés no laboratório. Obrigada, me ajudou muito!

Agradeço ao Zezé por ter sido o responsável pelas primeiras aprendizagens e por sempre estar disposto em todos os momentos necessários.

Agradeço à Celinha, que mesmo abarrotada de tarefas, me ajudou no que precisei.

Enfim, agradeço a todas àquelas pessoas que fizeram parte desta história.

### LISTA DE ABREVIAÇÕES

Ang I = Angiotensina I

Ang II = Angiotensina II

Ang III = Angiotensina-(2-8)

Ang IV = Angiotensina-(3-8)

Ang-(1-5) = Angiotensina-(1-5)

Ang-(1-7) = Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) = Angiotensina-(1-9)

AT1 = receptor tipo 1 da angiotensina II

AT2 = receptor tipo 2 da angiotensina II

 $A-779 = [d-Ala^7]-Ang-(1-7)$ 

 $D-Pro = D-Pro^7-Ang-(1-7)$ 

ECA = enzima conversora de angiotensina

ECA2 = enzima conversora de angiotensina 2

FC = freqüência cardíaca

fc = fator de correção

GMPc = guanosina 3<sup>'</sup>5'monofosfato cíclico

KOH = hidróxido de potássio

KO-Mas = camundongo Knockout para o receptor Mas da Ang-(1-7)

L-NAME =  $N^{G}$ -nitro-L-arginina metil éster

MF = microesferas fluorescentes

NEP = endopeptidase neutra 24,11

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

PAM = pressão arterial média

PEP = prolyl-endopeptidase

SD = rato Sprague-Dawley Hannover

SRA = Sistema Renina Angiotensina

TG = rato Transgênico [TGR(A1-7)3292]

VE = ventrículo esquerdo

WT = camundongo controle *Wild-type* 

# LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Cores de microesferas fluorescentes atualmente disponíveis e seus respectivos espectros de emissão/excitação (Glenny e cols., 2003)	19
Tabela 2.	Resumo dos principais parâmetros adotados como referência dos trabalhos publicados por Sarin e cols. (1990), Barbee e cols. (1992) e Richer e cols. (2000), para padronização da técnica de microesferas fluorescentes (MF) em camundongo	20
Tabela 3.	Protocolo de utilização de microesferas fluorescentes para mensuração dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais em ratos tratados agudamente com Ang-(1-7) ou A-779 ou cronicamente com A-779	32
Tabela 4.	Protocolo de utilização de microesferas fluorescentes para mensuração dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais em camundongos no estado basal	34
Tabela 5.	Protocolo de recuperação das microesferas fluorescentes em ratos	36
Tabela 6.	Protocolo de recuperação das microesferas fluorescentes em camundongos	37
Tabela 7.	Tabela representativa das diluições sucessivas da solução mãe para obtenção dos pontos das curvas padrão em ratos e em camundongos	39
Tabela 8.	Média dos pesos dos órgãos de ratos SD e TG e de camundongos WT e KO- <i>Mas</i>	46

Tabela 9.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD e TG, anestesiados, no estado basal	50
Tabela 10.	Resistência vascular regional de ratos SD e TG anestesiados no estado basal e diminuição em percentagem da resistência vascular dos órgãos de ratos TG comparados aos ratos controle	53
Tabela 11.	Fluxos sanguíneos regionais de ratos SD e TG anestesiados no estado basal e aumento em percentagem dos fluxos sangüíneos dos órgãos de ratos TG comparados aos ratos controle	54
Tabela 12.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de Ang- (1-7) na dose de 0,11 pmol/min/min	57
Tabela 13.	Resistência vascular regional de ratos SD anestesiados no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min e diminuição em percentagem após o tratamento com Ang-(1-7)	61
Tabela 14.	Fluxos sanguíneos regionais de ratos SD anestesiados no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 110 fmol/min/10 min e suas respectivas percentagem de aumento	62
Tabela 15.	Sumário dos resultados obtidos com o aumento agudo e crônico de Ang-(1-7) em ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292, respectivamente	63
Tabela 16.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica	

	total de camundongos WT e KO-Mas no estado basal, e com idade	
	entre 12 e 16 semanas	66
Tabela 17.	Resistência vascular regional de camundongos WT e KO-Mas de	
	idade entre 12 e 16 semanas, no estado basal, e respectivas	
	diferenças em percentagem	69
Tabela 18.	Fluxo sanguíneo regional de camundongos WT e KO-Mas de	
	idade entre 12 e 16 semanas, no estado basal, e respectivas	
	diferenças em percentagem	70
Tabela 19.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito	
	cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica	
	total de camundongos WT e KO-Mas no estado basal, e com idade	
	entre 36 e 44 semanas	74
Tabela 20.	Resistência vascular regional de camundongos WT e KO-Mas, no	
	estado basal, com idade entre 36 e 44 semanas, e respectivas	
	diferenças em percentagem	77
Tabela 21.	Fluxo sanguíneo regional de camundongos WT e KO-Mas, no	
	estado basal, com idade entre 36 e 44 semanas, e respectivas	
	diferenças em percentagem	78
Tabela 22.	Sumário dos efeitos da deleção genética do receptor Mas na	
	regulação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais	
	em camundongos jovens e mais velhos, comparados aos animais	
	controle de mesma idade	79
Tabela 23.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito	
	cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica	
	total de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de A-779	

	na dose de 11 pmol/min/10min	82
Tabela 24.	Resistência vascular regional de ratos SD no estado basal e após a	
	infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min	85
Tabela 25.	Fluxo sanguíneo regional de ratos SD, anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min	86
Tabela 26.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min	89
Tabela 27.	Resistência vascular regional de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min	95
Tabela 28.	Fluxo sanguíneo regional de ratos TG, anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min	96
Tabela 29.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD tratados cronicamente com veículo ou com A-779 na dose de 0,5 µg/100g/hora	99
Tabela 30.	Resistência vascular regional de ratos SD tratados cronicamente com veículo (salina fisiológica estéril) ou com A-779 na dose de 0,5 µg/100g/hora	103
Tabela 31.	Fluxo sanguíneo regional de ratos Sprague-Dawley anestesiados tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo ou A-779 na dose de 0,5µg/100g/hora	104

Tabela 32.	Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito	
	cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica	
	total de ratos TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo	
	ou com A-779 na dose de 0,5 µg/100g/hora	107
Tabela 33.	Resistência vascular regional de ratos TG tratados cronicamente	
	com veículo (salina fisiológica estéril) ou com A-779 na dose de	
	0,5 μg/100g/hora	112
Tabela 34.	Fluxo sanguíneo regional de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados	
	tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo	
	ou A-779 na taxa de 0,5µg/100g/hora e percentagem de diminuição	
	em relação ao controle	113
Tabela 35.	Sumário dos efeitos do bloqueio agudo e crônico com A-779 sobre	
	os parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD e	
	TG	114

# LISTA DE FIGURAS

		1 a
Figura 1:	Ilustração simplificada das vias proteolíticas para a formação de peptídeos de angiotensina biologicamente ativos. PEP, prolilendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra 24.11 (Neprisilina); PCP, prolilcarboxiendopeptidase; ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2. Adaptado de Varagic e cols., 2008	04
Figura 2:	Representação esquemática dos componentes estruturais do <i>construct</i> utilizado para a geração dos ratos [TGR(A1-7)3292] e da proteína de fusão codificada pelo transgene. A ANG-(1-7) é liberada pela ação da enzima constitutiva furina após a secreção da proteína de fusão. <i>Fonte</i> : Ferreira, 2004	13
Figura 3:	Figura demonstrativa das canulações da (1) artéria braquial esquerda, (2) artéria femoral, (3) veia femoral, (4) ventrículo esquerdo e (5) traqueostomia. Estão representados, também, os registros da pressão arterial pulsátil, pressão ventricular esquerda, pressão arterial média e freqüência cardíaca, coleta de sangue pela bomba peristáltica através da cânula inserida previamente na artéria femoral e infusão de angiotensina-(1-7) ou de A-779 por bomba de infusão através da cânula previamente inserida na veia femoral	27
Figura 4:	Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. test- <i>t</i> Student	47
Figura 5.	Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. test- <i>t</i> Student	48
Figura 6.	Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	48

Página

Figura 7.	Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * P < 0,05, test- $t$ Student	49
Figura 8.	Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	49
Figura 9.	Resistência vascular regional dos rins, adrenais, ventrículo esquerdo (VE) e cérebro de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * $P < 0.05$ , test- <i>t</i> Student	51
Figura 10.	Resistência vascular regional dos pulmões, mesentério, músculo gastrocnêmio e baço de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	51
Figura 11.	Resistência vascular regional da pele abdominal, testículos, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	52
Figura 12:	Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 110 fmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	55
Figura 13:	Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 110 fmol/min/10 min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	55
Figura 14:	Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 110 fmol/min/10 min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	56

Figura 15.	Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no	
	estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 110	
	fmol/min/10 min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	56
Figura 16.	Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5)	
	anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na	
	dose de 110 fmol/min/10 min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	57
Figura 17.	Resistência vascular regional dos rins, adrenais e coração de ratos	
	Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal	
	e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min.	
	* P < 0,05, test- <i>t</i> Student	58
Figura 18.	Resistência vascular regional dos pulmões, cérebro e baço de ratos	
	Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal	
	e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min.	
	* P < 0,05, test- <i>t</i> Student	59
Figura 19.	Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo	
	branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados	
	com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na	
	dose de 0,11 pmol/min/10 min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	59
Figura 20.	Resistência vascular regional do mesentério, músculo gastrocnêmio,	
	tecido adiposo marrom interescapular e testículos de ratos Sprague-	
	Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a	
	infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. * P <	
	0,05, test- <i>t</i> Student	60
Figura 21.	Pressão arterial média de camundongos controle (WT; n=11) e de	
	camundongos knouckout para o receptor Mas da Ang-(1-7) (KO-Mas;	
	n=10) da linhagem C57B1/6, anestesiados com uretana, com idade	
	entre 12 e 16 semanas. test- <i>t</i> Student	64
Figura 22.	Débito cardíaco de camundongos controle (WT; n=11) e de	

Figura 28. Resistência vascular dos testículos, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos knouckout para o receptor Mas da Ang-(1-7) (KO-Mas; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados

	com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. * P < 0,05, test- $t$ Student	68
Figura 29.	Resistência vascular da pele abdominal e músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor <i>Mas</i> da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. test- <i>t</i> Student	69
Figura 30.	Pressão arterial média de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor Mas da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. test- <i>t</i> Student	71
Figura 31.	Débito cardíaco de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor <i>Mas</i> da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	72
Figura 32.	Índice cardíaco de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor <i>Mas</i> da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	72
Figura 33.	Volume sistólico de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor <i>Mas</i> da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	73
Figura 34.	Resistência periférica total de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos <i>knouckout</i> para o receptor <i>Mas</i> da Ang-(1-7) (KO- <i>Mas</i> ; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. * $P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	73
Figura 35.	Resistência vascular dos rins, adrenais e coração de camundongos	

controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.....

Figura 36. Resistência vascular do cérebro, baço e pulmões de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.....

75

Figura 42.	Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados	
	com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose	
	de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	81
Figura 43.	Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	82
Figura 44.	Resistência vascular dos rins, cérebro e baço de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	83
Figura 45.	Resistência vascular dos pulmões e mesentério de ratos Sprague- Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	83
Figura 46.	Resistência vascular dos testículos, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo marrom interescapular de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	84
Figura 47.	Resistência vascular da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	84
Figura 48.	Resistência vascular das adrenais e coração de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test- <i>t</i> Student	85
Figura 49.	Pressão arterial média de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose	

	de 11pmol/min/10min. test-t Student	87
Figura 50.	Débito cardíaco de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	87
Figura 51.	Índice cardíaco de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	88
Figura 52.	Volume sistólico de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	88
Figura 53.	Resistência periférica total de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	89
Figura 54.	Comparação do índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley no estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang-(1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A- 779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. * P < 0,05, ANOVA seguido de test- <i>t</i> Student	89
Figura 55.	Comparação do volume sistólico de ratos Sprague-Dawley no estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang-(1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-	

na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. \* P < 0,05, ANOVA seguido de test-*t* Student.....

Figura 56. Comparação da resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley no

	estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang- (1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. * P < 0,05, ANOVA seguido de test- <i>t</i> Student	92
Figura 57.	Resistência vascular regionaL dos rins, cérebro e baço de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	93
Figura 58.	Resistência vascular regional do coração e adrenais de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	93
Figura 59.	Resistência vascular regional da pele e tecido adiposo branco epididimal de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	94
Figura 60.	Resistência vascular regional dos testículos, mesentério e músculo gastrocnêmio de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	94
Figura 61.	Resistência vascular regional do tecido adiposo marrom interescapular e pulmões de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test- <i>t</i> Student	95
Figura 62.	Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A- 779 (n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- <i>t</i> Student	97

Figura 63.	Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7			
	dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779			
	(n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- $t$ Student	97		
Figura 64.	Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7			
	dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779			
	(n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- $t$ Student	98		
Figura 65.	Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7			
	dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779			
	(n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- $t$ Student	98		
Figura 66.	Resistência Periférica Total de ratos Sprague-Dawley anestesiados,			
	tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo			
	(n=6) ou A-779 (n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- $t$ Student	99		
Figura 67.	Resistência vascular regional dos rins, cérebro, tecido adiposo marrom			
	interescapular e pulmões de ratos Sprague-Dawley anestesiados,			
	tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo salina (n=6)			
	ou A-779 (n=7) na dose de $0.5\mu g/100g/hora.$ test- <i>t</i>			
	Student	100		
Figura 68.	Resistência vascular regional do mesentério e baço de ratos Sprague-			
	Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas			
	contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora.			
	test- <i>t</i> Student	101		
Figura 69.	Resistência vascular regional dos testículos e músculo gastrocnêmio de			
	ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-			
	bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de			
	0,5µg/100g/hora. test- <i>t</i> Student	101		
Figura 70.	Resistência vascular regional das adrenais e coração de ratos Sprague-			
	Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas			
	contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora.			

	test-t Student	102
Figura 71.	Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de 0,5µg/100g/hora. test-t Student	102
Figura 72.	Pressão arterial média de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados tratados	
	por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0.5\mu g/100g/hora$ . test- <i>t</i> Student	105
Figura 73.	Débito cardíaco de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0.5\mu g/100g/hora$ . * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	105
Figura 74.	Índice cardíaco de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0.5\mu g/100g/hora$ . * P < 0.05, test- <i>t</i> Student	106
Figura 75.	Volume sistólico de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0,5\mu g/100 g/hora$ . * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	106
Figura 76.	Resistência periférica total de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0.5\mu g/100g/hora$ . * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	107
Figura 77.	Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de $0,5\mu g/100g/hora * P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	108

Figura 78.	Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de $0,5\mu g/100g/hora * P < 0,05$ , test- <i>t</i> Student	109
Figura 79.	Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1- 7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de 0,5µg/100g/hora * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	109
Figura 80.	Resistência vascular regional dos rins, coração, pulmões e adrenais de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com minibombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0,5\mu$ g/100g/hora. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	110
Figura 81.	Resistência vascular regional do baço e cérebro de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de $0.5\mu g/100g/hora$ . * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	111
Figura 82.	Resistência vascular regional dos testículos, tecido adiposo marrom interescapular, mesentério e músculo gastrocnêmio de ratos TGR(A1- 7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de 0,5 $\mu$ g/100g/hora. * P < 0,05, test- <i>t</i> Student	111
Figura 83.	Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de 0,5µg/100g/hora. test- <i>t</i> Student	112

# SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Animal [TGR(A1-7)3292]	11
1.2.Camundongo knockout Mas	15
1.3.Fundamentação da Técnica de Microesferas Fluorescentes	16
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. MATERIAL	23
3.1.1. Animais	23
3.1.2. Equipamentos utilizados	24
3.1.3. Drogas, reagentes e soluções	25
3.2. MÉTODOS	26
3.2.1. Procedimentos Experimentais	26
3.2.1.1. Procedimentos cirúrgicos em ratos	26
3.2.1.2. Procedimentos cirúrgicos em camundongos	28
3.2.1.3. Injeção das Microesferas Fluorescentes em ratos	30
3.2.1.4. Injeção das Microesferas Fluorescentes em camundongos	33
3.2.1.5. Recuperação das Microesferas Fluorescentes em Ratos	34
3.2.1.6. Recuperação das Microesferas Fluorescentes em Camundongos	36

3.2.1.7. Curvas Padrão	38
3.2.1.8. Parâmetros calculados	41
3.2.1.9. Seleção das doses de Ang-(1-7) e A-779	43
3.3. Grupos Experimentais	44
3.4. Análise Estatística	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Peso dos órgãos	46
4.2. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley e ratos Transgênicos	
TGR(A1-7)3292 anestesiados no estado basal	47
4.3. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados no estado	
basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min	54
4.4. Avaliação Hemodinâmica de Camundongos knockout para o Receptor Mas	
da Ang-(1-7) (KO-Mas) e seu Controle Wild-Type (WT) da linhagem C57Bl/6	63
4.4.1. Camundongos WT e KO-Mas Jovens	63
4.4.2. Camundongos WT e KO-Mas Idosos	71
4.5. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados no estado	
basal e após a infusão de [d-Ala7]-Ang-(1-7) (A779) na dose de 11	
pmol/min/10min	79
4.6. Avaliação hemodinâmica de ratos Transgênicos TGR(A1-7)3292	
anestesiados no estado basal e após a infusão de [d-Ala <sup>7</sup> ]-Ang-(1-7) (A779) na	
dose de 11 pmol/min/10min	86
4.7. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados tratados	
cronicamente com mini-bombas osmóticas contendo salina ou A-779 na taxa de	
0,5µg/100g/hora	96

4.8.	Avaliação	hemodinâmica	de	ratos	Transgênicos	TGR(A1-7)3292	
anestesiados tratados cronicamente com mini-bombas osmóticas contendo salina							
ou A	-779 na taxa	de 0,5µg/100g/ho	ora				104
5. DI	5. DISCUSSÃO				115		
6. CO	6. CONCLUSÕES				127		
7. RI	7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS				128		
8. Al	NEXO						144

#### **RESUMO**

O eixo Angiotensina-(1-7)/Mas é considerado um importante modulador das funções cardiovasculares. Neste estudo, foram realizadas medidas hemodinâmicas em ratos [TGR(A1-7)3292] (TG) e em camundongos knockout para o receptor Mas (KO-Mas). O fluxo sanguíneo regional e o débito cardíaco foram medidos utilizando microesferas fluorescentes. A pressão sanguínea foi similar entre os ratos TG e os ratos controle Sprague-Dawley (SD). Achado similar foi obtido para camundongos. Entretanto, diferenças pronunciadas foram observadas em outras medidas hemodinâmicas. Ratos TG apresentaram volume sistólico  $(0.29 \pm 0.01 \text{ vs } 0.25 \pm 0.01 \text{ ml})$  e índice cardíaco  $(24,59 \pm 0.91 \text{ vs } 21.98 \pm 0.65 \text{ ml/min/100g})$  significativamente maiores e resistência periférica total  $(3.95 \pm 0.13 \text{ vs } 4.55 \pm 0.13 \text{ mmHg.ml}^{-1}$ .min.100g) e resistências vasculares dos rins, adrenais, cérebro, pulmões, baço, testículos e tecido adiposo marrom significativamente menores do que os ratos SD. Além disso, a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos SD, causou aumento pronunciado do volume sistólico e índice cardíaco e diminuição da resistência periférica total e resistências vasculares dos rins, ventrículo esquerdo, pulmões, cérebro, baço, pele, mesentério, tecido adiposo marrom e testículo. O tratamento agudo com A-779, não alterou as medidas hemodinâmicas em ratos SD, entretanto, em ratos TG, promoveu diminuição acentuada do volume sistólico e índice cardíaco. Por sua vez, tratamento crônico de ratos TG com A-779 durante sete dias, diminuiu o volume sistólico e o índice cardíaco e aumentou a resistência periférica total e regional. Camundongos KO-Mas quando comparados aos camundongos controle WT de mesma idade, apresentaram volume sistólico e índice cardíaco significativamente menores e resistência periférica total e resistências vasculares para os rins, adrenais, pulmões, mesentério, baço, testículos e tecido adiposo marrom significativamente maiores. É interessante ressaltar, que os testículos de camundongos KO-Mas jovens apresentaram resistência vascular menor, quando comparados aos testículos de camundongos WT de mesma idade. Estes resultados sugerem que a idade pode influenciar na distribuição e expressão dos receptores Mas ao longo da árvore vascular. Sumarizando, os resultados deste estudo, mostram que o eixo Ang-(1-7)/Mas está envolvido de forma importante na regulação hemodinâmica sistêmica e regional de ratos e camundongos.

#### ABSTRACT

The Angiotensin-(1-7)/Mas axis has been suggested as an important modulator of cardiovascular functions. In this study we performed hemodynamic measurements in [TGR(A1-7)3292] (TG) rats and Knockout Mas receptor mice (KO-Mas). Regional blood flow and cardiac output were measured using fluorescent microspheres. Blood pressure was similar in TG and control Sprague-Dawley rats. A similar finding was However, pronounced differences were observed in other obtained for mice. hemodynamic measurements. TG rats presented a significantly increase in stroke volume  $(0.29 \pm 0.01 \text{ vs } 0.25 \pm 0.01 \text{ ml})$  in SD, increased cardiac index  $(24.59 \pm 0.91 \text{ vs})$  $21.98 \pm 0.65$  ml/min/100g) and decreased total peripheral resistance (3.95 \pm 0.13 vs  $4.55 \pm 0.13$  mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.100g). In adition, TG rats presented a pronounced decrease in the vascular resistance in kidney, adrenal, brain, lung, spleen, testis and brown fat tissue. Interestingly, acute infusion of Ang-(1-7) in SD rats, caused pronounced increase in stroke volume and cardiac index and decreased total peripheral resistance and vascular resistance in many territories. Acute treatment with A-779, did not alter the hemodynamics measurements in SD rats, however, in TG rats, significant decrease in stroke volume and cardiac index was observed. On the other hand, chronic treatment with A-779 during seven days decreased the stroke volume and cardiac index and increased total peripheral resistance and regional. KO-Mas mice when compared to agematched Wild-type (WT) control mice, presented pronounced decrease in stroke volume and cardiac index and pronounced increase in total peripheral resistance and vascular resistance in many territories. Interestingly, we observed that the testis of young KO-Mas mice presented smaller vascular resistance in comparison to WT control mice. These results suggest age-related differential distribution and expression of Mas receptors along the vascular tree. In summary, our results showed that Ang-(1-7)/Mas axis is involved importantly in the systemic and regional hemodynamic regulation of rats and mice.

### 1. INTRODUÇÃO

O estudo do papel do Sistema Renina Angiotensina (SRA), no controle fisiopatológico da pressão arterial iniciou-se em 1898, quando Tigerstedt, ao injetar por via endovenosa extrato de rim, ao qual denominou renina, em coelhos, observou a participação dessa substância na manutenção do tônus da musculatura lisa vascular (Bader, 2001). Posteriormente, Harry Goldblatt *et al.* (1934), ao criarem um modelo experimental de hipertensão arterial em cães, redescobriram a renina, demonstrando a importante participação dessa substância na indução de hipertensão arterial após o clampeamento da artéria renal. Seis anos após, Page-Helmer observou que a renina, por si só, não exercia efeito vasoconstritor direto, mas se tratava de uma enzima capaz de formar outra substância, à qual denominaram angiotonina. Simultaneamente, o grupo de Braun-Menendez, em Buenos Aires, isolou da veia renal substância idêntica, denominando-a de hipertensina. Anos depois, Page e Braun-Menendez chamaram essa substância de angiotensina (Raizada *et al.*, 1993).

Quase duas décadas se passaram antes que a angiotensina fosse purificada e sua estrutura, elucidada. Em 1956, durante o estágio de purificação, Skeggs e seu grupo de investigadores descobriram a enzima conversora de angiotensina (ECA) e, em seguida, dois peptídeos, a Angiotensina I (Ang I) e a Angiotensina II (Ang II) (Page *et al.*, 1974).

A partir daí e de avanços no campo da Biologia Molecular e Celular, o SRA se tornou um dos principais alvos dos estudos relacionados às funções fisiológicas. Foi demonstrado que tal sistema influencia a regulação da pressão sanguínea, o controle do balanço hidroeletrolítico e a hemodinâmica regional de órgãos, como coração, vasos sanguíneos e rins (Timmermans *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008).

Na visão clássica, o SRA era considerado um sistema hormonal. Pensava-se que seu principal efetor, a Ang II, era gerada exclusivamente no sangue e em seguida distribuída a todos os órgãos e tecidos pelo fluxo sanguíneo, exercendo, então, suas ações nos órgãos que possuíssem seus receptores específicos tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2). Recentemente, esse conceito do SRA clássico foi revisado. A grande maioria de seus componentes pode ser produzido localmente, como em coração, vasos sanguíneos, adrenais, sistema nervoso central, rins e entre outros, exercendo ações complementares àquelas do SRA clássico (Phillips *et al.*, 1979; Taugner *et al.*, 1982; Dzau, 1988; Cassis *et al.*, 1988; Chiu *et al.*, 1989; Schunkert *et al.*, 1990). Acredita-se que a importância do SRA local esteja relacionada a possível efeito direto sobre a regulação de mecanismos locais (Kramkowski *et al.*, 2006).

Vários estudos demonstraram que o efeito final da ativação do SRA é bastante complexo e baseia-se não apenas nos efeitos da Ang II, mas também nas ações de outros produtos biologicamente ativos provenientes do metabolismo da Ang I e da própria Ang II (Griedling *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000). A angiotensina-(2-8) (Ang III), a Angiotensina-(3-8) (Ang IV) e a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] são os outros peptídeos considerados biologicamente ativos desse sistema. A Ang III exerce suas ações em receptores AT1 e AT2 da Ang II, e a Ang IV e a Ang-(1-7) exercem suas ações em seus próprios receptores (Wright *et al.*, 1992; Peach *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2003; Campbell, 2003). Destes novos peptídeos, a Ang-(1-7) têm sido alvo de muitos estudos, por demonstrar importante participação na regulação das funções fisiológicas

(Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que a Ang II, agindo em seu receptor específico AT1, promove elevação da pressão arterial, vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, facilitação da liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas simpáticas e retenção renal de sódio e água (Hall *et al.*, 1999; Volpe *et al.*, 2002). Agindo em seu receptor específico AT2, desencadeia resposta vasodilatadora dependente da formação de cininas, óxido nítrico (NO) e guanosina 3<sup>'</sup>5'monofosfato cíclico (GMPc) (Tsutsumi *et al.*, 1999) e inibe a apoptose (Yamada *et al.*, 1996), bem como a proliferação celular induzida pela estimulação dos receptores AT1 (You *et al.*, 2005). A Ang-(1-7), por sua vez, exerce ações contrárias a Ang II, participando da regulação da pressão arterial (Benter *et al.*, 1995; Ferrario *et al.*, 2005), da função cardíaca (Ferreira *et al.*, 2002; Loot *et al.*, 2002) e do crescimento celular (Tallant *et al.*, 2005).

A Ang-(1-7) pode ser formada diretamente a partir da Ang I por ação da endopeptidase neutra 24,11 (NEP) e da prolil-endopeptidase (PEP) (Welches *et al.*, 1993; Neves *et al.*, 1995; Ferrario *et al.*, 1997). Indiretamente, pode ser formada da Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] pela ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que catalisa a clivagem da Ang I para Ang-(1-9) (Donoghue *et al.*, 2000) e que, por sua vez, é metabolizada à Ang-(1-7) pela ação da ECA ou da NEP (Rice *et al.*, 2004). Além disso, a Ang-(1-7) pode ser formada da Ang II a partir da ação de prolil-endopeptidase e prolil-carboxypeptidase (Trask *et al.*, 2007) ou pela ECA2 (Tipnis *et al.*, 2000; Donoghue *et al.*, 2000) (figura 1). Em adição, estudos demonstraram que a PEP participa da formação da Ang-(1-7) em culturas de células endoteliais vasculares e

musculares lisas e a NEP, da produção de Ang-(1-7) circulante por ser uma enzima ligada à membrana e localizada no lado luminal do endotélio (Iyer *et al.*, 1998). Mais estudos são necessários para avaliar a participação desta última via na síntese de Ang-(1-7), uma vez que foi demonstrado que a NEP promove a degradação de Ang-(1-7) à Ang IV (Favrat *et al.*, 1995; Turner, 2003).



**Figura 1**: Ilustração simplificada das vias proteolíticas para a formação de Ang II e Ang-(1-7) biologicamente ativos. PEP, prolilendopeptidase; NEP, endopeptidase neutra 24.11 (Neprisilina); PCP, prolilcarboxiendopeptidase; ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; AMP, aminopeptidase. Adaptado de Varagic *et al.*, 2008.

A ECA2 é uma enzima que apresenta 42% de homologia com a ECA. É considerada enzima central envolvida no balanço entre as ações vasoconstritoras e

proliferativas da Ang II, com os efeitos vasodilatadores e antiproliferativos da Ang-(1-7) (Donoghue *et al.*, 2000; Raizada & Ferreira, 2007). Está presente em muitos órgãos relevantes para o controle do sistema cardiovascular, como rins, coração e endotélio vascular (Oudit *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a deleção genética da ECA2, em camundongos, resultou em disfunção cardíaca grave e acúmulo de Ang II no coração, enquanto a superexpressão local de ECA2 foi seguida por atenuação do remodelamento cardíaco em ratos hipertensos (Crackower *et al.*, 2002; Huentelman *et al.*, 2005). Foi observado também, aumento dos níveis de Ang-(1-7) em corações infartados de ratos e de humanos (Averil *et al.*, 2005; Zisman *et al.*, 2003) e predominância da ECA2 para a produção de Ang-(1-7), em corações de animais hipertensos (Trask *et al.*, 2007), sugerindo resposta compensatória da ECA2 à área atingida pela isquemia.

Em adição, estudos demonstraram que os inibidores da ECA constituem uma classe de drogas anti-hipertensivas efetiva em inibir a formação de Ang II e tratar importantes patologias cardiovasculares, como a hipertensão arterial e a falência cardíaca (Trask *et al*, 2007; Ferreira *et al*, 2008). Foi observado que tratamento prolongado com inibidor de ECA resulta em aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) em torno de 5 a 50 vezes (Kucharewicz *et al.*, 2002; Brosnihan *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998; Simões e Silva *et al.*, 2006). Dessa forma, o fato de a ECA2 não ser bloqueada pelos inibidores da ECA e o uso desses inibidores, por tempo prolongado, resultar em aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7), tornam a ECA2 e os inibidores da ECA importantes alvos para o estudo farmacológico (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000; Ferreira *et al*, 2008).

Block *et al.* (1988) observaram imunorreatividade para a Ang-(1-7) em várias regiões cerebrais, como núcleos paraventricular e supraquiasmático, bulbo ventrolateral e neurohipófise. Um ano após, Chappell *et al.*, empregando técnicas de radiomunoensaio acoplada à cromatografia líquida de alta resolução, observaram a presença de Ang-(1-7) no cérebro, glândulas adrenais e plasma de ratos. Em seguida, este heptapeptídeo foi encontrado no coração e plasma de cães (Santos *et al.*, 1990), em plasma de ovelhas (Lawrence *et al.*, 1992) e de humanos (Lawrence *et al.*, 1990), em cultura de células endoteliais de aorta bovina (Kifoi & Dzau, 1987; Tallant *et al.*, 1997) e em células musculares lisas vasculares (Tallant *et al.*, 1997).

Santos *et al.* (2003), utilizando fatias de rim de camundongos *Wild-Type* (WT) e de camundongos *knockout* (KO-*Mas*) para o receptor *Mas* da Ang-(1-7), observaram que a ligação de Ang-(1-7) marcada com isótopo radioativo estava abolida nos camundongos KO-*Mas*, indicando que o *Mas* é um receptor específico para a Ang-(1-7). No mesmo trabalho, em células CHO transfectadas com o *Mas*, a Ang-(1-7) marcada se ligou com alta afinidade e de forma específica, que foi deslocada pela adição de Ang-(1-7) não marcada e de [d-Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7) (A-779), antagonista específico de Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003). Essa ligação não foi deslocada pela adição de CV 11974 (antagonista de receptor AT1) ou PD 123319 (antagonista de receptor AT2), excluindo a possibilidade de ligação da Ang-(1-7) aos receptores AT1 e AT2.

Em 2003, o mesmo grupo demonstrou que o [d-Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7) (A-779) era antagonista específico para o receptor de Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003). Esse antagonista deslocou a ligação da Ang-(1-7) do seu receptor *Mas*. Em seguida, descreveram o D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (D-Pro) como outro antagonista para o receptor da Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2003). Estes antagonistas bloqueiam vários dos efeitos da Ang-

(1-7), incluindo o efeito vasodilatador dependente do endotélio, pelo receptor *Mas*, em anéis de aorta de camundongos (Lemos *et al.*, 2005) e o efeito dilatador da Ang-(1-7) em alguns leitos vasculares (Sampaio *et al.*, 2003).

As ações fisiológicas da Ang-(1-7) começaram a ser demonstradas em 1988, quando Schiavone *et al.* observaram que este peptídeo era tão potente quanto a Ang II em liberar vasopressina do eixo neurohipofisário. Em seguida, Campagnole-Santos *et al.* (1989) observaram diminuição da pressão arterial após a microinjeção de baixas doses de Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário de ratos normotensos. A partir daí, numerosos estudos foram e vêm sendo desenvolvidos, demonstrando a importância fisiológica desse heptapeptídeo no controle do sistema cardiovascular (Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Ferreira *et a*l., 2008).

Sadoshima *et al.* (1993 e 1995) observaram que o aumento crônico de Ang II induziu efeitos deletérios no coração, resultando em hipertrofia cardíaca patológica por indução direta de hipertrofia do miócito cardíaco e reprogramação gênica e por proliferação de fibroblastos, com subseqüente formação de processo fibrótico, redução da performance cardíaca e aumento da suscetibilidade a infarto do miocárdio. A Ang-(1-7), por sua vez, reduz ou previne o remodelamento cardíaco e melhora a função cardíaca por diminuir a hipertrofia e a fibrose cardíacas, reduz a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e preserva o fluxo coronariano (Loot *et al.*, 2002; Grobe *et al.*, 2007). Além disso, Santos *et al.* (2004) e Santos *et al.* (2006) observaram efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) em ratos que superexpressam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) e piora da função cardíaca em camundongos com deleção genética do receptor *Mas*.
As artérias de resistência são vasos de aproximadamente 100 a 300 µm de diâmetro e importantes locais de resistência à passagem do fluxo sangüíneo. A diminuição do lúmen desses vasos, determinando aumento da resistência periférica, participa efetivamente do desenvolvimento e das complicações das patologias cardiovasculares. Além disso, é comum encontrar redução do lúmen arteriolar, bem como aumento da razão camada média-lúmen arteriolar, como resultado do rearranjo das células musculares lisas e aumento de colágeno e fibronectina (Touyz & Schiffrin, 2000). A característica primária da hipertensão essencial humana, por exemplo, é o aumento da resistência periférica total, e o aumento da reatividade vascular é um dos fatores que contribuem para a elevação do tônus vascular (Mulvany, 1990).

Vários estudos demonstraram que a Ang-(1-7), além de produzir respostas opostas àquelas produzidas pela Ang II (Sampaio *et al.*, 2003; Schindler *et al.*, 2007; Varagic *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008), exerce potente efeito dilatador em uma variedade de leitos vasculares, promovendo, então, redução do tônus vascular. Foi observado que a Ang-(1-7) exerce efeito vasodilatador em arteríolas aferentes de coelhos (Ren *et al.*, 2002), artérias coronárias de suínos (Porsti *et al.*, 1994) e cães (Brosnihan *et al.*, 1996), artérias mesentéricas de ratos (Neves *et al.*, 2003), aorta de ratos (le Tran & Foster, 1997; Lemos *et al.*, 2002) e de camundongos (Lemos *et al.*, 2005), leito mesentérico de felinos (Osei *et al.*, 1993), vasos neoformados de camundongos (Machado *et al.*, 2002) e vasos humanos (Roks *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2001). Adicionalmente, redução da resistência periférica total e dilatação de vários leitos vasculares foram observados em pesquisas *in vivo* após a infusão aguda de Ang-(1-7) (Sampaio *et al.*, 2003).

Em estudo realizado por Luque *et al.* (1996), pacientes com hipertensão essencial, tratados por seis meses com captopril (inibidor de ECA), apresentaram elevação dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7). Este aumento provavelmente ocorreu pela inibição da conversão da Ang-(1-7) à Ang-(1-5) e pelo aumento dos níveis de Ang I. Nestes pacientes os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) se correlacionaram de forma inversa com a pressão arterial diastólica, sugerindo relevância clínica deste peptídeo na regulação de parâmetros hemodinâmicos sistêmicos. Além disso, foi observado que crianças com hipertensão essencial apresentaram aumento seletivo dos níveis de Ang-(1-7) quando comparadas a crianças normotensas, ao contrário de crianças com hipertensão renovascular, que apresentaram elevação tanto dos níveis de Ang-(1-7) quanto dos níveis de Ang II (Simões e Silva *et al.*, 2004).

Roks *et al.* (1999), avaliando a influência da Ang-(1-7) sobre o leito vascular humano, observaram que este heptapeptídeo bloqueou as ações vasoconstritoras da Ang II. Esses autores sugeriram três vias: (1) antagonismo do receptor AT1 da Ang II, (2) liberação de NO ou outros fatores de relaxamento, como as prostaglandinas vasodilatadoras, ou (3) mecanismos intracelulares.

Foi observado que em altas doses a Ang-(1-7) produziu vasoconstrição, provavelmente por exercer fraca ação agonista em receptores AT1 (Kumagai *et al.*, 1990; Neves *et al.*, 1997). Resposta vasodilatadora, independentemente dos receptores AT1 e AT2, foi observada em artérias coronárias de suínos por Brosninhan *et al.* (1996). *Crosstalk* entre o receptor *Mas* e outros receptores, tais como o receptor B2 da bradicinina e o receptor AT2, foi sugerido por Gorelik *et al.* (1998), Almeida *et al.* (2000), Santos *et al.* (2001), Fernandes *et al.* (2005) e Santos *et al.* (2006). Silva *et al.* (2007) demonstraram que a Ang-(1-7) induziu efeito vasodilatador dependente da produção de NO endotelial em aorta de ratos Sprague-Dawley (SD). A remoção do endotélio ou a inibição da óxido nítrico sintase (NOS) pelo N<sup>G</sup>-nitro-Larginina metil éster (*L*-NAME) bloqueou completamente esse efeito. O mesmo grupo demonstrou que a inibição das ciclooxigenases com indometacina, não alterou o efeito vasodilatador da Ang-(1-7), corroborando estudos de Porsti *et al.* (1994) e Ren *et al.* (2002), que observaram resultados similares em artérias coronárias de suínos e em arteríolas aferentes de coelho, respectivamente.

Experimentos de Paula *et al.* (1995), demonstraram que a Ang-(1-7) potencializou o efeito vasodilatador da bradicinina administrada endovenosamente em ratos conscientes. Mais tarde, Almeida *et al.* (2000) observaram resultados similares em corações isolados de ratos. Essa atividade foi bloqueada pela indometacina, *L*-NAME e A-779, sugerindo a participação das prostaglandinas e NO no efeito potencializador da bradicinina e ação da Ang-(1-7) via receptor *Mas.* Resultados semelhantes foram observados em estudos de reatividade vascular realizados por Oliveira *et al.* (1999) em arteríolas mesentérica de ratos normotensos. Além disso, foi sugerido por Silva *et al.* (2007), a existência de outro receptor além do *Mas* em aorta de ratos SD. Esses autores observaram que o A-779, mesmo em altas concentrações, não alterou o efeito vasodilatador da Ang-(1-7).

Faria-Silva *et al.* (2005) demonstraram que a estimulação *in vivo*, em curto prazo, do receptor *Mas* pela Ang-(1-7), melhorou a função endotelial por promover facilitação da liberação de NO. O pré-tratamento com *L*-NAME ou A-779, bloqueou esse efeito completamente. Dois anos mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que a Ang-(1-7) estimulou a liberação de NO em células de ovário de hamster chinês (CHO)

transfectadas com o *Mas* de uma maneira dose-dependente e por tempo superior a 30 minutos, e que esse efeito também foi completamente bloqueado pelo A-779 e pelo *L*-NAME (Sampaio *et al.*, 2007). Além disso, esses resultados demonstram o acoplamento do receptor *Mas* a NOS endotelial.

Uma vez que já foi demonstrado o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em vasos isolados, corações isolados, em células musculares lisas vasculares e em experimentos *in vitro*, o nosso trabalho objetivou investigar a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) *in vivo*. Para isso, utilizou-se bloqueio ou estimulação do eixo Ang-(1-7)/*Mas* por via farmacológica ou transgênica.

## 1.1. Animal [TGR(A1-7)3292]

Methot *et al.* (1997), desenvolveram uma proteína de fusão a qual era capaz de liberar o peptídeo Ang II sem a necessidade dos componentes clássicos do SRA. A Ang II era liberada da proteína de fusão dentro da via secretória pela endoprotease constitutiva furina, passando a ser produzida constitutivamente. Assim, essa nova tecnologia possibilitava o direcionamento da produção de uma ampla variedade de peptídeos para tecidos e tipos de células específicos em animais transgênicos. Dessa forma, esses tecidos passavam a funcionar como bombas biológicas localizadas, as quais estariam oferecendo uma contínua produção de determinado peptídeo.

Recentemente foi produzido por Santos *et al.* (2004), em colaboração com o Prof. Michael Bader do MDC (Max – Delbrück - Center for Molecular Medicine) – Berlim, um *construct* baseado na tecnologia descrita por Methot *et al.* (1997). A expressão deste *constuct* foi direcionada pela inserção do promotor citomegalovírus (CMV), com o sítio de clivagem sendo mantido para a furina e os demais componentes mantidos como sugerido pelo próprio grupo de Methot.

O construct é injetado em zigotos e implantados em ratas pseudográvidas e é composto pelos seguintes componentes: (1) peptídeo sinal proveniente da prorenina humana, o qual assegura que a proteína entre no retículo endoplasmático para a futura secreção desta proteína para o meio extracelular; (2) porção da região constante da cadeia pesada da IgG2b de camundongo, que promove massa para a proteína de fusão; (3) porção do pró-segmento da prorenina humana, o qual funciona como um espaçador molecular, pois é necessário para expor o sítio de clivagem para a endoprotease furina o que resulta na liberação do peptídeo; (4) sítio de clivagem na porção carboxi terminal do pró-segmento da prorenina humana, sendo que neste sítio de clivagem a endoprotease furina atuará liberando a Ang-(1-7) nos tecidos; (5) o peptídeo que será liberado, no caso a Ang-(1-7), e finalmente (6) a seqüência Poly A. Na extremidade 5'do construct foi adicionado o promotor inespecífico CMV (cytomegalovirus promoter) para direcionar a expressão gênica em células de mamíferos de um modo geral (figura 2). Esta nova linhagem de ratos transgênicos foi denominada de L3292. A expressão do transgene nos ratos [TGR(A1-7)3292] (TG) foi aparentemente restrita aos testículos, visto não ter sido encontrado o RNAm do transgene nos outros órgãos analisados, como rins, glândulas adrenais, pulmões, átrio esquerdo, ventrículo esquerdo, cérebro e aorta (Santos et al., 2004).



**Figura 2**: Representação esquemática dos componentes estruturais do *construct* utilizado para a geração dos ratos [TGR(A1-7)3292] e da proteína de fusão codificada pelo transgene. A ANG-(1-7) é liberada pela ação da enzima constitutiva furina após a secreção da proteína de fusão. *Fonte*: Santos *et al*, 2004.

Nesses animais os testículos passaram a funcionar como tecido produtor de Ang-(1-7), o que aumenta sua concentração local e sistêmica. Santos *et al.*, (2004) e Ferreira *et al.* (2006), estudando vários aspectos desse animal TG e comparando com seu controle Sprague-Dawley (SD), concluíram que: (1) a concentração de Ang-(1-7) nos testículos foi de aproximadamente 4,5 vezes mais alta, enquanto no sangue venoso e no sangue arterial, o aumento foi de 2,5 vezes; (2) os níveis de Ang-(1-7) presentes nos ventrículos esquerdo e direito, átrios, rins, glândulas adrenais e pulmões foram semelhantes aos encontrados nos SD; (3) não foram encontradas diferenças arteriovenosas na concentração de Ang-(1-7) nesses ratos nem nos SD, sugerindo que o leito vascular pulmonar é importante fonte de Ang-(1-7); (4) as concentrações de Ang II nos átrios, ventrículo direito, glândulas adrenais, rins, pulmões, testículos e sangue venoso permaneceram inalteradas com o aumento dos níveis de Ang-(1-7), porém no ventrículo esquerdo ocorreu redução significativa dos níveis deste peptídeo; (5) não houve alterações nos níveis da ECA plasmática nem na atividade da renina plasmática; (6) a média dos valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) não foram diferentes entre as linhagens, porém a freqüência cardíaca (FC) dos animais TG foi significativamente maior que a dos animais controle; (7) os ratos TG apresentaram diminuição nas arritmias de reperfusão e melhor função cardíaca pós-isquemia global; (8) apresentaram aumento da dP/dt durante os períodos diurno e noturno nos registros hemodinâmicos por telemetria; (9) apresentaram uma atenuação na hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol; (10) apresentaram fluxo urinário de 24 horas menor que o do animal SD, sem no entanto, apresentar diferenças na ingestão de água; (11) apresentaram maior osmolalidade urinária e menor clearance de água livre e (12) taxa de filtração glomerular similar ao do rato SD, assim como, os níveis de vasopressina plasmáticos e a expressão de RNAm para os receptores V2 da vasopressina e o receptor Mas.

Entretanto, vários aspectos referentes a esses animais ainda são desconhecidos. Considerando os importantes efeitos descritos para a Ang-(1-7) no controle humoral da pressão arterial, seria importante investigar esses aspectos nos ratos [TGR(A1-7)3292].

#### 1.2. Camundongo knockout Mas

O proto-oncogene *Mas* foi primeiramente detectado em células tumorais (Young *et al.*, 1986) e acreditava-se tratar de um receptor envolvido nas ações da Ang II (Jackson *et al.*, 1988). Atualmente, sabe-se que ele codifica um receptor acoplado à proteína G com sete domínios transmembrana (Martin *et al.*, 1992), e Santos *et al.* (2003) detectaram o *Mas* como um receptor funcional para a Ang-(1-7).

Em mamíferos, o *Mas* é expresso predominantemente nos testículos e em algumas regiões do cérebro, como hipocampo e amígdala (Bunnermann *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1992) e, em menor proporção, nos rins e coração (Metzger *et al.*, 1995). Foi demonstrado, tanto em camundongos quanto em ratos, que o *Mas* não é detectável nos testículos de recém-nascidos. Sua expressão aumenta acentuadamente várias semanas após o nascimento, alcançando pico máximo na décima quinta semana de vida em ratos e, no sexto mês de vida, em camundongos (Metzger *et al.*, 1995; Alenina *et al.*, 2002).

Recentemente, foi desenvolvido um camundongo com deleção genética do proto-oncogene *Mas (knockout)* (KO-*Mas*) a partir do camundongo C57Bl/6 (Walther *et al.*, 1998), o que permitiu estudar o papel fisiológico deste receptor na homeostasia cardiovascular.

Estudos de Walther *et al.* (2000) não observaram diferenças de pressão arterial e freqüência cardíaca entre os camundongos KO-*Mas* e os animais controle. Santos *et al.* (2003) observaram que o efeito antidiurético da Ang-(1-7) em camundongos com sobrecarga hídrica foi abolido em camundongos KO-*Mas*, assim como o relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta. Em adição, o mesmo grupo demonstrou

43

piora da função cardíaca, aumento da pressão de perfusão em preparações de corações isolados, menor freqüência cardíaca intrínseca e alterações das proteínas da matrix extracelular (Santos *et al.*, 2006).

Xu *et al.* (2008) observaram que a deleção genética do *Mas* em camundongo com "*background*" genético puro (FVB/N) promoveu aumento da pressão arterial, piora da função endotelial, desequilíbrio entre a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio, menor excreção urinária de metabólitos de NO, menor nível plasmático de NO e menor expressão de NO sintase (NOS).

Dessa forma, seria interessante avaliar a participação do receptor *Mas* na modulação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de camundongos KO-*Mas* em experimentos *in vivo*.

## 1.3. Fundamentação da Técnica de Microesferas Fluorescentes

O primeiro estudo da circulação utilizando partículas foi o de Pohlman *et al.* (1909), que utilizaram injeções de grânulos gordurosos para determinar a distribuição do fluxo miocárdico em corações de fetos de porcos. Quarenta anos mais tarde, Prinzmetal *et al.*, utilizaram microesferas de vidro para detectar anastomoses vasculares em corações de humanos e em vários órgãos de coelhos. Em seguida, bombardeamento de nêutrons foi utilizado para produzir microesferas radioativas de vidro (Neutze *et al.*, 1968). No mesmo ano, Makowski *et al.*, iniciaram a técnica de retirada de amostra de sangue para quantificação do fluxo sangüíneo regional e um ano após, Domenech *et al.*, validaram o uso de microesferas radioativas para mensurar o fluxo sangüíneo miocárdico em animais de grande porte.

Duas décadas após, Sarin *et al.* (1990) e Barbee *et al.* (1992), validaram o uso da técnica de microesferas radioativas em camundongos, demonstrando que se tratava de método eficaz para determinar a hemodinâmica sistêmica e regional e estudar as alterações de fluxo sangüíneo desencadeadas por doenças e fármacos. Mais tarde, com o intuito de substituir a radioatividade por compostos não radioativos, Glenny *et al.* (1993) e Gervais *et al.* (1999), padronizaram a técnica de microesferas fluorescentes (MF) em ratos, demonstrando que se tratava de método tão eficaz quanto às microesferas radioativas para mensurar o débito cardíaco e a perfusão regional em animais de pequeno porte. Em 2000, Richer *et al.* padronizaram a técnica de MF em camundongos anestesiados.

A utilização das microesferas fluorescentes se baseia no mesmo princípio das microesferas radioativas. Quando microesferas de tamanho apropriado são usadas, elas ficam aprisionadas durante sua primeira passagem pelo órgão e o fluxo sanguíneo de cada órgão é diretamente proporcional ao número de esferas recuperadas de dentro do órgão. Porém, enquanto as microesferas radioativas são diretamente quantificadas por contagem gama, as microesferas fluorescentes necessitam primeiramente de serem separadas dos tecidos antes da avaliação da fluorescência.

A fluorescência ocorre quando a molécula absorve fótons de luz de um espectro de luz ultra-violeta visível (200-900 nm), sofrendo a transição para um estado eletrônico de alta energia e então emite esses fótons com o seu retorno ao estado inicial. Além disso, os compostos fluorescentes podem ser identificados e quantificados com base nas suas propriedades de excitação e emissão e as cores fluorescentes são facilmente separadas, uma vez que cada cor tem um único e estreito espectro de excitação. Quando excitadas em um comprimento de onda específico, pouco spillover ocorre da emissão de uma cor dentro do espectro de emissão da cor adjacente. E esta seletividade pode ser aumentada pelo estreitamento do slit width do monocrômetro de emissão até que somente a luz emitida dentro de um estreito espectro seja medida. A fluorescência é linearmente proporcional à concentração do corante em amostras diluídas, entretanto, se a concentração do corante é alta, quenching ocorre e a relação entre a fluorescência e a concentração torna-se curvilínea. O quenching ocorre porque a luz excitante é absorvida e não tem possibilidade de excitar a amostra inteira.

Atualmente, MF de poliestireno, de diâmetro em torno de 10 a 15  $\mu$ m mantidas em 10 ml de suspensão de 15 M de NaCl com 0,05% de Tween 80 e 0,02% de thimerosal e em cinco combinações distintas de espectros de excitação/emissão (Tabela 1), estão disponíveis para mensuração de fluxo regional, débito cardíaco e resistência periférica total e para detectar e quantificar as mudanças induzidas por drogas e doenças nos fluxos sanguíneos regional e sistêmico. Há cerca de 10<sup>6</sup> esferas em cada ml de solução e possibilitam uma mensuração adequada de fluxo por apresentarem densidade relativa de 1,05 g/ml, que é bem próxima daquela das células vermelhas do sangue.

Os fatores que podem afetar a uniformidade da concentração das MF são o local da injeção e o número de microesferas injetadas. Quando se realiza a mensuração da distribuição do fluxo sanguíneo sistêmico, as injeções devem ser realizadas dentro do átrio esquerdo ou ventrículo esquerdo do animal. Em adição, estudos preliminares mostraram que até quatro injeções de 360.000 microesferas em ratos (Stanek *et al.*, 1983) e duas injeções sucessivas de 80.000 MF em camundongos (Richer *et al.*, 2000), não causam repercussões hemodinâmicas.

Cor	Comprimento de onda de emissão (nm)	Comprimento de onda de excitação (nm)
Azul	360	425
Verde	445	492
Amarela	517	524
Laranja	534	552
Vermelha	566	598

*Tabela 1:* Cores de microesferas fluorescentes atualmente disponíveis e seus respectivos espectros de emissão/excitação (Glenny *et al.*, 2003).

Como a tecnologia transgênica tem sido usada amplamente para estudar os genes envolvidos na regulação da função cardíaca e na regulação da hemodinâmica sistêmica e regional, bem como em condições patológicas, a utilização da técnica de MF se mostra um método eficaz para a determinação de parâmetros cardiovasculares nesses animais modificados geneticamente. Por essas razões e objetivando estudar a participação da Ang-(1-7), bem como a deleção genética do receptor *Mas in vivo* sobre a hemodinâmica sistêmica e regional, empregamos a técnica de MF tanto em ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7), quanto em camundongos *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7).

A técnica de MF empregada em ratos foi padronizada no laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por Sampaio *et al.* (2003). A padronização da técnica de MF em camundongos foi um dos objetivos deste trabalho, tomando como referencial teórico os trabalhos de Sarin *et al.* (1990), Barbee *et al.* (1992), Richer *et al.* (2000) e Sampaio *et al.* (2003). A tabela 2 abaixo representa um resumo dos principais parâmetros adotados como referência dos três primeiros trabalhos citados anteriormente. *Tabela 2*: Resumo dos principais parâmetros adotados como referência dos trabalhos publicados por Sarin *et al.* (1990), Barbee *et al.* (1992) e Richer *et al.* (2000) para padronização da técnica de microesferas fluorescentes (MF) em camundongos.

	<b>SARIN (1990)</b>	<b>BARBEE</b> (1992)	<b>RICHER (2000)</b>
Microesferas utilizadas	Microesferas radioativas	Microesferas radioativas	Microesferas fluorescentes
Animais	Camundongos C3H (25-30g)	Camundongos C3H (25-30g)	Camundongod C57Bl/6 (22-27g)
Anestesia	Pentobarbital de sódio	Tribromoetil	Pentobarbital de sódio
Canulações	Artérias carótida direita e femoral	Artérias carótida direita e femoral	Artérias carótidas direita e esquerda
	esquerda	esquerda	
Cânula utilizada e seu	PE10 com PE50 - utilizou a	PE10 esticado (400 µm diâmetro	PE10 com PE50 - canulação direta
posicionamento para	alternativa de canulação da artéria	interno) - a cânula foi inserida 1 cm	do VE via artéria carótida direita.
injeção das MF no VE	carótida próxima ao arco aórtico.	dentro do VE.	
Quantidade de	25.000 a 30.000	-	80.000
microesferas injetadas			
Taxa de retirada da	0,4 – 0,6 ml/min	0,4-0,8 ml/min	0,25 ml/min
amostra de sangue			
Tempo de coleta de	35 segundos - infusão das MF do	17 segundos – infusão das	55 segundos - injeção das MF do
sangue	quinto ao décimo segundos de	microesferas do segundo ao décimo	quinto ao décimo segundos de coleta
	coleta de sangue.	segundos de coleta de sangue.	de sangue.
Tipo de leitura	Contagem gama	Contagem gama	Espectofotômetro de luminescência
			equipado com placa well

#### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação do eixo Ang-(1-7)/*Mas* na regulação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais utilizando agonismo ou bloqueio farmacológico e modelos transgênicos com aumento ou redução da atividade desse eixo.

#### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do aumento da produção endógena de Ang-(1-7) sobre o débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico, resistência periférica total e resistências vasculares regionais de ratos [TGR(A-1-7)3292] (TG) comparados aos ratos controle Sprague-Dawley (SD).
- Avaliar o efeito do aumento agudo de Ang-(1-7) sobre o débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico, resistência periférica total e resistências vasculares regionais de ratos SD.
- Avaliar o efeito do bloqueio agudo e crônico do receptor *Mas*, com A-779, sobre o débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico, resistência periférica total e resistências vasculares regionais de ratos TG e SD.
- Padronizar a mensuração do débito cardíaco e sua distribuição regional por meio da técnica de microesferas fluorescentes em camundongos.
- 5. Avaliar a influência da deleção genética do receptor *Mas* sobre o débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico, resistência periférica total e resistências vasculares regionais de camundongos *knockout* para o receptor *Mas*

da Ang-(1-7) comparados aos seus controles, camundongos da linhagem C57Bl/6, em diferentes idades.

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

## **3.1. MATERIAL**

#### 3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Transgênicos [TGR(A1-7)3292] (TG) e seu controle Sprague-Dawley Hannower (SD) com idade entre 12 a 20 meses e com peso aproximado de 350 a 450 gramas, fornecidos pelo Biotério de Animais Transgênicos do Instituto de Ciências Biológicas.

Foram utilizados, também, camundongos machos *Knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*) e o seu controle *Wild-Type* (WT) da linhagem C57Bl/6 com idades entre 12 a 16 semanas e entre 36 e 44 semanas, ambos os grupos com peso aproximado de 25 a 35 gramas, fornecidos pelo biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biológicas. Foram utilizados camundongos de diferentes idades para verificar a influência do envelhecimento na distribuição sistêmica e regional do fluxo sanguíneo.

Tanto os camundongos quanto os ratos, foram mantidos em ciclos de claroescuro de 12 horas e com livre acesso à água e à ração. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal de Minas Gerais.

## 3.1.2. Equipamentos utilizados

- BIOPAC System Inc Acqknowledge III MP100 WSW, MP100A / Transonic System Inc, Santa Brbara, Califórnia, USA;
- Cronômetro de ponteiros Technos;
- Bomba peristáltica Pump 113 Minipuls 3 Gilson Villiers Lê Bel France;
- Bomba de infusão Pump 11 Harvard Apparatus Holliston, MA 01746, USA;
- Agitador orbital de tubos tipo vórtex vórtex-genie 2, VWR Scientific Products;
- Sonicador ultrassonic cleaner by branson Branson A Smithkline Beckman Company Parrott Dr. Shelton OT, USA;
- Tubos para centrífuga centrifuge ware 16 PP TUBE (20 PCS/SET MFG n° 0403 – B4033) – HITACHI KOKI Co., LTD;
- Homogeneizador Thermolyne Cimarec 2 Barnstead/Thermolyne 2555 Kerper Boulevard Dubuque, IOWA USA mode nº 546725;
- Banho Maria Sheldon Manufacturing, INC Model 1255 Water bath;
- Balança Micronal S/A B360;
- Centrífuga Centrífuga Himac CR21E Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge CR22E/CR21E);
- Espectrofluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer/Varian;
- Pipeta Gilson Pipetman® Precision Microliter Pipete Instrument Co, INC.
- Mini-bombas osmóticas MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2001, 1.0 µl per hour, 7 days – ALZET;
- Lupa OPTO SM 2002;
- Gelcro Angiocath número 14;

# 3.1.3. Drogas, reagentes e soluções

- Microesferas fluorescents (Fluospheres Blood Flow Determination, Molecular Probes; Eugene, OR)
- Álcool etílico ABS.ACS 99,5% Ecibra / Reagentes analíticos / produtos de alta pureza / CETUS;
- Hidróxido de potássio Potassium Hidroxide Pellets Merck KGaA
  B742533049 Germany;
- Tween® 80 Monooleato de polioxietilenosorbitano Sigma Ultra Sigma Aldrich P8074 – 500 ml Batch #: 073K00643;
- Triton X® 100 Baker Analyzed Reagent / J.T.Baker, USA;
- Acetato de etila SynthLabsynth Produtos para Laboratórios Ltda/Reagente analítico (1000 ml);
- Tribromoethanol 2,5% (Aldrich Chemical Company, Mc Milwaukee USA;
- Urethane 1,2 % Sigma Aldrich Company.PO. Ethyl carbamate Minimium 99%
  U 2500/500 g Germany;
- D-[Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7) (A779) antagonista seletivo da Ang-(1-7) (Bachem);
- Angiotensina-(1-7) (Bachem);
- Salina isotônica estéril (NaCl 0,9% Merck);
- Água deionizada;
- Heparina (Liquemine ®, Roche, Brasil).

# **3.2. MÉTODOS**

## 3.2.1. Procedimentos Experimentais

### **3.2.1.1. Procedimentos cirúrgicos em Ratos**

Para a mensuração dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais, os ratos foram anestesiados com uretana na dose de 1,2g/100g de peso via intraperitoneal. A uretana foi o anestésico de escolha em virtude da padronização da técnica de microesferas fluorescentes ter sido feita com este anestésico (Sampaio *et al.*, 2003). Em seguida, foram submetidos às cirurgias de (1) canulação da artéria femoral direita para coleta de sangue; (2) canulação da veia femoral direita para a infusão de Ang-(1-7) ou de antagonista angiotensinérgico; (3) canulação da artéria braquial direita para registro da pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC); (4) canulação do ventrículo esquerdo (VE) via artéria carótida direita para a infusão das MF e (5) realização de traqueostomia para manutenção das vias aéreas (figura 3). Os ratos que receberam tratamento crônico não tiveram suas veias femorais canuladas.

As canulações dos vasos sanguíneos e VE foram feitas com cânulas de polietileno PE10 soldadas por aquecimento a cânulas do mesmo material PE50. Antes da inserção das cânulas nos vasos, elas foram previamente preenchidas com heparina diluída (0,1 ml a cada 1 ml – 10%). A traqueostomia foi feita isolando-se a traquéia, seguida da realização de uma incisão entre dois anéis cartilaginosos com posterior introdução e fixação de um gelcro Angiocath número 14. Ao fim dos procedimentos cirúrgicos, o animal foi colocado sobre uma cama térmica e um termômetro retal foi utilizado para controle da temperatura corporal mantida em torno de  $36^{\circ}$ C. As cânulas

previamente inseridas na artéria braquial e VE foram conectadas a diferentes canais de registro analógico digital do sistema Biopac, para registro, respectivamente, da PAM e FC e das pressões sistólica e diastólica do VE. A confirmação da cânula dentro do VE foi feita pelo registro das pressões dentro dessa câmara cardíaca.



**Figura 3**: Figura demonstrativa das canulações da (1) artéria braquial esquerda, (2) artéria femoral, (3) veia femoral, (4) ventrículo esquerdo e (5) traqueostomia. Estão representados, também, os registros da pressão arterial pulsátil, pressão ventricular esquerda, pressão arterial média e freqüência cardíaca, coleta de sangue pela bomba peristáltica através da cânula inserida previamente na artéria femoral e infusão de angiotensina-(1-7) ou de A-779 por bomba de infusão através da cânula previamente inserida na veia femoral.

Os ratos que receberam tratamento crônico com A-779 antes de serem submetidos ao protocolo para mensuração dos parâmetros hemodinâmicos, passaram pela cirurgia de implantação de mini-bombas osmóticas. Para isso, foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 1,0g/100 g de peso por via intraperitoneal. Em seguida, foram realizadas tricotomia e pequena incisão na região interescapular, com posterior realização de túnel subcutâneo para a passagem da mini-bomba até próximo à região caudal do animal. Após a introdução da bomba contendo veículo (salina estéril 0,9%) ou A779 na dose de 0,5  $\mu$ g/100g/hora, a pele foi suturada e o animal colocado em gaiolas separadas sob aquecimento até total recuperação. Após, permaneceram em gaiolas com livre acesso à água e à ração. No sétimo dia após a cirurgia de implantação da bomba, os ratos foram submetidos aos procedimentos experimentais com MF, no intuito de averiguar a influência do A-779, infundido cronicamente, na hemodinâmica sistêmica e regional.

## 3.2.1.2. Procedimentos cirúrgicos em Camundongos

Os camundongos foram anestesiados com uretana na dose de 0,1 g/10g de peso via intraperitoneal para a realização das medidas hemodinâmicas. Após aproximadamente 10 a 20 minutos de indução anestésica, eles foram submetidos aos seguintes procedimentos cirúrgicos: (1) canulação da artéria femoral esquerda para registro da PAM e FC; (2) canulação da artéria femoral direita para coleta da amostra de sangue e (3) canulação do VE via artéria carótida direita para injeção das MF. As canulações dos vasos sanguíneos foram feitas com cânulas de polietileno PE10 e PE50 soldadas entre si por aquecimento. Antes de serem inseridas dentro dos vasos sanguíneos, foram preenchidas com heparina diluída (0,1 ml a cada 1 ml de salina a 10%).

Os camundongos não foram submetidos à realização de traqueostomia por se tratarem de animais muito sensíveis aos procedimentos invasivos e à perda de pequenas quantidades de sangue. Além disso, os animais que não foram traqueostomizados apresentaram padrão respiratório melhor que os animais traqueostomizados. Assim, a manutenção da via aérea desses animais, foi feita por abertura oral, aspiração orofaríngea e ventilação com unidade ventilatória, caso necessário.

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, os camundongos foram colocados em cama aquecida e um termômetro retal foi utilizado para controle da temperatura corporal em torno de 36°C. Em seguida, a cânula previamente inserida na artéria femoral esquerda foi acoplada a um transdutor de pressão para mensuração da PAM e FC, enquanto que a cânula inserida dentro do VE foi acoplada a um outro transdutor de pressão. A confirmação do posicionamento da cânula dentro do VE foi feita pelo registro da pressão de pulso ventricular esquerda.

Após estabilização de cerca de 10 minutos, os animais que apresentaram boa condição clínica, como PAM acima de 70 mmHg, padrão respiratório sem esforço e sem repercussão no registro de pressão e ausência de edema agudo de pulmão, permaneceram no protocolo e foram submetidos à técnica de mensuração de perfusão regional e débito cardíaco com MF. Foi observada uma incidência de aproximadamente 30% de edema agudo de pulmão nesses animais, provavelmente por lesão de valva aórtica na tentativa de canulação do VE. Além disso, outras alterações com repercussões hemodinâmicas foram observadas, como perfuração de septo interventricular e

tamponamento cardíaco por perfuração da parede cardíaca. O índice de acerto dos procedimentos cirúrgicos foi em torno de 50%.

## 3.2.1.3. Injeção das Microesferas Fluorescentes em Ratos

O protocolo de injeção de MF em ratos variou conforme o grupo experimental. Em ratos que receberam tratamento agudo com Ang-(1-7) ou A-779, foram realizadas duas injeções de MF de cores diferentes para cada experimento, sendo a primeira cor referente à condição basal do animal e a segunda cor, referente à condição pós-infusão do peptídeo ou do antagonista angiotensinérgico. A escolha das cores das MF para serem utilizadas em um mesmo animal seguiu critérios de combinação previamente estabelecidos por Glenny e cols. (1993), para evitar um possível sinal de spillover (sobreposição dos comprimentos de onda de excitação e de emissão). Os animais tratados cronicamente, foram submetidos a apenas uma cor de injeção de MF, já que o objetivo foi determinar os parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais após a infusão por sete dias do antagonista angiotensinérgico.

Após a estabilização dos ratos em cama termostática, cerca de 300.000 MF (0,3 ml) de 10 a 15 µm de diâmetro nas cores verde, azul, vermelha, amarela e laranja, foram injetadas dentro do ventrículo esquerdo do animal anestesiado, a partir da cânula previamente inserida na artéria carótida direita. As esferas foram injetadas simultaneamente a uma coleta de sangue realizada através da artéria femoral direita por uma bomba peristáltica Minipuls Pump 113 (Minipuls 3 – Gilson – Villiers Lê Bel – France), previamente calibrada e heparinizada. A coleta de sangue foi realizada durante 90 segundos em tubo previamente pesado em uma taxa de 0,85 ml/min. As esferas

foram injetadas do 10° ao 20° segundos de coleta por uma seringa de plástico de 1 ml. A cânula utilizada para injetar as MF dentro do VE foi lavada com 0,3 ml de salina logo após o término da injeção. Para a reposição volêmica do animal, foi injetado 1 ml de salina estéril 0,9% através da artéria femoral. Durante a coleta de sangue e injeção das MF, foram mantidas as mensurações da PAM e FC através da artéria braquial. Ao término da última coleta de sangue, seguindo o protocolo de tratamento agudo ou crônico (tabela 3), os ratos foram sacrificados por dose letal de anestésico e os órgãos (rins, pulmões, glândulas adrenais, cérebro, coração, mesentério, testículos, pele abdominal, músculo gastrocnêmio, baço, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal) foram retirados, pesados e colocados em tubos individuais para posterior processamento e recuperação das MF, assim como os tubos contendo as amostras de sangue coletados.

No tratamento agudo, o peptídeo e o antagonista angiotensinérgico foram infundidos por uma bomba Pump 11 (*Harvard Apparatus Holliston*) acoplada à cânula previamente inserida na veia femoral direita. A taxa de infusão utilizada foi de 6 ml/h com um tempo total de infusão de 10 minutos, sendo que a dose utilizada de A-779 foi de 11 pmol/min/10min e de Ang-(1-7) foi de 110 fmol/min/10 min. A dose de A-779 para os animais tratados cronicamente por mini-bombas osmóticas, foi de 0,5 µg/100g/hora durante sete dias.

*Tabela 3*: Protocolo de utilização de microesferas fluorescentes para mensuração dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais em ratos tratados de forma aguda com Ang-(1-7) ou A-779 ou crônica com A-779.

	Tratamento Agudo	Tratamento Crônico	
Implantação de mini-bombas osmóticas	-	Implantação sete dias antes das medidas hemodinâmicas sob anestesia com tribromoetanol	
Cirurgias realizadas	Canulações da artéria braquial esquerda, artéria e veia femorais direita, VE e traqueostomia.	Canulações da artéria braquial esquerda, artéria femoral direita, VE e traqueostomia.	
Estabilização	Estabilização por cerca de 10 minutos	Estabilização por cerca de 10 minutos	
Coleta de sangue pela cânula inserida dentro da artéria femoral direita	90 segundos de coleta de sangue em uma taxa de 0,85 ml/min por uma bomba Minipuls 3	90 segundos de coleta de sangue em uma taxa de 0,85 ml/min por uma bomba Minipuls 3	
Injeção da primeira cor de MF	Injeção de 300.000 MF dentro do VE do $10^{\circ}$ ao $20^{\circ}$ segundos de coleta de sangue	Injeção de 300.000 MF dentro do VE do 10° ao 20° segundos de coleta de sangue	
Lavagem cânula	Injeção de 0,3 ml de salina para lavagem da cânula pela qual foram injetadas as MF	Injeção de 0,3 ml de salina para lavagem da cânula pela qual foram injetadas as MF	
Reposição volêmica	Injeção de 1,0 ml de salina pela artéria femoral	Injeção de 1,0 ml de salina pela artéria femoral	
Infusão do peptídeo ou do antagonista angiotensinérgico	Infusão de Ang-(1-7) na dose de 110 fmol/min/10min ou de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min	-	
Injeção da segunda cor de MF	Injeção de 300.000 MF de cor diferente da primeira cor utilizada, segundo critérios de Glenny e cols. (1993)	-	
Lavagem cânula e reposição volêmica	Idem primeira lavagem	-	
Sacrifício dos animais	Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e os órgãos foram retirados, pesados e colocados em tubos individuais para posterior processamento e recuperação das MF.	Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e os órgãos foram retirados, pesados e colocados em tubos individuais para posterior processamento e recuperação das MF.	

#### 3.2.1.4. Injeção das Microesferas Fluorescentes em Camundongos

Após a estabilização hemodinâmica dos camundongos e da temperatura corporal em torno de 36°C, os animais com boa condição clínica (PAM superior a 70mmHg, bom padrão respiratório, sem sinais de edema agudo de pulmão e de lesão de valva aórtica) foram submetidos ao protocolo de injeção das MF. Como nos camundongos foi medida somente a condição basal do animal, foi utilizada apenas uma cor de MF para cada experimento.

Cerca de 50.000 MF (50  $\mu$ L) foram injetadas dentro do VE do animal através da cânula previamente inserida na artéria carótida direita. Essa injeção foi realizada por uma seringa Hamilton de 100  $\mu$ l adaptada a um PE10 de aproximadamente 5 cm. As MF foram injetadas do 5° ao 10° segundos de coleta de sangue, sendo que a coleta foi realizada durante 55 segundos a uma taxa de 0,25 ml/min, como padronizado por Richer e cols. (2000). O sangue foi coletado pela cânula inserida na artéria femoral direita em tubo previamente pesado através de uma bomba peristáltica (Minipuls 3 – Gilson – Villiers Lê Bel – France) previamente calibrada. A PAM e a FC foram registradas durante a coleta de sangue através da cânula previamente inserida na artéria femoral esquerda do animal.

Ao final da coleta de sangue, manteve-se o registro de PAM e FC por mais 10 minutos e em seguida, o animal foi sacrificado por dose letal de anestésico. Os órgãos (rins, pulmões, glândulas adrenais, cérebro, coração, mesentério, testículos, pele abdominal, músculo abdominal, baço, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal) foram retirados, pesados e colocados em tubos individuais para posterior processamento e recuperação das MF, assim como o tubo contendo a amostra de sangue. O protocolo de utilização das MF para mensurações da hemodinâmica sistêmica e regional de camundongos encontra-se na tabela abaixo.

*Tabela 4*: Protocolo de utilização de microesferas fluorescentes para mensuração dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais em camundongos no estado basal.

	Protocolo
Cirurgias realizadas	Canulações das artérias femorais direita e esquerda e ventrículo esquerdo.
Condição clínica	Estabilização por cerca de 10 minutos
Coleta de sangue pela cânula inserida	55 segundos de coleta de sangue em uma taxa de 0,25 ml/min por uma
dentro da artéria femoral direita	bomba Minipuls 3.
Injeção da MF	Injeção de 50.000 MF (0,3 $\mu L)$ dentro do VE do 5° ao 10° segundos de
	coleta de sangue
Lavagem da cânula	Injeção de 0,1 ml de salina para lavagem da cânula pela qual foram
	injetadas as MF.
Reposição volêmica	Injeção de 0,3 ml de salina pela artéria femoral direita
Sacrifício dos animais	Os animais foram sacrificados por dose letal de anestésico e os órgãos
	foram retirados, pesados e colocados em tubos individuais para posterior
	processamento e recuperação das MF.

## 3.2.1.5. Recuperação das Microesferas Fluorescentes em Ratos

Em ratos, a digestão dos órgãos e das amostras de sangue foi feita em 8 ml de hidróxido de potássio (KOH) a 4 M com 2% de Tween 80. Após a adição do KOH, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas em banho maria a 50° C.

Uma vez digeridas, as amostras foram individualmente processadas para a recuperação das microesferas, de acordo com método de sedimentação descrito previamente por Van Oosterhout *et al.* (1995). As amostras foram retiradas do banho aquecido a 50° C, submetidas à agitação por vórtex até obter uma mistura homogênea e

levadas à centrífuga durante 20 minutos a 7.267 g (10.000 rpm) e à temperatura de 20° C. A diferença entre a gravidade específica da solução digerida (0,893g/cm<sup>3</sup>) e as microesferas (1,055 g/cm<sup>3</sup>), permitiu a formação de um sedimento composto de esferas e alguns restos de tecidos (pellet) após a sedimentação.

Em seguida, o sobrenadante foi pipetado cuidadosamente e descartado. O restante da amostra foi lavado com 8 ml de uma solução contendo Triton X-100 2% dissolvido em água desmineralizada. Após a adição do Triton X-100 as amostras foram submetidas à agitação por vórtex até se obter uma mistura homogênea e novamente levadas à centrífuga nos mesmos parâmetros utilizados anteriormente. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e em seguida foi adicionado 8 ml de água deionizada, com posterior realização de agitação em vórtex e nova centrifugação.

Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao pellet, 4 ml de acetato de etila seguido de agitação em vórtex. O acréscimo do acetato de etila foi realizado em ambiente escuro, por se tratar do solvente utilizado para quebrar a cápsula de poliestireno das MF e liberar o composto fluorescente. Após uma hora da adição do solvente, foi realizada nova centrifugação com posterior pipetagem de 2 ml do sobrenadante em tubos individuais para determinação da fluorescência de cada órgão.

A fluorescência de cada amostra foi determinada pela leitura de 2 ml em cubeta de quartzo no espectrofluorímetro, dentro de espectro de excitação/emissão específico para cada cor usada. A partir dos valores de fluorescência obtidos de cada órgão e das amostras de sangue, foram calculados o fluxo sanguíneo e a resistência vascular regional de todos eles. A tabela 5 resume o protocolo de recuperação das MF em ratos.



#### Tabela 5: Protocolo de recuperação das microesferas fluorescentes em ratos.

## 3.2.1.6. Recuperação das Microesferas Fluorescentes em Camundongos

O processo de recuperação das MF nas amostras de tecido e sangue de camundongos foi similar ao processo de recuperação utilizado em ratos. Em cada amostra foram adicionados 4 ml de KOH 4M com 2% de Tween 80. Após a adição do KOH, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas em banho maria a 50° C.

No dia seguinte, as amostras foram retiradas do banho aquecido a 50° C, submetidas à agitação por vórtex até se obter uma mistura homogênea e levadas à centrífuga durante 20 minutos a 7.267 g (10.000 rpm) e à temperatura de 20° C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e substituído por 4 ml de solução de Triton X-100 2% dissolvido em água desmineralizada. Após, foi utilizado vórtex para homogeneização seguida de nova centrifugação nos mesmos parâmetros anteriores. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado apenas com água deionizada, seguido de agitação em vórtex e centrifugação.

Após a lavagem com água deionizada, o sobrenadante foi descartado e em seguida, foi adicionado à cada amostra, 4 ml de acetato de etila para ruptura da cápsula de poliestireno e liberação do composto fluorescente. As amostras permaneceram no escuro por volta de 60 minutos e em seguida foram novamente levadas à centrífuga, para posterior leitura da fluorescência no espectrofluorímetro. A leitura foi realizada em 2 ml de cada amostra dentro de espectro de excitação/emissão específico para cada cor usada. A tabela 6 ilustra o protocolo de recuperação das MF em camundongos.



Tabela 6: Protocolo de recuperação das microesferas fluorescentes em camundongos.

## 3.2.1.7. Curvas Padrão

Para avaliar a linearidade e a precisão do sinal de fluorescência com relação à concentração do corante e determinar a intensidade de fluorescência como função do número de microesferas, foram obtidas curvas padrões. A preparação da curva padrão

foi realizada para cada experimento e conforme a cor de MF utilizada. Por exemplo, em um experimento onde haviam sido utilizadas as cores vermelha e azul, eram preparadas duas curvas padrões, uma vermelha e outra azul, constituídas cada uma de três pontos para ratos e de cinco pontos para camundongos. O número de pontos da curva foi maior para camundongos em virtude do menor número de MF injetadas e menor número de MF aprisionadas por órgão deste animal, quando comparado a ratos. A linearidade das MF foi bastante precisa sendo que o valor de r<sup>2</sup> foi de 1,0 para as cores vermelha e verde e de 0,99 para as cores laranja, azul e amarela.

Os pontos das curvas foram preparados a partir de diluições sucessivas de uma solução mãe, constituída de 10µl de MF diluídas em 4 ml de acetato de etila para ratos e de 5µl de MF diluídas em 4 ml de acetato de etila para camundongos. Após uma hora da preparação da solução mãe, foram realizadas diluições sucessivas, como demonstrado na tabela 7.

Foi calculado um fator de correção utilizando a relação linear entre a fluorescência lida e o número de microesferas. Este fator possibilitou converter o número de MF injetadas em valor de fluorescência total infundida, criando lineariedade entre o número total de MF injetadas e o número de MF presentes no sangue coletado.

**Tabela 7**: Tabela representativa das diluições sucessivas da solução mãe para obtençãodos pontos das curvas padrão em ratos e em camundongos

	Ratos	Camundongos		
Solução	10 µl de MF (10.000 MF) em 4 ml de	5 $\mu$ l de MF (5.000 MF) em 4 ml de acetato de		
mãe	acetato de etila	etila		
Diluições Sucessivas				
Tubo 1	Retirada de 2 ml da solução mãe (5.000	Retirada de 2 ml da solução mãe (2.500 MF)		
	MF)			
Tubo 2	2 ml do tubo $1 + 2$ ml de acetato de etila	2 ml do tubo $1 + 2$ ml de acetato de etila puro		
	puro (2.500 MF)	(1.250 MF)		
Tubo 3	2 ml do tubo $2 + 2$ ml de acetato de etila	2  ml do tubo $2 + 2  ml$ de acetato de etila puro		
	puro (1.250 MF)	(625 MF)		
Tubo 4	-	2 ml do tubo $3 + 2$ ml de acetato de etila puro		
		(312,5 MF)		
Tubo 5	-	2 ml do tubo $4 + 2$ ml de acetato de etila puro		
		(156,25 MF)		

# Cálculo do fator de correção (fc) em ratos:

 $\mathbf{fc} = [(\text{tubo1/fluorescência tubo1}) + (\text{tubo2/fluorescência tubo2}) + (\text{tubo3/fluorescência})]$ 

tubo3)] / 3

# Cálculo do fator de correção (fc) em camundongos:

 $\mathbf{fc} = [(tubo1/fluorescência tubo1) + (tubo2/fluorescência tubo2) + (tubo3/fluorescencia tubo3) + (tubo3/fluorescencia tubo$ 

tubo3) + (tubo 4/fluorescencia tubo 4) + (tubo 5/fluorescencia tubo5)] / 5

#### 3.2.1.8. Parâmetros calculados

O débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico, resistência periférica total, fluxo sanguíneo regional e resistência vascular regional foram calculados a partir dos valores de fluorescência obtidos tanto das amostras dos tecidos coletados quanto das amostras de sangue. As fórmulas utilizadas foram:

## • Débito cardíaco (DC, ml/min)

DC = (fluorescência total injetada) / (Rf x 2)

onde

Fluorescência total injetada = (número total de MF injetadas – número de MF remanescentes na seringa) / fc

Número de MF remanescentes na seringa = média de leituras de fluorescência feitas em experimentos aleatórios

Rf = fluorescência da amostra de sangue coletada

*Observação:* número de MF injetadas em ratos = 300.000 MF; número de MF injetadas em camundongos = 50.000 MF.

• Índice Cardíaco (IC, ml.min<sup>-1</sup>.100g)

IC = DC / 100 g de peso do animal

A fórmula do Índice Cardíaco refere-se ao cálculo feito em ratos. Em camundongos a divisão foi feita por 10 g de peso do animal.

• Volume sistólico (VS, ml)

$$VS = DC / FC$$

onde

FC = freqüência cardíaca mensurada durante a coleta de sangue correspondente

• Resistência periférica total (RPT, mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.100g)

$$RPT = PAM / IC$$

onde

PAM = pressão arterial média mensurada durante a coleta de sangue correspondente.

• Resistência vascular regional (RPR<sub>0</sub>, mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.g)

$$RPR_0 = PAM / Q_0$$

onde

 $Q_0 = fluxo$  sanguíneo regional

• Fluxo sanguíneo regional (Q<sub>0</sub>, ml.min<sup>-1</sup>.g)

 $Q_0 = [(fluorescência do órgão x Q_f) / (R_f x 2] / peso do órgão (g)$ 

onde

Q<sub>f</sub> (fluxo sanguíneo de referência, ml/min) = [peso da amostra sanguínea de referência (g) x 60 ] / [densidade do sangue (1,06) x tempo da coleta da amostra (90s)]

*Observação:* o peso da amostra de sangue é determinado pelo tempo de coleta de sangue e pela taxa com que esse sangue é retirado. No camundongo, por exemplo, a taxa é de 0,25 ml/min e o tempo de coleta de 55 segundos e no rato, a taxa de retirada é de 0,85 ml/min e o tempo de coleta de 90 segundos. A densidade do sangue é a mesma para ratos e camundongos.

#### 3.2.1.9. Seleção das doses de Ang-(1-7) e A-779

A dose de Ang-(1-7) utilizada foi determinada de acordo com experimentos de Sampaio *et al.* (2003). A dose aguda de A-779 foi selecionada após várias tentativas. Foram testadas as doses de 0,11 pmol/min/10min, 11 pmol/min/10min, 33 pmol/min/10min, 55 pmol/min/10min e 11 pmol/min/30min, sendo a dose de 11 pmol/min/10min a dose que apresentou melhores resultados. A dose crônica de A-779 foi selecionada de acordo com experimentos de Simões e Silva *et al.* (1998).

#### **3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os grupos experimentais desse estudo foram:

*Grupo 1*. Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD (n = 20) anestesiados, no estado basal;

*Grupo 2.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos TG (n=19) anestesiados, no estado basal;

*Grupo 3.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD (n = 5) anestesiados, após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min;

*Grupo 4.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais basais de camundongos C57Bl/6 (n=8) com idade entre 3 a  $4\frac{1}{2}$  meses.

*Grupo 5.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais basais de camundongos KO-*Mas* (n=8) com idade entre 3 a 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> meses.

*Grupo 6.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais basais de camundongos C57Bl/6 (n=11) com idade entre 9 e 11 meses;

*Grupo* 7. Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais basais de camundongos KO-*Mas* (n=10) com idade entre 9 e 11 meses;

*Grupo 8.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD (n = 6) anestesiados, após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min;

Grupo 9. Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos TG

(n=5) anestesiados, após a infusão aguda de A779 na dose de 11 pmol/min/10min;
*Grupo 10.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD anestesiados, tratados cronicamente com A779 na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$  (veículo, n=6 e tratado, n=7);

*Grupo 11.* Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos TG anestesiados, tratados cronicamente com A779 na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$  (veículo, n=6 e tratado, n=8).

# 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos valores individuais de cada grupo experimental. Foi realizado o teste de distribuição normal para cada uma das amostras utilizadas. Para a comparação das médias dentro do mesmo grupo foi utilizado o Teste *t* de Student pareado. Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizado o Teste *t* de Student não-pareado e para a comparação das médias médias entre os diferentes grupos foi utilizado ANOVA. O valor de p considerado significativo foi menor que 0,05.

# **4. RESULTADOS**

## 4.1. Peso dos órgãos

A média dos pesos dos órgãos de ratos SD e TG e de camundongos WT e KO-Mas estão representados na tabela 8. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os pesos individuais de cada órgão quando comparados ratos SD e TG e camundongos WT e KO-*Mas*. O envelhecimento não alterou o peso dos órgãos dos camundongos WT e KO-*Mas* (dados não mostrados).

Tabela 8. Média dos pesos dos órgãos de ratos SD e TG e de camundongos WT e KO-

Órgãos	Peso dos órgãos	Peso dos órgãos	Peso dos órgãos de	Peso dos órgãos de
	de ratos SD em	de ratos TG em	camundongos WT	camundongos KO-Mas
	gramas	gramas	em gramas	em gramas
Rins	2,52	2,35	0,36	0,34
Pulmões	1,72	1,38	0,15	0,16
Adrenais	0,05	0,06	0,014	0,010
Mesentério	1,25	1,49	0,18	0,17
Cérebro	1,38	1,46	0,33	0,31
Coração	0,77	0,54	0,074	0,076
Pele abdominal	2,11	2,29	0,22	0,21
Músculo	1,42	2,04	0,28	0,28
Baço	0,60	0,76	0,07	0,06
Testículos	3,18	2,70	0,21	0,22
Tecido adiposo marrom	0,23	0,50	0,09	0,09
interescapular				
Tecido adiposo branco	2,96	1,72	0,23	0,23
epididimal				

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 10 ratos), TG, [TGR(A1-7)3292] (n = 10 ratos), WT, *Wild-Type* (n = 10) e KO-Mas, *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (n = 10).

# 4.2. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley e ratos Transgênicos TGR(A1-7)3292 anestesiados no estado basal

As figuras 4, 5, 6, 7 e 8 ilustram a pressão arterial média (PAM), débito cardíaco (DC), índice cardíaco (IC), volume sistólico (VS) e resistência periférica total (RPT) de

ratos Sprague-Dawley (SD) e [TGR(A1-7)3292] (TG) anestesiados, no estado basal. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no DC e PAM entre os grupos analisados. No entanto, os ratos TG apresentaram IC e VS 12% e 16% respectivamente maiores que os dos animais SD e RPT e FC 13% e 9% respectivamente menores quando comparados aos animais controle (tabela 9).



**Figura 4.** Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. test-*t* Student.



**Figura 5.** Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. test-*t* Student.



**Figura 6.** Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 7.** Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 8.** Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 9.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD e TG, anestesiados, no estado basal.

	Ratos SD	Ratos TG
Pressão arterial (mmHg)	101 ± 3,0	99 ± 3
Freqüência cardíaca (bpm)	$359 \pm 6,0$	$326 \pm 7*$
Débito cardíaco (ml/min)	$91,96 \pm 3,06$	$95,33 \pm 3,35$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$21,\!98\pm0,\!65$	$24,59 \pm 0,91*$
Volume sistólico (ml)	$0,25\pm0,01$	$0,29 \pm 0,01*$
<b>Resistência periférica total (mmHg.ml<sup>1</sup>.min.100g)</b>	$4,55 \pm 0,13$	3,95 ± 0,13*

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 20 ratos) e TG, [TGR(A1-7)3292] (n = 19 ratos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

As figuras 9, 10 e 11 ilustram as resistências vasculares regionais de ratos SD e TG anestesiados no estado basal. Os rins, pulmões, adrenais, cérebro, baço, testículos e tecido adiposo marrom interescapular de animais TG apresentaram resistências vasculares regionais significativamente menores que as respectivas resistências vasculares regionais dos ratos SD. No entanto, os demais tecidos (coração, mesentério, músculo gastrocnêmio, pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal) apresentaram resistências vasculares regionais similares entre os ratos SD e TG. Os valores de resistência vascular para cada órgão estão descritos na tabela 10.

# Resistência Vascular Regional

**Figura 9.** Resistência vascular regional dos rins, adrenais, coração e cérebro de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 10.** Resistência vascular regional dos pulmões, mesentério, músculo gastrocnêmio e baço de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 11.** Resistência vascular regional da pele abdominal, testículos, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=20) e [TGR(A1-7)3292] (TG; n=19) anestesiados, no estado basal. \* P < 0,05, test-*t* Student.

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g					
-	SD	TG	% diferença			
Rins –	28,40 ± 3,01	21,76 ± 1,47*	24%			
Pulmões	$134,1 \pm 15,46$	93,61 ± 11,30*	31%			
Adrenais	$6,86 \pm 0,45$	$5,07 \pm 0,37*$	27%			
Coração	$9,94\pm085$	$11,03 \pm 0,83$	-			
Baço	$87,94 \pm 10,14$	$49,90 \pm 8,07*$	44%			
Mesentério	$305,1 \pm 55,38$	$246,5 \pm 22,31$	-			
Cérebro	$83,14 \pm 7,08$	$62,18 \pm 4,38*$	26%			
Pele	$962,7 \pm 76,20$	$820,2 \pm 80,26$	-			
Gastrocnêmio	$347,2 \pm 92,94$	$421,7 \pm 94,55$	-			
Testículo	$537,4 \pm 47,29$	369,2 ± 26,64*	32%			
Tec.adiposo marrom	$300,2 \pm 51,49$	143,9 ± 18,16*	53%			
Tec.adiposo branco	$1430 \pm 226,2$	$1598 \pm 158,0$	-			

**Tabela 10**. Resistência vascular regional de ratos SD e TG anestesiados no estado basale diminuição em percentagem dos órgãos de ratos TG comparados aos ratos controle.

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 20 ratos) e TG, [TGR(A1-7)3292] (n = 19 ratos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

A tabela 11 mostra o fluxo sangüíneo regional basal de ratos SD e TG. As taxas de fluxo sanguíneo para os rins, pulmões, adrenais, baço, cérebro, testículos e tecido adiposo marrom foram significantemente maiores nos ratos TG do que nos ratos controle. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas taxas de fluxo sanguíneo para o mesentério, ventrículo esquerdo, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo branco.

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>						
-	SD	TG	% diferença				
Rins	$3,70\pm0,25$	4,61 ± 0,36*	25%				
Pulmões	$0,93 \pm 0,14$	$1,47 \pm 0,28*$	58%				
Adrenais	$15{,}60 \pm 1{,}29$	$20,14 \pm 1,34*$	29%				
Coração	$10,\!71\pm1,\!31$	$9,91\pm0,89$	-				
Baço	$1,41 \pm 0,21$	$2,27 \pm 0,24 **$	61%				
Mesentério	$0,44 \pm 0,05$	$0,\!48\pm0,\!7$	-				
Cérebro	$1,\!27\pm0,\!08$	$1,49 \pm 0,06*$	17%				
Pele	$0,\!11\pm0,\!009$	$0,14\pm0,03$	-				
Gastrocnêmio	$0,\!45\pm0,\!06$	$0,\!40\pm0,\!07$	-				
Testículo	$0,\!19\pm0,\!017$	$0,28 \pm 0,03^{**}$	53%				
Tec.adiposo marrom	$0,\!39\pm0,\!07$	$1,00 \pm 0,28*$	156%				
Tec.adiposo branco	$0,08\pm0,01$	$0,06 \pm 0,009$	-				

**Tabela 11**. Fluxo sanguíneo regional de ratos SD e TG anestesiados no estado basal e aumento em percentagem dos órgãos de ratos TG comparados aos ratos controle.

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 20 ratos) e TG, [TGR(A1-7)3292] (n = 19 ratos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

# 4.3. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min

As figuras 12, 13, 14, 15 e 16 mostram os valores médios de PAM, DC, IC, VS e RPT de ratos SD, anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min. A PAM e a FC dos animais não apresentaram alterações após a infusão aguda de Ang-(1-7) quando comparadas ao estado basal. No entanto, o DC, IC e VS dos ratos SD, aumentaram 33%, 33% e 48%, respectivamente, após a infusão aguda de Ang-(1-7) quando comparados ao estado

basal, enquanto a RPT diminuiu 32%. Os valores de DC, IC, VS e RPT estão descritos na tabela 12.



**Figura 12.** Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 13.** Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 14.** Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 15.** Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 16.** Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5) anestesiados, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 12.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min.

	Rats SD no estado	Rato SD após a
	basal	infusão de Ang-(1-7)
Pressão arterial (mmHg)	107 ± 5	$103 \pm 6$
Freqüência cardíaca (bpm)	$365 \pm 10$	$349\pm15$
Débito cardíaco (ml/min)	99,1 ± 6,9 *	$131,8 \pm 3,6*$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$24,18 \pm 1,3$	$32,\!47 \pm 2,\!06*$
Volume sistólico (ml)	$0,\!27\pm0,\!01$	$0,4 \pm 0,03*$
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	$4,\!47\pm0,\!26$	$3,02 \pm 0,2*$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 5 ratos). \* P <

0,05, test-*t* Student.

Nas figuras 17, 18, 19 e 20 estão representadas a resistência vascular regional dos rins, adrenais, coração, pulmões, cérebro, baço, pele abdominal, mesentério, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo marrom interescapular, tecido adiposo branco epididimal e testículos de ratos SD no estado basal e após a infusão de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. Os valores de resistência vascular regional obtidos para cada órgão e a diminuição em percentagem após a infusão de Ang-(1-7) estão descritas na tabela 13.



**Figura 17.** Resistência vascular regional dos rins, adrenais e coração de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 18.** Resistência vascular regional dos pulmões, cérebro e baço de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 19.** Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 20.** Resistência vascular regional do mesentério, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo marrom interescapular e testículos de ratos Sprague-Dawley (SD; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min. \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 13**. Resistência vascular regional de ratos SD anestesiados no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min e diminuição em percentagem após o tratamento com Ang-(1-7).

	Resistência Vaso	cular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup>	.min.g
	Rato SD no estado basal	Rato SD no estado basal Rato SD após a infusão	
		de Ang-(1-7)	
Rins	$26,17 \pm 5,19$	$12,08 \pm 1,56*$	54%
Pulmões	$97,\!38\pm17,\!52$	$69,35 \pm 16,72*$	29%
Adrenais	$12,65 \pm 2,23$	$11,\!06\pm0,\!86$	-
Coração	$9{,}36\pm2{,}88$	$5{,}20\pm1{,}16*$	44%
Baço	$71,\!96 \pm 16,\!00$	$39,79 \pm 10,69 *$	45%
Mesentério	$399,7\pm43,47$	$245,4 \pm 40,5*$	38%
Cérebro	$75,02 \pm 12,71$	$42,07 \pm 5,22*$	44%
Pele	$1115 \pm 82,\!42$	$623,5 \pm 52,27*$	44%
Gastrocnêmio	$358,1\pm93,89$	$258,3\pm56,90$	-
Testículo	$560 \pm 26{,}02$	$346,2 \pm 47,38*$	38%
Tec.adiposo marrom	$330,7\pm64,89$	$135,2 \pm 30,80*$	41%
Tec.adiposo branco	$3006\pm361$	$2474\pm715$	-

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 5 ratos). \* P <

0,05, test-*t* Student.

Dos órgãos analisados, os que apresentaram aumento significativo de seus fluxos sanguíneos regionais após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min, foram: rins, coração, mesentério, pele abdominal, testículos, cérebro e tecido adiposo marrom interescapular. Os demais órgãos não apresentaram alterações de seus fluxos sanguíneos regionais após a infusão de Ang-(1-7) (tabela 14).

**Tabela 14**. Fluxos sanguíneos regionais de ratos SD anestesiados no estado basal e após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10 min e suas respectivas percentagem de aumento.

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>					
-	Rato SD no	Rato SD após a	% aumento			
	estado basal	infusão de Ang-(1-7)				
Rins	4,69 ± 0,83	$8,34 \pm 0,95*$	77%			
Pulmões	$1,24 \pm 0,23$	$1,76\pm0,51$	-			
Adrenais	$9,86 \pm 2,07$	$8,\!98\pm0,\!83$	-			
Coração	$12,\!64\pm4,\!05$	21,41 ± 3,18*	69%			
Baço	$2,03 \pm 0,41$	$3,17 \pm 1,01$	-			
Mesentério	$0,27\pm0,01$	$0,44 \pm 0,07*$	63%			
Cérebro	$1,57\pm0,24$	$2,40 \pm 0,34*$	53%			
Pele	$0,\!09\pm0,\!005$	$0,16 \pm 0,01*$	78%			
Gastrocnêmio	$0,39 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,08$	-			
Testículo	$0,19\pm0,01$	$0,29 \pm 0,03*$	53%			
Tec.adiposo marrom	$0,\!29\pm0,\!07$	$0,72 \pm 0,08*$	148%			
Tec.adiposo branco	$0,03 \pm 0,006$	$0,04 \pm 0,008$	-			

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 5 ratos). \* P <

0,05, test-*t* Student.

A tabela 15 sumariza os resultados obtidos com o aumento agudo e crônico de Ang-(1-7) sobre o IC, VS, RPT e resistência vascular regional dos rins, pulmões, adrenais, cérebro, mesentério, coração, baço, músculo gastrocnêmio, pele abdominal, testículos, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal. **Tabela 15.** Sumário dos resultados obtidos com o aumento agudo e crônico de Ang-(17) em ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292, respectivamente.

		Aumento agudo Ang-(1-7)	Aumento crônico Ang-(1-7)
	Índice cardíaco	<b>↑</b> :	↑ I
	Volume sistólico	<b>↑</b>	1
1	Resistência periférica total	Ļ	Ļ
1	Pressão arterial média	não alterou	não alterou
<b>v</b> 1	Rins	↓	Ļ
nai	Testículos	Ļ	Ļ
	Cérebro	$\downarrow$	$\downarrow$
sre	Pulmões	Ļ	Ļ
are	Tecido adiposo marrom	Ļ	$\downarrow$
	Baço	não alterou	↓.
/as	Adrenais	não alterou	↓
as	Coração	↓	não alterou
	Pele abdominal	<b>↓</b>	não alterou
l ste	Mesentério	Ļ	não alterou
(es	Tecido adiposo branco	não alterou	não alterou
- <u>1</u>	Músculo gastrocnêmio	não alterou	não alterou

# 4.4. Avaliação Hemodinâmica de Camundongos *knockout* para o Receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*) e seu Controle Wild-Type (WT) da linhagem C57Bl/6

## 4.4.1. Camundongos WT e KO-Mas Jovens

As figuras 21, 22, 23, 24 e 25 representam, respectivamente, a PAM, DC, IC, VS e RPT de camundongos WT e KO-*Mas* da linhagem C57Bl/6 com idade entre 12 a 16 semanas. Os camundongos KO-*Mas* apresentaram PAM e FC similares aos animais controles, porém, DC 36%, IC 35% e VS 40% significativamente menores e RPT 80% significativamente maior. Os valores obtidos estão descritos na tabela 16.





**Figura 21.** Pressão arterial média de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57B1/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. test-*t* Student.



**Figura 22.** Débito cardíaco de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 23.** Índice cardíaco de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 24.** Volume sistólico de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 25.** Resistência periférica total de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 16.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de camundongos WT e KO-*Mas* no estado basal, e com idade entre 12 e 16 semanas.

	WT	KO-Mas
Pressão arterial (mmHg)	$80\pm2$	$78\pm2$
Freqüência cardíaca (bpm)	$541\pm22$	$569\pm16$
Débito cardíaco (ml/min)	$31{,}64 \pm 5{,}80$	20,18 ± 2,30 *
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$1{,}24\pm0{,}23$	0,81 $\pm$ 0,08 *
Volume sistólico (ml)	$0,\!05\pm0,\!01$	0,03 ± 0,004 *
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>1</sup> .min.100g)	$57{,}50\pm13{,}05$	$103{,}6\pm10{,}95$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. WT, Wild-Type (n = 11 camundongos) e KO-Mas, *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (n = 10 camundongos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

A resistência vascular dos rins, pulmões, adrenais, mesentério, baço e tecido adiposo marrom interescapular de camundongos KO-*Mas* jovens da linhagem C57Bl/6, foram significativamente maiores que a resistência vascular dos mesmos órgãos de animais controle (figuras 26, 27, 28 e 29). Porém, os demais órgãos apresentaram resistências vasculares similares entre os grupos. A resistência vascular dos testículos de camundongos KO-*Mas* foi significativamente menor que a resistência vascular dos testículos de camundongos WT. Os dados obtidos estão descritos na tabela 17.



**Figura 26.** Resistência vascular dos rins, adrenais, coração e pulmões de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 27.** Resistência vascular do mesentério, cérebro e baço de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 28.** Resistência vascular dos testículos, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo branco epididimal de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da

linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 29.** Resistência vascular da pele abdominal e músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT; n=11) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=10) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 12 e 16 semanas. test-*t* Student.

Tabela	17.	Resistência	vascular	regional	de	camundongos	WT	e	KO-Mas	de	idade
entre 12	e 10	6 semanas, n	o estado ł	oasal, e re	spec	ctivas diferença	ıs em	p	ercentagei	n.	

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g					
—	WT	KO-Mas	% diferença			
Rins —	5,39 ± 1,19	8,24 ± 1,07*	53%			
Pulmões	$5,14 \pm 1,19$	$10,42 \pm 2,46*$	103%			
Adrenais	$4,\!10\pm0,\!76$	$8,42 \pm 2,09*$	105%			
Coração	$5{,}70 \pm 1{,}09$	$6,\!42 \pm 1,\!58$	-			
Baço	$23,23 \pm 4,0$	$38,\!68 \pm 8,\!0^*$	66%			
Mesentério	$47,\!41 \pm 8,\!66$	$73,03 \pm 8,94*$	54%			
Cérebro	$26,\!76\pm5,\!50$	$26,03 \pm 3,13$	-			
Pele	$171,7 \pm 19,78$	$200,1 \pm 18,37$	-			
Gastrocnêmio	$354,3 \pm 93,54$	$393,8\pm106,9$	-			
Testículo	$72,22 \pm 14,55$	$42,\!99 \pm 4,\!68*$	40%			
Tec.adiposo marrom	$67,\!64 \pm 10,\!30$	113,9 ± 19,15*	68%			

Tec.adiposo branco	$131,0 \pm 23,73$	$171,6 \pm 48,88$	-
Valores são representad	os pela média $\pm$ SE. V	WT, Wild-Type $(n = 11)$	camundongos) e
KO-Mas, knockout para	o receptor Mas da A	Ang- $(1-7)$ (n = 10 came	undongos). * P <
0,05, test-t Student.			

A distribuição do fluxo sanguíneo regional para os órgãos apresentou comportamento semelhante à resistência vascular. Os rins, pulmões, adrenais, mesentério, baço e tecido adiposo marrom interescapular de camundongos KO-*Mas* apresentaram fluxos sanguíneos significativamente menores que os órgãos de camundongos controle. Os testículos de camundongos KO-*Mas* apresentaram fluxo sanguíneo significativamente maior que os testículos de camundongos WT. A tabela 18 mostra os valores de fluxo sanguíneo obtidos com as respectivas percentagem de diferença.

**Tabela 18**. Fluxo sanguíneo regional de camundongos WT e KO-*Mas* de idade entre 12e 16 semanas, no estado basal, e respectivas diferenças em percentagem.

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>			
-	WT	KO-Mas	% diferença	
Rins	19,16±4,08	10,76 ± 1,38*	44%	
Pulmões	$16,90 \pm 2,90$	$9,79 \pm 1,79*$	42%	
Adrenais	$26,\!92\pm6,\!03$	$14,38 \pm 3,05*$	46%	
Coração	$18,51 \pm 3,30$	$16,60 \pm 2,88$	-	
Baço	$3,\!79\pm0,\!63$	$2,49 \pm 0,34*$	34%	
Mesentério	$1,\!90\pm0,\!35$	$1,11 \pm 0,16*$	42%	
Cérebro	$3,\!99\pm0,\!89$	$3,23 \pm 0,34$	-	
Pele	$0,46 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,05$		
Gastrocnêmio	$0,35\pm0,07$	$0,33 \pm 0,06$	-	
Testículo	$1,23 \pm 0,22$	$2,11 \pm 0,34*$	71%	
Tec.adiposo marrom	$1,65 \pm 0,40$	$0,74 \pm 0,10*$	55%	

Tec.adiposo branco $0,85 \pm 0,23$  $0,80 \pm 0,18$ -Valores são representados pela média  $\pm$  SE. Wild-Type (WT; n = 11) e knockout (KO-Mas, n = 10). \* P < 0,05, test-t Student.</td>

## 4.4.2. Camundongos WT e KO-Mas mais velhos

A avaliação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos de camundongos WT e KO-*Mas* mais velhos da linhagem C57Bl/6, demonstrou que ambos os grupos de animais apresentaram PAM e FC similares, porém, DC, IC, VS e RPT diferentes. Os camundongos KO-*Mas* apresentaram DC, IC e VS significativamente menores e RPT significativamente maior (figuras 30, 31, 32, 33 e 34) que os animais controle. O DC foi 45% menor no camundongo KO-*Mas*, IC 39% menor, VS 40% menor e RPT 59% maior. Os valores obtidos estão descritos na tabela 19.



**Figura 30.** Pressão arterial média de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor Mas da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. test-*t* Student.



**Figura 31.** Débito cardíaco de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 32.** Índice cardíaco de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 33.** Volume sistólico de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 34.** Resistência periférica total de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 19.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de camundongos WT e KO-*Mas* no estado basal, e com idade entre 36 e 44 semanas.

	WT	KO-Mas
Pressão arterial (mmHg)	$78 \pm 2$	$80 \pm 3$
Freqüência cardíaca (bpm)	$575 \pm 27$	$554\pm19$
Débito cardíaco (ml/min)	$34{,}61\pm4{,}10$	18,85 ± 2,80 *
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$1,\!10\pm0,\!16$	0,67 $\pm$ 0,11 *
Volume sistólico (ml)	$0,\!05\pm0,\!007$	0,03 ± 0,004 *
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	$78,33 \pm 13$	$124,5 \pm 21,03$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. WT, Wild-Type (n = 8 camundongos) e KO-Mas, *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (n = 8 camundongos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

As figuras 35, 36, 37 e 38 ilustram a resistência vascular regional de órgãos de camundongos WT e de camundongos KO-*Mas* mais velhos. A resistência vascular dos pulmões, adrenais, mesentério, cérebro, pele abdominal, baço, testículos e tecido adiposo marrom interescapular de camundongos KO-*Mas*, foram significativamente maiores que as resistências vasculares dos mesmos órgãos de camundongos WT. Os valores de resistência vascular obtidos estão descritos na tabela 20.



**Figura 35.** Resistência vascular dos rins, adrenais e coração de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 36.** Resistência vascular do cérebro, baço e pulmões de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 37.** Resistência vascular dos testículos e tecido adiposo marrom interescapular de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 38.** Resistência vascular do mesentério, pele abdominal, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo branco epididimal de camundongos controle (WT; n=8) e de camundongos *knouckout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (KO-*Mas*; n=8) da linhagem C57Bl/6, anestesiados com uretana, com idade entre 36 e 44 semanas. \* P < 0,05, test-*t* Student.

Tabela	20.	Resistência	vascular	regional	de	camundongos	WT	e	KO- <i>Mas</i> ,	no	estado
basal, co	om i	dade entre 3	6 e 44 sei	manas, e	resp	pectivas diferen	iças e	m	percentag	em	

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g			
	WT	KO-Mas	% diferença	
Rins	$6,22 \pm 1,27$	$11,16 \pm 4,62$	-	
Pulmões	$10,72 \pm 3,45$	$26,\!32\pm7,\!77$	145%	
Adrenais	$3,\!83\pm0,\!69$	$7,\!67 \pm 1,\!30$	100%	
Coração	$5,66 \pm 1,83$	$7,51 \pm 1,96$	-	
Baço	$31,92 \pm 9,22$	$62,95 \pm 11,75$	66%	
Mesentério	$113,8 \pm 36,36$	$239,3\pm56,26$	110%	
Cérebro	$16,\!42 \pm 3,\!19$	$27,11 \pm 4,73$	65%	
Pele	$213\pm60$	$592,1 \pm 161,2$	278%	
Gastrocnêmio	$271,3 \pm 64,25$	$434,7 \pm 113,6$	-	
Testículo	$43,18 \pm 10,73$	$129 \pm 45,40$	199%	

Tec.adiposo marrom	$52,76 \pm 13,77$	$135,9 \pm 25,27$	157%
Tec.adiposo branco	$294,7 \pm 82,41$	$338 \pm 79{,}18$	-

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. WT, Wild-Type (n = 8 camundongos) e KO-Mas, *knockout* para o receptor *Mas* da Ang-(1-7) (n = 8 camundongos). \* P < 0,05, test-*t* Student.

A tabela 21 mostra os valores de fluxo sanguíneo regional dos órgãos de camundongos KO-*Mas* e seus controles WT. Os camundongos KO-*Mas* apresentaram fluxo sanguíneo menor que os animais WT para os pulmões, adrenais, mesentério, cérebro, pele abdominal, baço, testículos e tecido adiposo marrom interescapular. As diferenças em percentagem também estão representadas na tabela 21.

Tabela 21. Fluxo sanguíneo regional de camundongos WT e KO-Mas, no estado basal
com idade entre 36 e 44 semanas, e respectivas diferenças em percentagem.

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>				
	WT	KO-Mas	% diferença		
Rins	$15,03 \pm 2,62$	$11,35 \pm 2,26$	-		
Pulmões	$16,00 \pm 5,27$	5,07 ± 1,93*	68%		
Adrenais	$24,\!06\pm4,\!26$	12,11 ± 2,81*	49%		
Coração	$22,01 \pm 5,23$	$15,61 \pm 3,64$	-		
Baço	$3,24\pm0,77$	$1,60 \pm 0,29*$	51%		
Mesentério	$0,\!99\pm0,\!32$	$0,3\ 8\pm 0,07*$	62%		
Cérebro	$4,\!81\pm0,\!75$	$2,68 \pm 0,51*$	44%		
Pele	$0,58 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,05*$	67%		

Gastrocnêmio	$0,\!39\pm0,\!08$	$0,25\pm0,06$	-
Testículo	$2,\!48\pm0,\!58$	$1,18 \pm 0,28*$	52%
Tec.adiposo marrom	$2,73 \pm 1,05$	$0,83 \pm 0,29*$	69%
Tec.adiposo branco	$0,\!09\pm0,\!03$	$0,02 \pm 0,006$	-

Valores são representados pela média ± SE. Wild-Type (WT; n = 8) e knockout (KO-*Mas*, n = 8). \* P < 0,05, test-*t* Student.

A tabela 22 sumariza os efeitos da deleção genética do receptor Mas, em camundongos jovens e mais velhos, na regulação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais.

Tabela 22. Sumário dos efeitos da deleção genética do receptor Mas na regulação dos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais em camundongos jovens e mais velhos, comparados aos animais controle de mesma idade.

	Deleção genética do Mas (Camundongosjovens)	Deleção genética do Mas (Camundongos mais velhos)
Índice cardíaco	Ļ	Ļ
Volume sistólico	Ļ	Ļ
Resistência periférica total	1	1
Pressão arterial média	não alterou	não alterou
Adrenais	<b>↑</b>	1
Pulmões	Î	1
Tecido adiposo marrom	Ť	1
Mesentério	<b>↑</b>	1
Baço	<b>↑</b>	1
Rins		não alterou
Testículos	Ļ	1
Cérebro	não alterou	1
Pele abdominal	não alterou	↑ (
Coração	não alterou	não alterou
Tecido adiposo branco	não alterou	não alterou
Músculo gastrocnêmio	não alterou	não alterou

4.5. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados no estado basal e após a infusão de [d-Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7) (A779) na dose de 11 pmol/min/10min

As figuras 39, 40, 41, 42 e 43 ilustram, respectivamente, a PAM, DC, IC, VS e RPT de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min. A infusão de A-779, nesta dose, não causou alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos sistêmicos citados, bem como na FC. Os valores obtidos estão descritos na tabela 23.



**Figura 39.** Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.


**Figura 40.** Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 41.** Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 42.** Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 43.** Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.

**Tabela 23.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min.

	SD no estado basal	SD após a infusão
		de A-779
Pressão arterial (mmHg)	94 ± 6	90 ± 7
Freqüência cardíaca (bpm)	$361 \pm 10$	$351 \pm 12$
Débito cardíaco (ml/min)	$89,53 \pm 4,54$	$78,\!46\pm5,\!22$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$22,\!36\pm1,\!40$	$19{,}62 \pm 1{,}51$
Volume sistólico (ml)	$0,\!24\pm0,\!01$	$0{,}21\pm0{,}02$
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	$4,\!34\pm0,\!28$	$4,\!46\pm0,\!32$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 6 ratos). test-*t* Student.

A infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min em ratos SD, não promoveu aumento significativo das resistências vasculares regionais de nenhum dos órgãos analisados. Nas figuras 44, 45, 46, 47 e 48 estão demonstradas as resistências vasculares no estado basal e após a infusão de A-779 e na tabela 24, estão descritos os valores obtidos para cada órgão.





**Figura 44.** Resistência vascular dos rins, cérebro e baço de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 45.** Resistência vascular dos pulmões e mesentério de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 46.** Resistência vascular dos testículos, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo marrom interescapular de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 47.** Resistência vascular da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.



**Figura 48.** Resistência vascular das adrenais e coração de ratos Sprague-Dawley (SD; n=6), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min. test-*t* Student.

**Tabela 24**. Resistência vascular regional de ratos SD no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min.

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g		
-	SD no estado basal	SD após a infusão de A-779	
Rins	$20,\!07\pm2,\!30$	$22,03 \pm 3,46$	
Pulmões	$113,5\pm18,84$	$163,0 \pm 34,50$	
Adrenais	$7{,}24 \pm 1{,}06$	$7{,}91 \pm 1{,}46$	
Coração	$9{,}67 \pm 0{,}99$	$9,63 \pm 1,42$	
Baço	$50,\!13\pm10,\!32$	$69,\!18\pm14,\!15$	
Mesentério	$195{,}4\pm50{,}98$	$224,1\pm48,87$	
Cérebro	$58{,}23 \pm 2{,}85$	$60,\!88\pm5,\!57$	
Pele	$664,\!4\pm75,\!07$	$848,1 \pm 158,7$	
Gastrocnêmio	$291,5\pm111,6$	$444,1 \pm 172,6$	
Testículo	$376,3\pm83,55$	$470,2 \pm 69,44$	
Tec.adiposo marrom	$290,3\pm75,55$	$296,2\pm90,32$	
Tec.adiposo branco	1361 ± 247,2	$1872\pm400{,}9$	

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 6 ratos). test-*t* Student.

Os valores de fluxo sanguíneo dos órgãos de ratos SD no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min, estão representados na tabela 25. De forma similar aos resultados obtidos de resistência vascular regional, a infusão de A-779 nesta dose, não promoveu alterações significativas do fluxo sanguíneo regional de nenhum dos órgãos analisados.

	Fluxo sanguíne	o, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>
	Basal	A-779
Rins	4,31 ± 0,30	4,10±0,35
Pulmões	$1,45 \pm 0,64$	$1,31 \pm 0,76$
Adrenais	$14,56 \pm 3,86$	13,69 ± 3,68
Ventrículo esquerdo	$9,\!45 \pm 1,\!05$	$10,05 \pm 1,76$
Baço	$2,21 \pm 0,56$	$1,38\pm0,16$
Mesentério	$0,60 \pm 0,14$	$0,\!45\pm0,\!08$
Cérebro	$1,\!49\pm0,\!09$	$1,43 \pm 0,12$
Pele abdominal	$0,13\pm0,01$	$0,11 \pm 0,02$
Músculo gastrocnêmio	$0,\!48 \pm 0,\!12$	$0,35\pm0,10$
Testículos	$0,22 \pm 0,04$	$0,18\pm0,02$
Tecido adiposo marrom	$0,55 \pm 0,28$	$0,53 \pm 0,23$

**Tabela 25**. Fluxo sanguíneo regional de ratos SD, anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10 min.

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD, Sprague-Dawley (n = 6 ratos). test-*t* Student.

 $0,07 \pm 0,01$ 

 $0.06 \pm 0.007$ 

Tecido adiposo branco

4.6. Avaliação hemodinâmica de ratos Transgênicos TGR(A1-7)3292 anestesiados no estado basal e após a infusão de [d-Ala<sup>7</sup>]-Ang-(1-7) (A779) na dose de 11 pmol/min/10min

As figuras 49, 50, 51, 52 e 53 demonstram, respectivamente, a PAM, DC, IC, VS e RPT de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min. A infusão de A-779 nesta dose, não promoveu alterações da PAM, FC e RPT, no entanto diminuiu de forma significativa o DC, IC e VS. Os valores obtidos estão descritos na tabela 26.



**Figura 49**. Pressão arterial média de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.



**Figura 50**. Débito cardíaco de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 51**. Índice cardíaco de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 52**. Volume sistólico de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. \* P < 0,05, test-*t* Student.





**Figura 53.** Resistência periférica total de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.

**Tabela 26.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min.

	TG no estado basal	TG após a infusão
		de A-779
Pressão arterial (mmHg)	$98 \pm 3$	94 ± 5
Freqüência cardíaca (bpm)	$349 \pm 11$	$337\pm9$
Débito cardíaco (ml/min)	$93,\!48\pm6,\!02$	$80,\!10\pm3,\!00$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$27,\!39\pm2,\!04$	$23,\!47 \pm 1,\!26$
Volume sistólico (ml)	$0,\!27\pm0,\!01$	$0,\!23\pm0,\!009$
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	$\textbf{3,60} \pm \textbf{0,26}$	$3,\!83\pm0,\!12$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. TG, TGR(A1-7)3292 (n = 5 ratos). test-*t* Student.

As figuras 54, 55 e 56 comparam os valores de IC, VS e RPT de ratos SD no estado basal, após a infusão aguda de Ang-(1-7) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na mesma dose. O tratamento com A-779 reverteu os efeitos da Ang-(1-7) elevada agudamente e cronicamente sobre o IC e o VS, não reverteu a diminuição da RPT promovida provavelmente pelo aumento crônico de Ang-(1-7), porém, reverteu ao estado basal, a diminuição da RPT promovida pelo aumento agudo de Ang-(1-7).



**Figura 54.** Comparação do índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley no estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang-(1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. \* P < 0,05, ANOVA seguido de test-*t* Student.



**Figura 55.** Comparação do volume sistólico de ratos Sprague-Dawley no estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang-(1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. \* P < 0,05, ANOVA seguido de test-*t* Student.



**Figura 56.** Comparação da resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley no estado basal (SD basal), após a infusão aguda de Ang-(1-7) (SD Ang-(1-7)) na dose de 0,11 pmol/min/10min e após a infusão de A-779 (SD A-779) na dose de 11 pmol/min/10min e de ratos TGR(A1-7)3292 no estado basal (TG basal) e após a infusão aguda de A-779 (TG A-779) na mesma dose. \* P < 0,05, ANOVA seguido de test-*t* Student.

As figuras 57, 58, 59, 60 e 61 demonstram as resistências vasculares dos rins, cérebro, baço, coração, adrenais, pele abdominal, tecido adiposo branco epididimal, testículos, mesentério, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo marrom interescapular e pulmões no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min em ratos TG anestesiados. Assim como nos animais SD, a infusão aguda de A-779 não alterou de forma significativa as resistências vasculares de nenhum dos órgãos

analisados. Os valores de resistências vasculares regionais obtidos estão descritos na tabela 27.



**Figura 57**. Resistência vascular regionaL dos rins, cérebro e baço de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão aguda de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.



**Figura 58**. Resistência vascular regional do coração e adrenais de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.



**Figura 59**. Resistência vascular regional da pele e tecido adiposo branco epididimal de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.



**Figura 60**. Resistência vascular regional dos testículos, mesentério e músculo gastrocnêmio de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.



## Resistência Vascular Regional

**Figura 61**. Resistência vascular regional do tecido adiposo marrom interescapular e pulmões de ratos transgênicos (TG; n=5), anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11pmol/min/10min. test-*t* Student.

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g		
-	TG no estado basal	TG após a infusão de A-779	
Rins	23,66 ± 3,07	26,90 ± 3,95	
Pulmões	$102,2\pm19,19$	$154,8\pm64,03$	
Adrenais	$\textbf{4,61} \pm \textbf{0,62}$	$4,\!65\pm0,\!53$	
Coração	$9{,}20\pm1{,}91$	$7,66 \pm 1,54$	
Baço	$34,\!42 \pm 4,\!41$	$69,\!28\pm16,\!30$	
Mesentério	$250,0\pm39,\!61$	$338,7\pm52,59$	
Cérebro	$65,\!86\pm5,\!79$	$66,46 \pm 6,12$	
Pele	$650, 6\pm156, 8$	$709,6 \pm 124,5$	
Gastrocnêmio	$178,9\pm39,77$	$290,7 \pm 115,2$	
Testículo	$267,4\pm54,11$	$310,1 \pm 68,79$	
Tec.adiposo marrom	$220,3\pm65,75$	$127,4 \pm 17,87$	
Tec.adiposo branco	$1655 \pm 294,8$	$1954 \pm 166,4$	

**Tabela 27**. Resistência vascular regional de ratos TG no estado basal e após a infusãoaguda de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min.

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. TG, TGR(A1-7)3292 (n = 5 ratos). test-t

Student.

A tabela 28 mostra o fluxo sanguíneo regional de órgãos de ratos TG no estado basal e após a infusão aguda de A-779. De forma similar às resistências vasculares regionais, o A-779 não promoveu alterações significativas do fluxo sangüíneo regional de nenhum dos órgãos analisados.

-	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>		
	Basal	A-779	
Rins	4,35 ± 0,81	$3,67\pm0,66$	
Pulmões	$1,\!80\pm0,\!57$	$1,42 \pm 0,55$	
Adrenais	$22,47 \pm 4,16$	$20,64 \pm 3,00$	
Ventrículo esquerdo	$12,42 \pm 2,66$	$14,12 \pm 3,06$	
Baço	$2,\!49\pm0,\!27$	$1,66 \pm 0,42$	
Mesentério	$0,40\pm0,06$	$0,29\pm0,05$	
Cérebro	$1,\!48\pm0,\!16$	$1,41 \pm 0,18$	
Pele abdominal	$0,16\pm0,06$	$0,15\pm0,04$	
Músculo gastrocnêmio	$0,68 \pm 0,20$	$0,52 \pm 0,20$	
Testículos	$0,35\pm0,07$	$0,32 \pm 0,07$	
Tecido adiposo marrom	$0,60 \pm 0,16$	$0,70\pm0,07$	
Tecido adiposo branco	$0,06 \pm 0,01$	$0,04\pm0,009$	

**Tabela 28**. Fluxo sanguíneo regional de ratos TG, anestesiados com uretana, no estado basal e após a infusão de A-779 na dose de 11 pmol/min/10min.

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. Transgênico (TG; n = 5) no estado basal e após infusão de A-779. \* P < 0,05, test-*t* Student.

4.7. Avaliação hemodinâmica de ratos Sprague-Dawley anestesiados tratados cronicamente com mini-bombas osmóticas contendo salina ou A-779 na dose de 0,5µg/100g/hora.

O tratamento de ratos SD com mini-bombas osmóticas liberando A-779 na taxa de 0,5 μg/100g/hora, durante sete dias, não promoveu alterações significativas na PAM, DC, IC, VS e RPT quando comparados aos animais controle, que receberam tratamento apenas com veículo (salina estéril 0,9%). Esses dados estão ilustrados nas figuras 62, 63, 64, 65 e 66. Os valores obtidos para cada parâmetro estão descritos na tabela 29.



**Figura 62.** Pressão arterial média de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 63.** Débito cardíaco de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 64.** Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 65.** Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 66.** Resistência Periférica Total de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.

**Tabela 29.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos SD tratados cronicamente com veículo ou com A-779 na dose de 0,5 μg/100g/hora.

	SD controle	SD tratado cronicamente
		<i>com A</i> <b>-</b> 779
Pressão arterial (mmHg)	$88 \pm 3$	$94 \pm 4$
Freqüência cardíaca (bpm)	$354\pm18$	$356\pm11$
Débito cardíaco (ml/min)	$128,9 \pm 17,\!61$	$134,2\pm19,42$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$38,\!85\pm5,\!06$	$30{,}86 \pm 4{,}56$
Volume sistólico (ml)	$0,\!39\pm0,\!05$	$0{,}38\pm0{,}05$
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>1</sup> .min.100g)	$2{,}74\pm0{,}57$	$3{,}53\pm0{,}63$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD controle (n = 6) e SD tratados por 7 dias com A-779 (n = 7). test-*t* Student.

Assim como no tratamento agudo, o tratamento crônico de ratos SD com A-779, não alterou as taxas de fluxo sanguíneo e resistência vascular regional para nenhum dos órgãos analisados (figuras 67, 68, 69, 70 e 71). Os valores de resistência vascular e fluxo sanguíneo regionais estão descritos nas tabelas 30 e 31, respectivamente.



**Figura 67**. Resistência vascular regional dos rins, cérebro, tecido adiposo marrom interescapular e pulmões de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo salina (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 68**. Resistência vascular regional do mesentério e baço de ratos Sprague-Dawley anestesiados tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na doce de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.





## 22.5 20.0-17.5-15.0-12.5-10.0-7.5-5.0-2.5-0.0adrenal coração

**Resistência Vascular Regional** 

**Figura 70**. Resistência vascular regional das adrenais e coração de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.



**Figura 71.** Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos Sprague-Dawley anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=6) ou A-779 (n=7) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g		
-	SD controle	SD tratado cronicamente	
		<i>com A</i> -779	
Rins	$38,\!84 \pm 13,\!34$	$41,04 \pm 13,52$	
Pulmões	$62,\!41 \pm 29,\!91$	$59,\!65\pm25,\!98$	
Adrenais	$10,\!25 \pm 3,\!24$	$15,\!32\pm4,\!68$	
Coração	$9{,}74 \pm 1{,}83$	$13,\!49\pm3,\!74$	
Baço	$65,\!04 \pm 18,\!40$	$92,11 \pm 25,43$	
Mesentério	$205{,}2\pm51{,}0$	$336,6 \pm 118,1$	
Cérebro	$56,\!49 \pm 9,\!69$	$81,\!14 \pm 14,\!00$	
Pele	$1098 \pm 274{,}3$	$1132 \pm 304,6$	
Gastrocnêmio	$238,2\pm123,9$	$474,0 \pm 213,8$	
Testículo	$449,9 \pm 168,8$	815,3 ± 225,1	
Tec.adiposo marrom	$128,\!6\pm64,\!20$	$120,9 \pm 34,18$	
Tec.adiposo branco	$449,5 \pm 142,7$	$917,1 \pm 291,8$	

**Tabela 30**. Resistência vascular regional de ratos SD tratados cronicamente com veículo (salina fisiológica estéril) ou com A-779 na dose de  $0.5 \mu g/100g/hora$ .

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD controle (n = 6) e SD tratados por 7 dias

com A-779 (n = 7). test-t Student.

**Tabela 31**. Fluxo sanguíneo regional de ratos Sprague-Dawley anestesiados tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo ou A-779 na dose de  $0,5\mu g/100 g/hora$ .

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>		
	Basal	A-779	
Rins	3,81 ± 0,94	3,27 ± 0,64	
Pulmões	$5,04 \pm 3,00$	$4,11 \pm 1,27$	
Adrenais	$14,\!73\pm5,\!00$	$10,03 \pm 4,22$	
Coração	$10,\!74\pm1,\!85$	$9,80 \pm 2,12$	
Baço	$1,\!97\pm0,\!49$	$1,43 \pm 0,44$	
Mesentério	$0,59 \pm 0,17$	$0,35 \pm 0,08$	
Cérebro	$1.73\pm0.2102$	$1,27\pm0,21$	
Pele abdominal	$0,12 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$	
Músculo gastrocnêmio	$0,88 \pm 0,26$	$0,54\pm0,16$	
Testículos	$0,77 \pm 0,38$	$0,13 \pm 0,05$	
Tecido adiposo marrom	3,66 ± 2,01	$1,\!39\pm0,\!48$	
Tecido adiposo branco	$0,\!19\pm0,\!07$	$0,06\pm0,02$	

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. SD controle (n = 6) e SD tratados por 7 dias com A-779 (n = 7). test-*t* Student.

4.8. Avaliação hemodinâmica de ratos Transgênicos TGR(A1-7)3292 anestesiados tratados cronicamente com mini-bombas osmóticas contendo salina ou A-779 na dose de 0,5μg/100g/hora.

As figuras 72, 73, 74, 75 e 76 ilustram respectivamente a PAM, DC, IC, VS e RPT de ratos TG tratados cronicamente com salina ou com A-779 na taxa de 0,5  $\mu$ g/100g/hora. O tratamento foi realizado através da liberação do antagonista angiotensinérgico, por sete dias, por mini-bombas osmóticas. Ocorreu redução

significativa do DC, IC e VS e aumento significativo da RPT. No entanto, não foram observadas alterações da PAM e FC. Os valores obtidos estão descritos na tabela 32.



**Figura 72.** Pressão arterial média de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora.$  test-*t* Student.



**Figura 73.** Débito cardíaco de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.



Figura 74. Índice cardíaco de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 75.** Volume sistólico de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100 g/hora$ . \* P < 0,05, test-*t* Student.



**Figura 76.** Resistência periférica total de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.

**Tabela 32.** Média dos valores de pressão arterial, freqüência cardíaca, débito cardíaco, índice cardíaco, volume sistólico e resistência periférica total de ratos TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo ou com A-779 na dose de 0,5 μg/100g/hora.

	TG controle	TG tratado cronicamente
		<i>com A</i> -779
Pressão arterial (mmHg)	83 ± 4	$86 \pm 4$
Freqüência cardíaca (bpm)	$313\pm9$	$307 \pm 10$
Débito cardíaco (ml/min)	$142,5\pm23,\!68$	$93,\!76\pm10,\!44$
Índice cardíaco (ml.min <sup>-1</sup> .100g)	$40{,}51\pm6{,}31$	$26,\!08\pm3,\!26$
Volume sistólico (ml)	$0,\!46\pm0,\!07$	$0,\!30\pm0,\!03$
Resistência periférica total (mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.100g)	$2,\!15\pm0,\!44$	$3,\!47 \pm 0,\!44$

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. TG controle (n = 7) e TG tratados por 7

dias com A-779 (n = 8). test-*t* Student.

As figuras 77, 78 e 79 demonstram, respectivamente, os valores de IC, VS e RPT de ratos SD e TG tratados cronicamente com veículo (salina 0,9%) ou com A-779 na dose de 0,5µg/100g/hora. O tratamento crônico com A-779 não alterou os IC, VS e RPT de ratos SD quando comparados ao estado basal, porém, reverteu o aumento observado nesses parâmetros promovidos provavelmente pelo aumento crônico de Ang-(1-7) em ratos TG, quando comparados aos ratos controle.



**Figura 77.** Índice cardíaco de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora * P < 0.05$ , test-*t* Student.

•



**Figura 78.** Volume sistólico de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora * P < 0.05$ , test-*t* Student.



**Figura 79.** Resistência periférica total de ratos Sprague-Dawley e TGR(A1-7)3292 tratados cronicamente com veículo (SD controle; TG controle) ou com A-779 (SD A-779; TG A-779) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora * P < 0.05$ , test-*t* Student.

O tratamento crônico de ratos TG com A-779 promoveu aumento significativo da resistência vascular dos rins, pulmões, baço e testículos. No entanto, não alterou as resistências vasculares dos demais órgãos analisados, como demonstrado nas figuras 80, 81, 82 e 83. Os valores de resistências vasculares regionais obtidos estão descritos na tabela 33.



**Figura 80.** Resistência vascular regional dos rins, coração, pulmões e adrenais de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 81.** Resistência vascular regional do baço e cérebro de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.



**Figura 82.** Resistência vascular regional dos testículos, tecido adiposo marrom interescapular, mesentério e músculo gastrocnêmio de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . \* P < 0.05, test-*t* Student.

## Resistência Vascular Regional 4500 Controle 4000 □ Tratado mmHg.ml<sup>-1</sup>.min.g 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500 0. pele tec.adip.branco

**Figura 83.** Resistência vascular regional da pele abdominal e tecido adiposo branco epididimal de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados, tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo (n=7) ou A-779 (n=8) na dose de  $0.5\mu g/100g/hora$ . test-*t* Student.

**Tabela 33**. Resistência vascular regional de ratos TG tratados cronicamente com veículo (salina fisiológica estéril) ou com A-779 na dose de 0,5  $\mu$ g/100g/hora e respectivos aumento em percentagem.

	Resistência Vascular Regional, mmHg.ml <sup>-1</sup> .min.g		
	TG controle	TG tratado com A-779	% aumento
Rins	$13,85 \pm 2,40$	28,45 ± 3,43*	103%
Pulmões	$7{,}45\pm0{,}53$	$21,46 \pm 7,25*$	88%
Adrenais	$7{,}92 \pm 1{,}10$	$9{,}69 \pm 1{,}39$	-
Coração	$8{,}52 \pm 1{,}55$	$12,59 \pm 2,70$	-
Baço	$41,\!14\pm8,\!12$	$83,\!24 \pm 21,\!45*$	102%
Mesentério	$208{,}8\pm25{,}18$	$217,9\pm48,62$	-
Cérebro	$60,\!81\pm8,\!60$	$60,\!82\pm10,\!61$	-
Pele	$1135\pm277{,}8$	$1146 \pm 343,3$	-
Gastrocnêmio	$248,\!4\pm81,\!44$	$512,4 \pm 182,5$	-
Testículo	$157,1\pm53,55$	$471,5 \pm 130,2*$	200%
Tec.adiposo marrom	$342,2 \pm 141,2$	$397,9 \pm 191,4$	-
Tec.adiposo branco	$2127 \pm 415,3$	$3515 \pm 684,6$	-

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. TG controle (n = 7) e TG tratados por 7 dias com A-779 (n = 8). test-*t* Student.

O fluxo sanguíneo regional dos órgãos analisados apresentou comportamento semelhante ao da resistência vascular. Os animais que receberam tratamento crônico com A-779 apresentaram fluxo sanguíneo menor para os rins, pulmões, baço e testículos quando comparados aos ratos tratados com veículo. A tabela 34 demonstra os valores de fluxos sanguíneos regionais obtidos, bem como a diminuição em percentagem quando comparados TG tratados com A-779 e TG tratados com veículo.

**Tabela 34**. Fluxo sanguíneo regional de ratos TGR(A1-7)3292 anestesiados tratados por 7 dias com mini-bombas osmóticas contendo veículo ou A-779 na taxa de  $0.5\mu g/100 g/hora$  e percentagem de diminuição em relação ao controle.

	Fluxo sanguíneo, ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup>		
-	Controle	Tratamento	% diminuição
		crônico	
Rins	$6,\!67\pm0,\!92$	$3,28 \pm 0,30*$	51%
Pulmões	$11,83 \pm 1,73$	$5,41 \pm 1,73*$	54%
Adrenais	$12,\!49\pm3,\!10$	$10,\!66\pm1,\!88$	-
Ventrículo esquerdo	$10,\!99 \pm 1,\!45$	$10,\!85\pm3,\!76$	-
Baço	$2,92\pm0,74$	$1,38 \pm 0,34*$	53%
Mesentério	$0,36 \pm 0,04$	$0,\!39\pm0,\!06$	-
Cérebro	$1,46 \pm 0,14$	$1,\!74\pm0,\!28$	-
Pele	$0,\!09\pm0,\!02$	$0,\!10\pm0,\!02$	-
Gastrocnêmio	$0,67 \pm 0,24$	$0,\!48\pm0,\!17$	-
Testículo	$0,97 \pm 0,48$	$0,29\pm0,06$	70%
Tec.adiposo marrom	$1,57\pm0,82$	$1,05\pm0,55$	-
Tec.adiposo branco	$0,\!04\pm0,\!01$	$0,03 \pm 0,01$	-

Valores são representados pela média  $\pm$  SE. TG controle (n = 7) e TG tratados por 7 dias com A-779 (n = 8). \* P < 0,05, test-*t* Student.

**Tabela 35**. Sumário dos efeitos do bloqueio agudo e crônico com A-779 sobre osparâmetros hemodinâmicos sistêmicos e regionais de ratos SD e TG.

		Sprague-Dawley		TGR(A1-7)3292	
		Bloqueio agudo A-779	Bloqueio crônico A-779	Bloqueio agudo A-779	Bloqueio crônico A-779
	Índice cardíaco	não alterou	não alterou	Ļ	Ļ
	Volume sistólico	não alterou	não alterou	Ļ	Ļ
	Resistência periférica total	não alterou	não alterou	não alterou	<b>↑</b>
	Pressão arterial média	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Rins	não alterou	não alterou	não alterou	Ŷ
	Pulmões	não alterou	não alterou	não alterou	Ť
0	Baço	não alterou	não alterou	não alterou	Ŷ
	Testículos	não alterou	não alterou	não alterou	Ť
	Ventrículo esquerdo	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Adrenal	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Pele abdominal	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Tecido adiposo branco	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Cérebro	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Tecido adiposo marrom	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Mesentério	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou
	Músculo gastrocnêmio	não alterou	não alterou	não alterou	não alterou

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos valores maiores de DC, IC e VS em ratos TGR(A1-7)3292 (TG). Além disso, observamos que a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos Sprague-Dawley (SD), aumentou de forma significativa esses parâmetros.

Várias pesquisas têm demonstrado a participação da Ang-(1-7) na regulação da função cardíaca (Ferreira *et al.*, 2002; Loot *et al.*, 2002; Schmaier, 2003; Santos *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2005). Sampaio *et al.* (2003) demonstraram que a Ang-(1-7), infundida agudamente em ratos Wistar anestesiados, aumentou o DC e o VS e que este efeito não foi abolido na presença de antagonista de Ang-(1-7), A-779. Loot *et al.* (2002) observaram que a infusão crônica de Ang-(1-7) preservou a função cardíaca em modelos de ratos de falência cardíaca. Mais recentemente, Santos *et al.* (2004) demonstraram que ratos TGR(A1-7)3292 apresentaram uma melhor função cardíaca quando comparados aos animais SD. Também observaram que os efeitos da Ang-(1-7) na função cardíaca podem ser mediados pelo seu receptor específico *Mas*, uma vez que camundongos *knockout* para este receptor apresentaram piora da função cardíaca quando comparados aos animais controle (Santos *et al.*, 2006). Corroborando esses dados, observamos que camundongos *knockout* para o receptor *Mas* (KO-*Mas*) apresentaram DC, IC e VS reduzidos em relação aos animais controle *Wild-type* (WT).

Por outro lado, o tratamento tanto agudo quanto crônico, com A-779 de ratos SD não alterou esses parâmetros. No entanto, em ratos TG, o tratamento agudo e crônico com A-779 reverteu o aumento de DC, IC e VS, possivelmente produzido pelo aumento crônico de Ang-(1-7). Esses resultados sugerem que o aumento crônico dos níveis
plasmáticos de Ang-(1-7), nesse rato, tenha aumentado a expressão ou a sensibilidade dos receptores *Mas* envolvidos na regulação da função cardíaca.

Dessa forma, os dados obtidos sugerem que a Ang-(1-7) exerce efeito inotrópico positivo sobre a função cardíaca, uma vez que tanto o aumento agudo quanto o crônico deste peptídeo, resultou em aumento da força contrátil do coração. Além disso, parece que esse efeito ocorre pela ativação do receptor *Mas*, já que a deleção genética e o bloqueio farmacológico deste receptor em ratos TG, resultou em piora da contratilidade cardíaca.

No entanto, não é possível excluir um efeito venoconstritor da Ang-(1-7), promovendo aumento do retorno venoso e resultando em aumento indireto da força de contração cardíaca pelo mecanismo de Frank-Starling. Há poucos estudos na literatura referentes à ação da Ang-(1-7) no leito venoso. Foi observado que, em anéis de veia portal de ratos, a Ang-(1-7) não alterou o diâmetro do vaso quando comparado ao veículo (Gurzu *et al.*, 2005). No entanto, em veias femorais de cães, a Ang-(1-7) potencializou a ação vasoconstritora da bradicinina (Hecker *et al.*, 1997). Mensurações dos diâmetros dos diferentes leitos venosos são necessárias para excluir esse possível efeito venoconstritor.

Benter *et al.* (1993) observaram que a Ang-(1-7) causou um efeito pressor/depressor, com predominância do componente depressor, quando injetada na circulação sanguínea de ratos SD. Dois anos mais tarde, após a administração crônica de Ang-(1-7), observaram redução da pressão sanguínea em ratos SHR, mas não em ratos *Wistar* e SD. Além disso, redução da pressão sanguínea foi demonstrada em pacientes gravemente hipertensos tratados com inibidor de ECA (Thibonnier *et al.*, 1981).

144

Santos *et al.* (2004), ao realizar medidas hemodinâmicas por radiotelemetria em ratos TG e SD, observaram que as médias dos valores de pressão arterial não foram diferentes entre os grupos. Resultados similares foram obtidos por Braga *et al.* (2002) e Sampaio *et al.* (2003), que observaram que o aumento crônico e o agudo de Ang-(1-7), respectivamente, no plasma de ratos Wistar, não alteraram os valores da pressão arterial média. Observaram, também, que a deleção genética do receptor *Mas* não alterou as médias de pressão arterial em camundongos Black C57/6 (Santos *et al.* 2006), embora Xu *et al.* (2008) tenham demonstrado que a deleção do *Mas* em camundongos FVB/N resultou em aumento da pressão arterial. As medidas de PAM realizadas no presente estudo confirmam essas observações, demonstrando que o aumento agudo ou crônico de Ang-(1-7), no plasma de animais normotensos, e que a deleção genética do receptor *Mas*, não alteram as médias de pressão arterial.

Há vários estudos na literatura demonstrando que a Ang-(1-7) exerce efeitos diversos sobre a freqüência cardíaca (FC). Braga *et al.* (2002) observaram que o aumento crônico de Ang-(1-7) causou bradicardia em ratos normotensos, enquanto Santos *et al.* (2004) observaram que ratos TGR(A1-7)3292 apresentaram FC maior quando comparados aos ratos controle. No entanto, outros autores demonstraram que a infusão aguda ou crônica de Ang-(1-7) não alterou a FC (Benter *et al.*, 1995; Strawn *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 2003), sugerindo que os diferentes modos de coleta utilizados podem interferir nos valores de FC, como: método utilizado para registro da FC, tempo de tratamento, tipo de experimento, se *in vivo* ou *in vitro*, dose de Ang-(1-7) utilizada e se a mensuração foi realizada em animais acordados ou anestesiados.

Observamos que os ratos TG apresentaram valores de FC significativamente menores que os ratos SD, ao contrário de Santos *et al.* (2004). No entanto, estes autores realizaram medidas hemodinâmicas em animais acordados utilizando telemetria, enquanto, neste trabalho, as medidas foram realizadas de forma aguda e em animais anestesiados. Além disso, há estudos demonstrando que a uretana é capaz de promover queda acentuada da FC (Bunag *et al.*, 1972). Assim, a utilização de uretana pode ter contribuído para reduzir a FC tanto dos ratos TG quanto dos SD, porém com efeito mais pronunciado nos ratos TG. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o efeito da anestesia sobre esses animais. Por sua vez, a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos SD, não alterou as médias de FC.

Em camundongos KO-Mas, observamos que a deleção genética do Mas também não alterou os valores de FC, como demonstrado por Santos *et al.* (2006) em camundongos acordados e anestesiados da mesma linhagem.

É conhecido que muitos fatores locais e sistêmicos regulam a função das células musculares lisas, determinando o tônus vascular e, conseqüentemente, a perfusão sanguínea tecidual. Dentre esses fatores, destacam-se a Ang II com seu efeito vasoconstritor e a Ang-(1-7) com seu efeito vasodilatador (Osei *et al.*, 1993; Porsti *et al*, 1994; Brosnihan *et al*, 1996; Roks *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2005).

No presente estudo, foi observado que os rins, testículos, pulmões e baço de ratos TG, quando comparados aos mesmos órgãos de ratos SD, apresentaram perfusões sanguíneas significativamente maiores. Foi observado, também, que a infusão aguda de Ang-(1-7), em ratos SD, promoveu alterações semelhantes nas perfusões sanguíneas regionais, exceto no baço.

Corroborando esses dados, Ren et al. (2002) e Sampaio et al. (2003), observaram efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em arteríolas aferentes renais précontraídas de coelhos e em leito vascular renal de ratos Wistar, respectivamente. Esses autores demonstraram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito renal é mediado por receptor específico, uma vez que este efeito foi abolido na presença de A-779. Além disso, Ren et al. (2002), observaram também, que na presença de L-NAME o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) nos rins foi abolido, mas não na presença de indometacina e de antagonistas específicos de receptores AT1 e AT2 da Ang II. De acordo com os estudos citados acima, observou-se que a deleção genética do receptor Mas em camundongos jovens, promoveu redução da perfusão sanguínea renal, sugerindo a participação do receptor Mas na modulação do tônus vascular dos rins. Além disso, observou-se também, que o tratamento crônico com A-779 de ratos TG reverteu o efeito vasodilatador renal da Ang-(1-7) elevada cronicamente no plasma. No entanto, o bloqueio agudo com A-779 não alterou a perfusão sanguínea renal, de acordo com estudos de Sampaio et al. (2007), que observaram que a estimulação da liberação de NO pela Ang-(1-7) em células de ovário de hamster chinês perdurou por tempo superior a 30 minutos, sugerindo que a cascata de sinalização desencadeada pela Ang-(1-7) não possa ser bloqueada de forma aguda.

Rins de camundongos KO-*Mas* mais velhos não apresentaram diferenças de resistência vascular quando comparados a rins de camundongos WT de mesma idade, diferentemente do observado em camundongos jovens. Esse resultado sugere alteração do leito vascular renal com o processo de envelhecimento, como enrijecimento e menor resposta aos agentes vasodilatadores, porém, estudos adicionais são necessários para averiguar essa hipótese.

No leito vascular testicular não há evidências diretas de efeito vasodilatador da Ang-(1-7), porém, foi observado que os testículos constituem um dos locais de maior expressão do RNAm, para o receptor *Mas* (Alenina *et al.*, 2002) e para a enzima formadora de Ang-(1-7), a ECA2 (Donoghue *et al.*, 2000). Neste estudo, foi observado que além do efeito vasodilatador da Ang-(1-7) elevada cronicamente e agudamente no plasma de ratos TG e SD, respectivamente, camundongos KO-*Mas* mais velhos apresentaram perfusão sanguínea testicular reduzida quando comparados a animais controle de mesma idade. Além disso, o bloqueio crônico com A-779, reverteu o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) sobre os testículos de ratos TG, sugerindo importante papel modulatório do eixo Ang-(1-7)/*Mas* nas funções fisiológicas e efeito vasodilatador da Ang-(1-7) mediado pelo receptor *Mas* e dependente da liberação de NO, corroborando dados de Sampaio *et al.* (2007), já que o bloqueio agudo não alterou a perfusão sanguínea desses órgãos.

De forma interessante, os testículos de camundongos KO-*Mas* jovens quando comparados aos testículos de animais controle de mesma idade, apresentaram perfusão sanguínea tecidual significativamente maior, sugerindo que em testículos de camundongos KO-*Mas* jovens, exista outra via de sinalização envolvida no controle do tônus vascular. Em adição, nos animais WT, parece que essa via é substituída pela via mediada pelo receptor *Mas* com o processo de envelhecimento, uma vez que Alenina *et al.*(2002) demonstraram que a expressão do receptor *Mas* começa a se tornar visível no 18° dia após o nascimento, atingindo seu pico máximo no 6° mês de vida.

Nos pulmões, a existência de SRA foi demonstrada por Orte *et al.* (2000) e Kuba *et al.* (2006). A expressão da ECA2, por exemplo, em pulmões humanos saudáveis ou doentes, demonstrou que essa enzima protege os pulmões de mamíferos de injúria pulmonar severa. Foi observado que em patologias como a hipertensão pulmonar, a Ang Il exerce importante participação no processo de remodelamento vascular, via receptor AT1 (Morrell et al., 1999) e tem sua produção aumentada por aumento na expressão da ECA endotelial (Studdy et al., 1983; Morrell et al., 1995). Assim, o fato da Ang-(1-7) contra-regular grande parte dos efeitos da Ang II e a ECA2 funcionar como enzima protetora contra injúria pulmonar, evidencia o importante papel da Ang-(1-7) na patofisiologia dos pulmões, promovendo vasodilatação, diminuindo os efeitos deletérios da Ang II sobre a função pulmonar, reduzindo os níveis de hipertensão pulmonar e melhorando a relação ventilação/perfusão. No presente estudo, observou-se efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na circulação brônquica, que trata-se de circulação totalmente independente da circulação proveniente da artéria pulmonar e de circulação não envolvida na regulação da relação ventilação-perfusão e sim na perfusão de brônquios e bronquíolos de condução. Porém, é possível sugerir efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito vascular pulmonar como um todo, uma vez que já foi demonstrado a participação de componentes do SRA na hipertensão pulmonar, por exemplo (Studdy et al., 1983). Além disso, observou-se também, que a deleção genética do receptor Mas promoveu aumento de tônus da vasculatura brônquica, assim como o bloqueio crônico com A-779 em ratos TG. No entanto, o bloqueio agudo com A-779 não causou alterações da perfusão sanguínea para o leito vascular brônquico. Esses resultados sugerem o envolvimento do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) sobre este leito vascular e de acordo com resultados obtidos por Sampaio et al. (2007), parece que esse efeito envolve a liberação de NO, uma vez que o tratamento agudo com A-779 não alterou a resistência vascular da circulação brônquica.

No leito vascular esplênico há poucos estudos avaliando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7). Porém, nossas observações vão de encontro aos resultados obtidos por Sampaio *et al.* (2003), que não observaram alteração da perfusão sanguínea para o baço após a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos *Wistar* anestesiados. O fato de apenas o aumento crônico de Ang-(1-7) no plasma ter desencadeado efeito vasodilatador do leito vascular esplênico, sugere aumento de expressão de receptor *Mas* como uma adaptação a esse aumento crônico. Além disso, a redução de perfusão sanguínea para o baço observado em camundongos KO-*Mas* e após o tratamento crônico com A-779 em ratos TG, sugere que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) sobre este leito vascular ocorre por ativação de receptor *Mas* e liberação de NO, como demonstrado por Sampaio *et al.* (2007).

Corroborando dados de Porsti *et al.* (1994) e Brosnihan *et al.* (1996), observamos que a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos SD, promoveu dilatação do leito vascular coronariano. Porém, não foi encontrado efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no coração de ratos TG quando comparados aos animais controle. Vários estudos demonstraram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7), no leito vascular coronário, varia conforme a dose utilizada, podendo causar vasodilação (Porsti *et al.*, 1994; Brosnihan *et al.*, 1996), vasoconstrição (Kumagai *et al.*, 1990; Neves *et al.*, 1997), ou não alterar a perfusão sanguínea tecidual (Gorelik *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2000). Além disso, Castro *et al.* (2005) observaram que, na presença de losartan, a Ang-(1-7) produziu vasodilatação coronariana, que foi completamente bloqueada na presença de A-779. No mesmo trabalho, resposta mais complexa foi obtida na presença de antagonista de receptor AT2, PD123319. O bloqueio de receptor AT2 produziu, por si só, aumento da pressão de perfusão, aumentada ainda mais na presença de Ang-(1-7). Em adição, camundongos KO-*Mas* apresentaram resistência vascular coronariana similar à dos animais WT e o tratamento agudo ou crônico, com A-779 de ratos SD e TG, não alterou a perfusão sanguínea coronariana. Esses resultados demonstram a necessidade de bloqueio simultâneo de receptores AT1, AT2 e *Mas*, para explicar o possível mecanismo envolvido nessa regulação. Porém, não pode ser descartada a hipótese de receptor distinto do *Mas* envolvido neste efeito ou a presença de metabólitos da Ang-(1-7).

O cérebro, glândulas adrenais e tecido adiposo marrom interescapular de ratos TG, apresentaram resistências vasculares regionais significativamente menores quando comparados aos mesmos órgãos de ratos SD. Resultados similares foram observados após a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos SD, no cérebro e tecido adiposo marrom. As glândulas adrenais, por sua vez, não apresentaram alteração de perfusão sanguínea após a infusão aguda de Ang-(1-7), corroborando dados de Sampaio *et al.* (2003).

O aumento de perfusão sanguínea cerebral após o estímulo agudo ou crônico com Ang-(1-7), confirmam dados de Meng e Busija (1993), Feterik *et al.* (2000) e Sampaio *et al.* (2003). Esses estudos observaram efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em microvasos cerebrais de porcos, em artérias cerebrais média de cães e aumento da perfusão sanguínea cerebral após a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos normotensos, respectivamente. Feterik *et al.* (2000) observaram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em artéria cerebral média de cães, ocorreu por liberação de NO das células endoteliais, uma vez que a remoção do endotélio e a adição de *L-NAME* aboliu este efeito, porém, observou que o A-779 foi incapaz de inibir o efeito vasodilatador da Ang-(1-7). Sampaio *et al.* (2003), por sua vez, observaram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi abolido na presença de A-779 em ratos *Wistar*, sugerindo a participação do receptor *Mas* nesse efeito vasodilatador. Além disso, observou-se no presente estudo, que camundongos KO-*Mas* mais velhos apresentaram redução de perfusão sanguínea cerebral quando comparados a animais WT de mesma idade, enquanto o bloqueio tanto agudo quanto crônico com A-779, não alterou a perfusão sanguínea para este órgão. Esses resultados sugerem que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no cérebro, varia conforme o leito vascular estudado e a espécie animal utilizada, já que em ratos *Wistar* o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) foi inibido pelo A-779, efeito não observado em ratos SD e TG, e em camundongos, o receptor *Mas* participar da regulação do tônus vascular cerebral. Além disso, em ratos SD, não pode ser descartada a hipótese de outro receptor além do *Mas* envolvido no efeito vasodilatador da Ang-(1-7) ou a presença de metabólitos da Ang-(1-7), como o D-Ala-Ang-(1-7) que tem demonstrado efeito vasodilatador não dependente do receptor Mas (comunicação pessoal).

No tecido adiposo marrom, não há estudos na literatura demonstrando a participação da Ang-(1-7) no controle do tônus vascular. Sabe-se que o SRA esta envolvido na patofisiologia de distúrbios associados à obesidade, resistência à insulina e a síndrome metabólica (ver Engeli *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008). Além disso, Campbell *et al.* (1993, 1995) e Shenoy & Cassis (1997), encontraram Ang I, Ang II, Ang-(1-9), Ang-(1-7) e Ang-(2-8) no tecido adiposo marrom, sugerindo produção endógena desses peptídeos e participação no controle do metabolismo, da perfusão tecidual e da atividade local do sistema nervoso simpático. Foi observado por nosso grupo, que medidas de perfusão sanguínea feitas no frio, demonstraram diminuição acentuada de tônus vascular do tecido adiposo marrom (dados não mostrados), evidenciando importante participação da Ang-(1-7) na termogênese corporal. Além disso, observou-se neste estudo, que a deleção genética do receptor *Mas* resultou em

diminuição significativa da perfusão sanguínea para o tecido adiposo marrom, evidenciando a participação do receptor *Mas* no controle do tônus vascular deste órgão. No entanto, o bloqueio agudo e crônico com A-779, não alterou a perfusão sanguínea do tecido adiposo marrom, sugerindo que em ratos SD, existe outro receptor além do *Mas* mediando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) ou a participação de metabólitos vasodilatadores da Ang-(1-7).

Com relação às glândulas adrenais, o aumento de perfusão tecidual após o tratamento agudo e crônico com Ang-(1-7), corroboram dados da literatura, que evidenciam o importante papel deste peptídeo nas funções e perfusão sanguínea das glândulas adrenais (Sampaio *et al.*, 2003; Mulroow, 1998; Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998). Além disso, observou-se que camundongos KO-*Mas* apresentaram diminuição de perfusão sanguínea para as glândulas adrenais quando comparados aos animais controle, sugerindo a participação do receptor *Mas* no controle do tônus vascular. Porém, o bloqueio tanto agudo quanto crônico com A-779, não alterou a perfusão sanguínea deste órgão, evidenciando novamente, assim como para outros órgãos, a presença de receptor distinto do *Mas* envolvido nesse efeito ou a participação de metabólitos vasodilatadores da Ang-(1-7).

Em adição, no cérebro, a idade parece interferir na participação do controle do tônus vascular pelo receptor *Mas*. Camundongos KO-*Mas* e WT jovens, apresentaram perfusão sanguínea cerebral similar, diferentemente dos resultados obtidos nos camundongos idosos. Esse resultado sugere aumento da expressão do receptor *Mas* na árvore vascular cerebral com o processo de envelhecimento.

As medidas hemodinâmicas regionais da pele e mesentério de ratos TG e SD, demonstraram que as resistências vasculares desses órgãos, foram similares entre os

153

dois grupos de ratos. Porém, a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos SD, promoveu vasodilatação de ambos os leitos vasculares. Observou-se, também, que a deleção genética do receptor *Mas* resultou em diminuição da perfusão sanguínea para estes órgãos, porém, tanto o tratamento agudo quanto o crônico com A-779, não promoveu alterações da resistência vascular cutânea e mesentérica.

Confirmando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) no leito mesentérico, Osei et al. (1993) observaram que a Ang-(1-7) apresentou efeito vasodilatador direto em leito mesentérico isolado de felinos. Mais tarde, Oliveira et al. (1999) e Fernandes et al. (2001), demonstraram que a Ang-(1-7) produziu dilatação em vasos de resistência mesentéricos de ratos normotensos e hipertensos, respectivamente, que foi inibida na presença de A-779 e parcialmente abolida na presença de L-NAME e indometacina. Além disso, Sampaio et al. (2003) demonstraram que a infusão aguda de Ang-(1-7) em ratos normotensos, aumentou a perfusão sanguínea mesentérica e que o pré-tratamento com A-779 inibiu esse efeito vasodilatador, sugerindo participação do receptor Mas no efeito vasodilatador da Ang-(1-7). Vários estudos demonstraram que o efeito da Ang-(1-7) sobre o leito vascular pode variar conforme a dose e o animal utilizados e a situação experimental (Neves et al., 1996; Almeida et al., 2000; Sampaio et al., 2003). Assim, a concentração de Ang-(1-7) presente no plasma de ratos TG, pode não ter sido efetiva para desencadear efeito vasodilatador no leito vascular mesentérico. Além disso, no rato SD não pode ser descartada a hipótese da presença de receptor distinto do Mas envolvido no efeito vasodilatador da Ang-(1-7), bem como de metabólitos vasodilatadores da Ang-(1-7).

Na pele, há estudos demonstrando o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) (Sampaio *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2002). Porém, neste leito vascular parece que a condição

154

experimental, a dose de Ang-(1-7) utilizada e o animal utilizado, também interferem nesse efeito vasodilatador.

Com relação ao tecido adiposo branco e músculo esquelético, nem o aumento agudo nem o crônico de Ang-(1-7), alteraram a perfusão sanguínea destes órgãos, assim como o tratamento com antagonista angiotensinérgico. Complementando esses resultados, os camundongos KO-*Mas* e WT apresentaram resistências vasculares do tecido adiposo branco epididimal e músculo gastrocnêmio, similares. No entanto, esses resultados não descartam a participação do eixo Ang-(1-7)/*Mas* nas funções fisiológicas destes órgãos. Apenas sugerem que, pelo menos no tônus vascular desses órgãos, esse eixo não exerce influência.

Assim, as diferentes respostas dos diferentes leitos vasculares ao efeito vasodilatador da Ang-(1-7), sugere seletividade da Ang-(1-7) nos vários leitos vasculares, bem como distribuição e expressão diferenciada dos receptores de Ang-(1-7) ao longo das árvores vasculares.

## 6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o eixo Ang-(1-7)/Mas exerce importante participação na regulação da hemodinâmica sistêmica e regional de ratos e camundongos.

Além disso, o modo como esse eixo exerce efeito dilatador varia conforme o leito vascular estudado, porém em alguns leitos vasculares parece que esse efeito é mediado pelo receptor *Mas*, ativando a NOS e promovendo a liberação por tempo prolongado de NO, como sugerido por Sampaio *et al.* (2007). Em outros leitos, parece que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) ocorre por ativação de receptor distinto do *Mas*.

Sugere-se, também, que a idade interfere na expressão do receptor *Mas*, uma vez que em alguns leitos vasculares de camundongos de diferentes idades, a deleção deste receptor regulou de forma diferente a resistência vascular regional.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, Walther T. Cell Type-Specific Expression of the Mas Proto-Oncogene in Testis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002, 50 (5): 691-696.

Almeida AP, Frábregas BC, Madureira MM, Santos RJS, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000, 33: 709-713.

Averil DB, Diz DI. Angiotensin peptides and the baroreflex controlo f sympathetic outflow: pathway and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Research Bull*. 1999, 51 (2): 119-28.

Averill DB, Jessup JA, Ishiyama Y, Ferrario CM. Augmented ACE2 expression in ischemic cardiomyopathy. *American Journal Hypertens*. 2005, 18: 118A–128A.

Bader M. The cardiac rennin-angiotensin system. New insights from transgenic animal models. *Revista Brasileira Hipertensão*. 2001, 8: 8.17.

Barbee RW, Perry BD, Richard NR, Murgo JP. Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice. *American Journal Physiology*. 1992, 263: R728-R733.

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

Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensina-(1-7). *Peptides*. 1993, 14: 679-684.

Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensina-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Heart Circulation Physiology*. 1995, 38: H313-H319.

Benter IF, Yousif MH, Anim JT, et al. Angiotensin-(1–7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*. 2006, 290: H684–H691.

Block CH, Santos RA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*. 1988, 9 (6): 1395-401.

Botelho-Santos, Giancarla Aparecida. Reflexos Cardiovasculares e Hemodinâmica Sistêmica e Regional de Ratos que Superexpressam uma Proteína de Fusão Produtora de Ang-(1-7) TGR(A1-7)3292. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Braga ANG, Lemos MS, Silva JR, Fontes WRP, Santos RAS. Effects of Angiotensins on Day-Night Fluctuations and Stress-Induced Changes in Blood Pressure. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comp Physiology*. 2002, 282: R1663-R1671.

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *Journal of Physiology*. 1940, 98 (3): 283-98.

Braun-Menendez E, Page IH. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science*. 1958, 127(3292):242.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) Dilates Canine Coronary Arteries through kinins and Nitric Oxide. *Hypertension*. 1996, 27: 523-528.

Brosnihan KB, Li P, Tallant EA, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biological Research*. 1998, 31: 227-234.

Bunag RD, Mullenix P. Augmentation of Drug Induced Blood Pressure Increases in Rats by Amobarbital. *British Journal Pharmacological*. 1972, 46: 511-513.

Bunnermann B, Fuxe K, Metzger R, Mullins J, Jackson TR, Hanley MR, Ganten D. Autoradiographic localization of Mas protooncogene mRNA in adult rat using in situ hybridization. *Neuroscience*. 1990, 114: 147-153.

Burgelova M, Kramer HJ, Teplan V, Velickova G, Vitko S, Heller J, Maly J, Cervenka L. Intrarenal infusion of angiotensin-(1–7) modulates renal functional responses to exogenous angiotensin II in the rat. *Kidney Blood Pressure Research*. 2002, 25: 202-210.

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RAS, et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1–7) injected into the dorsal medulla of rats. *American Journal of Physiology*. 1989, 257 (1 Pt 2): H324–H329.

Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*. 1993, 22: 513-522.

Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. Converting enzyme inhibition and its withdrawal in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1995, 26: 426-436.

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

Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen mRNA in rat aorta. *Circulation Research*. 1988, 62: 1259.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a

functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*. 2005, 46(4):937-942.

Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of Angiotensin-(1-7) in Rat Brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989, 264 (28): 16518-16523.

Chiu A, Herblin WF, McCall DE. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, 165; 196.

Costa AP, Fagundes-Moura CR, Pereira VM, Silva LF, Vieira MA, Santos RAS, dos Reis AM. Angiotensin-(1-7): a Novel Peptide in the Ovary. *Endocrinology*. 2003, 144 (5); 1942-1948.

Costa Gonçalves AC, Leite R, Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Reis AB, Reis FM, Touyz RM, Webb RC, Alenina N, Bader M, Santos RA. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *American Journal Of Physiology Heart Circ Physiol*. 2007, 293(4): H2588-96.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira Dos Santos AJ, Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Back PH, Yagil Y, Penninger JS. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002, 417: 822-828.

Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A Review of the Microcirculation of Adipose-Tissue: Anatomic Metabolic and angiogenic perpectives. *Microcirculation*. 1997, 4: 211-232.

DelliPizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic action of angiotensin(1–7). *British Journal Pharmacologyl.* 1994, *111*:1-3.

Domenech RJ, Hoffman MM, Saunders KB, Henson JR, Subijanto S. Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circulation Research*. 1969, 25: 581-596.

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 angiotensin1-9. *Circulation Research*. 2000, 87(5): E1-9.

Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circulation Research*. 1999, 85: 643-650.

Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzej RB. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertension*. 1997, 6: 88-105.

Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system:

emphasis on cardiovascular control. Journal of Hypertension. 1988, 6(Suppl 3): S7-S12.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev.* 1998, 19:101–143.

Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM. The Adipose-Tissue Renin-Angiotensin System: Role in the Metabolic Syndrome? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003, 35: 807-825.

Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RAS. Short-Term Angiotensin(1-7) Receptor Mas Stimulation Improves Endothelial Function in Normotensive Rats. *Hypertension*. 2005, 46 [part 2]: 948-952.

Favrat B, Burnier M, Nussberger J, Lecomte JM, Brouard R, Waeber B, Brunner HR (1995). Neutral endopeptidase versus angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 1995, 13:797–804.

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RCA, Santos RAS, de Carvalho MHC. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arteriles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*. 2001, 37(2): 703-709.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RCA, Santos RAS, de Carvalho MHC. Role of PGI2 and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regulatory Peptides*. 2005, 127: 183-189.

Ferrario CM. Biological roles of angiotensin-(1-7). *Hypertension Research*. 1992, 15: 61-66.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). Hypertension. 1997, 30(3 Pt 2):535-541.

Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *Journal of American Soc Nephrol*. 1998, 9: 1716–22.

Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 289(6): H2281-90.

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

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(9):1083-90.

Ferreira AJ, Pinheiro SV, Castro CH. Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. *Regulatory Peptides*. 2006, 137:128–133.

Ferreira AJ, Raizada MK. Are we poised to target ACE2 for the next generation of antihypertensives? *Journal Molecular Medical*. 2008, 86:685–690.

Feterik K, Smith L, Katusic ZS. Angiotensin-(1-7) Causes Endothelium-Dependent Relaxatation in Canine Middle Cerebral Artery. *Brain Research*. 2000, 873: 75-82.

Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, de Las Heras AI, Merino B, Arribas S, Ruiz-Gayo M, Huber M, Wehland M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *Journal Endocrinology*. 2008, 97(1):55-64.

Ganong WF. Reproduction and the rennin-angiotensin system. *Neuroscience Biobehavior Rev.* 1995, 19: 241-250.

Gervais M, Demolis P, Domergue V, Lesage M, Richer C, Giudicelli JF. Systemic and Regional Hemodynamics Assessment in Rats with Fluorescent Microspheres. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. v. 33, p.425-432, 1999.

Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of Fluorescent-Labeled Microspheres for Measurement of Regional Organ Perfusion. *American Physiological Society*. 1993, 93: 2585-2597.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by menas of renal ischemia. *Journal Exp Med.* 1934, 59: 347-349.

Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin 1-7 Induces Bradykinin-Mediated Relaxation in Porcine Coronary Artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998, 286: 403-410.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.1996, 36: 281–306.

Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1–7). American Journal Physiology Heart Circ Physiology. 2007, 292(2): H736-42.

Gurzu B, Costuleanu M, Slatineanu SM, Ciobanu A, Petrescu G. Are Multiple Angiotensin Receptor Types Involved in Angiotensin (1-7) Actions on Isolated Rat Portal Vein? *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2005, 6 (2): 90-95.

Hale SL, ALker KJ, Kloner RA. Evaluation of Nonradioactive, Colored Microspheres for Measurement of Regional Myocardial Blood Flow in Dogs. *Circulation*. 1998, 78: 428-434.

Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney. *Journal Am Soc Nephrol*. 1999, 10 (Suppl. 12): S258-65.

Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. 1996) Renal actions of angiotensin-(1-7): *In vivo* and *in vitro* studies. *American Journal Physiology*. 1996, 270: F141-F147.

Hecker M, Blaukat A, Bara AT, Muller-Esterl W, Busse R. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced venoconstriction. *British Journal Pharmacology*. 1997, 121: 1475-1481.

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

Heller J, Kramer HJ, Maly J, Cervenka L, Horacek V. Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1–7) in the dog. *Kidney Blood Pressure Research*. 2000, 23: 89-94.

Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci*. 2005, 29: 427-435.

Heymann MA, Payne BD, Hoffman JIE, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1977, 1: 55-79.

Hilbers U, Peters J, Bornstein SR, Correa FMA, Johren O, Saavedra JM, Ehrhart-Bornstein M. Local Renin-Angiotensin System Is Involved in K1-Induced Aldosterone Secretion from Human Adrenocortical NCI-H295 Cells. *Hypertension*. 1999, 33:1025-1030.

Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Association Between the Natriuretic Action of Angiotensin-(1-7) and Selective Stimulation of Renal Prostaglandin  $I_2$  Release. *Hypertension*. v.25, p.1238-1244, 1995.

Huentelman MJ, Grobe J, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, Ferrario CM, Raizada MK. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiology*. 2005, 90: 783–790.

Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin–angiotensin system. *Hypertension*. 1998, 31:356–361.

Jackson TR, Blair AC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*. 1988, 335: 437-440.

Jaiswal N, Jaiswal RK, Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. Hypertension. 1993,

21:900-905.

Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: from angiotensina I to angiotensin (1–7). *Cardiovascular Research*. 2007, 73 (3): 463-469.

Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.* 1987 Mar;60(3):422-8.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensina II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Rev.* 2000, 52(1): 11–34.

Kim S and Iwao H. Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001, 52 (1): 11-34.

Kono T, Taniguchi A, Imura H, Oseko F, Khosla MC. Biological activities of angiotensin II-(1-6)-hexapeptide and angiotensin II-(1-7)-heptapeptide in man. *Life Science*. 1986, 38:1515–1519.

Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. Measurement of Regional Myocardial Blood Flow with Multiple Colored Microspheres. *Circulation*. 1991, 83: 974-982.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Chabielska E, Cylwik D, Buczko W. The effect of 'tissue' and 'plasma' angiotensin converting enzyme inhibitors on overall haemostatic potentials in rats. *Thromb Res.* 2006; 117(5):557-61.

Kuba K, Imai Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2006, 6(3): 271-6. Review.

Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensina-(1-7). *Hypertension*. 2002, 0: 774-779.

Kumagai H, Khosla M, Ferrario CM, Foud-Tarazi FM. Biological activity of angiotensin-(1-7) heptapeptide in the hamster heart. *Hypertension*. 1990, 15 (2 supl): 129-33.

Kumamoto K, Stewart TA, Johnson AR, Erdos EG. Prolylcarboxypeptidase (angiotensinace C) in human lung and cultured cells. *Journal Clinical Invest.* 1981, 31: 362-367.

Kumar R. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. VII International Symposium Vasoactive Peptides. Fevereiro, 2008, página 25.

Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochemical Pharmacology*. 2007: 8-12.

Lawrence AC, Evin G, Kladis A, Campbell DJ. An alternative strategy for the radioimmunoassay of angiotensin peptides using amino-terminal-directed antisera: measurement of eight angiotensin peptides in human plasma. *Journal of Hypertension*. 1990, 8(8): 715-24.

Lawrence AC, Clark IJ, Campbell DJ. Increased angiotensin-(1-7) in hypophysial-portal plasma of conscious sheep. Neuroendocrinology. 1992, 55(1):105-14.

Leung PS, Wong TP, Lam SY, Chan HC, Wong PYD. Testicular Hormonal Regulation of the Renin-Angiotensin System in the Rat Epididymis. *Life Scinces*. 2000, 66 (14): 1317-1324.

le Tran Y, Foster C. Angiotensin-(1-7) and the Rat Aort: Modulation by the Endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacologic*. 1997, 30: 676-682.

Lemos VS, Cortes SF, Silva DM, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) is Involved in the Endothelium-Dependent Modulation of Phenylefrine-Induced Contraction in the Aorta of m-Ren Transgenic Rats. *British Journal Pharmacology*. 2002, 135: 1743-1748.

Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RAS. The endotheliumdependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang-(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of Mas-Knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2005, 46: 274-279.

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*. 1997, 29: 394-400.

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

Luque M, Martin P, Martell N, Fernandez C, Brosnihan KB, Ferrario CM. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1–7) in essential hypertension. *Journal of Hypertension*. 1996, 14: 799–805.

Machado RDP, Ferreira MAND, Belo AV, Santos RAS, Andrade SP. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regulatory Peptides*. 2002, 15;107(1-3): 105-113.

Makowski EL, Meschia G, Droegemueller W. Measurement of umbilical arterial blood flow to the sheep placenta and fetus in útero. *Circulation Research*. 1968, 23: 623-631.

Martin KA, Grand SGN, Hockfield S. The Mas protooncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Research*. 1992, 68: 75-82.

Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal disease. *Circulation research*. 1998, 83: 1182-1191. Mendes AC, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Santos RAS. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regulatory Peptides*. 2005, 125: 29 – 34.

Meng W & Busija DW. Comparative Effects of Angiotensin-(1-7) and Angiotensin II on Piglet Pial Arterioles. *Stroke*. 1993, 24: 2041-2045.

Methot D, Lapoint MC, touyz RM, Yang XP, Carretero OA, Deschepper CF, Schiffrin EL, Thibault G, Reudelhuber TL. Tissue Targeting of Angiotensin Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272 (20): 12994-12999.

Metzger R, Bader M, Lugwig T, Berberich C, Bunnermann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat protooncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters*. 1995, 357: 27-32.

Mohan K. Raizada, M. Ian Phillips, Colin Sumners. CELLULAR and MOLECULAR BIOLOGY of THE RENIN-AMGIOTENSIN SYSTEM. Florida, CRC Press, Inc, 1993.

Morrell NW, Morris KG, Stenmark KR. Role of angiotensina-converting enzyme and angiotensin II in development of hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal Physiology*. 1995, 269: H1186-H1194.

Morrell NW, Upton PD, Kotecha S, Huntley A, Yacoub MH, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II activates MAPK and stimulates growth of human pulmonary artery smooth muscle via AT1 receptors. *American Journal Physiology*. 1999, 277: L440-L448.

Mulrow PJ. Renin-angiotensin system in the adrenal. *Horm Metab Res.* 1998, 30: 346 – 349.

Mulvany MJ. Structure and function of small arteries in hypertension. *Journal of Hypertension*. 1990, 8(suppl 7): S225-S232.

Nakamoto H, Ferrario CM, Fuller SB, Robaczewski DL, Winicov E, Dean RH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide interaction in renovascular hypertension. *Hypertension*. 1995, 25: 796-802.

Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Santos RAS. Metabolism of Angiotensin I in Isolated Rat Hearts. Effect of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. *Biochemical Pharmacolog.* 1995, 50(9): 1451-1459.

Neves LAA, Almeida AP, Khosla MC, Campacnole-Santos, Santos RAS. Effect of Angiotensin-(1-7) on Reperfusion Arrhythmias in Isolated Rat Hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997, 30: 801-809.

Neves LA, Averill DB, Ferrario CM, Chappell MC, Aschner JL, Walkup MP,

Brosnihan KB. Characterization of angiotensin-(1-7) receptor subtype in mesenteric arteries. *Peptides*. 2003, 24(3): 455-62.

Neutze JM, Wyler F, Rudolph AM. Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *American Journal Physiology*. 1968, 215; 468-495.

Nora, E.H., Munzenmaier, D.H., Hansen-Smith, F.M., Lombard, J.H., Greene, A.S. 1998. Localization of the ANG II type2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *American Journal Physiology*. 1998, 275: H1395–H1403.

Oliveira MA, Fortes ZB, Santos RAS, Khosla MC, De Carvalho MHC. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. *Peptides*. 1999, 20: 1195-1201.

Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, Kadowitz PJ. Differential Responses to Ang-(1-7) in the Feline Mesenteric and Hindquarter Vascular Beds. *European Journal Pharmacology*. 1993, 234: 35-42.

Orte C, Polak JM, Haworth SG, Yacoub MH, Morrell NW. Expression of pulmonary vascular angiotensina-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *Journal Pathological*. 2000, 192: 379-384.

Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovascular Medical*. 2003, 13; 93-101.

Page IH. Pathogenesis of arterial hypertension. JAMA. 1949, 140: 451.

Page IH. A Sense of the History of Discovery. Science. 1974, 186 (4170):1161.

Page IH. Theories concerning causes of hypertension. *Hypertension Research: a memoir.* 1920-1960. I.ed.Pergamon Press. 1989: 56-61.

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

Peach M. Renin–angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev.* 1997, 57: 313–70.

Phillips MI, Weyhenmeyer JA, Felix D, Ganten D. Evidence for na endogenous brain renin–angiotensin system. Fed Proc. 1979, 38: 2260–6.

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(4): 490-6.

Pohlman AG. The course of the blood through the heart of the fetal mammal, with a note on the reptilian and amphibian circulations. *Anat Rec.* 1909, 3: 75-109.

Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *British Journal Pharmacology*. 1994, 111: 652-654.

Prinzmetal M, Ornitz EM Jr, Simkin B. Arterio-venous anastomoses in liver, spleen and lungs. *American Journal of Physiology*. 1948, 152; 48-52.

Qiu HY, Henrion D, Levy BI. Endogenous angiotensin II enhances phenylephrineinduced tone in hypertensive rats. *Hypertension*. 1994; 24:317-321.

Raizada MK, Lu D, Tang W, Kurian P, Sumners C. Increased angiotensin II type-1 receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. Endocrinology. 1993, 132(4):1715-22.

Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2. A New Target for Cardiovascular Disease Therapeutics. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007, 50(2): 112-119.

Ren Y, Garvin JL, Carretero AO. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 2002, 39 (3): 799-802.

Resende MM, Mill JG. Alternate Angiotensin II-Forming Pathways and Their Importance in Physiological or Physiopathological Conditions. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 2002, 78 (4): 432-8.

Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensinconverting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemistry Journal*. 2004, 383(Pt 1): 45-51.

Richer C, Domergue V, Gervais M, Bruneval P, Giudicelli JF. Fluospheres for Cardiovascular Phenotyping Genetically Modified Mice. *Journal Cardiovascular Pharmacology*. 2000, 36: 396-404.

Roks AJM, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, Zeeuw D, van Gilst WH. Angiotensin-(1–7) Is a Modulator of the Human Renin-Angiotensin System. *Hypertension*. 1999, 34:296-301.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrofy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: Critical role of the AT1 receptor subtype. Circulation Research. 1993, 73: 413-423.

Sadoshima J, Izumo S. Rapamyein selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro.: Potential role of 70-kDS6 kinase in angiotensina II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research*. 1995, 77: 1040-1052.

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RAS. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *American Journal Physiology*. 2003, 284: H1985-H1994.

Sampaio WO, Castro CH, Santos RAS, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells. *Hypertension*. 2007, 50: 1093-1098.

Santos RA, Brum JM, Brosnihan KB, Ferrario CM. The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension*. 1990, 15(2 Suppl):I121-7.

Santos RAS, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*. 1992, 19: II56-II61.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Magaldi AJ. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1–7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 1996, 27: 875–884.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. Regulatory Peptides. 2000, 28; 91(1-3):45-62. Review.

Santos RAS, Simões e Silva A, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schltheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor *Mas. PNAS*. 2003, 8: 8258-8263.

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, 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. *Physiologic Genomics*. 2004, 17: 292-299.

Santos RAS, Frezard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): Blood, Heart and Blood Vessels. *Current Medical Chemistry – Cardiovascular & Hematological Agents*. 2005, 3: 174-179.

Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeira AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of In Vitro and In Vivo Heart Function in Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Knockout Mice. Hypertension. 2006, 47(5): 996-1002.

Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2007, 16: 122–128.

Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AVN, Pôrto LCJ, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RAS. *Mas* Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism. *Diabetes*. 2008, 57: 340, 347.

Santos RAS, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensinconverting enzyme2–angiotensin(1–7)–Mas axis. *Experimental Physiology*. 2008, 93: 19-527. Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa H, Kajiyama G, Oshima T. Effects of Angiotensin-(1-7) on Forearm Circulation in Normotensive Subjects and Patients with Essential Hypertension. *Hypertension*. 2001, 38: 90-94.

Sarin SK, Sabba C, Groszmann RJ. Splanchnic and systemic hemodynamics in mice using a radioactive microsphere technique. *American Journal Physiology*. 1990, 258: G365-G369.

Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo–neurohypophysial system by angiotensin-(1–7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, 85: 4095–4098.

Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vascular Health Risk Manag.* 2007, 3(1):125-37.

Schmaier AH. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003, 285(1): R1-13. Review.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensina converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *Journal Clinical Investigation*. 1990, 86: 1923.

Shenoy U & Cassis LA. Characterization of Renin Activity in Brown Adipose-Tissue. *American Journal of Physiology*. 1997, 272: C989-C999.

Silva DMR, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS, Lemos VS. Evidende for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 2007, 28: 702-707.

Simões-e-Silva AC, Baracho NCV, Passaglio KT, Santos RAS. Renal Actions of Angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.30, p.503-513, 1997.

Simões e Silva AC, Bello AP, Baracho NC. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective angiotensin-(1–7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regulatory Peptides*. 1998, 74:177–184.

Simões e Silva AC, Diniz JS, Regueira Filho A, Santos RA. The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *Journal Pediat*. 2004, 145 (1): 9398.

Simões e Silva AC, Diniz JS, Pereira RM. Circulating renin angiotensina system in childhood chronic renal failure: marked increase of angiotensin-(1–7) in end-stage renal disease. *Pediatric Research*. 2006, 60:734–739.

Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *Journal Exp Med.* 1956, 103(3): 295-9. Song, Y., et al. Mapping of angiotensin II receptor subtypes in peripheral tissues of spontaneous hypertensive rats by in vitro autoradiography. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995, 22(Suppl. 1):S17–S19.

Stanek KA, Smith TL, Murphy WR, Coleman TG. Hemodynamic disturbances in the rat as a function of the number of microspheres injected. *American Journal Physiology*. 1983, 245: H920-H923.

Stegbauer J, Oberhauser V, Vonend O, Rump LC. Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*. 2004, 61: 352-359.

Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) Reduces Smooth Muscle Growth After Vascular Injury. *Hypertension*. 1999, 33(1 pt 2): 207-211.

Studdy PR, Lapworth R, Bird R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance – review. *Journal Clinical Pathological*. 1983, 36: 938 – 947.

Tallant EA, Lu X, Weiss RB, Chappell MC, Ferrario CM. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensina-(1-7) receptor. *Hypertension*. 1997, 29: 388-393.

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005, 289(4): H1560-6.

Taugner R, Hackenthal E, Rix R, Nobiling R, Poulsen K. Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system. *Kidney Int. Suppl.*, 1982, 12: 533.

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler R, Saye J, Smith R. Angiotensin II receptors and angiotensina II receptors antagonists. *Pharmacological Reviews*. 1993, 45: 205-251.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homology of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. *Journal Biological Chemistry*. 2000, 275: 238-243.

Thibonnier MME, Soto JM, ALDEGIR IC. Reduction of plasma and urinary vasopressin during treatment of severe hypertension by captopril. *Eur Journal Clinical Investigation*. 1981, 11: 449-453.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews*. 2000, 52: 639-672.

Trask AJ, Averill DB, Ganten D, Chappell MC, Ferrario CM. Primary role of

angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats. *American Journal Physiology*. 2007, 292: H3019–H3024.

Trask AJ, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7): Pharmacology and New Perspectives in Cardiovascular Treatments. *Cardiovascular Drug Review*. 2007, 25 (2): 162–174.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara T, Murasawa S, Takai S, Miyazuki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahasi H, Iwasaka T. Vascular smoth muscle-targeted over expression of angiotensina II type 2 receptor causes endothelium-dependent depressor and vasodilative effects via activation of the vascular kinin system. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999, 104: 855-864.

Turner AJ. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem. Soc Trans.* 2003, 31:723–727.

Vallon V, Heyne N, Richter K, Khosla MC, Fechter K. [7-D-ALA]-angiotensin 1-7 blocks renal actions of angiotensin 1-7 in the anesthetized rat. *Journal Cardiovascular Pharmacoogyl.* 1998, *32*:164-167.

van der Wouden EA, Ochodnicky P, van Dokkum RPE, Roks AJM, Deelman LE, Zeeuw D, Henning RH. The role of angiotensina-(1-7) in renal vasculature of the rat. Journal of Hypertension. 2006, 24: 1971-1978.

Van Oosterhout MFM, Willigers HMM, Reneman RS, Prinzen FW. Fluorescent Microspheres to Measure Organ Perfusion: Validation of a Simplified Sample Processing Technique. *American Physiological Society*. 1995, 95: H725- H733.

Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *Journal Molecular Medicine*. 2008, 86: 663–671.

Vinswanathan, M., Tsutsumi, K., Correa, F.M.A., and Saavedra, J.M. 1991. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 179: 1361–1367.

Volpe M, Savoia C, De Paolis P, Ostrowska B, Tarasi D, Rubattu S. The reninangiotensin system as a risk factor therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *Journal Am Soc Nephrol*. 2002, 13 (Suppl. 3): S173-8.

Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Gantem D, Bader M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273: 11867-11873. Walther T, Wessel N, Kang N, Sander A, Tschope C, Malberg H, Bader M, Voss A. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz Journal Medical Biological Research*. 2000, 33: 1-9.

Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin.

Journal Hypertension. 1991, 9: 631-8.

Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties, and enzymatic activity of three angiotensina processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolylendopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Science*. 1993, 52: 1461–1480.

Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev.* 1992, 17:227–62.

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

Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N, Santos RAS. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in Mas Gene-Deleted Mice. Hypertension. 2008, 51[part 2]: 574-580.

Yamada T, Horiuchi M, Dazu VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Science*. 1996, 93: 156-160.

You D, Loufrani L, Baron C, Lavy BI, Widdop RE, Henrion D. High Blood Pressure Reduction Reverses Angiotensin II Type 2 Receptor-Mediated Vasoconstriction Into Vasodilation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation*. 2005, 111: 1006-1011.

Young D, Waitches G, Birrchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domain. *Cell.* 1986, 45: 711-719.

Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2. *Circulation*. 2003, 108: 1707–1712.

## Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo