REGIANE CARDOSO CASTELO BRANCO

OS EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE O TROCADOR Na^+/H^+ (ISOFORMA NHE3) E A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ EM TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

REGIANE CARDOSO CASTELO BRANCO

Os efeitos da angiotensina-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos.

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Margarida de Mello Aires

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Branco, Regiane Cardoso Castelo.

Os efeitos da Angiotensina-(1-7) sobre o trocador Na⁺/H⁺ (isoforma NHE3) e a [Ca²⁺]_i em túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos / Regiane Cardoso Castelo Branco. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Margarida de Mello Aires.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação do pH; regulação renal do equilíbrio ácido-base.

Versão do título para o inglês: The effects of Angiotensin-(1–7) on the Na⁺/H⁺ exchanger (isoform NHE3) and on [Ca²⁺]_i in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats.

1. Túbulos renais proximais 2. Hipertensão 3. Angiotensinas 4. NHE3 5. 6. I. Margarida de Mello Aires II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB094/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Regiane Cardoso Castelo Branco.

Título da Tese: Os efeitos da Angiotensina-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos.

Orientador(a): Margarida de Mello Aires.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05308-000 São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 102 nas fls. 132 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Margarida de Mello Aires**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Angiotensina II e angitensina-(1-7): interação de suas ações e receptores na função renal. Estudos por clearance e microperfusão tubular in vivo*" do qual participam o(s) aluno(s), especialista em laboratório **Regiane Cardoso Castelo Branco** a pesquisadora **Maria Oliveira de Souza**, , está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 05.10.2012, com validade de 4 anos.

São Paulo, 17 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

“Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias. Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.” Isaías, 40:31

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, pela minha saúde, força e determinação para superar as dificuldades que surgiram ao longo desta caminhada. Obrigada por todas as conquistas.

Agradeço também este trabalho aos meus queridos pais, Olcir Castelo Branco e Maria Vaneide Cardoso, muito importantes na minha vida. Com esta tese conquisto mais um degrau e tenho muito a agradecer a vocês. Prepararam o meu caminho desde o início da minha vida. Abdicaram de muitos projetos pessoais para que eu tivesse uma boa formação profissional e também pessoal. Eu sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei e vocês seguraram a minha mão com muita firmeza. Sou e serei eternamente grata por tudo. Eu tenho orgulho e admiração pelos pais que tenho. Obrigada. Amo muito vocês.

À minha irmã Izane Cardoso, agradeço muito por sermos amigas e confidentes, sei que nem todos os irmãos têm uma relação tão bonita como a nossa. Você tem sido uma mulher guerreira e é com admiração que olho para sua forma de encarar a vida. Longe ou perto, minha irmã, o amor e a amizade que nos unem estarão sempre se fortalecendo, e serão eternos. Sou feliz em ser sua irmã e poder todos os dias aprender mais com você. Muito obrigada pelo apoio.

Meu querido tio Valderli Cardoso, é bastante complicado conseguir agradecer todas as coisas que você faz e fez por mim e por minha família. Nossa família não teria a mesma união e o mesmo carinho sem a sua sabedoria e generosidade. E por você ser assim, faz nossas vidas bem mais feliz, e podemos caminhar mais tranquilos. Agradeço a Deus por você ser este homem forte, temente a Deus, generoso e cheio de paz. Certamente, Ele vê em você um filho sem igual, assim como nós também o vemos. Muito obrigada pelo incentivo e apoio.

À Profa. Dra. Margarida de Mello Aires, pela confiança em mim depositada. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e por todas as oportunidades que me deu. Seu acompanhamento durante os experimentos, seus preciosos conselhos e sua inestimável confiança. Para mim foi uma honra poder trabalhar ao seu lado e fazer parte do desenvolvimento de sua linha de pesquisa. O modo como me apoiou nesta investigação: uma orientação científica objetiva e crítica, estimulando e dando o tempo para uma construção pessoal do trabalho. A disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu as minhas ideias, estimulando-me a vencer as inseguranças deste processo. Sabe ser muito mais que uma

orientadora, que além da sabedoria e competência, possui uma grande determinação, dinamismo e carisma, que a tornam uma pessoa muito especial. Muito obrigada.

Quero agradecer à Profa. Dra. Deise C Leite Dellova pela orientação e colaboração nas medidas de cálcio citosólico em túbulos isolados.

Grata também ao Prof. Dr. Gerhard Malnic pela colaboração nos experimentos, e o apoio e ensinamentos científicos que muito contribuíram para minha aprendizagem.

O meu reconhecimento a todos os alunos do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Renal que, direta ou indiretamente, me ajudaram ao longo desses anos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte e financiamento deste trabalho.

RESUMO

CASTELO-BRANCO, R. C. **Os efeitos da Angiotensina-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em túbulos proximais renais de ratos espontaneamente hipertensos.** 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A ação aguda direta da angiotensina (1-7) [Ang-(1-7)] sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) foi avaliada por microperfusão estacionária *in vivo* em túbulos proximais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles Wistar-Kyoto (WKY), utilizando microeletrodo sensível a H^+ . Nos ratos WKY, o valor médio controle do JHCO_3^- é $2,40 \pm 0,10 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (n=28). Losartan [10^{-7} M ; antagonista do receptor AT1 da Ang II] sozinho diminuiu o JHCO_3^- [38% (11)], assim como, o A779 [10^{-6} M ; antagonista do receptor Mas da Ang-(1-7)] e os dois inibidores de receptores juntos [32% (13) e 38% (15), respectivamente]. Esses dados indicam que na situação basal existe Ang II e a Ang-(1-7) endógenas que estimulam o JHCO_3^- . Quando perfundida na luz do túbulo, a Ang-(1-7) tem efeito bifásico sobre o NHE3: em baixas concentrações (10^{-9} M) causa queda do JHCO_3^- [28% (14)], enquanto que em altas concentrações (10^{-6} M) estimula o JHCO_3^- [49% (18)]. O A779 e o Losartan acentuam o efeito inibitório da Ang-(1-7; 10^{-9} M) e modificam de estimulatório para inibitório o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M), demonstrando que os efeitos da Ang-(1-7) se fazem via receptores Mas e AT1. O S3226 [10^{-6} M ; inibidor específico do NHE3] diminui o JHCO_3^- [48% (14)] e muda o efeito estimulador da Ang-(1-7) para um efeito inibidor, mas não afeta o efeito inibitório de Ang-(1-7). Nos ratos SHR, o JHCO_3^- controle é $2,04 \pm 0,13 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (14). O A779 e o Losartan diminuem [40% (11) e 55% (10), respectivamente]; os dois inibidores juntos inibem o JHCO_3^- [56% (11)]. Esses achados indicam que nos ratos SHR, na situação basal existe Ang-(1-7) e Ang II endógena intratubular que estimulam o JHCO_3^- . Entretanto, nos ratos hipertensos, a Ang-(1-7) demonstrou efeitos opostos aos dos ratos WKY; a Ang-(1-7; 10^{-9} M) aumentou o JHCO_3^- [52% (13)], enquanto a Ang (1-7; 10^{-6} M) causou significativa queda do JHCO_3^- [38% (13)]. O A779 e o Losartan aboliram o efeito estimulatório da Ang-(1-7; 10^{-9} M) e não modificaram o efeito inibitório da Ang-(1-7) (10^{-6} M) sobre o JHCO_3^- , indicando a participação dos receptores Mas e AT1 nas ações da Ang-(1-7) nos ratos SHR. O S3226 diminui JHCO_3^- [49% (11)] e mudou o efeito estimulador da Ang-(1-7) para um efeito inibidor, mas não afetou o efeito inibitório da Ang-(1-7). Em adição, monitoramos fluorimetricamente a concentração de cálcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em túbulos proximais isolados, por meio do probe sensível a cálcio FURA-2-AM. Nossos dados indicam que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em ratos WKY no controle é $99,7 \pm 2,28 \text{ nM}$ (n=5); a Ang-(1-7; 10^{-9} ou 10^{-6} M) aumentam esse valor [respectivamente, 101% e 64% (5)]. O A779 ou o Losartan não alteram a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, porém os dois inibidores juntos aumentam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [97% (5)], indicando que em ratos WKY, os efeitos dose dependente da Ang-(1-7) sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são via receptores Mas e AT1. Por outro lado, em animais SHR o controle é $94,3 \pm 1,66 \text{ nM}$ (n=5); a Ang-(1-7; 10^{-9} ou 10^{-6} M) aumenta esse valor [respectivamente, 52% e 84% (6)]. O A779 e o Losartan não alteram a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, porém os dois inibidores juntos aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [195% (5)]. Assim, em ratos SHR, os efeitos dose dependente da Ang-(1-7) sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são também via receptores Mas e AT1. Em conclusão, nossos dados indicam que a interação dos efeitos opostos dose dependente da Ang-(1-7) e Ang II sobre JHCO_3^- e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ representa importante mecanismo de regulação fisiológica do volume e do pH intra-extracelular. Nossos resultados indicam também que em indivíduos hipertensos, a alta concentração plasmática de Ang-(1-7) descrita na literatura, estaria mitigando a hipertensão, por inibição do NHE3 no túbulo proximal

com consequente queda do JHCO_3^- e da reabsorção proximal de água. Apesar das alterações da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ serem importantes para a ativação do NHE3 através da Ang-(1-7), outras vias de sinalização podem estar envolvidas, mas para isso serão necessários mais estudos.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-7). JHCO_3^- . $[\text{Ca}^{2+}]_i$. receptores AT1 e Mas.

ABSTRACT

CASTELO-BRANCO, R. C. **The effects of Angiotensin-(1-7) on the Na^+/H^+ exchanger (isoform NHE3) and on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats.** 2016. 125 p. Ph.D Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Direct acute effects of angiotensin (1-7) [$\text{Ang}-(1-7)$] on the resorptive bicarbonate flow (JHCO_3^-) was evaluated by stationary microperfusion *in vivo* in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive controls Wistar-Kyoto (WKY), using microelectrode sensitive to H^+ . In WKY control rats, JHCO_3^- average value was $2.40 \pm 0.10 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($n=28$). Losartan (10^{-7} M , an AT1 receptor antagonist of Ang II) decreased JHCO_3^- [38% (11)]; A779 [10^{-6} M , a Mas receptor antagonist of Ang-(1-7)], and a combination of both drugs decreased JHCO_3^- [32% (13) and 38% (15), respectively]. These data show that there are endogenous intrabular Ang II and Ang- (1-7) that stimulate JHCO_3^- . Ang-(1-7) has biphasic effects on Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3): at low dose (10^{-9} M) inhibits [28% (14)] and at higher one (10^{-6}) stimulates [49% (18)] the NHE3. A779 and losartan augment the inhibitory effect of Ang-(1-7; 10^{-9} M), and modify Ang-(1-7; 10^{-6} M) the stimulatory effect to an inhibitory one. Thus, these results show that Ang-(1-7) effects are through Mas and AT1 receptors. S3226 (10^{-6} M , a NHE3 specific inhibitor) decreases JHCO_3^- [48% (14)], and changes the stimulatory effect of Ang-(1-7) to an inhibitory one, but does not alter Ang-(1-7) inhibitory action. In SHR rats, JHCO_3^- in control group is $2.04 \pm 0.13 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (14), and A779 and losartan reduces this parameter [40% (11) and 55% (10), respectively]. Both drugs when together inhibit JHCO_3^- [56% (11)]. These findings indicate that in SHR rats, in a physiological state, there are endogenous intratubular Ang-(1-7) and Ang II that stimulate JHCO_3^- . However, Ang-(1-7) displayed opposite effects on SHR when compared to WKY rats: Ang- (1-7) at low dose (10^{-9} M) increases JHCO_3^- [52% (13)] whereas Ang (1-7) at higher dose (10^{-6} M) reduces JHCO_3^- [38% (13)]. A779 or losartan alone abolish the stimulatory effect of Ang-(1-7) at low dose, and does not alter the inhibitory effect of Ang-(1-7) at high dose on JHCO_3^- , which suggests the role of Mas and AT1 receptors on Ang-(1-7) effects. S3226 alone decreases JHCO_3^- [49% (11)]; at low dose of Ang-(1-7) changes the stimulatory effect to an inhibitory one, but does not change the inhibitory effect of higher dose of Ang-(1-7). In addition, we have fluorimetrically monitored cytosolic calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in isolated proximal tubule through FURA-2-AM. Our data show that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the WKY control group is $99.7 \pm 2.28 \text{ nM}$ ($n=5$). Ang-(1-7) at 10^{-9} or 10^{-6} M increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [101% (5) and 64% (5), respectively]. A779 and losartan did not alter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ but when they are together an increase on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is found [97% (5)]. So, in WKYrats, the dose-dependent effects of Ang-(1-7) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are via Mas and AT1 receptors. On the other hand, in SHR control rats $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is $94.3 \pm 1.66 \text{ nM}$ (5); Ang-(1-7) at low and high dose increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [52% (6) and 84% (6), respectively]. A779 and losartan *per se* did not alter the $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but when together an increase on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was found [195% (5)]. In SHR rats, the dose-dependent effects of Ang-(1-7) on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are via Mas and AT1 receptors. Thus, our data are indicating that the interaction of the opposing dose-dependent effects of Ang-(1-7) and Ang II on JHCO_3^- and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may represent an important physiological mechanism for regulating the intra and extracellular volume and pH in normotensive and hypertensive individuals. In hypertensives, the high plasma concentration of Ang-(1-7) described in the literature, would mitigating the hypertension by inhibiting NHE3 in the proximal tubule with consequent fall on JHCO_3^- and on proximal reabsorption of water. Our results also indicated that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alteration is an important factor

for NHE3 activation through Ang-(1-7). Whether this effect is also through other signaling pathways will require further studies.

Keywords: Angiotensin-(1-7). JHCO₃⁻. [Ca²⁺]_i. AT1 and Mas receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeitos da Angiotensina-(1-7) em diversos tecidos	18
Figura 2 - Papel do NHE3 na reabsorção de HCO_3^-	23
Figura 3 - Modelo estrutural do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3)	24
Figura 4 - Conceito clássico do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona intravascular	27
Figura 5 - Conceito atual do Sistema Renina Angiotensina, indicando as vias de formação das diversas angiotensinas e seus receptores	29
Figura 6 - Os mecanismos para a formação e degradação de Ang-(1-7) no rim	33
Figura 7 - Sistema de Análises de Pressão Arterial BP-2000	41
Figura 8 - Medida de pressão diastólica e sistólica	42
Figura 9 - Microeletrodos duplos utilizados para a medida do pH intratubular <i>in vivo</i>	44
Figura 10 - Micropipeta dupla usada para a microperfusão tubular estacionária <i>in vivo</i>	44
Figura 11 - Esquema do sistema de microperfusão estacionária <i>in vivo</i> , para medidas de pH luminal, em túbulos proximais convolutos (segmento S2)	45
Figura 12 - Curva de calibração do microeletrodo de pH	47
Figura 13 - Localização do segmento S3 proximal na região medular externa (OM) do rim	48
Figura 14 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7; 10^{-9} e 10^{-6} M) e/ou Losartan e/ou A779 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos WKY	53
Figura 15 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou S3226 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos WKY	54
Figura 16 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e Ang II sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos WKY	55
Figura 17 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou Losartan e/ou A779 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos SHR	56
Figura 18 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou S3226 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos SHR	57
Figura 19 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e Ang II sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , em ratos SHR	58

Figura 20 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY	60
Figura 21 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou S3226 (10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY	61
Figura 22 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} M, 10^{-9} M ou 10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY	62
Figura 23 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR	63
Figura 24 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou S3226 (10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR	64
Figura 25 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} M, 10^{-9} M ou 10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR	65
Figura 26 - Trocador Na^+/H^+	70
Figura 27 - Comparação dos efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), sobre o $JHCO_3^-$ no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , e na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal, em ratos WKY	71
Figura 28 - Efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$ em ratos WKY	72
Figura 29 - Comparação dos efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), sobre o $JHCO_3^-$ no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i> , e na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal, em ratos SHR	73
Figura 30 - Efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$ em ratos SHR ...	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios da Pressão Arterial de cauda de ratos WKY e SHR em diferentes tratamentos	51
Tabela 2 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) (10^{-9} ou 10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou S3226 (10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M) nos parâmetros de acidificação do túbulo proximal convoluto (segmento S2) de ratos WKY e SHR, <i>in vivo</i>	52
Tabela 3 - Efeito da Ang-(1-7) e/ou A779, e/ou Losartan, após 1 minuto de incubação hormonal na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY e SHR	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Soluções para o microeletrodo duplo (em mM)	43
Quadro 2 - Solução perfusora tubular luminal (em mM)	44
Quadro 3 - Composição das soluções utilizadas para a medida da $[Ca^{2+}]_i$ (em mM)	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Mecanismos de reabsorção de bicarbonato (HCO_3^-) no túbulo proximal	22
2.2 Trocador Na^+/H^+ - Isoforma 3 (NHE3)	23
2.3 Hipertensão e Sistema Renina Angiotensina (SRA)	26
2.3.1 Sistema Renina Angiotensina (SRA)	27
2.3.2 Papel do SRA na regulação da pressão arterial	30
2.4 Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA2)	32
2.5 Ações da Ang-(1-7) sobre os rins	34
2.5.1 Ações da Ang-(1-7) em SHR	36
2.6 Ações da Ang-(1-7) sobre a concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)	38
2.7 Atuação dos inibidores do receptor AT1 na hipertensão arterial	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda	41
4.2 Microperfusão	42
4.2.1 Preparação dos animais	43
4.2.2 Microeletrodos e micropipetas	43
4.2.3 Método de Microperfusão Tubular	44
4.2.4 Medidas do pH intratubular	46
4.2.5 Análise das curvas de pH	47
4.3 Medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência	48
4.3.1 Curva de calibração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$	50
4.4 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Microperfusão tubular	51
5.1.1 Ação da Ang-(1-7) na acidificação tubular proximal em ratos SHR E WKY	51

5.2 Ação da Ang-(1-7) na concentração de cálcio intracelular	58
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE	93
A - THE EFFECTS OF ANGIOTENSIN-(1-7) ON THE NHE3 EXCHANGER AND ON [Ca²⁺]_i IN PROXIMAL TUBULES OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS ...	94

1 INTRODUÇÃO

Há várias décadas o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) é reconhecido como um importante regulador da pressão arterial e da homeostase eletrolítica. A visão clássica do SRAA admite que a renina circulante atuando sobre o angiotensinogênio produziria angiotensina I (Ang I) que seria convertida em angiotensina II (Ang II) através da enzima conversora da angiotensina (ECA). A Ang II é considerada o principal componente hipertensor desse Sistema, mas acreditava-se que ela atuasse apenas como um hormônio circulante via receptores AT1 e AT2. O SRAA também tem sido identificado localmente em inúmeros órgãos: coração, rins, tecido adiposo, cérebro (NGUYEN; BURCKLE; SRAER, 2003; PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013). Adicionalmente, outros peptídeos do SRAA foram identificados e possuem ações biológicas, como a angiotensina III, a angiotensina IV e a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], que atua através dos receptores Mas. A descoberta de outra enzima conversora da angiotensina, a ECA2, e de receptores de renina acrescentaram mais um complemento para esse novo cenário. Esses achados sugerem que o SRAA pode ser um sistema regulatório duplo e independente, sanguíneo e tecidual, com atuação autócrina e/ou parácrina (SANTOS, 2014).

As ações dos peptídeos angiotensinérgicos são mediadas por receptores de membrana, sendo que o receptor Mas é considerado o receptor funcional para a Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2003). Várias revisões recentes têm-se centrado nas ações cardiovasculares e renais do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas (CASTRO-CHAVES et al., 2010; IWATA et al., 2011; RABELO; ALENINA; BADER, 2011). No entanto, este eixo tem efeitos pleiotrópicos que vão muito além de suas ações cardio-renais e vasculares (Figura 1).

Figura 1 - Efeitos da Angiotensina-(1-7) em diversos tecidos.

Ações da Ang-(1-7) via receptor Mas. As setas em verde e vermelho indicam, respectivamente, a ativação ou inibição do eixo Ang-(1-7)/Mas.

Fonte: Modificado de PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013.

Crescente importância tem sido atribuída a Ang-(1-7) na função cardiovascular, onde, além de promover vasodilatação, inibe: hipertrofia cardíaca, arritmia cardíaca de reperfusão, inflamação, fibrose, agregação plaquetária e estresse oxidativo (FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2001; FRAGA-SILVA et al., 2008; MERCURE et al., 2008; TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005).

O papel da Ang-(1-7) na regulação da excreção de sal e água foi objeto de vários estudos e, como as respostas hemodinâmicas desse heptapeptídeo, os dados referentes à sua ação renal

são difíceis de conciliar. Em túbulos proximais perfundidos e isolados (GARCIA; GARVIN, 1994) e na alça de Henle de ratos (VALLON et al., 1997c), baixas doses de Ang-(1-7) estimulam enquanto que altas doses inibem a reabsorção de água e sódio. No entanto, doses baixas de Ang-(1-7) inibem e altas doses estimulam o transporte de fluido em células epiteliais renais cultivadas (ANDRETTA VAN LEYEN, 1993) e em túbulo convoluto proximal isolado de ratos (HANDA; FERRARIO; STRANDHOY, 1996). A infusão intrarenal de Ang-(1-7) em cães aumenta a excreção urinária de água e de sódio e, embora essa ação seja parcialmente bloqueada pelo antagonista do receptor AT1, não é pelo antagonista do receptor AT2, sugerindo para a Ang-(1-7) uma via de sinalização mediada através do receptor AT1 (HELLER et al., 2000). Também foi suposto que a Ang-(1-7) pudesse limitar o transporte de sódio transcelular, por regular a atividade de transportadores no túbulo proximal; entretanto, nada foi categoricamente demonstrado a esse respeito.

Por outro lado, em túbulos proximais isolados de ratos, Garcia e Garvin (1994) demonstraram que a Ang-(1-7), através de receptores AT1, pode exercer um efeito bifásico sobre a reabsorção de água: em baixas concentrações (10^{-12} M), a Ang-(1-7) aumenta a reabsorção de fluido e bicarbonato, enquanto que em altas concentrações (10^{-8} M) inibe. Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) promove natriurese e diurese através da ativação de receptores AT1, já que, quando foi utilizado o DuP 753 (antagonista específico do receptor AT1 - 10^{-9} M) os efeitos da Ang-(1-7) foram inibidos. Em contraste, Santos e colaboradores (1996) demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) diminui o volume urinário, um efeito revertido pelo A779. Este achado sugere que o efeito antidiurético da Ang-(1-7) é mediado, pelo menos em parte, pelo receptor Mas. Adicionalmente, a administração crônica do antagonista do receptor Mas em ratos normotensos ou espontaneamente hipertensos (SHR) causa diurese e natriurese (SIMÕES E SILVA et al., 1998).

As discrepâncias entre os estudos sobre o papel da Ang-(1-7) na regulação da hemodinâmica renal, bem como na excreção renal de sal e água, podem ser explicadas por diferenças na metodologia e por utilização de preparações *in vitro* ou *in vivo*. Devido à rápida degradação da Ang-(1-7) no plasma, nos experimentos *in vivo* [que envolvem a infusão de Ang-(1-7)] pode haver concentração hormonal em níveis mais baixos do que quando iguais concentrações são utilizadas *in vitro* (VAN DER Wouden et al., 2006; YAMADA et al., 1998).

Dados do nosso laboratório demonstraram os efeitos *in vivo* da Ang-(1-7) sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e a concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no segmento S2 do túbulo proximal de ratos: i) a Ang-(1-7) tem efeito bifásico no JHCO_3^- : em doses baixas (10^{-12} ou 10^{-9} M) o inibe, mas em alta dose (10^{-6} M) o estimula; ii) esse efeito hormonal se faz via NHE3; iii) na situação controle existe Ang-(1-7) endógena intratubular inibindo esse trocador; iv) a Ang-(1-7) tem efeito dose dependente no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$: doses baixas (10^{-12} M ou 10^{-9} M) causam grande aumento e dose alta (10^{-6} M) causa pequeno aumento e v) o efeito da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se faz via receptor Mas (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013).

Ainda, confirmando esses achados, vários estudos de nosso Laboratório demonstram que o efeito bifásico dose dependente da Ang II (MUSA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2000), da Aldosterona (LEITE-DELLOVA et al., 2008) ou da Arginina-vasopressina (OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2001) sobre o trocador Na^+/H^+ está associado com aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Assim, baixas doses (10^{-12} , 10^{-9} M) de Ang II, Aldo ou AVP causam pequeno aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estimulando o trocador, enquanto que alta dose (10^{-6} M) de Ang II, Aldo ou AVP causam grande aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inibindo o trocador.

Portanto, é razoável acreditar que, no animal intacto, a interação dos efeitos da Ang II e da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ possa representar uma relevante regulação fisiológica em condições de modificação do volume e/ou do pH extracelular.

Além dos receptores Mas mediar muitos dos efeitos da Ang-(1-7) ao longo do néfron, os receptores de Ang II também podem estar envolvidos e influenciar os efeitos tubulares desse heptapeptídeo. Portanto, é evidente que mais estudos são necessários para desvendar os efeitos da Ang-(1-7) sobre o transporte tubular renal, uma vez que as informações disponíveis atualmente são difíceis de serem conciliadas em um modelo abrangente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de reabsorção de bicarbonato (HCO_3^-) no túbulo proximal

Na célula tubular proximal (predominantemente) ocorrem dois processos que são fundamentais para a regulação do equilíbrio ácido-base: a secreção de hidrogênio e a reabsorção de bicarbonato. Os dois processos ocorrem de forma acoplada, para cada íon H^+ secretado, um HCO_3^- é reabsorvido (Figura 2).

Em condições normais, praticamente todo o bicarbonato filtrado é reabsorvido ao longo do néfron. Cerca de 70% da reabsorção do bicarbonato ocorrem no túbulo proximal, principalmente na sua porção inicial.

O trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) é expresso na membrana apical do túbulo proximal. Este transportador utiliza o potencial eletroquímico de Na^+ através da membrana como força movente. Este gradiente é mantido pela Na^+/K^+ ATPase, expressa na membrana basolateral do epitélio tubular renal. A atividade da Na^+/K^+ ATPase está vinculada a um gasto de energia metabólica, pois transporta Na^+ e K^+ contra seus gradientes eletroquímicos. O Na^+ é transportador para o meio extracelular, e o K^+ para o meio intracelular, mantendo-se, com a atividade desse transportador, o meio intracelular pobre em Na^+ e concentrado em K^+ .

A reabsorção de bicarbonato depende do íon H^+ secretado para a luz tubular, sendo realizada majoritariamente via trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3), mas também através de outras proteínas extrusoras de H^+ , como a H^+ -ATPase presente no túbulo proximal.

O íon H^+ pode ser gerado no interior da célula tubular, a partir da reação entre CO_2 e H_2O , catalisada pela enzima anidrase carbônica. O H_2CO formado pela hidratação do CO_2 , instantaneamente, dissocia-se em H^+ e HCO_3^- . Outra maneira de representar esta reação envolve a dissociação intracelular da água em H^+ e OH^- . O H^+ é então secretado para a luz tubular e o OH^- reage intracelularmente com o CO_2 sob a ação da anidrase carbônica, originando HCO_3^- . O efeito resultante é o mesmo que o de hidratação do CO_2 , havendo formação de hidrogênio, que é secretado, e bicarbonato, que é reabsorvido. A reabsorção de bicarbonato pela membrana basolateral ocorre por meio do cotransportador $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ e o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AIRES et al., 2008, 2012)

Figura 2 - Papel do trocador Na^+/H^+ na reabsorção renal de HCO_3^- .

Fonte: Modificada de Aires (2008).

2.2 Trocador Na^+/H^+ - Isoforma 3 (NHE3)

O NHE3 é uma das 9 isoformas conhecidas da família de genes do permutador Na^+/H^+ (NHE) de mamíferos. Os NHEs de mamíferos consistem de isoformas presentes primariamente na membrana plasmática de células ou de organelas citoplasmáticas (BRETT et al., 2005). A isoforma NHE3 está presente no intestino, pâncreas, túbulos proximais renais e no segmento descendente fino e no ascendente espesso da alça de Henle (BRANT et al., 1995). Os túbulos proximais são os principais responsáveis pelo mecanismo de acidificação tubular luminal que contribui para a reabsorção do bicarbonato filtrado. Todos os membros da família dos NHE3s de mamíferos secretam um H^+ citosólico em troca por um Na^+ extracelular com uma estequiometria rígida de 1:1 e compartilham uma estrutura comum.

As isoformas de NHE apresentam um longo domínio N-terminal hidrofóbico com 10 a 12 segmentos transmembrana e um domínio C-terminal relativamente hidrofílico (que não atravessa

a membrana) dirigido ao citoplasma. O domínio hidrofóbico é altamente conservado (40 a 70%) entre as diferentes isoformas e compõe o núcleo catalítico da proteína, enquanto a porção citoplasmática é menos conservada (10 a 20%) e participa da modulação do transporte por diversos agentes, tais como fatores de crescimento, hormônios e alterações de osmolaridade (CHOW et al., 1999; GOYAL et al., 2003; ZIZAK et al., 2000).

Todos os membros da família do NHE compartilham de uma estrutura comum com aproximadamente 400 aminoácidos em sua porção N-terminal formando seus 12 segmentos transmembrana; sua porção C-terminal, também composta de aproximadamente 400 aminoácidos, tem importantes funções regulatórias. Esta alça citoplasmática contém diversos sítios de fosforilação, que são alvos de várias cinases, e domínios de interação com muitos fatores regulatórios (Figura 3).

Figura 3 - Modelo estrutural do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3).

O trocador apresenta 831 aminoácidos, 12 domínios transmembrânicos, e algumas alças intra e extracelulares. Seus grupamentos aminoterminal (NH₂, transportador e relativamente curto) e carboxiterminal (COOH, regulador e longo - com os aminoácidos 454 a 831) estão localizados no citosol. DPP-IV = depeptidil peptidase IV; CHP = *calcineurin homologous protein*; Ezrin = composto ezrina radixina e moesina – envolvido na migração e formação de complexos de sinalização e resistência a apoptose; NHERFs = Fatores reguladores do trocador NHE.

Fonte: Modificada de Orlowski e Grinstein (2004).

A porção C-terminal do NHE é importante na modulação do transporte iônico por interagir com diversos agentes (fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas). Além disso, este domínio possui sítios de fosforilação para várias proteínas quinases, tais como proteína quinases C (PKC) e proteína quinase A (PKA). A PKC fosforila praticamente todas as isoformas do trocador Na^+/H^+ , enquanto a PKA, parece fosforilar apenas as isoformas NHE1 e NHE3.

A extrusão celular de H^+ em troca por Na^+ é um dos meios mais efetivos de eliminação do excesso de ácidos de células metabolicamente ativas. Quando o pH intracelular (pHi) encontra-se próximo do valor neutro (pH=7,0), o trocador apresenta baixa afinidade pelo H^+ intracelular, funcionando em ritmo basal, apenas para manutenção do pHi. No entanto, com o aumento da concentração de H^+ intracelular, o trocador é ativado, atingindo sua taxa máxima de transporte (AIRES et al., 2008, 2012).

O trocador Na^+/H^+ não participa apenas da regulação do pHi, mas também do volume e divisão celular. As células do túbulo proximal expressam além do NHE1 na membrana basolateral, o NHE3 na membrana luminal (AIRES et al., 2008, 2012).

O NHE3 é menos sensível ao amiloride que o NHE1. O NHE3 apresenta particular relevância, pois secreta H^+ para a luz tubular e reabsorve Na^+ para o meio intracelular. Com isso o NHE3 contribui para a manutenção dos níveis adequados de Na^+ , do volume intra e extracelular, além de participar na manutenção do equilíbrio ácido-base. Essa isoforma corresponde a um polipeptídeo de 80 kDa e seu gene já foi identificado e denominado SLC26A3 (BIEMESDERFER et al., 1993). O conhecimento de todos os fatores que a modulam é de fundamental importância para se compreender o processo de reabsorção de íons, em especial o sódio, que em grande parte é reabsorvido, no túbulo proximal, por este transportador.

O NHE3 também está envolvido na gênese ou manutenção de várias condições patológicas, principalmente relacionadas ao controle da pressão arterial e da volemia, tais como, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão arterial essencial e hipertensão de outras origens (CRAJOINAS et al., 2010; HORITA et al., 2011). Por estas razões, este trocador tem sido estudado exaustivamente, bem como as proteínas e/ou fatores regulatórios que o modulam.

2.3 Hipertensão e Sistema Renina Angiotensina (SRA)

A hipertensão arterial é definida como a pressão sanguínea sistólica igual ou acima de 140 mmHg e/ou a pressão sanguínea diastólica igual ou superior a 90 mmHg. Níveis normais de pressão sistólica e diastólica são particularmente importantes para a função eficiente dos órgãos vitais, como o coração, cérebro e rins. Quase um bilhão de pessoas no mundo possuem hipertensão e estima-se que 1,56 bilhões de pessoas terão essa anomalia em 2025 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é crucial na regulação da pressão arterial (PA), sendo que a ativação do SRA tem sido implicada no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos estabelecidos como semelhantes à hipertensão humana e a PA em SHR é dependente do SRA (RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000). Este modelo experimental de hipertensão que não depende de intervenção farmacológica, fisiológica ou cirúrgica foi desenvolvido por Okamoto e Aoki, no final da década de 50, a partir da seleção dos ratos Wistar Kyoto que apresentavam pressão arterial superior a 150mmHg. Quase 20 anos depois estes ratos deram origem à linhagem de ratos SHR que desenvolve hipertensão espontaneamente, com idade entre 7-15 semanas de vida (LERMAN et al., 2005; OKAMOTO; AOKI, 1963; SARIKONDA et al., 2009).

A ativação do SRA e subsequente geração de Ang II é um importante mediador da hipertensão e da insuficiência cardíaca (CARRETERO; OPARIL, 2000; KIM; IWAO, 2000; MEHTA; GRIENDLING, 2007; WEBER; BRILLA, 1991). O nível elevado de Ang II é um mediador dos efeitos patológicos do SRA e leva ao remodelamento adverso do coração, vasos e os rins, servindo assim como um importante mecanismo para a insuficiência cardíaca e hipertensão (CARRETERO; OPARIL, 2000; MCKEE et al., 1971; ZILE; BRUTSAERT, 2002).

Atualmente o SRA, além de sua função endócrina, também é considerado um sistema com funções parácrina e autócrina, responsável pela produção de diversos peptídeos biologicamente ativos. Ademais de atuar no controle da pressão arterial, na homeostase hidroeletrolítica e na função celular, o SRA exerce importante papel em diversas situações patológicas, tais como no diabetes e na hipertensão (MENG et al., 2014).

2.3.1 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

A formação dos peptídeos angiotensinérgicos se inicia com a clivagem do angiotensinogênio pela renina, com consequente formação do decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). Este peptídeo, por sua vez, é hidrolisado, principalmente pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando o principal peptídeo vasoativo desse sistema: o octapeptídeo Angiotensina II (Ang II) (BADER; GANTEN, 2008).

A Figura 4 ilustra o conceito clássico, admitido até cerca de uma década, para o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

Figura 4 - Conceito clássico do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona intravascular.

O Angiotensinogênio, precursor de todos os peptídeos da Angiotensina, é sintetizado pelo fígado. Na circulação é clivado pela Renina, que é secretada no lúmen das arteríolas aferentes renais pelas células justaglomerulares. A Renina cliva quatro aminoácidos de Angiotensinogênio, formando a Ang I. Por sua vez, a Ang I é clivada pela enzima conversora de Angiotensina (ECA), uma enzima ligada à membrana das células endoteliais, para formar a Ang II. Na zona glomerulosa do córtex adrenal, a Ang II estimula a produção de Aldosterona (Aldo). A produção de Aldo também é estimulada por potássio, corticotropina, catecolaminas (por exemplo, norepinefrina) e endotelinas.

Fonte: Modificado de Weber (2001).

A renina é uma enzima proteolítica que tem um papel modulador da função cardiovascular; a enzima que tem mais ênfase é a de origem renal, que gera a angiotensina (BADER, 2010).

Outros locais de produção de renina são: vasos sanguíneos, miocárdio, glândulas adrenais, cérebro, órgãos reprodutores e retina (BADER et al., 2001; DANSER et al., 1989; HSUEH; BAXTER, 1991; VON LUTTEROTTI et al., 1994). A renina cliva a α 2-globulina (angiotensinogênio, oriundo do fígado), formando um decapeptídeo relativamente inativo, a angiotensina I. Em seguida, a enzima conversora de angiotensina (ECA) converte a angiotensina I em angiotensina II, um octapeptídeo vasopressor ativo. A ECA deriva principalmente do endotélio capilar do pulmão (ROGERSON et al., 1992), mas também é encontrada no plasma circundante e rins (CHAPPELL et al., 2004; CHAPPELL, 2007).

A geração de outro importante componente desse sistema, o heptapeptídeo Angiotensina-(1-7), ocorre por vias enzimáticas diferentes daquelas observadas na formação da Ang II. A mais importante e eficiente via, sob os pontos de vista fisiológico e catalítico, é a que se dá por meio de uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que converte a Ang II em Ang-(1-7) (VICKERS et al., 2002).

A Ang-(1-7) na forma de um heptapéptido é derivada principalmente da degradação da Ang II pela ECA2 no rim. Os níveis intrarenais de Ang-(1-7) e Ang II são regulados de acordo com as necessidades de homeostase. A Ang-(1-7) está presente no rim em concentrações que são comparáveis a Ang II (ALLRED et al., 2000a; CHAPPELL et al., 1998a, 2004; CHAPPELL; ALLRED; FERRARIO, 2001; FERRARIO et al., 2002b, 2005a).

Portanto, há algumas décadas acreditava-se que o SRA tivesse um caminho linear de proteólise limitada para a produção de um único produto final ativo, a Ang II. Porém, essa idéia inicial mudou drasticamente ao longo dos últimos 20 anos, com a identificação de novos componentes do SRA (ECA2, receptor Mas e renina/receptor pró-renina) e as novas ações descobertas para o SRA. A grande mudança na nossa compreensão do SRA foi a proposição do conceito do SRA como um sistema de dois eixos: um eixo representado pela ECA/AngII/AT1 (receptor de Ang II do tipo 1) e o outro pela ECA2/Ang-(1-7)/Mas. A identificação do receptor renina/pró-renina e suas ações fisiológicas, que vão além do seu papel no SRA e, mais recentemente de outro produto da ECA2, a Ang-(1-9) [Angiotensina (1-9)], como um membro biologicamente ativo do SRA (CHAPPELL et al., 2004; FERRARIO et al., 2005a) e a Ang III

2.3.2 Papel do SRA na regulação da pressão arterial

A pressão arterial é regulada pelo SRA por meio do seguinte mecanismo: quando há queda na pressão arterial registrada pela mácula densa, ocorre estimulação das células justaglomerulares para secretarem a renina, uma enzima renal de atuação sistêmica. Por sua vez, a renina cliva o angiotensinogênio, liberando Ang I, que é convertida em Ang II por ação da ECA. A angiotensina II é um autacóide que provoca contração das paredes musculares das pequenas artérias (arteríolas), aumentando a pressão arterial. A Ang II também desencadeia a liberação do hormônio Aldosterona pelas glândulas adrenais, provocando a retenção de sal (sódio) e a excreção de potássio. O sódio promove a retenção de água e, dessa forma, provoca a expansão da volemia e o aumento da pressão arterial (AIRES, 2008, 2012).

Depois da vasopressina (ou hormônio antidiurético), importante vasoconstritor em vasos de resistência, produzida no hipotálamo e liberada pela neuro-hipófise, a Ang II é o vasoconstritor mais potente produzido no corpo, sendo rapidamente degradada nos leitos capilares periféricos por angiotensinases (AIRES, 2008, 2012). A angiotensina III é um dos metabolitos produzidos pela degradação da Ang II por angiotensinases, e pode ser o mediador da liberação da aldosterona no córtex supra-renal, sendo o componente fisiologicamente mais ativo do SRA no cérebro (FOURNIE-ZALUSKI et al., 2004).

Como já dito, o aparelho justaglomerular é o local de produção de renina no rim. Neste órgão, a produção de renina é aumentada por redução da pressão renal, diminuição no volume do líquido extracelular, estimulação de nervos simpáticos destinados ao rim ou alterações da carga de sódio nos túbulos distais. Níveis elevados de sódio, Ang II ou hormônio antidiurético no sangue inibem a liberação de renina (AIRES, 2008, 2012). Assim, o SRA é um circuito fechado, um sistema de retroalimentação negativa. Como a Ang II estimula a liberação de aldosterona pelo córtex supra renal, o SRA desempenha papel fundamental no conteúdo corporal de sódio e água, e no equilíbrio de potássio. Portanto, este sistema de retroalimentação contribui para o controle da pressão arterial por regulação do equilíbrio hídrico extracelular e homeostase de potássio (AIRES, 2008; SAMAVAT; AHMADPOOR; SAMADIAN, 2011), contribuindo então para a regulação do volume plasmático.

Pequenas reduções na perfusão renal, entre 100 e 65 mmHg, liberam renina suficiente para aumentar a pressão arterial o que leva, dentro de 20 minutos, a uma compensação de 65% da

queda da pressão renal. Assim, o SRA tem um ganho suficiente e opera com velocidade apropriada para funcionar continuamente no controle da pressão arterial. A Ang II desempenha um papel significativo na manutenção da pressão arterial em condições de stress (ex.: deficiência em sal, remoção da suprarrenal, administração de diuréticos, redução da perfusão na pressão renal) mediante as suas ações vasoconstritoras e estimulantes da aldosterona. A Ang II promove também a exacerbação da sede e do apetite por sal, o auxílio na síntese e liberação de norepinefrina e a inibição da sua captação, estimulação da liberação de vasopressina, o aumento da secreção de epinefrina pelas adrenais e pode mesmo levar ao crescimento das células musculares cardíacas (AIRES, 2008, 2012; FRANCIS et al., 1993).

As ações da aldosterona, apesar de benéficas a curto prazo, tornam-se deletérias a longo termo, contribuindo para a progressão da insuficiência cardíaca (SCHULLER et al., 2011). Este hormônio promove a reabsorção de sódio e cloreto, a perda de magnésio, hidrogênio e potássio, ativação simpática e inibição parassimpática (MACFADYEN et al., 1997). Os efeitos deletérios diretos provocados por este hormônio englobam fibrose miocárdica e vascular, disfunção dos barorreceptores (WANG, 1994), redução do volume do colágeno miocárdico (MACFADYEN; BARR; STRUTHERS, 1997), arritmias ventriculares (BARR et al., 1995) e dano vascular, prejudicando a complacência arterial (PITT et al., 1999; STRUTHERS, 2004).

A pressão arterial é fisiologicamente um dos parâmetros mais fortemente controlados em humanos e animais, já que a sua manutenção é vital para garantir a normal função orgânica. Tanto a hipertensão como a hipotensão podem limitar a expectativa de vida dos pacientes, especialmente se as alterações persistem por períodos prolongados ou quando as variações são dramáticas. Os barorreceptores, os quimiorreceptores e o controle central da pressão na medula oblonga (bulbo), são os principais componentes do sistema de controle que visa assegurar uma adequada perfusão, através da manutenção de uma pressão arterial normal (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

A hipertensão arterial pode resultar de várias alterações estruturais do sistema cardiovascular, que amplificam o estímulo hipertensivo e causam dano cardiovascular. A intervenção farmacológica sobre as várias etapas do SRA tem eficácia comprovada no controle da pressão arterial, além de reduzir significativamente a hipertrofia ventricular esquerda. Os diversos fármacos têm eficácias distintas, sendo os beta-bloqueadores e os inibidores da enzima

de conversão da Ang II os de maior benefício clínico comprovado (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; KIM et al., 2000a).

2.4 Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA2)

A ECA2 é uma metalopeptidase semelhante a ECA, mas apresenta uma atividade carboxipeptidase, clivando a ligação Pro⁷-Phe⁸ da Ang II para gerar Ang-(1-7). A ECA2 também hidrolisa a ligação His⁹-Leu¹⁰ de Ang I para formar Ang-(1-9). Além disso, a abundância destas peptidases dentro do rim (para além das suas propriedades catalíticas) e do acesso celular para os substratos peptídicos irá determinar a medida em que podem participar na formação de Ang-(1-7). Tal como observado para ECA, a homóloga ECA2, é encontrada em ambas as formas solúveis e associadas à membrana dentro de um certo número de tecidos, incluindo: rim, coração, cérebro, pulmões e testículos (CHAPPELL, 2007). No rim, a ECA2 está localizada principalmente do lado apical dos túbulos proximais com expressão também evidente nos podócitos do glomérulo (REICH et al., 2008; VELEZ et al., 2007; WARNER et al., 2005; YE et al., 2006). A ECA2 é a principal enzima responsável pela conversão da Ang II para Ang-(1-7) nos túbulos proximais de ovelhas e podócitos isolados a partir de rim de rato (SHALTOUT et al., 2006; VELEZ et al., 2007). Portanto, torna-se cada vez mais evidente que a ECA2 influencia a expressão de Ang II e Ang-(1-7) no interior do rim, assim como em outros tecidos, em última análise impactando a saída funcional do SRA (OUDIT et al., 2006; WONG et al., 2007; YE et al., 2006).

A ECA2 é também uma glicoproteína de membrana do tipo 1 que é encontrada na maioria dos tecidos, com a sua expressão mais elevada em rins, endotélio e coração (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000). A superfície extracelular da enzima ECA2 contém um único domínio catalítico metalopeptidase, que partilha 42% de identidade e de 61% de sequência similar com o domínio catalítico N-terminal da ECA somática (FRAGA-SILVA; FERREIRA; SANTOS, 2013; SHALTOUT et al., 2006). A ECA2 é uma exopeptidase, que catalisa a conversão de Ang I ao nonapeptídeo Ang-(1-9) e a conversão de Ang II para o heptapeptídeo Ang-(1-7). O papel principal da ECA2 é a conversão de Ang II em Ang-(1-7) com uma eficácia 400 vezes maior do que a ação hidrolítica da ECA2 na formação de Ang-(1-9) (VICKERS et al., 2002). A ECA2 está associada com uma redução na Ang II e um aumento em níveis de Ang-(1-7). Os níveis da

proteína ECA2 são significativamente menores em rins de pacientes hipertensos (CRACKOWER et al., 2002) (Figura 6).

Figura 6 - Os mecanismos para a formação e degradação de Ang-(1-7) no rim.

São descritas as seguintes vias para a formação e degradação da Ang-(1-7) no rim: (i) degradação da Ang II dependente da ECA2, ou a clivagem da Ang I mediada pela ECA2, assim podendo ser convertida em Ang-(1-7) pela ECA; (ii) os compostos prolil oligopeptidase (POP), neprilisina (NEP), ou thimet oligopeptidase (TOP) medeiam a clivagem de Ang I; (iii) a Ang-(1-7) é metabolizada pela ECA a Ang-(1-5) ou (iv) por neprilisina ou aminopeptidases (AP) para gerar Ang-(1-4). A Ang-(1-7) se liga com alta afinidade ao receptor Mas, acoplado a proteína G. Em concentrações elevadas, a Ang-(1-7) pode ligar-se e ativar o receptor AT1. O receptor Mas pode atuar como um antagonista fisiológico do receptor AT1.

Fonte: Modificado de Zimmerman e Burns, 2012.

Além disso, o aumento dos níveis e da atividade da ECA2 têm sido associados a drogas conhecidas por bloquear o SRA. O olmesartan e o losartan (antagonistas do receptor da Ang II tipo 1 - AT1) e o inibidor da ECA (lisinopril) aumentaram os níveis de ECA2 e Ang-(1-7) (FERRARIO et al., 2005a; ISHIYAMA et al., 2004).

Foi demonstrado que a distribuição de ECA2 no interior dos túbulos renais é semelhante ao da Ang-(1-7) (CHAPPELL et al., 2004). Em ratos que receberam lisinopril ou losartan aumenta a atividade de ECA2 e os níveis urinários de Ang-(1-7) (FERRARIO et al., 2005a).

2.5 Ações da Ang-(1-7) sobre os rins

Muitos estudos têm abordado a complexidade das ações renais da Ang-(1-7). Diferenças entre as espécies, locais do néfron, concentrações sistêmicas, nível de ativação do SRA, e o nível de sódio e a água podem ser responsáveis por resultados discrepantes relativos aos efeitos renais da Ang-(1-7).

A ação diurética e natriurética da Ang-(1-7) tem sido descrita em muitos trabalhos em *in vitro* (ANDREATTA-VAN-LEYEN et al., 1993; LARA, 2006) e em modelos experimentais *in vivo*, principalmente através da inibição da reabsorção de sódio em túbulo proximal (DELLIPIZZI; HILCHEY; BELL-QUILLEY, 1994; HANDA, 1999; VALLON, 1997b). A Ang-(1-7) parece ser um potente inibidor da atividade da Na^+/K^+ -ATPase no córtex renal (LÓPEZ ORDIERES et al., 1998) e nos túbulos convolutos proximais isolados (BÜRGELOVÁ et al., 2002). Estudos *in vitro* também indicaram que a Ang-(1-7) modula o efeito estimulatório da Ang II sobre a reabsorção de sódio em túbulo proximal através do receptor sensível a A779, o receptor Mas. Em relação a isso, outro estudo mostrou que a administração intrarenal de Ang-(1-7) produziu natriurese e bloqueou as ações antinatriuréticas da Ang II (BÜRGELOVÁ et al., 2002).

A Ang-(1-7) também contribui para a regulação hemodinâmica renal. A capacidade do rim para gerar altas concentrações intratubulares e intersticiais de Ang II e Ang-(1-7) permite que o rim regule os níveis intrarenais destas angiotensinas de acordo com as necessidades de homeostase para a regulação da hemodinâmica renal, reabsorção tubular e balanço de sódio. Quando o SRA é estimulado inadequadamente, níveis elevados de Ang II intrarenais, agindo em receptores AT1, podem levar à hipertensão capilar sistêmica e glomerular, o que pode induzir lesão hemodinâmica ao endotélio vascular e glomérulo (BREWSTER; PERAZELLA, 2004; NAVAR; NISHIYAMA, 2004). Além disso, ações profibrotica e proinflamatória de Ang II também podem promover danos renal (JAIMES et al., 2005; NAVAR; NISHIYAMA, 2004).

Por outro lado, outras pesquisas relataram que a Ang-(1-7) induziu a dilatação da arteríola aferente renal em coelhos (REN; GARVIN; CARRTERO, 2002) e demonstraram que a infusão

de baixas concentrações de Ang-(1-7) aumentaram o fluxo sanguíneo renal em ratos (SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). A Ang-(1-7) também atenuou o efeito da resposta pressórica induzida por Ang II e a liberação de noradrenalina, à estimulação do nervo renal em rim isolado de ratos (STEGBAUER et al., 2004). Estes resultados abriram a possibilidade de que Ang-(1-7) também possa atuar como um regulador fisiológico da pressão intraglomerular, provavelmente, opondo-se aos efeitos hipertensos e fibrogênicos da Ang II.

As ações natriuréticas da Ang-(1-7) provavelmente envolvem a influência do peptídeo na atividade de vários canais de sódio. Estudos imunohistoquímicos, localizaram o receptor Mas em segmentos tubulares do rim, incluindo o túbulo proximal e ramo grosso ascendente da alça de Henle (DA SILVEIRA et al., 2010; GWATHMEY et al., 2010). A Ang-(1-7) inibe a atividade Na^+/K^+ -ATPase em túbulos proximais convolutos isolados e homogenatos de córtex renal (HANDA, 1999; HANDA; FERRARIO; STRANDHOY, 1996; LOPEZ et al., 1998). A Ang-(1-7) também inibe o fluxo intracelular de sódio em células epiteliais tubulares renais que está associado com a ativação de fosfolipase A2 e a liberação de ácido araquidônico (ANDREATTA-VAN LEYEN et al., 1993). Doses baixas (picomolar) de Ang-(1-7) estimula a incorporação de fosfatidilcolina no córtex renal, proporcionando um potencial mecanismo para substrato do ácido araquidônico no rim (CHANSEL et al., 2001; GIRONACCI et al., 2002; HEITSCH et al., 2001).

Em ovinos, baixas doses sistêmicas de Ang-(1-7) induz rápida natriurese, sem alterações gerais na pressão arterial sistêmica, sendo a resposta bloqueada pelo antagonista do receptor da Ang-(1-7) (A779) (TANG et al., 2009). A deleção da proteína Mas em camundongos, resulta na redução da excreção de sódio e um volume inferior de urina, bem como a redução do fluxo sanguíneo renal e o aumento da resistência vascular renal; no entanto, não houve alteração na pressão sanguínea arterial média neste modelo (PINHEIRO et al., 2009).

Os efeitos renais da Ang-(1-7) são complexos e podem não ser sempre oposto aos induzidos por Ang II. Enquanto a Ang II aumenta acentuadamente a resistência arteriolar glomerular eferente e não muda a resistência arteriolar aferente, a Ang-(1-7) direta e indiretamente vasodilata as arteríolas aferentes e aumenta o fluxo sanguíneo renal, por agir via Mas com a liberação de prostaglandinas, óxido nítrico e Ang II (BOTELHO-SANTOS et al., 2007; SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003; STEGBAUER et al., 2004)

Tal como observado para a Ang II agindo no túbulo proximal, a Ang- (1-7) também exerce efeitos diferenciados de acordo com sua concentração e o local do néfron (SIMÕES E SILVA; FLYNN, 2012; ZIMMERMAN; BURNS, 2012).

Os níveis intrarenais de Ang II e Ang-(1-7) são regulados de acordo com as necessidades de homeostase. A Ang-(1-7) está presente no rim em concentrações picomolar que são comparáveis às da Ang II (ALLRED et al., 2000; CHAPPELL et al., 1998, 2001, 2004; FERRARIO et al., 2002, 2005). A Ang-(1-7) é o principal produto obtido nos túbulos proximais isolados (CHAPPELL et al., 2001) e também está presente nos túbulos distais e ducto coletor (FERRARIO et al., 2002)

Dados imunohistoquímicos mostraram uma distribuição semelhante para Ang-(1-7), Mas e ECA2 nos rins (CHAPPELL et al., 2004), colocando os principais componentes em conjunto nas suas ativações e atividades. Consistente com esta última descoberta, demonstrou-se que os efeitos biológicos de Ang-(1-7) no rim são mediados principalmente pelo Mas (SANTOS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004).

Evidências sugerem que o equilíbrio entre a ativação do eixo ECA/Ang II/AT1 e o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas desempenha um papel importante na função de diferentes órgãos e sistemas, e que um desequilíbrio nesses caminhos opostos para o eixo ECA/Ang II/AT1 pode predispor a doenças cardiovasculares e outras desordens. Várias revisões recentes têm-se centrado nas ações cardiovasculares e renais do novo eixo do SRA e sua implicação em doenças cardiovasculares e renais. No entanto, este eixo tem múltiplos efeitos que vão muito além de suas ações cardio-renais e vasculares.

As ações opostas de Ang-(1-7) sobre a Ang II sugerem que uma parte das ações anti-hipertensiva e renoprotetoras, é devida ao bloqueio da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou aos bloqueadores dos receptores de Ang II, e podem ser mediados pelo eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas (FERRARIO et al., 2005b).

2.5.1 Ações da Ang-(1-7) em SHR

O SRA ativado tem sido implicado no desenvolvimento e na manutenção de certas formas de hipertensão (KATOVICH; GROBE; RAIZADA, 2008). A Ang-(1-7) estimula a produção de

óxido nítrico e vasodilatação, podendo ter benefício terapêutico no tratamento da hipertensão e na lesão renal hipertensiva.

Uma diminuição transitória da pressão arterial foi observada com a infusão intravenosa de Ang-(1-7) em SHR (BENTER et al., 1995). Curiosamente, em SHR, os efeitos anti-hipertensivos de tratamento com inibidores da ECA e receptores AT1 combinados, são associados a níveis elevados no plasma de Ang-(1-7), sendo que a Ang-(1-7) pode, em parte, mediar a resposta, uma vez que o tratamento com um anticorpo monoclonal específico de Ang-(1-7) induz elevação significativa da pressão arterial (IYER et al., 1998a). Assim, em modelos de animais hipertensos, a Ang-(1-7) endógena parece desempenhar importante papel contra regulatório á Ang II, tendendo a normalizar a PA.

Em SHR tratados com L-NAME, a administração crônica de Ang-(1-7) (576 ug/kg de peso corporal, por dia): i) reduziu significativamente a PA e a proteinúria, ii) foi associada com menores graus de lesão vascular hipertensiva, em cortes histológicos de rins e iii) restaurou a responsividade mesentérica vascular a estímulos constritores e vasodilatadores (BENTER et al., 2006). Neste modelo, os efeitos da Ang-(1-7) são semelhantes aos do captopril.

Os animais SHR apresentam grande expressão de receptor AT1 em córtex renal (SULLIVAN et al., 2007, 2010); a hipertensão tem sido associada à ativação do SRA, em parte devido à redução da ECA2 (TAN; WU; MA, 2011; VARAGIC et al., 2010; ZHONG et al., 2011); a Ang-(1-7) tem efeito protetor contra a doença cardiovascular e renal (BENTER et al., 2006; WIDDOP; SAMPEY; JARROTT, 1999)

Dado o papel crucial da ECA2 como um regulador negativo do SRA, fica reforçada a idéia que a ação da ECA2 pode ter efeitos terapêuticos para doenças cardiovasculares. Entretanto, em ratos SHR, a ECA2 tem mostrado resultados controversos, com relatos de aumento da fibrose do miocárdio e demais resultados adversos (MASSON et al., 2009), em contraste com estudos mostrando benefícios marcados pela super expressão de ECA2 (DÍEZ-FREIRE et al., 2006).

A Ang (1-7) se opõe às ações da Ang II sobre a regulação da função renal (FERRARIO; VARAGIC, 2010). A Ang-(1-7) está predominantemente localizada no interior do córtex renal e medula externa e foi encontrada em túbulos proximal e distal em ratos SHR (FERRARIO et al. 2002a).

2.6 Ações da Ang-(1-7) sobre a concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)

O íon Ca^{2+} desempenha um papel crucial em diferentes respostas biológicas. Um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ pode iniciar muitos processos celulares fisiopatológicos (BOOTMAN; BERRIDGE; RODERICK, 2002). No entanto, uma não regulação da $[Ca^{2+}]_i$ pode causar aumento de fluxo de íons, disfunção de proteínas, apoptose e a proliferação (CLAPHAM, 1995).

A Ang-(1-7) aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ em células tubulares renais caninas (MDCK), via: i) estimulação dos receptores da angiotensina tipo 1, com liberação do Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático e ii) pela fosfolipase C e influxo de Ca^{2+} , através da fosfolipase A2 (CHUNG-PIN et al., 2012).

Foram descritos efeitos da Ang-(1-7) sobre a $[Ca^{2+}]_i$ em astrócitos, onde ocasiona aumento da $[Ca^{2+}]_i$, mas o mecanismo não ficou claro (GUO et al., 2010).

A Ang-(1-7) pode aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ pela estimulação do NHE-1 ou através da ativação da Akt apenas em alta estimulação atrial, que por sua vez ativa Ca^{2+} /calmodulina kinase, em miócitos atriais (SHAH et al., 2010).

Além disso, a Ang-(1-7) não tem efeito sobre a $[Ca^{2+}]_i$ basal, enquanto que a Ang II e Ang-IV aumentam a $[Ca^{2+}]_i$ dose dependente, em células mesangiais (CHANSEL et al., 2001).

Assim como a Ang II, a Ang-(1-7) pode aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ através do receptor AT1, mas apresenta efeito oposto a Ang II uma vez que pode induzir efeito protetor e antiproliferativo através do receptor Mas (LIU et al., 2012; SAMPAIO et al., 2007).

Em comum, a maioria destes estudos utilizaram concentrações farmacológicas de Ang-(1-7), sugerindo que, nesta condição, a Ang-(1-7) poderia competir por receptores AT1 (OUDOT et al., 2005). Em concentrações fisiológicas, a Ang-(1-7) é um modulador endógeno das respostas mediadas via AT1 pela Ang II. Este fenômeno é observado claramente no nível intracelular.

2.7 Atuação dos inibidores do receptor AT1 na hipertensão arterial

A hipertensão arterial é um relevante fator comum de contribuição para todas as principais doenças cardiovasculares, incluindo: doença coronariana, acidentes encefálicos, doença arterial periférica, doença renal e insuficiência cardíaca. Os outros fatores de risco que

tendem a acompanhar a hipertensão arterial incluem: intolerância à glicose, obesidade e hipertrofia ventricular esquerda (ROSENDORFF et al., 2015).

Os antagonistas dos receptores da Ang II interferem no SRAA. Agem por antagonismo total, competitivo e específico nos receptores AT1 da Ang II, sem atuação no subtipo AT2 (MAGALHÃES, 2006). O tratamento com antagonista do receptor AT1 reduz a pressão arterial, além de mostrar os efeitos benéficos que estão relacionados com alterações nas concentrações plasmáticas de Ang-(1-7), que proporciona suporte adicional para um papel importante deste peptídeo na modulação da função e doença renal (IGASE; YOKOYAMA; FERRARIO, 2001).

O bloqueio dos receptores AT1 por antagonismo inibe a contração da musculatura lisa vascular causada pela Ang II, assim como previne e reverte todos os seus demais efeitos conhecidos. Como consequência, ocorre vasodilatação, aumento da excreção de sódio e diminuição da atividade noradrenérgica. O antagonismo do receptor AT1 reduz os efeitos de ativação desse receptor como, por exemplo, proliferação celular, crescimento tecidual e aumento da secreção de aldosterona (MAGALHÃES, 2006). Uma vez que estes antagonistas somente bloqueiam os receptores AT1, não interferem com as respostas fisiológicas resultantes da estimulação crônica dos receptores tipo AT2 (e outros) que poderiam resultar em aumento de renina ou liberação de angiotensinas (MUSCARÁ et al., 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos agudos da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e a concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), em túbulo proximal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WHY).

3.2 Específicos

- Analisar os efeitos agudos da Ang-(1-7) (10^{-9} ou 10^{-6} M), e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), e/ou S3226 (10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M), sobre o NHE3 em túbulo proximal *in vivo*.
- Avaliar os efeitos agudos da Ang-(1-7) (10^{-9} ou 10^{-6} M), e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), e/ou S3226 (10^{-6} M) sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em túbulo proximal isolado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos SHR e WKY (20-24 semanas de idade, pesando 280-370g). Os animais foram obtidos no Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Este estudo foi aprovado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - Comissão de Ética no Uso de Animais. Os animais tiveram livre acesso a ração e água até ao momento do experimento

4.1 Medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda

As medidas foram realizadas no sistema de análises de pressão arterial BP-2000 Série II (Visitech Systems) (Figura 7).

Figura 7 - Sistema de Análises de Pressão Arterial BP-2000.

Para a realização das medidas de pressão arterial sistólica, os ratos foram acondicionados em contêntores de ferro, que ficavam em cima de uma plataforma, na qual eram aquecidos e ventilados de maneira adequada. Para tal procedimento, a cauda dos animais era encaixada a um manguito de borracha adaptado à região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro, para insuflar e desinsuflar automaticamente, em intervalos fixos de aproximadamente 40 segundos.

O medidor BP-2000 utiliza fotopletismografia de transmissão, em que a variação na quantidade de luz transmitida através da cauda é o sinal de base, que é analisado para determinar a pressão arterial e a pulsação. Cada vez que o coração bate, uma onda de pressão se desloca através do sistema vascular. Quando esta onda de pressão atinge a cauda, os vasos se dilatam

ligeiramente, e assim dispersam mais a luz vermelha (correspondendo à sístole). À medida que a onda de pressão passa, os vasos da cauda tornam-se menores assim que a pressão diminui, e dispersam menos luz (correspondendo à diástole) (Figura 8). A variação da luz transmitida através da cauda é o que o monitor BP-2000 exibe na tela do computador. A pressão arterial sistólica e diastólica podem ser determinadas por monitoramento da dilatação dos vasos, pela oclusão de um manguito que infla.

Figura 8 - Medida de pressão diastólica e sistólica.

Para reduzir a influência do estresse induzido pela manipulação dos animais, foi realizado o treinamento prévio de uma semana, com estabilização dos sinais de pulso, da frequência cardíaca (FC) e das condições do ambiente onde era aferida a pressão. Já para análise da FC, foram selecionados intervalos de dez segundos entre os ciclos de insulflar e desinsulflar. Os valores da pressão sistólica e da FC foram considerados como a média de dez medidas.

4.2 Microperfusão

A atividade do trocador Na^+/H^+ foi avaliada pela capacidade de acidificação tubular, estudada pela velocidade de reabsorção tubular de bicarbonato (JHCO_3^-), medida por meio de microeletrodo de resina sensível a H^+ .

4.2.1 Preparação dos animais.

Foram utilizados ratos Wistar-Kyoto e SHR machos, pesando entre 180 e 220 g, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas, USP. Os animais foram preparados para a microperfusão *in vivo*, sendo anestesiados com uma injeção intramuscular de Zoletil (tiletamida + zolazepam) e Xilazina, nas doses de 50 e 5 mg/kg de peso corpóreo. Durante o experimento os ratos receberam, por via jugular, solução salina com manitol a 3%, numa velocidade de 0,05 ml/min., mediante bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus Compact Infusion, MA, USA). Em todos os ratos, após as microperfusões, foram coletadas amostras de sangue para a medida de pH e PCO₂ (Radiometer BMS3/MK2).

4.2.2 Microeletródios e micropipetas

Para a medida do pH intratubular usamos o microeletródio duplo, que contém em um ramo KCl 1M corado com verde FDC (referência) e, no outro ramo, resina neutra de troca iônica sensível a H⁺ (Fluka Chemika, Buchs, Suíça), sendo o restante do ramo preenchido com solução de complemento (Quadro 1). Para a confecção das micropipetas duplas usamos capilares duplos tipo Theta (R & D. Optical Systems, Inc., Spencerville, MD, USA). Um dos ramos da micropipeta era preenchido com óleo de rícino, corado com sudan negro; o outro ramo continha a solução microperfusora tubular (Quadro 2), corada com verde FDC a 0,05%. As micropipetas, bem como os microeletródios, eram manipulados por micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar).

Quadro 1 - Soluções para o microeletródio duplo (em mM):

*Solução de complemento** - NaCl (130); Na₂HPO₄ (10); NaH₂PO₄ (10)

Solução de referência - KCl (1M)

* A solução teve seu pH ajustado para 7, com 0,1 de NaOH ou de HCl.

Quadro 2 - Solução perfusora tubular luminal (em mM):

NaCl (100); NaHCO₃ (25); KCl (5); CaCl₂ (1); MgSO₄ (1,2); rafinose* (0,6 g/10ml)

* A rafinose foi utilizada até a solução alcançar 300 mOsm (para minimizar a reabsorção do fluido perfusor).

Figura 9 - Microeletródios duplos, utilizados para a medida do pH intratubular *in vivo*.

Figura 10 - Micropipeta dupla, usada para a microperfusão tubular estacionária *in vivo*.

4.2.3 Método de Microperfusão Tubular

A cinética de acidificação tubular proximal foi estudada pela técnica de microperfusão estacionária, com medidas contínuas de pH intratubular, como descrito previamente (MALNIC; MELLO-AIRES, 1971).

Conforme esquematizado na Figura 11, o pH intratubular foi medido por microeletródio duplo introduzido numa alça do túbulo proximal cortical convoluto, em contato com a solução perfusora. A solução perfusora foi injetada por um dos ramos da micropipeta e o óleo mineral

corado com sudan negro, pelo outro ramo. Como indicado, a solução perfusora fica isolada do fluido tubular, por 2 gotas de óleo. As medidas foram feitas na vigência de perfusão sanguínea capilar normal.

Figura 11 - Esquema do sistema de microperfusão estacionária in vivo, para medidas de pH luminal, em túbulos proximais corticais convolutos (segmento S2).

A esquerda, microeletrodo duplo com resina de troca iônica (H⁺) e solução de KCl 1M (referência). À direita, micropipeta dupla, com solução perfusora luminal em um dos ramos (em verde) e óleo mineral (em preto) no outro. Aumento ~ 300 vezes. Mais detalhes no texto.

4.2.4 Medidas do pH intratubular

A diferença de potencial entre os dois ramos do microeletrodo duplo é função do pH do fluido onde o microeletrodo está imerso. Enquanto que a diferença de potencial transepitelial corresponde à diferença entre o ramo de referência e a terra. Esta última é representada pela união da cauda do rato, cortada em seu extremo, com um eletrodo de Ag/AgCl. A cauda era submersa num Becker, com solução fisiológica, que estava ligado ao eletrodo de Ag/AgCl por uma ponte de Agar + KCl 3M. Desta forma, o compartimento extracelular do animal constituía o potencial de referência para as medidas de voltagem transepitelial (isto é, entre o microeletrodo de referência, intratubular, e o compartimento extracelular). Estas voltagens eram lidas por um voltímetro de alta impedância de entrada (electrometer, Model FD223-F, WPI, New Haven, CT, USA), cuja saída era continuamente registrada por um polígrafo ECB de dois canais. Estes valores eram então digitalizados em intervalos de 1 segundo, por microcomputador AT 386 (Dell 333D), acoplado a um conversor analógico digital (Data Translation DT 2801, Marlborough, MS), através do qual os dados eram adquiridos e processados. O programa de aquisição de dados foi elaborado a partir do software Asyst (Asyst Software Technologies Inc., Rochester, USA). Os valores de pH para cada ponto do registro eram calculados por interpolação, a partir das curvas de calibração dos eletrodos (Figura 12). Os valores de concentração de bicarbonato na luz tubular foram calculados em intervalos de 1 segundo, pela equação de Henderson-Hasselbach, usando o pK de 6,1. Para este cálculo era suposto que a PCO_2 tubular cortical é igual à plasmática peritubular (MELLO-AIRES; LOPES; MALNIC, 1990).

Figura 12 - Curva de calibração do microeletrodo de pH.

4.2.5 Análise das curvas de pH

A partir do registro da variação do pH intratubular em função do tempo, foi calculada a concentração intratubular de HCO_3^- . Esta diminuía ao longo do tempo e se aproximava do seu valor estacionário de maneira exponencial. A velocidade de acidificação tubular foi avaliada pela meia-vida de reabsorção do HCO_3^- injetado, ou meia-vida de acidificação ($t/2$), calculada a partir da inclinação da reta obtida com os valores da concentração intratubular de HCO_3^- ao longo do tempo (GIEBISCH, et al., 1977). Então, aplicando a equação n.º 1, calculávamos o fluxo reabsortivo de HCO_3^- (JHCO_3^-), sendo este um indicador direto da secreção resultante de H^+ .

$$\text{JHCO}_3^- = k ([\text{HCO}_3^-]_i - [\text{HCO}_3^-]_s) r/2 \quad (1)$$

em que:

k = constante de redução de bicarbonato na luz [$k = \ln 2/(t/2)$],

r = raio tubular ($14 \mu\text{m}$) e

$[\text{HCO}_3^-]_i$ e $[\text{HCO}_3^-]_s$ = HCO_3^- injetado e no nível estacionário, respectivamente.

Com base na equação nº1, vemos que a meia-vida de acidificação tubular ($t/2$) é inversamente proporcional ao fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-); ou seja, quando diminui a meia vida de acidificação aumenta a reabsorção de bicarbonato (e vice-versa).

Cada animal utilizado teve de 1 a 8 túbulos perfundidos, sendo realizado em cada túbulo de 3 a 8 microperfusões. A média de cada uma destas deu origem a um valor de meia vida de acidificação tubular ($t/2$) e um valor de fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-). As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância (one-way) com contraste pela técnica de Bonferroni, usando N como número de túbulos perfundidos (média de várias perfusões em cada túbulo).

4.3 Medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência

A medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi avaliada em segmentos S3 do túbulo proximal de ratos, pois este é mais fácil de dissecar que o S2. Os segmentos S3 eram microdissecados a partir da região medular externa renal (OM), segundo método descrito por Burg et al., (1966) e modificado por Schafer et al., (1997) e Leite-Dellova et al., (2008). A região OM, onde está localizado o segmento S3, pode ser observada no esquema da Figura 13.

Figura 13 - Localização do segmento S3 proximal na região medular externa (OM) do rim.

À esquerda encontra-se o esquema de um néfron, com a indicação da localização do segmento S3 proximal (em amarelo) na região medular externa. À direita encontra-se um corte longitudinal do rim, com destaque para a região medular externa, onde será realizado o procedimento de microdissecção do segmento S3. Fonte: Schafer et al., (1997).

Procuramos separar um único túbulo, ou no máximo 2 ou 3, num único conjunto. Os segmentos S3 isolados foram aspirados por pipeta Pasteur e transferidos para uma câmara de acrílico, com lamínula de vidro fixada em sua base e previamente tratada com poli-d-lisina (um polímero responsável pela adesão dos túbulos à lamínula). A câmara de acrílico foi montada na platina do microscópio de fluorescência, invertido, Leica DMI6000B (Leica Microsystem®, Alemanha, 2011), conectado a um sistema computadorizado para aquisição dos dados.

A medida da $[Ca^{2+}]_i$ nos segmentos S3 foi feita de acordo com o método descrito por Oliveira-Souza e Mello-Aires (2001), utilizando a sonda intracelular sensível à concentração de cálcio, o FURA-2-AM (Molecular Probes®, Brasil, 2011), cuja emissão de luz em 510 nm, após excitação na faixa de 340 nm e 380 nm, tem amplitude proporcional à concentração de cálcio citosólico.

Os túbulos aderidos à lamínula foram pré-incubados por 15 minutos com FURA 2-AM (5 μ M) e ácido plurônico diluídos em solução Tyrode (Quadro 3) (37 graus celsius, pH 7.4). Posteriormente, foram lavados com solução Tyrode e incubados com outras soluções, de acordo com o grupo experimental. A troca das soluções na câmara de acrílico foi feita manualmente.

Quadro 3 - Composição das soluções utilizadas para a medida da $[Ca^{2+}]_i$ (em mM):

	NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Glicose	HEPES	KCl	NaHCO ₃	Na ₂ HPO ₄	pH
Tyrode:	137	1.36	0.49	5.6	5.0	2.68	12	0.36	7.4
Tyrode 0 Ca²⁺:	137	-	0.49	5.6	5.0	2.68	12	0.36	7.4

HCl ou NaOH foram utilizados para calibração do pH das soluções.

Após excitação, a amostra inicia seu ciclo de emissão de fluorescência, sendo esta detectada por uma câmara de vídeo (CCD), que gera a imagem do tecido analisado. As imagens são adquiridas continuamente, antes e imediatamente após a substituição das soluções experimentais, em intervalos médios de 600 milissegundos, no total de 3 minutos.

A partir das imagens registradas no computador, selecionávamos 10 áreas ao longo de cada túbulo. O valor médio da intensidade de fluorescência do cálcio de 10 áreas de 1 túbulo foi considerado o valor da intensidade de fluorescência desse túbulo. Esses valores foram utilizados

para o cálculo da $[Ca^{2+}]_i$, a partir da equação de Grynkiewicz (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * F_o / F_s$$

em que:

K_d = constante de dissociação do FURA 2-AM (224 nm), fornecida pelo fabricante,

R = razão da intensidade de fluorescência (F_{340nm}/F_{380nm}) da amostra,

R_{min} = razão da intensidade de fluorescência mínima obtida da calibração com EGTA,

R_{max} = razão da intensidade de fluorescência máxima, obtida da calibração com ionomicina,

F_o = coeficiente de proporcionalidade do corante livre de cálcio a 380 nm e

F_s = coeficiente de proporcionalidade do corante ligado ao cálcio a 380 nm.

4.3.1 Curva de calibração da $[Ca^{2+}]_i$

Foi feita pela técnica de calibração com EGTA e Ionomicina (TAKAHASHI et al., 1999). O EGTA é um quelante de cálcio que, em solução carente de Ca^{2+} , provoca mínima concentração intracelular deste íon. A ionomicina é um ionóforo, que aumenta a permeabilidade ao cálcio e promove máxima concentração intracelular deste íon.

Após a incubação com FURA 2-AM (5 μ M) e lavagem com a solução Tyrode, os túbulos eram expostos à solução Tyrode 0 Ca^{2+} (Quadro 3), contendo EGTA (2.5 mM), iniciando-se um ciclo de detecção de fluorescência. Posteriormente, os mesmos túbulos eram expostos à solução Tyrode contendo ionomicina (5 μ M), iniciando-se outro ciclo de detecção de fluorescência. As intensidades de fluorescência obtidas na mínima e máxima concentração de cálcio foram utilizadas no cálculo da $[Ca^{2+}]_i$.

4.4 Análise estatística

O estudo foi realizado utilizando-se um software estatístico (GraphPad Prism 5). Os resultados foram analisados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) One Way ou Two, seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo os valores com $*p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Microperfusão tubular

5.1.1 Ação da Ang-(1-7) na acidificação tubular proximal em ratos SHR E WKY

Todos ratos utilizados tinham entre 20-24 semanas, tanto os WKY como os SHR.

A Tabela 1 indica os valores médios da pressão arterial da cauda de todos os animais nos vários grupos de tratamentos e seus respectivos controles.

Tabela 1 - Valores médios da Pressão Arterial da cauda de ratos WKY e SHR em diferentes tratamentos.

	WKY (n)	SHR (n)
Controle	142 ± 3 (7)	172 ± 2 (4)
A779 10 ⁻⁶ M	147 ± 5 (5)	174 ± 3 (3)
Losartan 10 ⁻⁷ M	135 ± 2 (3)	173 ± 8 (3)
A779 10 ⁻⁶ M + Losartan 10 ⁻⁷ M	135 ± 3 (4)	178 ± 3 (4)
S3226 10 ⁻⁶ M	136 ± 4 (3)	176 ± 3 (3)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁹ M	139 ± 5 (4)	174 ± 6 (5)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁶ M	133 ± 3 (4)	174 ± 5 (5)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁹ M + A779 10 ⁻⁶ M	146 ± 5 (4)	174 ± 3 (4)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁶ M + A779 10 ⁻⁶ M	141 ± 2 (4)	173 ± 4 (5)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁹ M + Losartan 10 ⁻⁷ M	148 ± 5 (3)	173 ± 9 (3)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁶ M + Losartan 10 ⁻⁷ M	132 ± 2 (6)	173 ± 4 (4)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁹ M + S3226 10 ⁻⁶ M	136 ± 5 (3)	176 ± 2 (4)
Ang-(1-7) 10 ⁻⁶ M + S3226 10 ⁻⁶ M	138 ± 3 (4)	182 ± 3 (3)
Ang II 10 ⁻¹² M	133 ± 5 (3)	183 ± 4 (3)
Ang II 10 ⁻⁹ M	133 ± 3 (2)	178 ± 9 (2)
Ang II 10 ⁻⁶ M	143 ± 3 (5)	181 ± 2 (4)

Pressão arterial sistólica em mmHg. Valores expressos em média ± SEM; (n) o número de animais.

Na Tabela 2 são dados os valores médios dos parâmetros de acidificação tubular proximal, para os grupos experimentais estudados.

Tabela 2 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) (10^{-9} ou 10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M) e/ou A779 (10^{-6} M) e/ou S3226 (10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M) nos parâmetros de acidificação do túbulo proximal convoluto (segmento S2) de ratos WKY e SHR, *in vivo*.

	WKY		SHR	
	t/2 s	JHCO3 (nmol/cm ² .s ¹)	t/2 s	JHCO3 (nmol/cm ² .s ¹)
Controle	3,78 ± 0,19 (120/28)	2,40 ± 0,10 (120/28)	4,24 ± 0,21 (56/14)	2,04 ± 0,13 (56/14)
A779 10^{-6} M	5,49 ± 0,33 (87/13)	1,63 ± 0,11* (87/13)	9,28 ± 1,54 (37/11)	1,23 ± 0,17* (37/11)
Losartan 10^{-7} M	6,70 ± 0,38* (37/11)	1,49 ± 0,07* (37/11)	7,25 ± 0,93 (42/10)	0,91 ± 0,12* (42/10)
A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	5,50 ± 0,27 (73/15)	1,48 ± 0,15* (73/15)	12,76 ± 2,25* (43/11)	0,91 ± 0,13* (43/11)
S3226 10^{-6} M	8,08 ± 0,92 (92/14)	1,26 ± 0,12* (92/14)	9,44 ± 0,67* (40/11)	1,05 ± 0,06* (40/11)
Ang-(1-7) 10^{-9} M	5,48 ± 0,38 (66/14)	1,72 ± 0,08* (66/14)	3,24 ± 0,29 [@] _{\$} (60/13)	3,11 ± 0,31* [@] _# (60/13)
Ang-(1-7) 10^{-6} M	2,62 ± 0,13 [@] _# (92/18)	3,58 ± 0,21* [@] _# (92/18)	8,90 ± 1,48 (70/13)	1,27 ± 0,12* (70/13)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + A779 10^{-6} M	7,56 ± 0,72* (96/17)	1,11 ± 0,11* (96/17)	8,01 ± 0,68 (75/15)	1,19 ± 0,10* ^{&} (75/15)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + A779 10^{-6} M	5,72 ± 0,48 ⁺ (78/15)	1,52 ± 0,10* ⁺ (78/15)	6,73 ± 0,62 (49/17)	1,16 ± 0,12* (49/17)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + Losartan 10^{-7} M	9,57 ± 1,28* ^{&} (51/15)	0,97 ± 0,12* (51/15)	6,13 ± 0,86 (38/10)	1,62 ± 0,17* ^{&} (38/10)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	4,54 ± 0,26 (93/22)	2,05 ± 0,12 ⁺ (93/22)	7,32 ± 1,01 (67/13)	1,53 ± 0,15 (67/13)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + S3226 10^{-6} M	8,00 ± 0,58* (50/11)	1,32 ± 0,10* (50/11)	8,29 ± 0,59* ^{&} (58/18)	1,02 ± 0,14* ^{&} (58/18)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + S3226 10^{-6} M	8,25 ± 0,59* (66/18)	1,13 ± 0,11* ⁺ (66/18)	8,52 ± 0,62* (67/14)	1,07 ± 0,12* (67/14)
Ang II 10^{-12} M	2,05 ± 0,17 (71/12)	3,92 ± 0,23* (71/12)	6,80 ± 0,71 (67/15)	1,05 ± 0,10* (67/15)
Ang II 10^{-9} M	2,81 ± 0,13 (12/03)	3,23 ± 0,24 (12/03)	6,32 ± 1,43 (25/05)	1,85 ± 0,27 (25/05)
Ang II 10^{-6} M	5,00 ± 0,31 (69/14)	1,42 ± 0,20* (69/14)	10,35 ± 0,97* (83/13)	0,97 ± 0,10* (83/13)

Meia vida de acidificação tubular = t/2; fluxo reabsorptivo de bicarbonato = JHCO₃⁻. Os valores correspondem à média ± erro padrão (n° de perfusões / n° túbulos). * p < 0,01 vs. controle, # p < 0,01 vs. Losartan 10^{-7} M, @ p < 0,01 vs. A779 10^{-6} M, \$ p < 0,01 vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, & p < 0,01 vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, + p < 0,01 vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

Figura 14 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7; 10^{-9} e 10^{-6} M) e/ou Losartan e/ou A779 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos WKY.

Conforme observado na Figura 14, referente aos ratos WKY, podemos observar que em relação ao controle, os grupos A779, Losartan e A779 + Losartan apresentaram uma inibição significativa (32%, 38% e 38%, respectivamente) do JHCO_3^- ; estes dados indicam que em ratos WKY na situação basal existe Ang-(1-7) e Ang II intratubular estimulando o JHCO_3^- . A Ang-(1-7) na concentração 10^{-9} M causa queda significativa do JHCO_3^- (28%); porém, na concentração 10^{-6} M o eleva significativamente (49% em relação ao controle). Ou seja, nossos dados indicam

que nos ratos WKY a Ang-(1-7) tem efeito bifásico dose dependente sobre o NHE3. Ang-(1-7) (10^{-9} M ou 10^{-6} M) com A779 ou Losartan causa inibição significativa do JHCO_3^- (de 54%, 37%, 60% e 15%, respectivamente). Ou seja, nossos dados indicam que a Ang-(1-7) (10^{-9} M ou 10^{-6} M) + A779 ou Losartan tem efeito inibitório sobre o trocador NHE3, demonstrando que nos ratos WKY o efeito da Ang-(1-7) se faz via receptor Mas e AT1.

Figura 15 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou S3226 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos WKY.

A Figura 15 mostra que a perfusão luminal de S3226 (10^{-6} M, inibidor específico de NHE3) sozinho causou diminuição significativa do JHCO_3^- ; esses resultados indicam o papel do NHE3 na reabsorção proximal de HCO_3^- em condições basais. A perfusão de Ang-(1-7) 10^{-9} M + S3226 não causa qualquer efeito adicional, sugerindo que o NHE3 é o único transporte de H^+ que

regula o efeito da Ang-(1-7) 10^{-9} M nesse segmento tubular. O uso de S3226 na perfusão de Ang-(1-7) 10^{-6} foi capaz de abolir completamente o efeito estimulador da Ang- (1-7) 10^{-6} sobre o JHCO_3^- , mostrando que este efeito também é dependente de NHE3.

Figura 16 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e Ang II sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos WKY.

A Figura 16 demonstra que a Ang II nas concentrações 10^{-12} e 10^{-9} M causa aumento significativo do JHCO_3^- (63% e 35% respectivamente); porém, na concentração 10^{-6} M causa queda significativa (41% em relação ao controle). Vemos portanto, que nos ratos WKY a Ang-(1-7) apresenta efeito bifásico dose dependente sobre o NHE3, assim como a Ang II.

Figura 17 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou Losartan e/ou A779 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos SHR.

* p < 0,01 vs controle
 @ p < 0,01 vs A779
 # p < 0,01 vs losartan
 \$ p < 0,01 vs A779 + Losartan
 & p < 0,01 vs Ang-(1-7) 10⁻⁹ M

N = número de perfusões / número de túbulos

A Figura 17 indica que a perfusão dos grupos A779, Losartan e A779 + Losartan causam diminuição significativa (39%, 55% e 55%) do JHCO_3^- comparado ao controle; estes resultados indicam que também nos ratos SHR, em condições basais existe Ang-(1-7) e Ang II intratubular estimulando o JHCO_3^- . A perfusão luminal de Ang-(1-7) 10⁻⁹ M causa significativo aumento (52%) do JHCO_3^- ; porém, a perfusão da Ang-(1-7) 10⁻⁶ M diminui (38%) o JHCO_3^- . Vemos portanto, que nos ratos SHR a Ang-(1-7) também apresenta efeito bifásico dose dependente sobre o NHE3 (porém, este é oposto ao dos ratos WKY). A adição de A779 e/ou Losartan aboliu

completamente o efeito estimulatório da Ang-(1-7) 10^{-9} M, mas não alterou o efeito da Ang-(1-7) 10^{-6} M. Estes dados indicam que também nos ratos SHR o efeito bifásico da Ang-(1-7) sobre JHCO_3^- ocorre via receptores Mas e AT1.

Figura 18 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e/ou S3226 sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos SHR.

A Figura 18 demonstra que a perfusão luminal de S3226 sozinho causa significativa queda no JHCO_3^- ; este resultado indica o papel do NHE3 sobre a reabsorção proximal de HCO_3^- no estado basal também em ratos SHR. A adição de S3226 aboliu completamente o efeito estimulatório da Ang-(1-7) 10^{-9} M, sugerindo que o NHE3 está regulando o transporte de H^+ . O uso de S3226 não causou nenhum efeito adicional no efeito inibitório da Ang-(1-7) 10^{-6} M sobre o JHCO_3^- , mostrando que este efeito é também dependente de NHE3.

Figura 19 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) e Ang II sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, em ratos SHR.

A Figura 19 demonstra que a Ang-(1-7) (10^{-9} M) estimula o JHCO_3^- (cerca de 52%) e a Ang-(1-7) 10^{-6} M inibe o JHCO_3^- (cerca de 38 %). A Ang II 10^{-12} M ou 10^{-6} M causa inibição (49% e 52% respectivamente) sobre o JHCO_3^- em relação ao controle. Portanto, nos ratos SHR, a Ang-(1-7) apresenta efeito bifásico dose dependente sobre o JHCO_3^- enquanto que a Ang II exibe apenas efeito inibitório.

5.2 Ação da Ang-(1-7) na concentração de cálcio intracelular

Todos os ratos WKY e SHR utilizados tinham entre 20-24 semanas. Antes da realização dos experimentos de microscopia de fluorescência realizamos as medidas de pressão arterial de cauda dos animais e essas demonstram que os ratos SHR eram significativamente hipertensos [167 ± 5 (n=5) mmHg] em relação aos ratos WKY [137 ± 3 (n=5) mmHg].

Na Tabela 3 são dados os valores médios da concentração do cálcio citosólico para os grupos experimentais estudados.

Tabela 3 - Efeito da Ang-(1-7) e/ou A779 e/ou Losartan, após 1 min de incubação hormonal na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY ou SHR.

	WKY		SHR	
	$[Ca^{2+}]_i$ nM	N	$[Ca^{2+}]_i$ nM	N
Controle	99,7 ± 2,28	5	94,3 ± 1,66	5
A779 10^{-6} M	102,0 ± 2,66	5	75,5 ± 9,36	5
Losartan 10^{-7} M	103,1 ± 2,74	5	99,6 ± 3,05	5
A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	196,6 ± 26,4 *	5	277,9 ± 7,79 *	5
S3226 10^{-6} M	101,2 ± 6,53	5	121,1 ± 13,8	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M	200,5 ± 25,1 *	5	143,3 ± 7,63 *	6
Ang-(1-7) 10^{-6} M	163,6 ± 6,45 *	5	173,9 ± 13,4 *	6
Ang-(1-7) 10^{-9} M + A779 10^{-6} M	96,5 ± 7,15 #	5	82,5 ± 11,6 #	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + A779 10^{-6} M	97,9 ± 6,61 #	5	106,1 ± 11,5 #	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M + Losartan 10^{-7} M	103,5 ± 4,93 #	5	83,31 ± 8,33 #	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	127,1 ± 1,91	5	126,0 ± 9,00 #	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M + S3226 10^{-6} M	159,7 ± 11,6 *	5	119,9 ± 2,70	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + S3226 10^{-6} M	125,1 ± 8,45 #	5	155,3 ± 12,2 *	5
Ang II 10^{-12} M	131,5 ± 8,05	5	131,0 ± 5,32	5
Ang II 10^{-9} M	126,6 ± 6,49	5	153,8 ± 3,74 *	5
Ang II 10^{-6} M	203,4 ± 13,0 *	5	191,8 ± 9,04 *	5

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão. N corresponde ao número de túbulos (cada túbulo corresponde à média de 10 áreas). *p < 0,01 vs. controle, #p < 0,01 vs. respectiva dose de Ang-(1-7).

A Tabela 3 indica que nos ratos WKY a $[Ca^{2+}]_i$ do túbulo proximal na situação controle é 99,7 ± 2,28 nM (5) e nos ratos SHR na situação controle é 94,3 ± 1,66 nM (5), portanto, estatisticamente semelhante à dos ratos WKY.

Figura 20 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY.

A Figura 20 indica que nos ratos WKY o Losartan e o A779 sozinhos não mudam significativamente a $[Ca^{2+}]_i$ em relação controle. O grupo Losartan + A779 juntos causa aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ (97% em relação ao controle). Ang-(1-7) aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ dose dependentemente: dose hormonal baixa (10^{-9} M) causa aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (101% em relação ao controle), enquanto na dose hormonal alta de (10^{-6} M) o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é menor (64 % em relação ao controle). A Figura 18 também indica que a adição de A779 e/ou Losartan aboliu o efeito estimulatório da Ang-(1-7; 10^{-9} M) sobre $[Ca^{2+}]_i$. A adição de A779 aboliu o efeito estimulatório da Ang-(1-7; 10^{-6} M), mas o Losartan não alterou significativamente, apesar do menor aumento (27%) da $[Ca^{2+}]_i$. Nossos dados indicam que nos ratos WKY os efeitos da Ang-(1-7) sobre a $[Ca^{2+}]_i$ se fazem via receptores Mas e AT1.

Figura 21 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou S3226 (10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY.

Na Figura 21 está indicado que a incubação com S3226 sozinho não alterou de forma significativa a $[Ca^{2+}]_i$. A adição de S3226 diminuiu o efeito estimulador da Ang-(1-7; 10^{-9} M) e aboliu o efeito estimulador da Ang-(1-7; 10^{-6} M) sobre $[Ca^{2+}]_i$.

Figura 22 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} M, 10^{-9} M ou 10^{-6} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos WKY.

* $p < 0,01$ vs controle

A Figura 22 demonstra que a Ang II 10^{-12} M ou 10^{-9} M causa aumento não significativo da $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao controle (32% e 27% respectivamente). Entretanto, a Ang II 10^{-6} M apresenta um aumento significativo (104%) da $[Ca^{2+}]_i$.

Figura 23 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR.

A Figura 23, referente aos ratos SHR, indica que o Losartan ou o A779 sozinhos não modificam a $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao controle, embora o A779 tenha apresentando uma tendência de diminuição (20%). O grupo Losartan + A779 juntos apresenta aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ (195% em relação ao controle). A Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) também apresenta aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ (52% e 84%, respectivamente) em relação ao controle, o qual é inibido por A779 ou Losartan, demonstrando que esse efeito se faz via receptor Mas e AT1.

Figura 24 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e /ou S3226 (10^{-6} M) na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR.

A Figura 24 mostra que a incubação com S3226 sozinho não alterou de forma significativa a $[Ca^{2+}]_i$, mas aboliu o efeito da Ang-(1-7; 10^{-9} M) e não alterou o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M).

Figura 25 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e Ang II (10^{-12} M, 10^{-9} M ou 10^{-6} M) na $[Ca^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos SHR.

A Figura 25 demonstra que a Ang II 10^{-12} M causou aumento (39%), mas não significativo da $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao controle. A Ang II 10^{-9} M ou 10^{-6} M apresentou aumento significativo (63% e 103%) da $[Ca^{2+}]_i$.

6 DISCUSSÃO

Considerando que:

- em consequência dos efeitos encontrados da Ang-(1-7) em diversos tecidos, as ações do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no rim vêm sendo estudadas mais amplamente (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA; SANTOS, 2013; SCHINDLER et al., 2007; TRASK; FERRARIO, 2007);
- os efeitos dos peptídeos angiotensinérgicos são mediados por receptores de membrana, sendo que o receptor Mas é considerado o receptor principal para a Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2003);
- várias evidências apoiam fortemente que o SRA intrarenal ou tecidual contribui para a função renal, bem como para regulação da pressão arterial e do balanço de sódio e de água (NAVAR et al., 2011a, 2011b) e
- o túbulo proximal é um segmento do rim que contém muitos, se não todos, os elementos do SRA capaz de gerar e responder ao peptídeo Ang II (NAVAR et al., 2011b) e Ang-(1-7) (CHAPPELL et al., 2004; CHAPPELL; ALLRED; FERRARIO, 2001);

no presente estudo resolvemos avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$ em túbulo proximal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), modelo reconhecido como semelhante à hipertensão humana (RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000), e seus controles normotensos (WKY).

Dados anteriores do nosso Laboratório demonstraram os efeitos da Ang-(1-7) sobre o $JHCO_3^-$ e a $[Ca^{2+}]_i$ no túbulo proximal de ratos Wistar, *in vivo*. Nossos dados indicaram que nesses animais, sabidamente normotensos: i) a Ang-(1-7) tem efeito bifásico sobre $JHCO_3^-$: em doses baixas (10^{-12} ou 10^{-9} M) o inibe, mas em alta dose (10^{-6} M) o estimula; ii) esse efeito hormonal se faz via isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+ ; iii) na situação controle existe Ang-(1-7) endógena intratubular inibindo esse trocador; iv) a Ang-(1-7) tem efeito dose dependente no aumento da $[Ca^{2+}]_i$: doses baixas (10^{-12} M ou 10^{-9} M) causam grande aumento e dose alta (10^{-6} M) causa pequeno aumento e v) o efeito da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ e a $[Ca^{2+}]_i$ se faz via receptor Mas (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013).

No presente trabalho, mostramos que nos ratos WKY o Losartan sozinho diminui o $JHCO_3^-$, indicando que nesses animais a Ang II intratubular está estimulando o NHE3 via AT1.

Estes achados concordam com alguns estudos que mostraram o papel estimulatório da Ang II sobre o NHE3 via receptor AT1 (BAUM; QUIGLEY; QUAN, 1997; PONTES et al., 2015; SCHUSTER; KOKKO; JACOBSON, 1984). O A779 sozinho diminuiu o JHCO_3^- , indicando que nesses animais a Ang-(1-7) endógena intratubular está estimulando o NHE3 via receptor Mas. A inibição do JHCO_3^- permanece quando perfundimos os dois inibidores dos receptores juntos. Já a Ang-(1-7; 10^{-9} M) sozinha inibe o JHCO_3^- em relação ao controle, enquanto que a Ang-(1-7; 10^{-6} M) estimula o JHCO_3^- ; assim, nossos dados indicam um efeito bifásico da Ang-(1-7) sobre o NHE3. Nossos atuais achados, reafirmam o que demonstramos em nossos trabalhos com os ratos Wistar (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013). Por outro lado, nossos resultados indicam que a inibição do NHE3 pela Ang-(1-7) também ocorre via receptor AT1, corroborando com a literatura que indica que a Ang-(1-7) também pode se ligar ao receptor da Ang II (GIRONACCI; COBA; PEÑA, 1999; OHSHIMA et al., 2014; ROWE et al., 1995; WALTERS; GASPARI; WIDDOP, 2005). Portanto, nossos resultados indicam que no Segmento S2 do túbulo proximal de ratos normotensos (WKY) a Ang-(1-7; 10^{-9} M e 10^{-6} M) tem efeito bifásico sobre o NHE3, via receptor Mas e AT1.

Em ratos SHR, o Losartan sozinho inibe o JHCO_3^- , indicando que a Ang II endógena intratubular estimula o JHCO_3^- em relação ao controle; portanto, a Ang II tem efeitos deletérios para esses ratos espontaneamente hipertensos, pois aumenta a reabsorção proximal de fluido, como já demonstrado na literatura (PEDROSA et al., 2008; TURBAN et al., 2006). No entanto, quando o receptor Mas é inibido, ocorre a inibição do JHCO_3^- indicando que a Ang-(1-7) endógena intratubular estimula o NHE3 via receptor Mas. É interessante notar que nos animais SHR a Ang-(1-7) tem efeito bifásico oposto sobre o NHE3, quando comparado com os ratos WKY: alta dose de Ang-(1-7; 10^{-6} M) inibe enquanto que baixa dose Ang-(1-7; 10^{-9} M) estimula o JHCO_3^- . Esse dado que estamos encontrando nos parece muito importante pois indica que nos hipertensos, a alta concentração plasmática de Ang-(1-7) inibe o trocador NHE3 no túbulo proximal, na tentativa de diminuir a pressão arterial. Porém, nossos dados indicam que a Ang-(1-7; 10^{-9} M) perfundida na presença de A779 não altera significativamente o JHCO_3^- , enquanto que a Ang-(1-7; 10^{-6} M) na presença do antagonista do receptor Mas abole o efeito estimulatório exibido por este hormônio. O efeito inibitório sobre o JHCO_3^- de cada fármaco isoladamente continua quando o Losartan e o A779 estão associados. Portanto, estes resultados sugerem que, em ratos SHR a Ang-(1-7; 10^{-9} M) via receptor Mas exibe um efeito estimulador sobre o NHE3,

que mitiga os efeitos deletérios da Ang II. Assim, nossos dados concordam com a literatura indicando que os efeitos opostos da Ang-(1-7) e Ang II sugerem que, em parte, os efeitos anti-hipertensivos e as ações de proteção da Ang- (1-7) são devidas à ativação do receptor Mas (CHAPPELL, 2007; FERREIRA; SANTOS, 2005; SAMPAIO et al., 2007).

No trabalho atual estamos demonstrando que em ratos WKY a Ang-(1-7) exibe efeito bifásico sobre o NHE3, semelhante ao descrito anteriormente para os ratos normotensos Wistar: a Ang-(1-7) em dose baixa (10^{-12} M) inibe o NHE3 e em dose elevada (10^{-6} M) o estimula (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013). Já no caso dos ratos SHR, nossos dados indicam o oposto, sendo semelhantes ao que acontece com a Ang II para os ratos normotensos Wistar: a Ang-(1-7) em dose hormonal baixa (10^{-12}) inibe o trocador Na^+/H^+ e em dose elevada (10^{-6} M) o estimula (COPPOLA; FRÖMTER, 1994; EGUTI et al., 2010; GEIBEL; GIEBISCH; BORON, 1990; HOUILLIER et al, 1996; MELLO-AIRES; OLIVEIRA-SOUZA, 2000; MUZA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005;). Interessantemente, em ratos Wistar (normotensos), a Ang-(1-7) apresenta efeito bifásico sobre o NHE3 (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013) oposto ao descrito para a Aldosterona (LEITE-DELLOVA et al. 2008) ou AVP (OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2001). Para estes dois últimos hormônios a ação bifásica é similar a Ang II. Esses nossos achados confirmam com dados da literatura que indicam que: i) a Ang-(1-7) é encontrada em elevada concentração em diversos segmentos tubulares do néfron, ii) a Ang-(1-7) é excretada na urina em concentrações mais elevadas do que a própria Ang II, iii) a ECA2 é encontrada na superfície luminal do epitélio tubular e iv) o receptor Mas é expresso nas células do túbulo renal proximal (ALENINA et al., 2008; BROSNIHAN et al., 2003; FERRARIO; VARAGIC, 2010; SU; ZIMPELMANN; BURNS, 2006; TIPNIS et al., 2000).

É amplamente conhecido que a Ang II em doses baixas estimula o NHE3 via receptor AT1. Este efeito se faz através da fosfolipase C (PLC) e do inositol trifosfato (IP3), responsáveis por pequena elevação do cálcio citosólico que, mais a proteína kinase C (PKC), via ligação cálcio-calmodulina, estimula o trocador. Por outro lado, em dose elevada a Ang II, também via receptor AT1, estimula a fosfolipase A2 (PLA2), com quebra do ácido araquidônico e consequente grande elevação do cálcio citosólico, que via ligação cálcio-calmodulina, inibe o trocador (EGUTI et al., 2010; MELLO-AIRES; OLIVEIRA-SOUZA, 2000; MUZA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005).

Consistente com nossos achados, em ratos Wistar normotensos, a Ang-(1-7) em dose fisiológica se liga ao receptor Mas que promove a liberação de ácido araquidônico; assim, a Ang-(1-7) leva ao grande aumento de cálcio citosólico que via cálcio-calmodulina, finalmente, inibe o NHE3 (CASTELO-BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013). Portanto, nossos resultados são consistentes com o seguinte: i) o atual entendimento de que os efeitos, tanto da Ang-(1-7) como da Ang II, são opostos sobre vários mecanismos cardiovasculares (CHAPPELL, 2007; FERREIRA; SANTOS, 2005; SANTOS, 2014), e ii) é amplamente aceito que em doses fisiológicas a Ang-(1-7) exibe efeito vasodilatador, enquanto a Ang II exibe um efeito oposto vasoconstritor (IUSUF et al., 2008).

Até agora, há poucos artigos descrevendo os efeitos da Ang-(1-7) indutores do aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Em astrócitos, da medula ventrolateral rostral, a Ang-(1-7) aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ via receptor Mas, através da liberação de Ca^{2+} a partir de reservas intracelulares (GUO et al., 2010). A Ang-(1-7) também aumenta a $[Ca^{2+}]_i$ em células tubulares renais caninas (MDCK), porém este efeito foi via receptores de angiotensina do tipo 1, a partir da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (dependente de fosfolipase C) e influx de Ca^{2+} (dependente de fosfolipase A2) (CHUNG-PIN et al., 2012). Com base no que foi mencionado acima, procuramos avaliar a $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a Ang-(1-7) e Ang II, na presença de Losartan e/ou A779.

Em animais WKY e SHR, o A779 sozinho ou na presença de Ang-(1-7), não altera a $[Ca^{2+}]_i$, assim como o Losartan, demonstrando que nossos dados estão de acordo com a literatura que indica que os efeitos da Ang-(1-7) podem ser através dos receptores Mas e AT1 (CARRARO-LACROIX; MALNIC, 2006; CHANSEL et al., 2001; CHUNG-PIN et al., 2012; LIU et al., 2012). No entanto, nós somos os primeiros a identificar, pelo que é de nosso conhecimento, que quando ambos os receptores Mas e AT1 são inibidos simultaneamente, um grande aumento na $[Ca^{2+}]_i$ é encontrado. A relevância fisiológica desses resultados ainda é desconhecida e exige uma investigação mais aprofundada.

Nossos dados demonstram que em ratos WKY o efeito bifásico da Ang-(1-7) sobre o NHE3 se faz via receptor Mas e AT1, uma vez que o A779 e o Losartan, atenuam o efeito inibitório da Ang-(1-7) em baixas doses (10^{-9} M) sobre o NHE3 e abolem seu efeito estimulatório sobre a $[Ca^{2+}]_i$. Além disso, o A779 e o Losartan modificam a ação estimulatória sobre o NHE3 efetuada pela Ang-(1-7) em altas doses (10^{-6} M) para inibitória, e abolem seu efeito estimulatório sobre a $[Ca^{2+}]_i$. Esses efeitos são similares aos da Ang-(1-7) em ratos Wistar (CASTELO-

BRANCO; LEITE-DELLOVA; MELLO-AIRES, 2013). Por outro lado, no presente estudo, em ratos SHR o A779 e o Losartan, abolem o efeito estimulatório da Ang-(1-7; 10^{-9} M) sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$. Além disso, o A779 e o Losartan não modificam o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M) sobre o NHE3 e mostram uma tendência de diminuição da $[Ca^{2+}]_i$.

A Figura 26 indica que o domínio citoplasmático C-terminal, regulador do trocador Na^+/H^+ , possui dois sítios de ligação ao complexo cálcio/calmodulina, que modulam sua atividade: um de alta afinidade ao cálcio (sítio A) - que é tonicamente inibidor do trocador, e outro de baixa afinidade ao cálcio (sítio B) - que é estimulador do trocador (SINGH et al., 2014; WAKABAYASHI et al., 1994).

Figura 26 - Trocador Na^+/H^+ .

Fonte: Modificado de SINGH et al., 2014; WAKABAYASHI et al., 1994.

Quando há pequeno aumento da $[Ca^{2+}]_i$, o sítio de alta afinidade liga-se ao complexo cálcio/calmodulina e, então, é suprimida a inibição do trocador, ou seja, o trocador passa a ser estimulado. Entretanto, quando há grande aumento da $[Ca^{2+}]_i$, o sítio de baixa afinidade liga-se ao complexo cálcio/calmodulina e, nessas condições, deixa de estimular o trocador, ou seja, o trocador passa a ser inibido (SINGH et al., 2014; WAKABAYASHI et al., 1994).

A grande coerência dos nossos achados com os dados da literatura acima expostos pode ser verificadas nas análises das Figuras 27 e 28, para os ratos WKY, e Figuras 29 e 30, para os ratos SHR.

Figura 27 - Comparação dos efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal, em ratos WKY.

A Figura 27 indica que no caso dos ratos WKY, a Ang-(1-7) em baixa concentração (10^{-9} M) causa grande elevação da $[Ca^{2+}]_i$ (101% em relação ao controle); assim, nessa situação o complexo cálcio/calmodulina se liga ao sítio B e inibe o NHE3 (SINGH et al., 2014; WAKABAYASHI et al., 1994). A Figura 25 mostra também que nos ratos WKY a Ang-(1-7) em dose alta (10^{-6} M) causa pequena elevação da $[Ca^{2+}]_i$ (64% em relação ao controle); portanto, nessa condição, o complexo cálcio/calmodulina se liga ao sítio A e estimula o NHE3 (SINGH et al., 2014; WAKABAYASHI et al., 1994).

A Figura 28 exibe um modelo esquemático que descreve esse efeito hormonal bifásico nos ratos WKY.

Figura 28 - Efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$ em ratos WKY.

Figura 29 - Comparação dos efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M), e/ou Losartan (10^{-7} M), sobre o JHCO_3^- no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*, e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, em segmentos S3 isolados do túbulo proximal, em ratos SHR.

A Figura 29 indica que para os ratos SHR, encontramos que a Ang-(1-7) em baixa concentração (10^{-9} M) causa uma elevação da $[Ca^{2+}]_i$ (38% em relação ao controle), fazendo com que o complexo cálcio/calmodulina se ligue ao sítio A que estimula o NHE3; enquanto que Ang-(1-7; 10^{-6} M) aumenta mais ainda a $[Ca^{2+}]_i$ (56% em relação ao controle) e inibe a atividade do NHE3.

A Figura 30 exibe um modelo esquemático que descreve esse efeito hormonal bifásico nos ratos SHR.

Figura 30 - Efeitos da Ang-(1-7; 10^{-9} M ou 10^{-6} M) sobre o NHE3 e a $[Ca^{2+}]_i$ em ratos SHR.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados são coerentes com a ideia da literatura atual que admite que a Ang-(1-7), de um modo geral, tem efeitos opostos aos da Ang II.

Em conclusão, nossos dados, demonstram a interação dos efeitos opostos dose dependente da Ang-(1-7) e Ang II no túbulo proximal renal sobre o trocador Na^+/H^+ e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicam um importante mecanismo hormonal de regulação fisiológica do volume e pH intra-extracelular. No entanto, este é um mecanismo complexo e fatores adicionais precisam ser investigados.

Adicionalmente, nossos dados indicam que nos animais SHR a Ang-(1-7) tem efeito bifásico oposto sobre o NHE3, quando comparado com os ratos WKY: alta dose de Ang-(1-7; 10^{-6} M) inibe, enquanto que baixa dose Ang-(1-7; 10^{-9} M) estimula o JHCO_3^- . Esse dado nos parece extremamente relevante pois indica que nos hipertensos a alta concentração plasmática de Ang-(1-7), descrita na literatura, inibe o NHE3 no túbulo proximal, diminuindo a reabsorção tubular de sódio e água, na tentativa de mitigar a hipertensão.

REFERÊNCIAS *

- AGATA, J.; URA, N.; YOSHIDA, H.; SHINSHI, Y.; SASAKI, H.; HYAKKOKU, M.; TANIQUCHI, S.; SHIMAMOTO, K. Olmesartan is an angiotensin II receptor blocker with an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res.* v. 29, p. 865-74, 2006.
- AIRES, M. M. Fisiologia 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1. 1232 p.
- AIRES, M. M. Fisiologia 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. v. 1. 1352 p.
- ALENINA, N.; XU, P.; RENTZSCH, B.; PATKIN, E. L.; BADER, M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol.* v. 93, p. 528-537, 2008.
- ALLRED, A. J.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M.; DIZ, D. I. Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 279, n. 4, p. F636-45, 2000a.
- ALLRED, A. J.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C. Pathways for angiotensin-(1-7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 279, n. 5, p. F841-50, 2000b.
- ANDREATTA-VAN-LEYEN, S.; ROMERO, M. F.; KHOSLA, M. C.; DOUGLAS, J. G. Modulation of phospholipase A2 activity and sodium transport by angiotensin-(1-7). *Kidney Int.* v. 44, p. 932-6, 1993.
- ARITA, D. Y.; CUNHA, T. S.; PEREZ, J. D.; COLUCCI, J. A.; RONCHI, F. A.; NOGUEIRA, M. D.; ARITA, L. S.; ARAGÃO, D. S.; TEIXEIRA, V. D. E. P.; CASARINI, D. E. Overexpression of urinary N-domain ACE in chronic kidney dysfunction in Wistar rats. *Clin Exp Hypertens.* v. 34, p. 389-96, 2012.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; GUILHERME, A. L.; REIS-SILVA, C.; COSTA-SARMENTO, G.; OLIVEIRA, M. M.; VIEYRA, A. Protein kinase C-mediated inhibition of renal Ca^{2+} ATPase by physiological concentrations of angiotensin II is reversed by AT1- and AT2-receptor antagonists. *Regul Pept.* v. 127, p. 151-157, 2005.
- AXELBAND, F.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; DE PAULA, I. R.; FERRÃO, F. M.; DIAS, J.; MIRANDA, A.; MIRANDA, F.; LARA, L.; VIEYRA, A. Ang-(3-4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regul Pept.* v. 155, p. 81-90, 2009a.
- AXELBAND, F.; DIAS, J.; MIRANDA, F.; FERRÃO, F. M.; BARROS, N. M.; CARMONA, A. K.; LARA, L. S.; VIEYRA, A. A scrutiny of the biochemical pathways from Ang II to Ang-(3-4) in renal basolateral membranes. *Regul Pept.* v. 158, p. 47-56, 2009b.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue rennin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl).* v. 86, n. 6, p. 615-21, 2008.
- BADER, M.; PETERS, J.; BALTATU, O.; MULLER, D. N.; LUFT, F. C.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems: New insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl).* v. 79, p. 76-102, 2001.
- BANDAY, A. A.; LOKHANDWALA, M. F. Angiotensin II-mediated biphasic regulation of proximal tubular Na^+/H^+ exchanger 3 is impaired during oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 301, n. 2, p. F364-70, 2011.
- BARACHO, N. C.; SIMÕES E SILVA, A. C.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res.* v. 31, n. 9, p. 1221-7, 1998.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BARR, C. S.; LANG, C. C.; HANSON, J.; AMOTT, M.; KENNEDY, N.; STRUTHERS, A. D. Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol.* v. 76, n. 17, p. 1259-65, 1995.
- BATLLE, D.; WYSOCKI, J.; SOLER, M. J.; RANGANATH, K. Angiotensin-converting enzyme 2: enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int.* v. 81, n. 6, p. 520-8, 2012.
- BAUER, J. H.; REAMS, G. P. ACE inhibitors in renal disease. *Clin Cardiol.* v. 14, p. 38-43, 1991a.
- BAUER, J. H.; REAMS, G. P.; WU, Z. The aging hypertensive kidney: pathophysiology and therapeutic options. *Am J Med.* v. 90, p. S21-27, 1991b.
- BAUM, M.; QUIGLEY, R.; QUAN, A. Effect of luminal angiotensin II on rabbit proximal convoluted tubule bicarbonate absorption. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 273, p. F595-F600, 1997.
- BENTER, I. F.; FERRARIO, C. M.; MORRIS, M.; DIZ, D. I. Anti-hypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v. 269, p. H313-H319, 1995.
- BENTER, I. F.; YOUSIF, M. H.; ANIM, J. T.; COJOCEL, C.; DIZ, D. I. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 290, n. 2, p. H684-91, 2006.
- BERTRAND, B.; WAKABAYASHI, S.; IKEDA, T.; POUYSSÉGUR, J.; SHIGEKAWA, M. The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem.* v. 269, n. 18, p. 13703-9, 1994.
- BHATIA, K.; ZIMMERMAN, M. A.; SULLIVAN, J. C. Sex differences in angiotensin-converting enzyme modulation of Ang-(1-7) levels in normotensive WKY rats. *Am J Hypertens.* v. 26, n. 5, p. 591-8, 2013.
- BIEMESDERFER, D.; PIZZONIA, J.; ABU-ALFA, A.; EXNER, M.; REILLY, R.; IGARASHI, P. ARONSON, P. S. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol.* v. 265, p. F736-F742, 1993.
- BOOTMAN, M. D.; BERRIDGE, M. J.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol.* v. 12, p. R563-R565, 2002.
- BOSNYAK, S.; JONES, E. S.; CHRISTOPOULOS, A.; AGUILAR, M. I.; THOMAS, W. G.; WIDDOP, R. E. Relative affinity of angiotensins and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond).* v. 121, n. 7, p. 297-303, 2011.
- BOTELHO-SANTOS, G. A.; SAMPAIO, W. O.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 292, n. 5, p. H2485-90, 2007.
- BRAGA-SOBRINHO, C.; LEITE-DELLOVA, D. C.; MELLO-AIRES, M. Action of ANP on the nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on NHE1 in proximal S3 segment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* v. 128, p. 89-97, 2012.
- BRANT, S. R.; YUN, C. M.; TSE, C. M. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol.* v. 269, p. C198-C206, 1995.

- BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *American Journal of Medicine*. v. 116, n. 4, p. 263-272, 2004.
- BROSNIHAN, K. B.; NEVES, L. A.; JOYNER, J.; AVERILL, D. B.; CHAPPELL, M. C.; SARAO, R.; PENNINGER, J.; FERRARIO, C. M. Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy. *Hypertension*. v. 42, n. 4, p. 749-53, 2003.
- BRUNNER, H. R.; GAVRAS, H. Renin and sodium in blood pressure regulation. *Schweiz Med Wochenschr*. v. 104, n. 40, p. 1401-11, 1974.
- BRUNNER, H. R.; GAVRAS, H.; LARAGH, J. H. Specific inhibition of the renin-angiotensin system: A key to understanding blood pressure regulation. *Prog Cardiovasc Dis*. v. 17, n. 2, p. 87-98, 1974.
- BURG, M. J.; GRANTHAM, J.; ABRAMOW, M.; ORLOFF, J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. *Am J Physiol*. v. 291, p. 1293-1298, 1966.
- BÜRGELOVÁ, M.; KRAMER, H. J.; TEPLAN, V.; VELICKOVÁ, G.; VÍTKO, S.; HELLER, J.; MALÝ, J.; CERVENKA, L. Intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) modulates renal functional responses to exogenous angiotensin II in the rat. *Kidney Blood Press Res*. v. 25, n. 4, p. 202-10, 2002.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. v. 8, p. 30-40, 2001.
- CAMPBELL D. J. Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol*. v. 10, p. S1-8, 1987a.
- CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*. v. 79, n. 1, p. 1-6, 1987b.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56: 395–433, 1987
- CARRARO-LACROIX, L. R.; MALNIC, G. Signaling pathways involved with the stimulatory effect of angiotensin II on vacuolar H⁺-ATPase in proximal tubule cells. *Pflugers Arch*. v. 452, p. 728-36, 2006.
- CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* v. 101, p. 329-335, 2000.
- CASTELO-BRANCO, R. C.; LEITE-DELLOVA, D. C.; MELLO-AIRES, M. D. Dose-dependent effects of Angiotensin-(1-7) on the NHE3 exchanger and [Ca²⁺]_i in in vivo proximal tubules. *Am J. Physiol. Renal Physiol*. v. 304, p. F1258-F1265, 2013.
- CASTRO-CHAVES, P.; CERQUEIRA, R.; PINTALHAO, M.; LEITE-MOREIRA, A. F. New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy. *Expert Opin. Ther. Target*. v. 14, p. 485-496, 2010.
- CHANSEL, D.; VANDERMEERSCH, S.; OKO, A.; CURAT, C.; ARDAILLOU, R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. *Eur J Pharmacol*. v. 414, p. 165-75, 2001.
- CHAPPELL, M. C. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7) MAS receptor axis; more than regulation of blood pressure? *Hypertension*. v. 50, p. 596-599, 2007.
- CHAPPELL, M. C.; ALLRED, A. J.; FERRARIO, C. M. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. v. 16, p. 22-6, 2001.
- CHAPPELL, M. C.; DIZ, D. I.; YUNIS, C.; FERRARIO, C. M. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl*. v. 68, p. S3-6, 1998a.
- CHAPPELL, M. C.; IYER, S. N.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. v. 31, n. 9, p. 1205-12, 1998b.

- CHAPPELL, M. C.; MODRALL, J. G.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol.* v. 143, p. 77-89, 2004.
- CHAPPELL, M. C.; PIRRO, N. T.; SYKES, A.; FERRARIO, C. M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* v. 31, pp. 362-367, 1998c.
- CHAPPELL, M. C. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol.* v. 2, n. 4, p. 2733-52, 2012.
- CHUNG-PIN, L.; CHIANG-TING, C.; CHAO-CHUAN, C.; KO-LONG, L.; HE-HSIUNG, C.; YI-CHAU, L.; JIN-SHIUNG, C.; CHUN-CHI, K.; WEI-ZHE, L.; I-FEI, H.; CHUNG-REN, J. Mechanism of $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by angiotensin 1-7 in MDCK renal tubular cells. *J Recept Signal Transduct Res.* v. 32, n. 6, p. 335-41, 2012.
- CLAPHAM, D. E. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature.* v. 375, p. 634-635, 1995.
- CLAUSER, E.; CURNOW, K. M.; DAVIES, E.; CONCHON, S.; TEUTSCH, B.; VIANELLO, B.; MONNOT, C.; CORVOL, P. Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur J Endocrinol.* v. 134, n. 4, p. 403-11, 1996.
- COLEMAN, J. K. M.; KREBS, L. T.; HAMILTON, T. A.; ONG, B.; LAWRENCE, K. A.; SARDINIA, M. F.; HARDING, J. W.; WRIGHT, J. W. Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV-binding sites and angiotensin IV induced renal cortical blood flow changes in rats. *Peptides.* v. 19, p. 269-277, 1998.
- COPPOLA, S.; FRÖMTER, E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO₃ cotransport and K⁺ conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. *Pflügers Arch* 427: 151-6, 1994.
- CORONEL, F.; CIGARRÁN, S.; GARCÍA-MENA, M.; HERRERO, J. A.; CALVO, N.; PÉREZ-FLORES, I. Irbesartan in hypertensive non-diabetic advanced chronic kidney disease. Comparative study with ACEI. *Nefrologia.* v. 28, n. 1, p. 56-60, 2008.
- CORONEL, F.; PÉREZ, F. I. Factors related to loss of residual renal function in peritoneal dialysis. *Nefrologia.* v. 28, p. 39-44, 2008.
- CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; DA COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P. H.; YAGIL, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* v. 417, p. 822-828, 2002.
- CRAJOINAS, R. O.; LESSA, L. M.; CARRARO-LACROIX, L. R.; DAVEL, A. P.; PACHECO, B. P.; ROSSONI, L. V.; MALNIC, G.; GIRARDI, A. C. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 299, n. 4, p. F872-F881, 2010.
- DA SILVEIRA, K. D.; POMPERMAYER, BOSCO, K. S.; DINIZ, L. R.; CARMONA, A. K.; CASSALI, G. D.; BRUNA-ROMERO, O.; DE SOUSA, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; RIBEIRO, VIEIRA, M. A. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond).* v. 119, p. 385-394, 2010.
- DANSER, A. H.; VAN DEN DORPEL, M. A.; DEINUM, F. H.; FRANKEN, A. A.; POPPERKAMP, E.; DE JONG, P. T.; SCHALEKAMP, M. A. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 68, n. 1, p. 160-7, 1989.

- DE GASPARO, M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W.; UNGER, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* v. 52, n. 3, p. 415-72, 2000.
- DELLIPIZZI, A. M.; HILCHEY, S. D.; BELL-QUILLEY, C. P. Natriuretic action of angiotensin (1-7). *Br J Pharmacol.* v. 111, n. 1, p. 1-3, 1994.
- DÍEZ-FREIRE, C.; VÁZQUEZ, J.; CORREA DE ADJOUNIAN, M. F.; FERRARI, M. F.; YUAN, L.; SILVER, X.; TORRES, R.; RAIZADA, M. K. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics* v. 27, p. 12-19, 2006.
- DILAURO, M.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Scientific World Journal*; v. 9, p. 522-535, 2009.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* v. 87, n. 5, p. E1-E9, 2000.
- DUKE, M. D.; GUIDRY, C.; GUICE, J.; STUKE, L.; MARR, A. B.; HUNT, J. P.; MEADE, P.; MCSWAIN, N. E. Jr.; DUCHESNE, J. C. Restrictive fluid resuscitation in combination with damage control resuscitation: time for adaptation. *J Trauma Acute Care Surg.* v. 73, n. 3, p. 674-8, 2012.
- EGUTI, D. M. N.; THIEME, K.; LEUNG, G.; MELLO-AIRES, M.; OLIVEIRA-SOUZA, M. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) by calmodulin-binding sites: role of angiotensin II. *Cell Physiol Biochem.* v. 26, p. 541-552, 2010.
- ESTEBAN, V.; HERINGER-WALTHER, S.; STERNER-KOCK, A.; DE BRUIN, R.; VAN DEN ENGEL, S.; WANG, Y.; MEZZANO, S.; EGIDO, J.; SCHULTHEISS, H. P.; RUIZ-ORTEGA, M.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor Mas are key players in renal inflammation. *PLoS One.* v. 4, n. 4, p. e5406, 2009.
- FAN, X.; LIU, K.; CUI, W.; HUANG, J.; WUANG, W.; GAO, Y. Novel mechanism of intra-renal angiotensin II-induced sodium/proton exchanger 3 expression by losartan in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep.* v. 10, p. 2483-8, 2014.
- FÉRAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-depedent. Sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* v. 81, p. 345-417, 2001.
- FERRÃO, F. M.; LARA, L. S.; AXELBAND, F.; DIAS, J.; CARMONA, A. K.; REIS, R. I.; COSTA-NETO, C. M.; VIEYRA, A.; LOWE, J. Exposure of luminal membranes of LLC-PK1 cells to ANG II induces dimerization of AT1/AT2 receptors to activate SERCA and to promote Ca²⁺ mobilization. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 302, n. 7, p. F875-83, 2012.
- FERRARIO, C. M.; AVERILL, D. B.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; ISKANDAR, S. S.; DEAN, R. H.; DIZ, D. I. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int.* v. 62, p. 1349-1357, 2002a.
- FERRARIO, C. M.; JESSUP, J.; GALLAGHER, P. E.; AVERILL, D. B.; BROSNIHAN, K. B.; ANN TALLANT, E.; SMITH, R. D.; CHAPPELL, M. C. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int.*, v. 68, p. 2189-2196, 2005a.
- FERRARIO, C. M.; SMITH, R. D.; BROSNIHAN, B; CHAPPELL, M. C.; CAMPESE, V. M.; VESTERQVIST, O.; LIAO, W. C.; RUDDY, M. C.; GRIM, C. E. Effects of omapatrilat on the rennin angiotensin system in salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens.* v.15, p. 557-564, 2002 b.

- FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. 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.* v. 289, n. 6, p. H2281-90, 2005b.
- FERRARIO, C. M.; VARAGIC, J.; The ANG-(1-7)/ACE2/MAS axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol.*, v. 298, n. 6, p. F1297-F1305, 2010.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* v. 38, p. 499-507, 2005.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension.* v. 38, p. 665-8, 2001.
- FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; FASSOT, C.; VALENTIN, B.; DJORDJJEVIC, D.; REAUX-LE GOAZIGO, A.; CORVOL, P.; ROQUES, B. P.; LLORENS-CORTES, C. Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 101, p. 7775-7780, 2004.
- FRAGA-SILVA, R. A.; FERREIRA, A. J.; DOS SANTOS, R. A. Opportunities for targeting the angiotensin-converting enzyme 2/ angiotensin-(1-7)/mas receptor pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* v. 15, p. 31-38, 2013.
- FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONÇALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; FRANCIS, G. S.; MCDONALD, K. M.; COHN, J. N. Neurohumoral activation in preclinical heart failure. Remodeling and the potential for intervention. *Circulation.* v. 87, n. 5, p. 90-6, 1993.
- FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONÇALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol. Med.* v. 14, p. 28-35, 2008.
- FRANCIS, G. S.; COHN, J. N.; JOHNSON, G.; RECTOR, T. S.; GOLDMAN, S.; SIMON, A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation.* v. 87, p. VII40-8, 1993.
- GALLAGHER, P. E.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A. Distinct roles ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Cell Physiol.* v. 290, p. C420-426, 2006.
- GARCIA, N. H.; GARVIN, J. L. Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol.* v. 5, n. 4, p. 1133-8, 1994.
- GEIBEL, J.; GIEBISCH, G.; BORON, W. F. Angiotensin II stimulates both $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci* v. 87, p. 7917-7920, 1990.
- GIRONACCI, M. M.; COBA, M. P.; PEÑA, C. Angiotensin-(1-7) binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. *Regul Pept.* v. 84, p. 51-4, 1999.
- GIRONACCI, M. M.; FERNANDEZ, TOME, M. C.; SPEZIALE, E.; STERIN-SPEZIALE, N.; PENA, C. Enhancement of phosphatidylcholine biosynthesis by angiotensin-(1-7) in the rat renal cortex. *Biochem Pharmacol.* v. 63, p. 507-514, 2002.
- GODÍNEZ-HERNÁNDEZ, D.; GALLARDO-ORTÍZ, I. A.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, P.; VILLALOBOS-MOLINA, R. Captopril therapy decreases both expression and function of alpha-adrenoceptors in pre- hypertensive rat aorta. *Auton Autacoid Pharmacol.* v. 26, n. 1, p. 21-9, 2006.
- GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* v. 260, p. 3440-3450, 1985.

- GUO, F.; LIU, B.; TANG, F.; LANE, S.; SOUSLOVA, E. A.; CHUDAKOV, D. M.; PATON, J. F.; KASPAROV, S. Astroglia are a possible cellular substrate of angiotensin (1-7) effects in the rostral ventrolateral medulla. *Cardiovasc Res.* v. 87, p. 578-584, 2010.
- GWATHMEY, T. M.; WESTWOOD, B. M.; PIRRO, N. T.; TANG, L.; ROSE, J. C.; DIZ, D. I.; CHAPPELL, M. C. Nuclear angiotensin-(1-7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 299, p. F983-F990, 2010.
- HANDA, R. K. Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT(4) receptor system. *Am J Physiol.* v. 277, p. F75-83, 1999.
- HANDA, R. K.; FERRARIO, C. M.; STRANDHOY, J. W. Renal actions of angiotensin-(1-7) in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol.* v. 270, p. F141-F147, 1996.
- HE, P.; KLEIN, J.; YUN, C. C. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor-binding protein released with IP₃ (IRBIT) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* v. 285, n. 36, p. 27869-78, 2010.
- HEITSCH, H.; BROVKOVYCH, S.; MALINSKI, T.; WIEMER, G. Angiotensin-(1-7) stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension.* v. 37, p. 72-76, 2001.
- HELLER, J.; KRAMER, H. J.; MALÝ, J.; CERVENKA, L.; HORÁČEK, V. Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) in the dog. *Kidney Blood Press Res.* v. 23, p. 89-94, 2000.
- HENRICH, W. L.; LEVI, M. Ontogeny of renal renin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am J Physiol.* v. 260, p. F530-5, 1991.
- HILCHEY, S. D.; CAROLINE, P.; BELL-QUILLEY, C. P. Association between the natriuretic action of angiotensin (1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release. *Hypertension.* v. 25, p. 1238-1244, 1995.
- HORITA, S.; SEKI, G.; YAMADA, H.; SUZUKI, M.; KOIKE, K.; FUJITA, T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. *Int J Hypertens.* 391762, 2011.
- HOULLIER, P.; CHAMBREY, R.; ACHARD, J. M.; FROISSART, M.; POGGIOLI, J.; PAILLARD, M. Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na⁺/H⁺ antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int.* v. 50, p. 1496-1505, 1996.
- HSUEH, W. A.; BAXTER, J. D. Human prorenin. *Hypertension.* v. 17, p. 469-477, 1991.
- HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT₁ receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol.* v. 20, n. 5, p. 953-70, 2005.
- IGASE, M.; YOKOYAMA, H.; FERRARIO, C. M. Attenuation of hypertension-mediated glomerulosclerosis in conjunction with increased angiotensin (1-7). *Ther Adv Cardiovasc Dis.* v. 5, p. 297-304, 2011.
- ISHIYAMA, Y.; GALLAGHER, P. E.; AVERILL, D. B.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension.* v. 43, p. 970-976, 2004.
- IUSUF, D.; HENNING, R. H.; VAN GILST, W. H.; ROKS, A. J. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol.* v. 585, p. 303-312, 2008.
- IWATA, M.; COWLING, R. T.; YEO, S. J.; GREENBERG, B. Targeting the ECA2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 51, p. 542-547, 2011.
- IWAI, M.; HORIUCHI, M. Devil and angel in the renin angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT₁ receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research.* v. 32, n. 7, p. 533-536, 2009.

- IYER, S. N.; CHAPPELL, M. C.; AVERILL, D. B.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension*. v. 31, n. 2, p. 699-705, 1998a.
- IYER, S. N.; FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. v. 31, p. 356-61, 1998b.
- JAIMES, E. A.; TIAN, R. X.; PEARSE, D.; RAIJ, L. Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. *Kidney International*. v. 68, n. 5, p. 2143-2153, 2005.
- KAMO, T.; AKAZAWA, H.; KOMURO, I. Pleiotropic Effects of Angiotensin II Receptor Signaling in Cardiovascular Homeostasis and Aging. *Int Heart J*. v. 56, n. 3, p. 249-54, 2015.
- KATOVICH, M. J.; GROBE, J. L.; RAIZADA, M. K. Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target. *Curr. Hypertens*. v. 10, p. 227-232, 2008.
- KIM, C. S.; KIM, I. J.; BAE, E. H.; MA, S. K.; LEE, J.; KIM, S. W. Angiotensin-(1-7) Attenuates Kidney Injury Due to Obstructive Nephropathy in Rats. *PLoS One*. v. 10, n. 11, p. e0142664, 2015.
- KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. v. 52, n. 1, p. 11-34, 2000a.
- KIM, S.; ZHAN, Y.; IZUMI, Y.; IWAO, H. Cardiovascular effects of combination of perindopril, candesartan, and amlodipine in hypertensive rats. *Hypertension*. v. 35, n. 3, p. 769-74, 2000b.
- KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. v. 59, n. 3, p. 251-87, 2007.
- KOHARA, K.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7). A member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension*. v. 17, p. 131-138, 1991.
- KOHARA, K.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin (1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Peptides*. v. 14, p. 883-891, 1993.
- KUCHAREWICZ, I.; PAWLAK, R.; MATYS, T.; CHABIELSKA, E.; BUCZKO, W. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. *J Physiol Pharmacol*. v. 53, p. 533-540, 2002.
- LARA, L. S.; CAVALCANTE, F.; AXELBAND, F.; DE SOUZA, A. M.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Involvement of the Gi/o/cGMP/ PKG pathway in the AT2-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochemical Journal*. v. 395, n. 1, p. 183-190, 2006.
- LEITE-DELLOVA, D. C. A.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. *Am J Physiol Renal Physiol*. v. 295, p. F1342-F1352, 2008.
- LEITE-DELLOVA, D. C. A.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H⁺-ATPase in proximal S3 segments. *Am J Physiol Renal Physiol*. v. 300, n. 3, p. F682-91, 2011.
- LERMAN, L. O.; CHADE, A. R.; SICA, V.; NAPOLI, C. Animal of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. v. 146, p. 160-173, 2005.

- LI, N.; ZIMPELMANN, J.; CHENG, K.; WILKINS, J. A.; BURNS, K. D. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1–7 by rat proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 288, p. F353-F362, 2005.
- LIU, C. P.; CHOU, C. T.; CHI, C. C.; LIN, K. L.; CHENG, H. H.; LU, Y. C.; CHENG, J. S.; KUO, C. C.; LIANG, W. Z.; HUANG, I. F.; JAN, C. R. Mechanism of $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by angiotensin 1-7 in MDCK renal tubular cells. *J Recept Signal Transduct Res.* v. 32, p. 335-41, 2012.
- LÓPEZ ORDIERES, M. G.; GIRONACCI, M.; RODRÍGUEZ, L. A. G.; PEÑA, C. Effect of angiotensin-(1-7) on ATPase activities in several tissues. *Regul Pept.* v. 77, p. 135-9, 1998.
- LOPEZ, O.; GIRONACCI, M.; RODRIGUEZ, D.; PENA, C. Effect of angiotensin-(1-7) on ATPase activities in several tissues. *Regulatory Peptides.* v. 77, p. 135-139, 1998.
- LUQUE, M.; MARTIN, P.; MARTELL, N.; FERNANDEZ, C.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensina-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens.* v. 14, p. 799-805, 1996.
- LV, L. L.; LIU, B. C. Role of non-classical renin-angiotensin system axis in renal fibrosis. *Front Physiol.* v. 6, p. 117, 2015.
- MAGALDI, A. J.; CESAR, K. R.; DE ARAÚJO, M.; SIMÕES E SILVA, A. C.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch.* v. 447, n. 2, p. 223-30, 2003.
- MAGALHÃES, L. B. N. C. Anti-hipertensivos. In: SILVA, P. Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* v. 220, p. 1759-1767, 1971.
- MANSOORI, A.; ORYAN, S.; NEMATBAKHSH, M. Role of Mas receptor antagonist (A779) on pressure diuresis and natriuresis and renal blood flow in the absence of angiotensin II receptors type 1 and 2 in female and male rats. *J Physiol Pharmacol.* v. 65, n. 5, p. 633-9, 2014.
- MASSON, R.; NICKLIN, S. A.; CRAIG, M. A.; MCBRIDE, M.; GILDAY, K.; GREGOREVIC, P.; ALLEN, J. M.; CHAMBERLAIN, J. S.; SMITH, G.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A. F.; NAPOLI, C.; BAKER, A. H. Onset of experimental severe cardiac fibrosis is mediated by overexpression of angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension.* v. 53, p. 694-700, 2009.
- MCFADYEN, R. J.; BARR, C. S.; STRUTHERS, A. D. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res.* v. 35, n. 1, p. 30-4, 1997.
- MCKEE, P. A.; CASTELLI, W. P.; MCNAMARA, P. M.; KANNEL, W. B. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* v. 285, p. 1441-1446, 1971.
- MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* v. 292, p. C82-C97, 2007.
- MELLO-AIRES, M.; LOPES, M. J.; MALNIC, G. PCO_2 in renal cortex. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 259, p. F357-F365, 1990.
- MELLO-AIRES, M.; OLIVEIRA-SOUZA, M. Interaction of Angiotensin II and Atrial Natriuretic Peptide on pH_i regulation in MDCK cells. *Am J Physiol. Renal Physiol.* v. 279, p. F944-F953, 2000.
- MENDES, A. C.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. *Regul Pept.* v. 125, p. 29-34, 2005.

- MENG, W.; ZHAO, W.; ZHAO, T.; LIU, C.; CHEN, Y.; LIU, H.; SUN, Y. Autocrine and paracrine function of Angiotensin 1-7 in tissue repair during hypertension. *Am J Hypertens.* v. 27, n. 6, p. 775-82, 2014.
- MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; WALTHER, T.; TOUYZ, R. M.; REUDELHUBER, T. L. Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* v. 103, p. 1319-26, 2008.
- MOON, J. Y. ACE 2 and Angiotensin-(1-7) in Hypertensive Renal Disease. *Electrolyte Blood Press.* v. 9, n. 2, p. 41-4, 2011.
- MOON, J. Y. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press.* v. 11, n. 2, p. 41-5, 2013.
- MUSA-AZIZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Signalling pathways in the biphasic effect of ANG II on Na⁺/H⁺ exchanger in T84 cells. *The Journal of Membrane Biology.* v. 205, n. 2, p. 49-60, 2005.
- MUSCARÁ, M. N.; LOVREN, F.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; DEL SOLDATO, P.; TRIGGLE, C. R.; WALLACE, J. L. Vasorelaxant effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative in normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* v. 133, n. 8, p. 1314-22, 2001.
- NASCIMENTO-GOMES, G.; SOUZA, M. O.; VECCHIA, M. G.; OSHIRO, M. E.; FERREIRA, A. T.; MELLO-AIRES, M. Atrial natriuretic peptide modulates the effect of angiotensin II on the concentration of free calcium in the cytosol of Mandin-Darby canine kidney cells. *Braz J Med Biol Res.* v. 28, p. 609-13, 1995.
- NAVAR, L. G.; KOBORI, H.; PRIETO, M. C.; GONZALEZ-VILLALOBOS, R. A. Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension.* v. 57, p. 355-362, 2011a.
- NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin in Nephrol Hypert.* v. 13, n. 1, p. 107-115, 2004.
- NAVAR, L. G.; PRIETO, M. C.; SATOU, R.; KOBORI, H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol.* v. 11, n. 2, p. 180-6, 2011b.
- NGUYEN, G.; BURCKLE, C.; SRAER, J. D. The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* v. 12, p. 51- 55, 2003.
- NINGJUN, L.; JOSEPH, Z.; KEDING, C.; JOHN, A. W.; KEVIN, D. B. The role of angiotensina converting enzyme 2 in the generation of angiotensina 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 288, p. F353-F362, 2005.
- O'NEILL, J.; CORBETT, A.; JOHNS, E. J. Dietary sodium intake modulates renal excretory responses to intrarenal angiotensin (1-7) administration in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 304, p. R260-R266, 2012.
- OHSHIMA, K.; MOGI, M.; NAKAOKA, H.; IWANAMI, J.; MIN, L. J.; KANNO, H.; TSUKUDA, K.; CHISAKA, T.; BAI, H. Y.; WANG, X. L.; OGIMOTO, A.; HIGAKI, J.; HORIUCHI, M. Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension.* v. 63, n. 3, p. e53-9, 2014.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* v. 27, p. 282-293, 1963.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of Arginine Vasopressin and ANP on pHi and [Ca²⁺]_i regulation in MDCK cells. *Kidney Int.* v. 60, p. 1800-1808, 2001.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pHi regulation in MDCK cells. *Am J Renal Physiol.* v. 279, p. F944-F953, 2000.

- OUDIT, G. Y.; HERZENBERG, A. M.; KASSIRI, Z.; WONG, D.; REICH, H.; KHOKHA, R.; CRACKOWER, M. A.; BACKX, P. H.; PENNINGER, J. M.; SCHOLEY, J. W. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* v. 168, p. 1808-1820, 2006.
- OUDOT, A.; VERGELY, C. ECARNOT-LAUBRIET, A. ROCHETTE, L. Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation. *Regul. Pept.* v. 127, p. 101-10, 2005.
- PARYS, J. B.; DE SMEDT, H.; BORGHGRAEF, R. Calcium transport systems in the LLC-PK1 renal epithelial established cell line. *Biochim Biophys Acta.* v. 888, p. 70-81, 1986.
- PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond).* v. 124, n. 7, p. 443-56, 2013.
- PECHÁNOVÁ, O.; JENDEKOVÁ, L.; VRANKOVÁ, S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. *Pharmacol. Rep.* v. 61, p. 116-22, 2009.
- PEDROSA, R.; VILLAR, V. A.; PASCUA, A. M.; SIMÃO, S.; HOPFER, U.; JOSE, P. A.; SOARES-DA-SILVA, P. H₂O₂ Stimulation of the Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger by Angiotensin II and Angiotensin II Type 1 Receptor Distribution in Membrane Microdomains. *Hypertension.* v. 51, n. 5, p. 1332-8, 2008.
- PERGHER, P. S.; LEITE-DELLOVA, D.; DE MELLO-AIRES, M. Direct action of aldosterone on bicarbonate reabsorption in in vivo cortical proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 296, n. 5, p. F1185-93, 2009.
- PINHEIRO, S. V.; FERREIRA, A. J.; KITTEN, G. T.; DA SILVEIRA, K. D.; DA SILVA, D. A.; SANTOS, S. H.; GAVA, E.; CASTRO, C. H.; MAGALHAES, J. A.; DA MOTA, R. K.; BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A.; SIMÕES E SILVA, A. C. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int.* v. 75, p. 1184-1193, 2009.
- PINHEIRO, S. V.; SIMÕES E SILVA, A. C. Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. *Int J Hypertens.* v. 2012, p. 414128, 2012.
- PINHEIRO, S. V.; SIMÕES E SILVA, A. C.; SAMPAIO, W. O.; DE PAULA, R. D.; MENDES, E. P.; BONTEMPO, E. D.; PESQUERO, J. B.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; BLEICH, M.; SANTOS, R. A. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* v. 44, n. 4, p. 490-6, 2004.
- PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W. J.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A.; PALENSKY, J.; WITTES, J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* v. 341, n. 10, p. 709-17, 1999.
- PONTES, R. B.; CRAJOINAS, R. O.; NISHI, E. E.; OLIVEIRA-SALES, E. B.; GIRARDI, A. C.; CAMPOS, R. R.; BERGAMASCHI, C. T. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 308, n. 8, p. F848-56, 2015.
- RABELO, L. A.; ALENINA, N.; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertension.* v. 34, p. 154-160, 2011.
- RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* v. 35, p. 480-483, 2000.

- REICH, H. N.; OUDIT, G. Y.; PENNINGER, J. M.; SCHOLEY, J. W.; HERZENBERG, A. M. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int.* v. 74, p. 1610-1616, 2008.
- REN, Y.; GARVIN, J. L.; CARRTERO, O. A. Vasodilator action of angiotensin (1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension.* v. 39, p. 799-802, 2002.
- ROGERSON, F. M.; CHAI, S. Y.; SCHLAWE, I.; MURRAY, W. K.; MARLEY, P. D.; MENDELSON, F. A. Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J Hypertens.* v. 10, n. 7, p. 615-20, 1992.
- ROSENDORFF, C.; LACKLAND, D. T.; ALLISON, M.; ARONOW, W. S.; BLACK, H. R.; BLUMENTHAL, R. S.; CANNON, C. P.; DE LEMOS, J. A.; ELLIOTT, W. J.; FINDEISS, L.; GERSH, B. J.; GORE, J. M.; LEVY, D.; LONG, J. B.; O'CONNOR, C. M.; O'GARA, P. T.; OGEDEGBE, G.; OPARIL, S.; WHITE, W. B.; AMERICAN HEART ASSOCIATION; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION. Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Hypertension.* v. 65, n. 6, p. 1372-407, 2015.
- ROSIVALL, L. Intrarenal renin-angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol.* v. 302, n. 2, p. 185-92, 2009.
- ROWE, B. P.; SAYLOR, D. L.; SPETH, R. C.; ABSHER, D. R. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul Pept.* v. 56, p. 139-46, 1995.
- RUIZ, P.; BASSO, N.; CANNATA, M. A.; TAQUINI, A. C. The renin-angiotensin system in different stages of spontaneous hypertension in the rat (SHR). *Clin Exp Hypertens A.* v. 12, n. 1, p. 63-81, 1990.
- SAAVEDRA, J. M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology.* v. 36, n. 1, p. 1-18, 2001.
- SAMAVAT, S.; AHMADPOOR, P.; SAMADIAN, F. Aldosterone, hypertension, and beyond. *Iran J Kidney Dis.* v. 5, n. 2, p. 71-6, 2011.
- SAMPAIO, W. O.; HENRIQUE, D. E.; CASTRO, C.; SANTOS, R. A.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension.* v. 50, p. 1093-1098, 2007.
- SAMPAIO, W. O.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS, R. A. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 284, n. 6, p. H1985-94, 2003.
- SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7). *Hypertension.* v. 63, p. 1138-47, 2014.
- SANTOS, R. A. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* v. 14, p. 28-35, 2008.
- SANTOS, R. A.; BARACHO, N. C. Angiotensin-(1-7) is a potent antidiuretic peptide in rats. *Braz J Med Biol Res.* v. 25, n.6, p. 651-4, 1992.
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES E SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology.* v. 93, n. 5, p. 519-527, 2008.
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.* v. 216, n. 2, p. R1-17, 2013.
- SANTOS, R. A.; HAIBARA, A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SIMÕES E SILVA, A. C.; PAULA, R. D.; PINHEIRO, S. V.; LEITE, M. F.; LEMOS, V. S.; SILVA, D. M.; GUERRA,

- M. T.; KHOSLA, M. C. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension*. v. 41, p. 737-43, 2003.
- SANTOS, R. A.; SIMÕES E SILVA, A. C.; MAGALDI, A. J.; KHOSLA, M. C.; CESAR, K. R.; PASSAGLIO, K. T.; BARACHO, N. C. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. v. 27, p. 875-84, 1996.
- SANTOS, R. A.; SIMÕES E SILVA, A. C.; MAGALDI, A. J.; KHOSLA, M. C.; CESAR, K. R.; PASSAGLIO, K. T.; BARACHO, N. C. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. v. 27, n. 4, p. 875-84, 1996.
- SANTOS, R. A.; SIMÕES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci*. v. 100, n. 14, p. 8258-63, 2003.
- SARIKONDA, K. V.; WATSON, R. E.; OPARA, O. C.; DIPETTE, D. J. Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens*. v. 3, p. 158-165, 2009.
- SCHAFER, J. A.; WATKINS, M. L.; LI, L.; HERTER, P.; HAXELMANS, S.; SCHLATTER, E. A simplified method for isolation of large numbers of defined nephrons segments. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. v. 273, p. F650-F657, 1997.
- SCHINDLER, C.; BRAMLAGE, P.; KIRCH, W.; FERRARIO, C. M. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc. Health Risk Manag*. v. 3, p. 125-137, 2007.
- SCHULLER, S.; VAN ISRAEL, N.; VANBELLE, S.; CLERCX, C.; MCENTEE, K. Lack of efficacy of low-dose spironolactone as adjunct treatment to conventional congestive heart failure treatment in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. v. 34, n. 4, p. 322-31, 2011.
- SCHUSTER, V. L.; KOKKO, J. P.; JACOBSON, H. R. Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest*. v. 73, p. 507-515, 1984.
- SHAH, A.; GUL, R.; YUAN, K.; GAO, S.; OH, Y. B.; KIM, S. H. Angiotensin-(1-7 stimulates high atrial pacing-induced ANP secretion via Mas/PI3-kinase/Akt axis and Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 298, n. 5, p. H1365-74, 2010.
- SHALTOUT, H. A.; WESTWOOD, B.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M.; FIGUEROA, J.; DIZ, D. I.; ROSE, J. C.; CHAPPELL, M. C. Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine and serum of sheep: Evidence for ACE2-dependent processing of Angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*. v. 292, p. F82-F91, 2006.
- SILVA, D. M.; VIANNA, H. R.; CORTES, S. F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A.; LEMOS, V. S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. v. 28, n. 3, p. 702-7, 2007.
- SIMÕES E SILVA, A. C.; BARACHO, N. C.; PASSAGLIO, K. T.; SANTOS, R. A. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. v. 30, n. 4, p. 503-13, 1997.
- SIMÕES E SILVA, A. C.; BELLO, A. P.; BARACHO, N. C.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regul Pept*. v. 74, p. 177-84, 1998.
- SIMÕES E SILVA, A. C.; FLYNN, J. T. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. v. 27, n. 10, p. 1835-45, 2012.
- SINGH, V.; LIN, R.; YANG, J.; CHA, B.; SARKER, R.; TSE, C. M.; DONOWITZ, M. AKT and GSK-3 are necessary for direct ezrin binding to NHE3 as part of a C-terminal stimulatory complex: role of a novel Ser-rich NHE3 C-terminal motif in NHE3 activity and trafficking. *J Biol Chem*. v. 289, n. 9, p. 5449-5461, 2014.

- STEGBAUER, J.; OBERHAUSER, V.; VONEND, O.; RUMP, L. C. Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* v. 61, n. 2, p. 352-9, 2004.
- STEGBAUER, J.; VONEND, O.; OBERHAUSER, V.; SELLIN, L.; RUMP, L. C. Angiotensin II receptor modulation of renal vascular resistance and neurotransmission in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res.* v. 28, n. 1, p. 20-6, 2005.
- STRUTHERS, A. D. Aldosterone in heart failure: pathophysiology and treatment. *Curr Heart Fail Rep.* v. 1, n. 4, p. 171-5, 2004.
- SU, Z.; ZIMPELMANN, J.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int.* v. 69, n. 12, p. 2212-8, 2006.
- SULLIVAN, J. C.; BHATIA, K.; YAMAMOTO, T.; ELMARAKBY, A. A. Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* v. 56, p. 658–666, 2010.
- SULLIVAN, J. C.; SEMPRUN-PRIETO, L.; BOESEN, E. I.; POLLOCK, D. M.; POLLOCK, J. S. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 293, p. R1573-R1579, 2007.
- TAKAHASHI, A.; CAMACHO, P.; LECHLEITER, J. D.; HERMAN, B. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews.* v. 79, n. 4, p. 1089-1125, 1999.
- TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the MAS receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 289, n. 4, p. 1560-6, 2005.
- TAN, Z.; WU, J.; MA, H. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1–7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* v. 12, p. 413-419, 2011.
- TANG, L.; CAREY, L. C.; BI, J.; VALEGO, N.; SUN, X.; DEIBEL, P.; PERROTT, J.; FIGUEROA, J. P.; CHAPPELL, M. C.; ROSE, J. C. Gender differences in the effects of antenatal betamethasone exposure on renal function in adult sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 296, p. R309-R317, 2009.
- TINEL, H.; KINNE-SAFFRAN, E.; KINNE, R. K. Calcium signalling during RVD of kidney cells. *Cell Physiol Biochem.* v. 10, p. 297-302, 2000.
- TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* v. 275, n. 43, p. 33238-43, 2000.
- TRASK, A. J.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardiovasc. Drug Ver.* v. 25, p. 162-174, 2007.
- TURBAN, S.; BEUTLER, K. T.; MORRIS, R. G.; MASILAMANI, S.; FENTON, R. A.; KNEPPER, M. A.; PACKER, R. K. Long-term regulation of proximal tubule acid-base transporter abundance by angiotensin II. *Kidney Int.* v. 70, n. 4, p. 660-8, 2006.
- VALLON, V.; KIRSCHENMANN, D.; WEAD, L. M.; LORTIE, M. J.; SATRIANO, J.; BLANTZ, R. C.; THOMSON, S. C. Effect of chronic salt loading on kidney function in early and established diabetes mellitus in rats. *J Lab Clin Med.* v. 130, n. 1, p. 76-82, 1997.
- VALLON, V.; OSSWALD, H.; BLANTZ, R. C.; THOMSON, S. Potential role of luminal potassium in tubuloglomerular feedback. *J Am Soc Nephrol.* v. 8, n. 12, p. 1831-7, 1997b.
- VALLON, V.; RICHTER, K.; HEYNE, N.; OSSWALD, H. Effect of intratubular application of angiotensin (1–7) on nephron function. *Kidney Blood Press Res.* v. 20, p. 233-239, 1997c.

- VAN DER WOUDE, E.A.; OCHODNICKY, P.; VAN DOKKUM, R. P.; ROCKS, A. J.; DEELMAN, L. E.; DE ZEEUW, D.; HENNING, R. H. The role of angiotensin (1-7) in renal vasculature of the rat. *J Hypertens.* v. 24, n. 10, p. 1971-8, 2006.
- VAN TWIST, D. J.; HOUBEN, A. J.; DE HAAN, M. W.; MOSTARD, G. J.; KROON, A. A.; DE LEEUW, P. W. Angiotensin-(1-7)-induced renal vasodilation in hypertensive humans is attenuated by low sodium intake and angiotensin II co-infusion. *Hypertension.* v. 62, n. 4, p. 789-93, 2013.
- VARAGIC, J.; AHMAD, S.; BROSNIHAN, K. B.; HABIBI, J.; TILMON, R. D.; SOWERS, J. R.; FERRARIO, C. M. Salt-induced renal injury in spontaneously hypertensive rats: effects of nebivolol. *Am J Nephrol.* v. 32, n. 6, p. 557-66, 2010.
- VARAGIC, J.; AHMAD, S.; NAGATA, S.; FERRARIO, C. M. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1-7) balance in cardiac and renal injury. *Curr Hypertens Rep.* v. 16, n. 3, p. 420, 2014.
- VELEZ, J. C.; BLAND, A. M.; ARTHUR, J. M.; RAYMOND, J. R.; JANECH, M. G. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 293, p. F398-F407, 2007.
- VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A. TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* v. 277, n. 17, p. 14838-43, 2002.
- VILLALOBOS-MOLINA, R.; IBARRA, M. Increased expression and function of vascular alpha1D-adrenoceptors may mediate the prohypertensive effects of angiotensin II. *Mol Interv.* v. 5, n. 6, p. 340-2, 2005.
- VILLALOBOS-MOLINA, R.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F. G.; LÓPEZ-GUERRERO, J. J.; FIGUEROA-GARCÍA, M. C.; GALLARDO-ORTIZ, I. A.; IBARRA, M.; RODRÍGUEZ-SOSA, M.; GONZALEZ, F. J.; ELIZONDO, G. Vascular alpha-1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Auton Autacoid Pharmacol.* v. 28, p. 61-7, 2008.
- VON LUTTEROTTI, N.; CATANZARO, D. F.; SEALEY, J. E.; LARAGH, J. H. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation.* v. 89, p. 458-470, 1994.
- WAANDERS, F.; VAIDYA, V. S.; VAN G. H.; LEUVENINK, H.; DAMMAN, K.; HAMMING, I.; BONVENTRE, J. V.; VOGT, L.; NAVIS, G. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* v. 53, n. 1, p. 16-25, 2009.
- WAKABAYASHI, S.; BERTRAND, B.; IKEDA, T.; POYSSEGUR, J.; SHIEKAWA, M. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation defective. *J Biol Chem.* v. 269, p. 13710-13715, 1994.
- WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases. *Semin Immunopathol.* v. 36, n. 3, p. 351-63, 2014.
- WALTERS, P. E.; GASPARI, T. A.; WIDDOP, R. E. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension.* v. 45, p. 960-966, 2005.
- WANG, W. Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension.* v. 24, n. 5, p. 571-5, 1994.

- WARNER, F. J.; LEW, R. A.; SMITH, A. I.; LAMBERT, D. W.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem.* v. 280, p. 39353-39362, 2005.
- WEBER, K. T. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med.* v. 345, p. 1689-1697, 2001.
- WEBER, K. T.; BRILLA, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* v. 83, p. 1849-1865, 1991.
- WIDDOP, R. E.; SAMPEY, D. B.; JARROTT, B. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* v. 34, p. 964-8, 1999.
- WILSON, B. A.; CRUZ-DIAZ, N.; MARSHALL, A. C.; PIRRO, N. T.; SU, Y.; GWATHMEY, T. M.; ROSE, J. C.; CHAPPELL, M. C. Na angiotensin-(1-7) peptidase in the kidney cortex, proximal tubules, and human HK-2 epithelial cells that is distinct from insulin-degrading enzyme. *Am J Physiol Renal Physiol.* v. 308, n. 6, p. F594-601, 2015.
- WILSON, B. A.; MARSHALL, A. C.; ALZAYADNEH, E. M.; CHAPPELL, M. C. The ins and outs of angiotensin processing within the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 307, n. 5, p. R487-9, 2014.
- WOLF, W. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant.* v. 9, p. 48-51, 2002.
- WONG, D. W.; OUDIT, G. Y.; REICH, H.; KASSIRI, Z.; ZHOU, J.; LIU, Q. C.; BACKX, P. H.; PENNINGER, J. M.; HERZENBERG, A. M.; SCHOLEY, J. W. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* v. 171, p. 438-451, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 mai. 2016.
- XU, F.; MAO, C.; LIU, Y.; WU, L.; XU, Z.; ZHANG, L. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. *Curr Med Chem.* v. 16, n. 28, p. 3701-15, 2009.
- XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/MAS pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 300, n. 4, p. R804-17, 2011.
- YAMADA, K.; IYER, S. N.; CHAPPELL, M. C.; GANTEN, D.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* v. 32, n. 3, p. 496-502, 1998.
- YE, M.; WYSOCKI, J.; WILLIAM, J.; SOLER, M. J.; COKIC, I.; BATLLE, D. Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme: Implications for albuminemia in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* v. 17, p. 3067-3075, 2006.
- ZHANG, J.; NOBLE, N. A.; BORDER, W. A.; HUANG, Y. Infusion of angiotensin-(1-7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 298, p. F579-F588, 2010.
- ZHEN, T.; JINGGUO, W.; HONG, M. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and MAS receptor by ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* v. 12, n. 4, p. 413-419, 2011.
- ZHONG, J. C.; YE, J. Y.; JIN, H. Y.; YU, X.; YU, H. M.; ZHU, D. L.; GAO, P. J.; HUANG, D. Y.; SHUSTER, M.; LOIBNER, H.; GUO, J. M.; YU, X. Y.; XIAO, B. X.; GONG, Z. H.; PENNINGER, J. M.; OUDIT, G. Y. Telmisartan attenuates aortic hypertrophy in hypertensive rats by the modulation of ACE2 and profilin-1 expression. *Regul Pept* v. 166, p. 90-97, 2011.

- ZICHA, J.; KUNES, J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* v. 79, n. 4, p. 1227-82, 1999.
- ZILE, M. R.; BRUTSAERT, D. L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation.* v. 105, p. 1503-1508, 2002.
- ZIMMERMAN, D.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond).* v. 123, n. 6, p. 333-46, 2012.

APÊNDICE

†THE EFFECTS OF ANGIOTENSIN-(1-7) ON THE NHE3 EXCHANGER AND ON $[Ca^{2+}]_i$ IN PROXIMAL TUBULES OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Regiane C Castelo-Branco¹, Deise CA Leite-Dellova², Gerhard Malnic¹
and Margarida de Mello-Aires¹

¹*Department of Physiology and Biophysics, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.* ²*Department of Basic Sciences, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil.*

Abbreviated title for the running head:

Ang-(1-7) effects on NHE3 and $[Ca^{2+}]_i$ in proximal tubules of SHR rats.

Name and address for mailing proofs:

Margarida de Mello Aires
Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas
University of São Paulo, SP 05508-900, Brazil
Telephone number: 55 (11) 3091-7241
FAX number: 55 (11) 3091-7285
E-mail: mmaires@icb.usp.br

ABSTRACT

Direct acute effects of angiotensin (1-7) (Ang-(1-7)) on the resorptive bicarbonate flow (JHCO_3^-) was evaluated by stationary microperfusion *in vivo* in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive controls Wistar-Kyoto (WKY), using microelectrode sensitive to H^+ . In WKY control rats, JHCO_3^- average value was $2.40 \pm 0.10 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($n = 28$). Losartan (10^{-7} M , an AT1 receptor antagonist) decreased JHCO_3^- (38%); A779 (10^{-6} M , a Mas antagonist), and a combination of both drugs decreased JHCO_3^- (32% and 38%, respectively). These data show that there are endogenous intrabular Ang II and Ang- (1-7) that stimulate JHCO_3^- . Ang-(1-7) has biphasic effects on Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3): at low dose (10^{-9} M) inhibits (28%) and at higher one (10^{-6}) stimulates (49%) NHE3. A779 and losartan augment the inhibitory effect of Ang-(1-7; 10^{-9} M), and modify Ang-(1-7; 10^{-6} M) the stimulatory effect to a inhibitory one. Thus, these results show that Ang-(1-7) effects are through Mas and AT1 receptors. S3226 (10^{-6} M , a NHE3 specific inhibitor) decreases JHCO_3^- (48%), and changes the stimulatory effect of Ang-(1-7) to an inhibitory one, but does not alter Ang-(1-7) inhibitory action. In SHR rats, JHCO_3^- in control group is $2.04 \pm 0.13 \text{ nmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (14), and A779 and losartan reduces this parameter (40% and 55%, respectively) (10). Both drugs when together inhibit JHCO_3^- (56%) (11). These findings indicate that in SHR rats, in a physiological state, there are endogenous and intratubular Ang-(1-7) and Ang II that stimulate JHCO_3^- ; however, Ang-(1-7) displayed opposite effects on SHR when compared to WKY rats: Ang- (1-7) at low dose (10^{-9} M) increases JHCO_3^- (52%) (13) whereas Ang (1-7) at higher dose (10^{-6} M) reduces JHCO_3^- (38%) (13). A779 and losartan alone abolish the stimulatory effect of Ang-(1-7) at low dose, and does not alter the inhibitory effect of Ang-(1-7) at high dose on JHCO_3^- , which suggests the role of Mas AT1 receptors on Ang-(1-7) effects. S3226 alone decreases JHCO_3^- (49%) (11), and abolishes the stimulatory effect of Ang-(1-7), at low dose, to an inhibitory one, and it does not change the inhibitory effect at higher dose of Ang-(1-7). In addition, we have fluorimetrically monitored cytosolic calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in isolated proximal tubule through FURA-2-AM. Our data show that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the WKY control group is $99.7 \pm 2.28 \text{ nM}$ ($n=5$). Ang-(1-7) at 10^{-9} or 10^{-6} M increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (101%) (5) and (64%) (5), respectively. A779 and losartan did not alter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ but when they are together an increase on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is found (97%) (5). In WKY, dose-dependent effects of Ang-(1-7) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are via Mas and AT1 receptors.; on the other

hand, in SHR control rats $[Ca^{2+}]_i$ is 94.3 ± 1.66 nM (5). Ang-(1-7) at low and high dose increase $[Ca^{2+}]_i$ by (52% and 84%, (6), respectively). A779 and losartan *per se* did not alter $[Ca^{2+}]_i$ but when together an increase on $[Ca^{2+}]_i$ was found (195%) (5). In SHR rats, dose-dependent effects of Ang-(1-7) on the $[Ca^{2+}]_i$ are via Mas and AT1 receptors; thus, the interaction of the opposing dose-dependent effects of Ang-(1-7) and Ang II on $JHCO_3^-$ and $[Ca^{2+}]_i$ may represent an important physiological mechanism for regulating the intra and extracellular volume. However, $[Ca^{2+}]_i$ alteration is an important factor for NHE3 activation through Ang-(1-7). Whether this effect is also through other signaling pathways will require further studies. In the interaction between dose-dependent opposing effects of Ang-(1-7) and Ang II in $JHCO_3^-$ and $[Ca^{2+}]_i$ represents an important physiological regulatory mechanism on pH and intra and extracellular volume in normotensive and hypertensive individuals.

Keywords: Angiotensin (1-7), $JHCO_3^-$, $[Ca^{2+}]_i$, AT1 and Mas receptor.

INTRODUCTION

Hypertension is defined when systolic blood and diastolic pressure is equal or higher than 140 and 90 mm Hg, respectively. Normal levels of both systolic and diastolic pressure are particularly important to keeping the homeostasis of heart, brain, kidneys, and global health and well-being. It is estimated that there are 1 billion people with hypertension worldwide. Unfortunately, this issue is growing and by 2025 it is expected 1.56 billion people with hypertension (World Health Organization, 2016).

The Angiotensin Renin System (RAS) is crucial in regulating blood pressure; RAS activation has been implicated in the developing and maintenance of hypertension. It is widely known that spontaneously hypertensive rats (SHR) are a model of established human hypertension, which is RAS dependent (Reckelhoff, 2000).

Angiotensin 1-7 [Ang-(1-7)] is a heptapeptide member of RAS. Ang-(1-7) is synthesized by different enzymatic pathways when compared to Ang II synthesis (Chappell, 2012). It is known that Ang-(1-7) binds to a specific G protein coupled receptor – known as Mas (XU et al., 2011; Chappell, 2012). Ang II is an octapeptide that has two specific receptors: AT1 and AT2.

Each receptor when activated triggers different responses in many tissues (Kamo, 2015; Saavedra, 2011; Wolf, 2002). The most important and efficient pathways, in terms of physiology and catalytic standpoint, is the synthetic pathway mediated by Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2); the latter converts Ang II into Ang-(1-7) (VICKERS et al., 2002; Ferrario et al. 2005b, 2005c; Tipnis, 2000; Donoghue, 2000). Ang-(1-7) is able to compete with AT1 (Rowe et al., 1995; OUDOT et al., 2005); in addition, some studies have shown that Ang-(1-7) binds to both AT1 and AT2 (Jaiswal et al., 1992; Jaiswal et al., 1993; Muthalif et al., 1998; Rowe et al., 1995; Tallant et al., 1997; Walters, 2005; Ohshima, 2014; Iusuf, 2008).

The hypertensive process in SHR rats could be dependent on Ang II effects since it was shown that AT1 expression is increased in renal cortex (Sullivan, 2010; Sullivan, 2007). ACE inhibition leads to increased circulating levels of Ang-(1-7), a fact that was implicated in an anti-hypertensive response (Iyer, 1998). Ang-(1-7) is predominantly found in renal cortex and medulla, and in proximal and distal tubules of SHR rats (Ferrario et al. 2002b). Interestingly, Ang-(1-7) displays cardiovascular and renal protector effects in SHR rats (Widdop et al 1999; Benter et al 2006; Igase, 2011).

Ang-(1-7) is also cardiovascular and renal protector in humans and this peptide is also present in distal and collecting tubules (Ferrario, 2002); ACE2 is highly expressed in proximal tubule, renal vascular, and glomerular epithelial cells (Battle, 2012; Li, 2005; Ye, 2006). ACE2 is distributed in renal tubules in a similar way as Ang-(1-7) (Chappell, 2004). Ang-(1-7) has been found in significant levels in the urine (Li, 2005; Chappell, 2001), and in plasma of Lewis rats treated with losartan (Ferrario et al. 2005b), which suggests that the kidneys are an important source for Ang-(1-7) synthesis. Ang-(1-7) is also found in the bloodstream, and in many tissues such as heart (Wilson, 2015; Santos, 2008; Iwai, 2009); in these organs Ang-(1-7) effects were shown to antagonize the vasoconstrictor and pro-proliferative actions of Ang II (Ferreira, 2005, Santos, 2013).

In the kidney Ang-(1-7) and Ang II display a dose-dependent effect in the proximal tubule by modulating Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3) (Banday, 2011; Castelo-Branco, 2013). The latter mediates most of NaCl , NaHCO_3 , and fluids reabsorption in renal proximal tubule. In this line, previous studies from our laboratory and other groups have shown that Ang-(1-7), Ang II, Arginine Vasopressin (AVP), and aldosterone act on NHE3 that is associated with increased intracellular calcium concentration (Oliveira-Souza, 2001; Oliveira-Souza, 2000; Pergher, 2009;

He, 2010; Castelo-Branco, 2013). Based on this, in this given study, our goal was to determine in SHR rats and their normotensive control Wistar Kyoto (WKY) Ang-(1-7, 10^{-9} or 10^{-6} M) effects when perfused alone or in the presence of A779, Losartan, and S3226 (specific Mas, AT1, and NHE3 antagonists, respectively) in renal proximal tubule *in vivo*, seeking to evaluate bicarbonate flow reabsorption (JHCO_3^-). We also evaluated in isolated superfused proximal tubules intracellular calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

METHODS

Animals:

Male WKY and SHR rats (20-24 weeks old weighing 280-370g) were obtained from the Department of Physiology and Biophysics, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo. This study was approved by the Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo – Ethical Committee for Animal Research. Animals received a pellet diet and water *ad libitum* until the time of the experiment. Systolic blood pressure (SBP) was measured by a non-invasive method of tail-cuff plethysmography when animals were 20-24 weeks old.

Bicarbonate flow reabsorption (JHCO_3^-) Measurement:

Animals were anesthetized with Tiletamine/Zolazepam (Zoletil[®]-Virbac[®]) and Xylazine at 50 and 5 mg/kg, respectively, via intramuscular, and were prepared for *in vivo* micropuncture, as previously described (Malnic, 1971). To start the experiment, animals were tracheostomized, the left jugular vein was cannulated, and then saline containing 3% mannitol at 0.05 ml/min were infused. The kidney was isolated using a lumbar approach, immobilized *in situ* using Ringer-agar in a Lucite cup under a microscope, and illuminated adequately.

Net JHCO_3^- was evaluated using stopped-flow microperfusion of *in vivo* S2 segments with intratubular pH continuous measurements as previously described (Malnic, 1971). The tubule was perfused using a double-barreled micropipette; one barrel was filled with Sudan black-colored castor oil, and the other with the luminal perfusion solution colored with 0.05 %

FD & C green. Intratubular pH was measured as the voltage difference between the two asymmetric barrels of the H^+ ion-sensitive microelectrode: the larger barrel contained a H^+ -sensitive ion-exchange resin (Fluka), and the smaller one contained 1M KCl colored by FD & C green (reference barrel). The transepithelial electrical potential difference (between the reference barrel and ground) was the main criterion for identifying the S2 segment (Gil, 1989). Intratubular pH changes were recorded continuously in the same tubule with a microcomputer equipped with an analog-to-digital conversion board (Lynx, São Paulo, Brazil) for data acquisition and processing.

$JHCO_3^-$ was measured by injecting a droplet of luminal perfusion solution between the oil columns, and following intratubular pH changes toward the steady-state level $[(pH)_s]$. Based on intratubular pH values measured along this curve and on systemic CO_2 pressure (PCO_2), intratubular concentrations of HCO_3^- were calculated at intervals of 1 s using the Henderson-Hasselbach equation. This calculation is possible because we have previously demonstrated that renal cortical PCO_2 is similar to the arterial blood (Mello-Aires, 1990). The rate of tubular acidification was expressed as the half-time ($t_{1/2}$) to reduce the infused HCO_3^- levels to stationary ones. Then, $JHCO_3^-$ was calculated from the following equation (Malnic, 1971): $JHCO_3^- = k [(HCO_3^-)_i - (HCO_3^-)_s] r/2$. Where k is the constant rate of luminal bicarbonate reduction, $[k = \ln 2 / (t_{1/2})]$; r is the tubule radius, and $(HCO_3^-)_i$ and $(HCO_3^-)_s$ are HCO_3^- concentrations at the infused and at the stationary level, respectively.

Before and after every tubular impalement on the kidney's surface, pH microelectrodes were calibrated by superfusion of 20 mM of phosphate Ringer buffer solutions containing 130 mM NaCl at 37°C. Solution pH levels were adjusted to 6.5, 7.0, and 7.5 with either 0.1 N NaOH or HCl. Luminal perfusion solution contained the following (in mM): 100 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 5 KCl, 1 $CaCl_2$ and 1.2 $MgSO_4$. The osmolality was adjusted to ~ 290 mOsmol/Kg H_2O with raffinose. $JHCO_3^-$ was evaluated in the presence of intratubular perfusion control solution alone or in the presence of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), A779 (10^{-6} M), Losartan (10^{-7} M), and/or S3226 (10^{-6} M). In each tubule, several measurements of $JHCO_3^-$ were performed but only one

intratubular perfusion solution was used. The measurements were performed within ~ 0.3 min of the start of the luminal perfusion.

Intracellular calcium concentration levels $[Ca^{2+}]_i$ measurement

The kidneys were removed from anesthetized male rats, and 2-mm thick slices were prepared. Then, proximal tubules were isolated by microdissection, and transferred to glass coverslips coated with poly-d-lysine (for tubule adhesion). Coverslips were mounted on a Leica DMI6000B (Leica Microsystem®) confocal microscope in a thermostatically regulated perfusion chamber. Changes on intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ were fluorometrically monitored using a calcium-sensitive probe FURA-2-AM (Molecular Probes®) (Oliveira-Souza, 2001). Proximal segments were infused for 15 min with FURA-2-AM (5 μ M) at 37°C, and rinsed in a solution containing the following (in mM): 137 NaCl, 12 NaHCO₃, 2.68 KCl, 1.36 CaCl₂, 0.49 MgCl₂, 0.36 Na₂HPO₄, 5.6 glucose, 5.0 HEPES, and at pH 7.4. FURA-2-AM intensity emitted at 510 nm was imaged using excitation lasers at 340 nm and 380 nm. The images were continuously acquired (at time intervals of 600 ms) before and after replacing experimental solutions. For each tubular calcium measurement, maximum fluorescence signals covering 10 areas of the same tubular segment were averaged, and then used to calculate the $[Ca^{2+}]_i$ of this segment. The fluorescence signal was transformed into $[Ca^{2+}]_i$ by calibrating maximal calcium signal (ionomycin at 5 μ M) followed by minimal calcium signal (EGTA at 2.5 mM), accordingly to Grynkiewicz equation (Grynkiewicz, 1985). All used chemicals were of analytic grade, and were obtained from Sigma Chemical Company. pH and PCO₂ in blood samples were measured using a Radiometer ABL 5 blood gas system.

Statistical Analysis

All data were analyzed by One-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. All data analyzed were carried in GraphPad software version 5. Statistical significance was set as *p<0.05.

RESULTS

The plasmatic and tissular (renal cortex and medulla) of Ang I, Ang II, and Ang-(1-7) were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in collaboration with Dr. Dra. Dulce Elena Casarini (Department of Nephrology, Federal University of São Paulo – UNESP). We have found no difference in Ang I, Ang II, and Ang-(1-7) between WKY and SHR rats (data not shown).

Ang-(1-7) effects on JHCO_3^-

No significant changes in intratubular stationary $(\text{pH})_s$ or $(\text{HCO}_3^-)_s$ were observed in any of the experimental groups, suggesting that the main driving force for H^+ secretion (i.e., the Na^+ gradient across the apical membrane) was not significantly altered.

Table 1 summarizes blood pressure mean levels in tails of WKY and SHR rats in different treatment conditions. The table 2 summarizes tubular acidification levels in different treatment scenarios. It is shown that JHCO_3^- mean value in control group is $2.40 \pm 0.10 \text{ nmol. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [120/28 (n° of measurements/n° of tubules)] in WKY rats. In figure 1 is represented that luminal perfusion of Ang-(1-7) at 10^{-9} M in the proximal tubule leads to a significant decrease of JHCO_3^- (28%) compared to the control group. The perfusion of Ang-(1-7) at 10^{-6} M increases JHCO_3^- (49%) in comparison to control; thus, our results show that Ang-(1-7) has a biphasic effect on JHCO_3^- in *in vivo* middle proximal tubules. Luminal perfusion of A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) decreased significantly JHCO_3^- . These data indicate that, in basal conditions, intratubular Ang-(1-7) and Ang II stimulate proximal JHCO_3^- . When A779 or losartan are added, the inhibitory effect on JHCO_3^- displayed by Ang-(1-7) at 10^{-9} M is increased. The addition of A779 or losartan completely abolished the stimulatory effect of Ang-(1-7) at 10^{-6} M . Based on this, our data indicate that the biphasic effect of Ang-(1-7) on JHCO_3^- takes place via Mas and AT1 receptors.

Figure 2 shows that luminal perfusion of S3226 (10^{-6} M) alone significantly decreased JHCO_3^- (48%) when compared to control. This result indicates the role of NHE3 on proximal HCO_3^- reabsorption in basal conditions. When S3226 is associated in the perfusion solution with Ang-(1-7) at 10^{-9} M no additional effect was seen in JHCO_3^- , which suggests that NHE3 is the

only H^+ transporter negatively regulated Ang-(1-7) at 10^{-9} M. Interestingly, when Ang-(1-7) at 10^{-6} M is combined to S3226 in the perfusion solution, the stimulatory effect of Ang-(1-7 at 10^{-6} M) on proximal $JHCO_3^-$ was completely abolished. These data, therefore, show that Ang-(1-7) stimulatory effect is also NHE3-dependent.

Figure 3 shows that $JHCO_3^-$ mean control value is 2.04 ± 0.13 nmol. cm^{-2} . s^{-1} [56/14 (n° of measurements/ n° of tubules)] in SHR rats. Low dose of Ang-(1-7; 10^{-9} M) in luminal perfused tubules increased significantly $JHCO_3^-$ (52%) in comparison to control, but at higher dose of Ang-(1-7; 10^{-6} M), $JHCO_3^-$ was decreased (38%) when compared to control value. Thus, our results show that Ang-(1-7) has a biphasic effect on $JHCO_3^-$ in *in vivo* middle proximal tubules of SHR rats. Luminal perfusion of A779 (10^{-6} M) and/or losartan (10^{-7} M) alone led to a significant decrease in $JHCO_3^-$. These data indicate that, in basal conditions, intratubular Ang-(1-7) and Ang II stimulates proximal $JHCO_3^-$. It is interesting to note that adding A779 or losartan, the stimulatory effect of Ang-(1-7) at 10^{-9} M was completely abolished; however, when A779 or losartan were added the inhibitory effect on $JHCO_3^-$ displayed by Ang-(1-7) at 10^{-6} M remained unaltered. Taken together, our data indicate that the biphasic effect of Ang-(1-7) on $JHCO_3^-$ occurs via MAS and AT1 receptors.

As shown in figure 4, S3226 (10^{-6} M) when added to luminal perfusion alone significantly decrease $JHCO_3^-$ (49 %) when compared to control, which suggests the role of NHE3 on proximal HCO_3^- reabsorption in basal conditions. The addition of S3226 completely abolished Ang-(1-7; 10^{-9} M) stimulatory effect, suggesting that NHE3 is the only H^+ transporter regulated by Ang-(1-7) in SHR rats. When NHE3 was inhibited in the presence of Ang-(1-7; 10^{-6} M), no additional inhibitory effects on proximal $JHCO_3^-$ displayed by Ang-(1-7; 10^{-6} M) alone was found. This, therefore, shows that this effect is also NHE3-dependent.

Ang-(1-7) effects on $[Ca^{2+}]_i$

Based on these data, our next step was to evaluate $[Ca^{2+}]_i$ in microdissected proximal tubule S3 segments since it is known that main effects displayed by Ang-(1-7) are mediated by calcium (Braga-Sobrinho, 2012; Leite-Dellova, 2011). Our findings show that $[Ca^{2+}]_i$ in proximal tubules in control is 99.73 ± 2.28 nM ($n=5$) and 94.34 ± 1.66 nM ($n=5$) in WKY and SHR, respectively (Table 3). Our data show that Ang-(1-7) at both higher and low dose leads to a dose-

dependent increase on $[Ca^{2+}]_i$, a fact that is inversely proportional to the hormonal concentrations. These results suggest that the stimulatory and inhibitory effect of Ang-(1-7) on $JHCO_3^-$ occur via Ca^{2+} signaling, and it is depend on the magnitude of $[Ca^{2+}]_i$ increase (Figure 5); moreover, the inhibition of Mas and AT1 receptor increased significantly (97%) $[Ca^{2+}]_i$ with respect to control. When A779 or losartan are added the effects of Ang-(1-7) – at higher and low dose – on $[Ca^{2+}]_i$ increase are abolished. Therefore, our data show that Ang-(1-7) stimulatory effects occur via MAS and AT1 receptor.

Interestingly, in SHR rats the superfusion of isolated proximal tubules with of Ang-(1-7) at 10^{-9} M led to an increased on $[Ca^{2+}]_i$. These results suggest that the stimulatory effect of Ang-(1-7) at low dose on NHE3 is due to a small increase of $[Ca^{2+}]_i$; at higher dose of Ang-(1-7) an inhibition of NHE3 was found as well as increased $[Ca^{2+}]_i$. When A779 or losartan were added with Ang-(1-7) at 10^{-9} M and 10^{-6} M, a inhibitory and no effect on $[Ca^{2+}]_i$ increase was found, respectively. This indicates that these stimulatory effects occur via the receptors MAS and AT1 (Figure 6)

DISCUSSION

Ang-(1-7) displays several effects in many tissues (Santos et al., 2005; Schindler et al., 2007; Trask and Ferrario, 2007). The Ang-(1-7)/ACE2/Mas axis has been more extensively studied in the kidney. The angiotensinergic peptides effects are mediated by membrane receptors, and Mas receptor is considered the main – but not the only – Ang-(1-7) functional receptor (Santos et al., 2003).

Several lines of evidence strongly support the local or tissular RAS in the kidney that contributes to renal function, and regulates blood pressure, sodium and water balance (Navar, 2011a, 2011b). The kidney proximal tubule is a segment that contains many – if not all – RAS elements that are capable of generating and responding to Ang II (Navar 2011) and Ang (1-7) (Chappell, 2004; Chappell, 2001). In this given study we have assessed Ang-(1-7) effects in NHE3, and $[Ca^{2+}]_i$ in the proximal tubule. Previously data from our laboratory have shown the effects of Ang-(1-7) on $JHCO_3^-$ and $[Ca^{2+}]_i$ in proximal tubule of Wistar rats (Castelo-Branco, 2013). In that study, Ang-(1-7) displays a biphasic effect on $JHCO_3^-$: at low (10^{-12} or 10^{-9} M), and

at higher doses (10^{-6} M), Ang-(1-7) displays inhibitory and stimulatory effects, respectively. Interestingly, the effects of Ang-(1-7) are mediated by NHE3. In the control group we have found endogenous Ang-(1-7) that inhibits NHE3 in physiological conditions; Ang-(1-7) also displays a dose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ increase: at low doses a large increase on $[Ca^{2+}]_i$ is found and at higher dose a smaller increase is found. Therefore, in Wistar rats Ang-(1-7) effects on NHE3 and $[Ca^{2+}]_i$ are mediated by Mas receptor (Castelo-Branco, 2013).

We show here that in WKY group losartan alone reduces $JHCO_3^-$, which indicates that in these animals intratubular Ang II – through AT1 receptor – stimulates NHE3. This finding corroborates several studies that have shown the stimulatory role of Ang II on NHE3 via AT1 receptor (Baum, 1997; Schuster, 1984; Pontes, 2015); furthermore, when Mas receptor is inhibited, a decrease on $JHCO_3^-$ takes place, which is suggestive that intratubular Ang-(1-7) stimulates NHE3 via Mas receptor. The inhibitory effect on $JHCO_3^-$ of each drug alone continues when both losartan and A779 are in association. Since higher and lower doses of Ang-(1-7; 10^{-9} M and 10^{-6} M, respectively) inhibit and stimulate, respectively, $JHCO_3^-$ in the control group, our data show a biphasic effect of Ang-(1-7) on NHE3. These findings corroborate our previous study in Wistar rats (Castle-Branco et al., 2013). Interestingly, our data show that NHE3 inhibition by Ang-(1-7) also occurs via AT1 receptor. This effect of Ang-(1-7) on AT1 receptor has been previously demonstrated (Rowe et al, 1995; Gironacci et al 1999; Walters, 2005; Ohshima, 2014). Therefore, we provide evidence that in S2 segment of proximal tubule of WKY animals, Ang-(1-7; 10^{-9} M and 10^{-6} M) displays a biphasic effect on NHE3, and AT1 and Mas receptor.

In SHR rats losartan alone inhibits $JHCO_3^-$ that likely indicates that intratubular Ang II stimulates $JHCO_3^-$ and/or stimulates NHE3 in control group; thus, our data show that Ang II displays deleterious effects by increasing fluid reabsorption in proximal tubule of SHR rats as it has been shown previously (Turban, 2006; Pedrosa, 2008). Moreover, when Mas receptor is inhibited, an inhibition of $JHCO_3^-$ takes places. This is suggestive that endogenous Ang-(1-7) stimulates NHE3 via Mas receptor. It is interesting to note that in SHR Ang-(1-7) has an opposite biphasic effect on NHE3 when compared to WKY rats: lower and higher dose Ang-(1-7; 10^{-9} M and 10^{-6} M, respectively) stimulates and inhibits, respectively, $JHCO_3^-$ in the control group; however, Ang-(1-7, 10^{-9} M) in the presence of A779 does not alter $JHCO_3^-$ while Ang-(1-7, 10^{-6} M) in the presence of Mas antagonist abolishes the stimulatory effect displayed by this hormone.

The inhibitory effect on JHCO_3^- of each drug alone continues when both losartan and A779 are in association. Therefore, these findings are suggestive that in SHR rats Ang-(1-7) via Mas receptor displays a stimulatory effect on NHE3, which mitigates the deleterious effects of Ang II. The opposite effects of Ang-(1-7) over Ang II suggest that part of the anti-hypertensive effects and protective actions of Ang-(1-7) are due to Mas receptor activation (Ferreira, 2005; Chappell, 2007; Sampaio, 2007).

It is known that in WKY rats Ang-(1-7) displays a biphasic effect on NHE3, which is similar to what have been described for normotensive Wistar rats: Ang-(1-7) at lower dose (10^{-12} M) inhibits and at higher dose (10^{-6} M) stimulates NHE3 (Castelo-Branco et al., 2013). Interestingly, in SHR rats our data show an opposite scenario when compared to WKY animals. In SHR rats Ang-(1-7) displays similar effects to Ang II in Wistar normotensive rats: at low and higher dose of Ang-(1-7) (10^{-12} and 10^{-6} M, respectively) NHE3 is inhibited and stimulated, respectively (Coppola; Frömter, 1994; Geibel; Giebisch; Boron, 1990; Houillier et al, 1996; Mello-Aires, Oliveira-Souza, 2000; Muza-Aziz, Oliveira-Souza, Mello-Aires, 2005; Eguti et al., 2010). Interestingly, in normotensive Wistar rats, Ang-(1-7) displays biphasic effects on NHE3 (Castle-Branco et al., 2013) as it has been described for Aldosterone (Leite-Dellova et al. 2008) or AVP (Oliveira-Souza et al., 2001). For both aldosterone and AVP the biphasic action is similar to Ang II. Together, our findings corroborates the current literature data that shows the following: 1) Ang-(1-7) is found at high concentration in several tubular segments of the nephron; 2) Ang-(1-7) is excreted in urine at higher concentrations than Ang II; 3) ACE2 is found on the luminal surface of tubular epithelium; and 4) Mas receptor is expressed in renal proximal tubule cells (Alenina et al, 2008; Brosnihan et al. 2003; Ferrario; Varagic, 2010; Su; Zimpelmann; Burns 2006; Tipnis et al, 2000).

It is widely accepted that Ang II at low doses stimulates NHE3 via AT1 receptor. This effect is through phospholipase C (PLC) and inositol triphosphate (IP3) that leads to a small increase on cytosolic calcium, and protein kinase C (PKC) activation via calcium-calmodulin pathway. The consequence of these effects leads to NHE3 stimulation; on the other hand, higher dose of Ang II through AT1 receptor leads to phospholipase A2 (PLA2) activation that stimulates arachidonic acid cleavage with subsequent large increase on cytosolic calcium via binding calcium-calmodulin. This pathways leads to NHE3 inhibition (Mello-Aires et al., 2000; Muza-Aziz et al, 2005 and Eguti et al, 2010).

Consistent with our findings, in normotensive Wistar rats, Ang-(1-7) at physiological dose binds to Mas receptor that promotes arachidonic acid release; thus, Ang-(1-7) leads to cytosolic calcium increase via calcium-calmodulin that ultimately inhibits NHE3 (Castelo-Branco, 2013). Therefore, our results are consistent with the following: 1) the current understanding that both Ang-(1-7) and Ang II display opposite effects on several cardiovascular mechanisms (Ferreira, 2005; Chappell, 2007; Santos, 2014), and 2) it is widely accepted that at physiological doses Ang-(1-7) display a vasodilator effect whereas Ang II displays an opposite one (Iusuf, 2008).

Thus far, there have been few studies describing the effects of Ang-(1-7) in increasing $[Ca^{2+}]_i$. In astrocytes, from the rostral ventrolateral medulla, Ang-(1-7) increases $[Ca^{2+}]_i$ due to calcium release from the intracellular calcium storage (Guo, 2010). Another study has shown that Ang-(1-7) also increases $[Ca^{2+}]_i$ in canine renal tubular cells (MDCK). This effect was through AT1 receptor activation with subsequent calcium release from the endoplasmic reticulum, being dependent on PLC and PLA2 calcium-dependent increase (Chung-Pin, 2012). Based on what was mentioned above, we sought to evaluate $[Ca^{2+}]_i$ in response to Ang-(1-7) and Ang II in the presence of losartan and/or A779.

In WKY and SHR rats when Mas or AT1 receptor are inhibited or when Ang-(1-7) is present (with Mas and AT1 receptor inhibited), no alteration on $[Ca^{2+}]_i$ was found. These findings are in agreement with the literature where Ang-(1-7) effects are through AT1 and Mas receptor (Chansel et al., 2001; Carraro-Lacroix; Malnic, 2006; Chung-Pin et al, 2012; Liu, 2012); however, we are the first to identify, to the best of our knowledge, that when both AT1 and Mas receptors are simultaneously inhibited, a large increase on $[Ca^{2+}]_i$ is found. The physiological relevance of these findings is still unknown and required further investigation.

Moreover, our data show that in WKY rats Ang-(1-7) displays a biphasic effect on NHE3, which is through AT1 and Mas receptor. At low dose of Ang-(1-7, 10^{-9} M) NHE3 is inhibited due to a stimulatory effect on $[Ca^{2+}]_i$; on the other hand, at higher dose of Ang-(1-7, 10^{-6} M), the stimulatory effect on NHE3 is due to a smaller increase on $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, A779 or losartan alters the stimulatory role of Ang-(1-7), at high dose (10^{-6} M), on NHE3 to an inhibitory one as well as these antagonists abolish the stimulatory effect on $[Ca^{2+}]_i$ (Guo et al., 2010; Chung-Pin et al, 2012). In fact, these effects are similar to Ang-(1-7) in Wistar rats (Castelo-Branco et al., 2013). On the other hand, in SHR rats A779 or losartan abolishes the stimulatory effect of Ang-(1-7; 10^{-9} M) on NHE3 and $[Ca^{2+}]_i$; moreover, A779 or losartan does not modify the inhibitory

effect of Ang-(1-7; 10^{-6} M) on NHE3 but we have found a decreasing tendency on $[Ca^{2+}]_i$ (Guo et al, 2010;. Chung-Pin et al., 2012).

Regarding the protein structure of Na^+/H^+ transporter family, it is known that these proteins share a cytoplasmic C-terminal domain, which regulates Na^+/H^+ activity. This domain has two calcium/calmodulin binding sites that modulate Na^+/H^+ activity Na^+/H^+ : the higher calcium affinity binding site constantly inhibits the exchanger, and another site that has low affinity for calcium that stimulates this protein (Wakabayashi et al., 1994; Singh et al., 2014). Whenever a small increase on $[Ca^{2+}]_i$ takes place, the higher calcium affinity site binds to calcium/calmodulin, and then, the inhibition of the exchanger is suppressed, i.e, the Na^+/H^+ is stimulated; however, when a large increase on $[Ca^{2+}]_i$ takes place, the low calcium affinity site binds to calcium/calmodulin, and thus, the exchanger is inhibited (Wakabayashi et al., 1994; Singh et al., 2014).

Based on this, in our data we have found that in WKY rats Ang-(1-7) at low dose (10^{-9} M) leads to a large increase on $[Ca^{2+}]_i$ and inhibits NHE3 while at higher dose (10^{-6} M) leads to a small increase on $[Ca^{2+}]_i$ that stimulates NHE3. Interestingly, in SHR rats Ang-(1-7) at low dose (10^{-9} M) increases $[Ca^{2+}]_i$ that stimulates NHE3 while at higher dose (10^{-6} M) slightly increases $[Ca^{2+}]_i$, and thus, NHE3 is inhibited.

Taken together, the interaction of the opposite dose-dependent effects of Ang-(1-7) and Ang II on the renal proximal Na^+/H^+ exchanger and $[Ca^{2+}]_i$ levels may represent an important physiological regulatory mechanism on extracellular and intracellular volume and/or pH changes. Nevertheless, it is a complex mechanism and additional factors need to be investigated.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Dr. Karina Thieme and Dr. Thaissa Dantas Pessoa due to their assistance in this study.

Sources of Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) and National Council for Scientific and Technological (CNPq).

Disclosure

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

References

- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M.** Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol* 93: 528-537, 2008.
- Banday AA, Lokhandwala MF.** Angiotensin II-mediated biphasic regulation of proximal tubular Na⁺/H⁺ exchanger 3 is impaired during oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 301(2): F364-70, 2011.
- Battle D, Wysocki J, Soler MJ, Ranganath K.** Angiotensin-converting enzyme 2: enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 81(6): 520-8, 2012.
- Baum M, Quigley R, Quan A.** Effect of luminal angiotensin II on rabbit proximal convoluted tubule bicarbonate absorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F595-F600, 1997.
- Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI.** Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(2): H684-91, 2006.
- Braga-Sobrinho C, Leite-Dellova DC, Mello-Aires M.** Action of ANP on the nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on NHE1 in proximal S3 segment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 128: 89-97, 2012.

Brosnihan KB, Neves LA, Joyner J, Averill DB, Chappell MC, Sarao R, Penninger J, Ferrario CM. Enhanced renal immunocytochemical expression of ANG-(1-7) and ACE2 during pregnancy. *Hypertension* 42(4): 749-53, 2003.

Carraro-Lacroix LR, Malnic G. Signaling pathways involved with the stimulatory effect of angiotensin II on vacuolar H⁺-ATPase in proximal tubule cells. *Pflugers Arch* 452: 728-36, 2006.

Castelo-Branco RC, Leite-Dellova DC, Mello-Aires MD. Dose-dependent effects of Angiotensin-(1-7) on the NHE3 exchanger and [Ca²⁺]_i in in vivo proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1258-F1265, 2013.

Chansel D, Vandermeersch S, Oko A, Curat C, Ardaillou R. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 414: 165-75, 2001.

Chappell MC, Gregory Modralt J, Diz DI, Ferrario CM. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contributions to Nephrology* 143: 77-89, 2004.

Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol* 2(4): 2733-52, 2012.

Chappell MC. Emerging evidence for a functional Angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis: more than regulation of blood pressure. *Hypertension* 50: 596-599, 2007.

Chappell MC, Allred AJ, Ferrario CM. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 16: 22-6, 2001.

Chung-Pin L, Chiang-Ting C, Chao-Chuan C, Ko-Long L, He-Hsiung C, Yi-Chau L, Jin-Shiung C, Chun-Chi K, Wei-Zhe L, I-Fei H, Chung-Ren J. Mechanism of [Ca²⁺]_i rise induced by angiotensin 1-7 in MDCK renal tubular cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 32(6): 335-41, 2012.

Coppola S, Frömter E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO₃ cotransport and K⁺ conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. *Pflügers Arch* 427: 151-6, 1994.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-

related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87(5): E1-9, 2000.

Eguti DMN, Thieme K, Leung G, Mello-Aires M, Oliveira-Souza M. Regulation of Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1) by calmodulin-binding sites: role of angiotensin II. *Cell Physiol Biochem* 26: 541-552, 2010.

Ferrario CM, Averill DB, Brosnihan KB, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 62: 1349–1357, 2002b.

Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 68: 2189-2196, 2005b.

Ferrario CM, Smith RD, Brosnihan B, Chappell MC, Campese VM, Vesterqvist O, Liao WC, Ruddy MC, Grim CE. Effects of omapatrilat on the rennin angiotensin system in salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens* 15: 557-564, 2002.

Ferrario CM, Trask AJ, Jessup J. A. 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* 289(6): H2281-90, 2005c.

Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1-7)/ACE2/Mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(6): F1297-F1305, 2010.

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

Geibel J, Giebisch G, Boron WF. Angiotensin II stimulates both $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci* 87: 7917-7920, 1990.

Gil FZ, Malnic G. Effects of Amphotericin B on renal tubular acidification in the rat. *Pflügers Arch* 413: 280-286, 1989.

Gironacci MM, Coba MP, Peña C. Angiotensin-(1-7) binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. *Regul Pept.* 84: 51-4, 1999.

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

- Guo F, Liu B, Tang F, Lane S, Souslova EA, Chudakov DM, Paton JF, Kasparov S.** Astroglia are a possible cellular substrate of angiotensin (1-7) effects in the rostral ventrolateral medulla. *Cardiovasc Res*. 87: 578-584, 2010.
- He P, Klein J, Yun CC.** Activation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3 (IRBIT) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 285(36): 27869-78, 2010.
- Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M.** Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na⁺/H⁺ antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int* 50: 1496-1505, 1996.
- Igase M, Yokoyama H, Ferrario CM.** Attenuation of hypertension-mediated glomerulosclerosis in conjunction with increased angiotensin (1-7). *Ther Adv Cardiovasc Dis* 5: 297–304, 2011.
- Iusuf D, Henning RH, Van Gilst WH, Roks AJ.** Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 585: 303-312, 2008.
- Iwai M, Horiuchi M.** Devil and angel in the renin angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1–7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research* 32(7): 533-536, 2009.
- Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM.** Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension* 31(2): 699-705, 1998.
- Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC.** Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 31: 356-61, 1998.
- Kamo T, Akazawa H, Komuro I.** Pleiotropic Effects of Angiotensin II Receptor Signaling in Cardiovascular Homeostasis and Aging. *Int Heart J* 56(3): 249-54, 2015.
- Leite-Dellova DCA, Oliveira-Souza M, Malnic G, Mello-Aires M.** Genomic and nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295: F1342-F1352, 2008.
- Leite-Dellova DCA, Malnic G, Mello-Aires M.** Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H⁺-ATPase in proximal S3 segments. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(3): F682-91, 2011.

- Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD.** The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288(2): F353-62, 2005.
- Liu CP, Chou CT, Chi CC, Lin KL, Cheng HH, Lu YC, Cheng JS, Kuo CC, Liang WZ, Huang IF, Jan CR.** Mechanism of $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by angiotensin 1-7 in MDCK renal tubular cells. *J Recept Signal Transduct Res* 32: 335-41, 2012.
- Malnic G, Mello-Aires M.** Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 220: 1759-1767, 1971.
- Mello-Aires M, Lopes MJ, Malnic G.** PCO_2 in renal cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 259: F357-F365, 1990.
- Mello-Aires M, Oliveira-Souza M.** Interaction of Angiotensin II and Atrial Natriuretic Peptide on pH_i regulation in MDCK cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 279: F944-F953, 2000.
- Musa-Aziz R, Oliveira-Souza M, Mello-Aires M.** Signalling pathways in the biphasic effect of ANGII on Na^+/H^+ exchanger in epithelial colon cells. *J Membr Biol* 205: 49–60, 2005.
- Navar LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA.** Intratubular renin- angiotensin system in hypertension. *Hypertension* 57: 355-362, 2011.
- Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H.** Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 11: 180-186, 2011b.
- Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, Iwanami J, Min LJ, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Bai HY, Wang XL, Ogimoto A, Higaki J, Horiuchi M.** Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension* 63(3): e53-9, 2014.
- Oliveira-Souza M, Mello-Aires M.** Effect of Arginine Vasopressin and ANP on pH_i and $[Ca^{2+}]_i$ regulation in MDCK cells. *Kidney Int*. 60: 1800-1808, 2001.
- Oliveira-Souza M, Mello-Aires M.** Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pH_i regulation in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F944-F953, 2000.
- Pedrosa R, Villar VA, Pascua AM, Simão S, Hopfer U, Jose PA, Soares-da-Silva P.** H_2O_2 Stimulation of the Cl^-/HCO_3^- Exchanger by Angiotensin II and Angiotensin II Type 1 Receptor Distribution in Membrane Microdomains. *Hypertension* 51(5): 1332-8, 2008.

- Pergher PS, Leite-Dellova D, de Mello-Aires M.** Direct action of aldosterone on bicarbonate reabsorption in in vivo cortical proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 296(5): F1185-93, 2009.
- Pontes R B, Crajoinas R O, Nishi E E, Oliveira-Sales E B, Girardi A C, Campos R R, Bergamaschi C T.** Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 308(8): F848-56, 2015.
- Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K.** Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 480-3, 2000
- Rowe BP, Saylor DL, Speth RC, Absher DR.** Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul Pept* 56: 139-46, 1995.
- Saavedra JM, Sánchez-Lemus E, Benicky J.** Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology* 36(1): 1-18, 2011.
- Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM.** Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 50: 1093-1098, 2007.
- Santos RA.** Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 63: 1138-47, 2014.
- Santos, RA.** The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med* 14: 28-35, 2008.
- Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M.** Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol* 216(2): R1-R17, 2013.
- Santos RA, Frezard F, Ferreira AJ.** Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 3: 383-391, 2005.
- Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM.** Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc. Health Risk Manag* 3: 125-137, 2007.
- Schuster VL, Kokko JP, Jacobson HR.** Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest* 73: 507-515, 1984.

Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides* 28(3): 702-7, 2007.

Singh V, Lin R, Yang J, Cha B, Sarker R, Tse CM, Donowitz M. AKT and GSK-3 are necessary for direct ezrin binding to NHE3 as part of a C-terminal stimulatory complex: role of a novel Ser-rich NHE3 C-terminal motif in NHE3 activity and trafficking. *J Biol Chem* 289(9): 5449-5461, 2014.

Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int* 69(12): 2212-8, 2006.

Sullivan JC, Bhatia K, Yamamoto T, Elmarakby AA. Angiotensin (1-7) receptor antagonism equalizes angiotensin II-induced hypertension in male and female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 56: 658-666, 2010.

Sullivan JC, Semprun-Prieto L, Boesen EI, Pollock DM, Pollock JS. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1573-R1579, 2007.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275(43): 33238-43, 2000.

Trask AJ, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardiovasc. Drug Rev* 25: 162-174, 2007.

Turban S, Beutler KT, Morris RG, Masilamani S, Fenton RA, Knepper MA, Packer RK. Long-term regulation of proximal tubule acid-base transporter abundance by angiotensin II. *Kidney Int* 70(4): 660-8, 2006.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277(17): 14838-43, 2002.

Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Poysegur J, Shiekawa M. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation defective. *J Biol Chem* 269: 13710-13715, 1994.

Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* 45: 960-6, 2005.

Widdop RE, Sampey DB, Jarrott B. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34: 964-8, 1999.

Wilson BA, Cruz-Diaz N, Marshall AC, Pirro NT, Su Y, Gwathmey TM, Rose JC, Chappell MC. Na angiotensin-(1-7) peptidase in the kidney cortex, proximal tubules, and human HK-2 epithelial cells that is distinct from insulin-degrading enzyme. *Am J Physiol Renal Physiol* 308(6): F594-601, 2015.

Wolf W. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant* 9: 48-51, 2002.

World Health Organization. A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis. 2013. http://ish-world.com/downloads/pdf/global_brief_hypertension.pdf. <http://www.who.int/en/> Accessed May 13, 2016.

Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(4): R804-17, 2011.

Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D. Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol* 17: 3067-3075, 2006.

Figure Legends

Figure 1. Direct effect of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption of WKY animals proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/ number of tubules. *p < 0.01 vs. control. [#]p < 0.01 vs. Losartan 10^{-7} M, [@]p < 0.01 vs. A779 10^{-6} M, ^{\$}p < 0.01 vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, [&]p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, ⁺p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

Figure 2. Direct effect of Ang-(1-7), and/or S3226 (10^{-6} M) tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in WKY rat proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$

SEM. N = number of microperfusions/ number of tubules. *p < 0.01 vs. control. ⁺p < 0.01 vs. Ang-(1-7) (10^{-6} M).

Figure 3. Direct effect of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in SHR rats proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM N = number of microperfusions/ number of tubules. *p < 0.01 vs. control. [#]p < 0.01 vs. Losartan 10^{-7} M, [@]p < 0.01 vs. A779 10^{-6} M, ^{\$}p < 0.01 vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, [&]p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, ⁺p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

Figure 4. Direct effect of Ang-(1-7), and/or S3226 (10^{-6} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in SHR rats proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/number of tubules. *p < 0.01 vs. control. [&]p < 0.01 vs. Ang-(1-7) (10^{-9} M).

Figure 5. Effects of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in maximum cytosolic calcium concentration of isolated proximal tubules from WKY rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of tubules (each tubule corresponds to an average of 10 areas). *p < 0.01 vs. control. [#]p < 0.01 vs. Ang-(1-7) alone in the respective dose.

Figure 6. Effects of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in maximum cytosolic calcium concentration of isolated proximal tubules from SHR rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of tubules (each tubule corresponds to an average of 10 areas). *p < 0.01 vs. control. [#]p < 0.01 vs. Ang-(1-7) alone in the respective dose.

Table

Table 1 - Blood pressure levels in tails of WKY and SHR rats in different treatment conditions.

Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of rats.

	WKY (N)	SHR (N)
Control	141,9 $\pm$ 3,1 (7)	171,9 $\pm$ 2,3 (4)
A779 10⁻⁶ M	146,5 $\pm$ 4,8 (5)	175,3 $\pm$ 3,0 (3)
Losartan 10⁻⁷ M	134,4 $\pm$ 1,8 (3)	172,9 $\pm$ 8,4 (3)
A779 10⁻⁶ M + Losartan 10⁻⁷ M	134,8 $\pm$ 2,6 (4)	178,0 $\pm$ 2,9 (4)
S3226 10⁻⁶ M	135,6 $\pm$ 4,4 (3)	179,5 $\pm$ 3,1 (3)
Ang-(1-7) 10⁻⁹ M	133,8 $\pm$ 4,6 (4)	174,4 $\pm$ 5,8 (5)
Ang-(1-7) 10⁻⁶ M	134,2 $\pm$ 3,1 (4)	173,8 $\pm$ 5,3 (5)
Ang-(1-7) 10⁻⁹ M + A779 10⁻⁶ M	146,2 $\pm$ 5,2 (4)	174,0 $\pm$ 2,7 (4)
Ang-(1-7) 10⁻⁶ M + A779 10⁻⁶ M	141,4 $\pm$ 2,2 (4)	172,6 $\pm$ 4,1 (5)
Ang-(1-7) 10⁻⁹ M + Losartan 10⁻⁷ M	147,7 $\pm$ 5,3 (3)	173,0 $\pm$ 9,4 (3)
Ang-(1-7) 10⁻⁶ M + Losartan 10⁻⁷ M	131,6 $\pm$ 1,6 (6)	172,7 $\pm$ 3,6 (4)
Ang-(1-7) 10⁻⁹ M + S3226 10⁻⁶ M	135,5 $\pm$ 5,3 (3)	175,3 $\pm$ 1,6 (4)
Ang-(1-7) 10⁻⁶ M + S3226 10⁻⁶ M	137,8 $\pm$ 2,5 (4)	182,1 $\pm$ 2,8 (3)

Table 2 - Luminal perfusion of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or Losartan (10^{-7} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or S3226 (10^{-6} M) on acidification parameters in proximal convoluted tubule (segment S2) of WKY and SHR rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/number of tubules. *p < 0.01 vs. control. #p < 0.01 vs. Losartan 10^{-7} M, @p < 0,01 vs. A779 10^{-6} M, \$p < 0.01 vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, &p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, +p < 0.01 vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

	WKY		SHR	
	t/2 s	JHCO3 (nmol/cm ² .s ¹)	t/2 s	JHCO3 (nmol/cm ² .s ¹)
Control	3,78 $\pm$ 0,19 (120/28)	2,40 $\pm$ 0,10 (120/28)	4,24 $\pm$ 0,21 (56/14)	2,04 $\pm$ 0,13 (56/14)
A779 10^{-6} M	5,49 $\pm$ 0,33 (87/13)	1,63 $\pm$ 0,11* (87/13)	9,28 $\pm$ 1,54 (37/11)	1,23 $\pm$ 0,17* (37/11)
Losartan 10^{-7} M	6,70 $\pm$ 0,38* (37/11)	1,49 $\pm$ 0,07* (37/11)	7,25 $\pm$ 0,93 (42/10)	0,91 $\pm$ 0,12* (42/10)
A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	5,50 $\pm$ 0,27 (73/15)	1,48 $\pm$ 0,15* (73/15)	12,76 $\pm$ 2,25* (43/11)	0,91 $\pm$ 0,13* (43/11)
S3226 10^{-6} M	8,08 $\pm$ 0,92 (92/14)	1,26 $\pm$ 0,12* (92/14)	9,44 $\pm$ 0,67* (40/11)	1,05 $\pm$ 0,06* (40/11)
Ang-(1-7) 10^{-9} M	5,48 $\pm$ 0,38 (66/14)	1,72 $\pm$ 0,08* (66/14)	3,24 $\pm$ 0,29@ ^{\$} (60/13)	3,11 $\pm$ 0,31* ^{@#} (60/13)
Ang-(1-7) 10^{-6} M	2,62 $\pm$ 0,13 ^{@#} (92/18)	3,58 $\pm$ 0,21* ^{@#} (92/18)	8,90 $\pm$ 1,48 (70/13)	1,27 $\pm$ 0,12* (70/13)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + A779 10^{-6} M	7,56 $\pm$ 0,72* (96/17)	1,11 $\pm$ 0,11* (96/17)	8,01 $\pm$ 0,68 (75/15)	1,19 $\pm$ 0,10* ^{&} (75/15)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + A779 10^{-6} M	5,72 $\pm$ 0,48 ⁺ (78/15)	1,52 $\pm$ 0,10* ⁺ (78/15)	6,73 $\pm$ 0,62 (49/17)	1,16 $\pm$ 0,12* (49/17)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + Losartan 10^{-7} M	9,57 $\pm$ 1,28* ^{&} (51/15)	0,97 $\pm$ 0,12* (51/15)	6,13 $\pm$ 0,86 (38/10)	1,62 $\pm$ 0,17* ^{&} (38/10)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	4,54 $\pm$ 0,26 (93/22)	2,05 $\pm$ 0,12 ⁺ (93/22)	7,32 $\pm$ 1,01 (67/13)	1,53 $\pm$ 0,15 (67/13)
Ang-(1-7) 10^{-9} M + S3226 10^{-6} M	8,00 $\pm$ 0,58* (50/11)	1,32 $\pm$ 0,10* (50/11)	8,29 $\pm$ 0,59* ^{&} (58/18)	1,02 $\pm$ 0,14* ^{&} (58/18)
Ang-(1-7) 10^{-6} M + S3226 10^{-6} M	8,25 $\pm$ 0,59* (66/18)	1,13 $\pm$ 0,11* ⁺ (66/18)	8,52 $\pm$ 0,62* (67/14)	1,07 $\pm$ 0,12* (67/14)

Table 3 - Ang-(1-7) effects, and/or A779, and/or Losartan on $[Ca^{2+}]_i$ after 1 minute incubation in isolated S3 segments of proximal tubular of WKY and SHR rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of tubule (each tubule corresponds to an average of 10 areas analyzed). *p < 0,001 vs. control, #p < 0,01 vs. respective to Ang-(1-7).

	WKY		SHR	
	$[Ca^{2+}]_i$ nM	N	$[Ca^{2+}]_i$ nM	N
Control	99,7 $\pm$ 2,28	5	94,3 $\pm$ 1,66	5
A779 10^{-6} M	102,0 $\pm$ 2,66	5	75,5 $\pm$ 9,36	5
Losartan 10^{-7} M	103,1 $\pm$ 2,74	5	99,6 $\pm$ 3,05	5
A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	196,6 $\pm$ 26,4 *	5	277,9 $\pm$ 7,79 *	5
S3226 10^{-6} M	101,2 $\pm$ 6,53	5	121,1 $\pm$ 13,8	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M	200,5 $\pm$ 25,1 *	5	143,4 $\pm$ 7,65 *	6
Ang-(1-7) 10^{-6} M	163,6 $\pm$ 6,45 *	5	173,9 $\pm$ 13,4 *	6
Ang-(1-7) 10^{-9} M + A779 10^{-6} M	96,5 $\pm$ 7,15 #	5	82,5 $\pm$ 11,6 #	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + A779 10^{-6} M	97,9 $\pm$ 6,61 #	5	106,1 $\pm$ 11,5 #	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M + Losartan 10^{-7} M	103,5 $\pm$ 4,93 #	5	83,31 $\pm$ 8,33 #	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M	127,1 $\pm$ 1,91	5	126,0 $\pm$ 9,00 #	5
Ang-(1-7) 10^{-9} M + S3226 10^{-6} M	159,7 $\pm$ 11,6 *	5	119,9 $\pm$ 2,70	5
Ang-(1-7) 10^{-6} M + S3226 10^{-6} M	125,1 $\pm$ 8,45 #	5	155,3 $\pm$ 12,2 *	5
Ang II 10^{-12} M	131,5 $\pm$ 8,05	5	131,0 $\pm$ 5,32	5
Ang II 10^{-9} M	126,6 $\pm$ 6,49	5	153,8 $\pm$ 3,74 *	5
Ang II 10^{-6} M	203,4 $\pm$ 13,0 *	5	191,8 $\pm$ 9,04 *	5

Figure legends

Figure 1. Direct effect of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption of WKY animals proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/ number of tubules. * $p < 0.01$ vs. control. # $p < 0.01$ vs. Losartan 10^{-7} M, @ $p < 0.01$ vs. A779 10^{-6} M, \$ $p < 0.01$ vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, & $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, + $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

Figure 2. Direct effect of Ang-(1-7), and/or S3226 (10^{-6} M) tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in WKY rat proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/ number of tubules. *p < 0.01 vs. control. ⁺p < 0.01 vs. Ang-(1-7) (10^{-6} M).

Figure 3. Direct effect of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in SHR rats proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM N = number of microperfusions/ number of tubules. * $p < 0.01$ vs. control. # $p < 0.01$ vs. Losartan 10^{-7} M, @ $p < 0.01$ vs. A779 10^{-6} M, \$ $p < 0.01$ vs. A779 10^{-6} M + Losartan 10^{-7} M, & $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) 10^{-9} M, + $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) 10^{-6} M.

Figure 4. Direct effect of Ang-(1-7), and/or S3226 (10^{-6} M) in tubular luminal microperfusion on net bicarbonate reabsorption in SHR rats proximal S2 segments. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of microperfusions/number of tubules. * $p < 0.01$ vs. control. & $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) (10^{-9} M).

Figure 5. Effects of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in maximum cytosolic calcium concentration of isolated proximal tubules from WKY rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of tubules (each tubule corresponds to an average of 10 areas). * $p < 0.01$ vs. control. # $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) alone in the respective dose.

Figure 6. Effects of Ang-(1-7) (10^{-9} or 10^{-6} M), and/or A779 (10^{-6} M), and/or losartan (10^{-7} M) in maximum cytosolic calcium concentration of isolated proximal tubules from SHR rats. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. N = number of tubules (each tubule corresponds to an average of 10 areas). * $p < 0.01$ vs. control. # $p < 0.01$ vs. Ang-(1-7) alone in the respective dose.