REGIANE CARDOSO CASTELO BRANCO

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NO FLUXO REABSORTIVO DE
BICARBONATO (JHCO_3^-) E NA CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE CÁLCIO
($[\text{Ca}^{2+}]_i$): ESTUDO POR MICROPERFUSÃO TUBULAR PROXIMAL, *IN VIVO*.**

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

São Paulo
2012

REGIANE CARDOSO CASTELO BRANCO

Efeito da angiotensina-(1-7) no fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$): estudo por microperfusão tubular proximal, *in vivo*.

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarida de Mello Aires

Versão Corrigida: A versão original encontra-se arquivada no setor de comunicação do ICB.

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Castelo Branco, Regiane Cardoso.

Efeito da angiotensina-(1-7) no fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$): estudo por microperfusão tubular proximal, *in vivo* / Regiane Cardoso Castelo Branco. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Margarida de Mello Aires.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação hormonal do pH intracelular.

Versão do título para o inglês: Effect of angiotensin-(1-7) on the net reabsortive flow of bicarbonate and on calcium cytosolic concentration: study by *in vivo* proximal tubular microperfusion.

1. Angiotensinas 2. Equilíbrio ácido-base 3. Hormônios do sistema renal 4. Túbulos renais proximais 5. Fisiologia I. Aires, Profª Drª. Margarida de Mello II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB035/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Regiane Cardoso Castelo Branco.

Título da Dissertação: Efeito da angiotensina-(1-7) no fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$): estudo por microperfusão tubular proximal, *in vivo*.

Orientador(a): Prof^a Dr^a. Margarida de Mello Aires.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

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. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **017** nas fls. **83** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Margarida de Melo Aires, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito da angiotensina-(1-7) no trocador Na⁺/H⁺ (isoforma NHE3) no túbulo proximal cortical, in vivo** do qual participou(aram) o(s) alunos **Regiane Cardoso Castelo Branco**, 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 **30.03.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 31 de março de 2010.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

“Pois tu, Senhor, abençoa o justo e, como escudo, o
cercas da tua benevolência.” Salmos, 5:12

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha vida primeiramente a Deus, sem Ele nada seria.

Muito obrigada aos meus pais Olcir Castelo Branco e Maria Vaneide Cardoso, que estiveram ao meu lado, sempre me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Sou grata a vocês pelo ensino e apoio diário que fizeram de mim a profissional e a mulher que sou hoje.

A minha irmã Izane por ter sido minha primeira grande companheira e hoje ser um exemplo de vida e uma amiga sincera.

Dedico este trabalho a minha Orientadora, Professora Margarida de Mello Aires, que com muita sabedoria e dedicação me proporcionou excelentes momentos de aprendizagem na área da pesquisa, pelas experiências diárias e por todos os inesquecíveis momentos de ensinamentos de vida.

Quero agradecer á Professora Deise C. Leite Dellova pela orientação e colaboração nas medidas de cálcio citosólico em túbulos isolados.

Grata também aos Professores Maria Oliveira de Souza e Gehard Malnic pela colaboração, apoio e ensinamentos que muito contribuíram para minha aprendizagem.

Ao longo deste tempo recebi do meu tio Valderli Cardoso, inúmeras orações e conversas que sempre soaram como incentivo e apoio.

O meu reconhecimento ao Técnico Edson Miranda e todas as demais pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram.

Muito Obrigada!

RESUMO

CASTELO-BRANCO, R. C. **Efeito da angiotensina-(1-7) no fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$): estudo por microperfusão tubular proximal, *in vivo*.** 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente estudo avaliou os efeitos agudos da Ang-(1-7) na reabsorção resultante de bicarbonato no túbulo proximal cortical (segmento S2) de rato, *in vivo*. A pesquisa foi realizada por microperfusão tubular estacionária, medindo o pH intratubular através do microeletrodo duplo sensível a H^+ . Os dados indicam que o JHCO_3^- controle é $2,84 \pm 0,08 \text{ nmol. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [49/19 (n° de medidas/ n° de túbulos)], a Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M) o reduz (respectivamente, de 35 % ou 61 %) e a Ang-(1-7; 10^{-6} M) o eleva (56 %). A inibição do receptor Mas (por A779 10^{-6} M) eleva o JHCO_3^- (30 %), indicando que na situação controle há Ang-(1-7) intratubular, inibindo o JHCO_3^- . Adicionalmente, a inibição do Mas abole o efeito inibidor da Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M) sobre o JHCO_3^- , mas não afeta o efeito estimulador da Ang-(1-7; 10^{-6} M) sobre esse parâmetro. A inibição da isoforma NHE3 (por S3226 10^{-6} M) diminui o JHCO_3^- (45 %), não altera o efeito inibidor da Ang-(1-7; 10^{-9} M), mas transforma o efeito estimulador da Ang-(1-7; 10^{-6} M) em inibidor do JHCO_3^- . Portanto, nossos resultados indicam que o efeito bifásico dose-dependente da Ang-(1-7) sobre a reabsorção resultante de bicarbonato no túbulo proximal S2 *in vivo* é mediado pelo receptor Mas e se dá via isoforma NHE3. Adicionalmente, 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ controle é $100 \pm 2,47 \text{ nM}$ [35 (n° de túbulos; cada túbulo é a média de 10 células)] e que a Ang-(1-7; 10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) aumenta esse valor (respectivamente, para 152 %, 103 % ou 53 %), transientemente (3 min). A inibição do receptor Mas aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (26 %), mais inibe o efeito estimulador de todas as doses de Ang-(1-7). Os resultados sugerem um papel do cálcio citosólico na regulação do NHE3 e são compatíveis com a estimulação do trocador por moderado aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na vigência de Ang-(1-7; 10^{-6} M) e sua inibição por pronunciado aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na presença de Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M). Nossos presentes achados são o oposto dos encontrados para o efeito bifásico da Ang II, descrito em vários trabalhos, que indicam estimulação do trocador com baixas doses de Ang II (10^{-12} ou 10^{-9} M), por pequeno aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e sua inibição na vigência de alta dose de Ang II (10^{-6} M), por grande aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Assim, é razoável admitir 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.

Palavras-chave: Ang-(1-7). NHE3. JHCO_3^- . pH intracelular. Cálcio citosólico.

ABSTRACT

CASTELO-BRANCO, R. C. **Effect of Angiotensin-(1-7) on the net reabsorptive flow of bicarbonate and on calcium cytosolic concentration: study by *in vivo* proximal tubular microperfusion.** 2012. 67 p. Master Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The direct action of Ang-(1-7) on net bicarbonate reabsorption (JHCO_3^-) was evaluated by stationary microperfusion of *in vivo* middle proximal tubule (S2) of rat kidney, using H ion-sensitive microelectrodes. Our data indicate that the mean control value of JHCO_3^- is $2,84 \pm 0,08 \text{ nmol. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [49/19 (n° of measurements/ n° of tubules)], Ang-(1-7; 10^{-12} or 10^{-9} M) in lumenally perfused tubules causes a significant decrease in this parameter (respectively of 35% and 61% of the control value) but Ang-(1-7; 10^{-6} M) increased it (56%). A779 (10^{-6} M; a specific Ang-(1-7) receptor Mas antagonist) alone causes a significant increase in the JHCO_3^- (30%); these data indicate that in the control situation intratubular Ang-(1-7) inhibits JHCO_3^- in proximal tubule. However, A779 prevents the inhibitory effect of Ang-(1-7; 10^{-12} or 10^{-9} M) and does not affect the stimulatory effect of Ang-(1-7; 10^{-6} M) on this parameter. S3226 (10^{-6} M; a specific inhibitor of isoform NHE3) alone causes a significant decrease in the JHCO_3^- (45%), does not affect the inhibitory effect. So, our results indicate that the biphasic dose-dependent effect of Ang-(1-7) on net bicarbonate reabsorption in *in vivo* proximal tubule (S2) is mediated by the Mas receptor and via NHE3 isoform. In addition, in isolated perfused proximal tubules the mean control value of cytosolic free calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), monitored fluorometrically by using the calcium-sensitive probe FURA-2-AM, is $100 \pm 2,47 \text{ nM}$ [35 (n° of tubules; each tubule is the average of 10 cells)] and Ang-(1-7; 10^{-12} , 10^{-9} or 10^{-6} M) causes a transient (3 min) increase of it (respectively to 152 %, 103 % or 53 %). The receptor Mas antagonist alone increases the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (26 %) but impaired the stimulatory effect of Ang-(1-7; 10^{-12} , 10^{-9} or 10^{-6} M). The results suggest a role of cytosolic calcium in the regulation of NHE3 and are compatible with stimulation of this exchanger by a moderate increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of Ang-(1-7, 10^{-6} M), and its inhibition by large increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the presence of Ang-(1-7, 10^{-12} or 10^{-9} M). Our present findings are the opposite of those found for the biphasic effect of Ang II, since several studies indicate the stimulation of the exchanger with low doses of Ang II (10^{-12} or 10^{-9} M) by small increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and inhibition of the exchanger in the presence of high dose of Ang II (10^{-6} M) by a large increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. It is therefore reasonable to assume that in the intact animal, the interaction of the effects of Ang II and Ang-(1-7) on the Na^+/H^+ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may represent an important physiological regulation in terms of volume changes and/or extracellular pH.

Keywords: Ang-(1-7). NHE3. JHCO_3^- . Intracellular pH. Cytosolic Calcium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática dos principais mecanismos de transporte de H^+ luminal e basolateral, em célula do túbulo proximal renal	16
Figura 2 - Estrutura molecular do NHE3	18
Figura 3 - Conceito clássico do Sistema renina angiotensina aldosterona intravascular	22
Figura 4 - Conceito atual do Sistema renina angiotensina, indicando as vias de formação das diversas angiotensinas e seus receptores	25
Figura 5 - Ações da Ang II sobre o rim	28
Figura 6 - Efeitos opostos da Ang II e da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular	34
Figura 7 - Microeletrodos duplos utilizados para a medida do pH intratubular <i>in vivo</i>	39
Figura 8 - Micropipeta dupla usada para a microperfusão tubular estacionária <i>in vivo</i>	39
Figura 9 - Esquema do sistema de microperfusão estacionária <i>in vivo</i> , para medidas de pH luminal, em túbulos proximais convolutos (segmento S2)	40
Figura 10 - Curva de calibração do microeletrodo de pH	41
Figura 11 - Localização do segmento S3 proximal na região medular externa (OM) do rim	43
Figura 12 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato no segmento S2 do túbulo proximal, <i>in vivo</i>	47
Figura 13 - Efeito da perfusão luminal da Ang-(1-7) com o A779 (10^{-6} M; antagonista do receptor Mas) no trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3), sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato em túbulo proximal convoluto (segmento S2), <i>in vivo</i>	48
Figura 14 - Efeito da perfusão luminal da Ang-(1-7) com o S3226 (inibidor do NHE3 (1×10^{-6} M) no trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3), sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato em túbulo proximal convoluto (segmento S2), <i>in vivo</i>	49
Figura 15 - Experimentos representativos da razão de fluorescência do cálcio citosólico em segmentos S3 do túbulo proximal de ratos	50
Figura 16 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7) e ou A779 (10^{-6} M; antagonista do receptor Mas), na concentração do cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos	52
Figura 17 - Resumo dos efeitos da Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M, antagonista do receptor Mas) sobre o $JHCO_3^-$ e a $[Ca^{2+}]_i$	56
Quadro 1 - Soluções usadas no microeletrodo duplo	38
Quadro 2 - Solução perfusora tubular luminal	38

Quadro 3 - Composição das soluções utilizadas nos experimentos para medida da $[Ca^{2+}]_i$	
.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da perfusão intratubular de Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) e/ou do antagonista do receptor MAS e ou do inibidor do NHE3, nos parâmetros de acidificação do túbulo proximal convoluto (segmento S2) de rato, <i>in vivo</i>	46
Tabela 2 - Efeito da Ang-(1-7) e/ou A779, após 1 min de incubação hormonal na concentração do cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_i - Concentração de cálcio intracelular
A779 - Antagonista específico do receptor Mas
AA - Ácido araquidônico
Aldo - Aldosterona
Ang I - Angiotensina I
Ang II - Angiotensina II
Ang-(1-5) - Angiotensina-(1-5)
Ang-(1-7) - Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9) - Angiotensina-(1-9)
AT1 - Receptor de Angiotensina II
AT2 - Receptor de Angiotensina II
AT4 - Receptor de Angiotensina IV
AVP - Arginina-vasopressina
ECA - Enzima conversora de angiotensina
ECA2 - Enzima conversora de angiotensina II
EGTA - Quelante de cálcio
H⁺ - Hidrogênio
IP3 - Inositol trifosfato
JGA - Célula do aparelho justaglomerular
JHCO₃⁻ - Fluxo reabsortivo de bicarbonato
Jv - Fluxo absortivo de fluido
KCl - Cloreto de potássio
Kf - Coeficiente de ultrafiltração glomerular
MAS - receptor de Angiotensina-(1-7)
NEP - Endopeptidase Neutra
NHE - o trocador Na⁺/H⁺
NHE3 - o trocador Na⁺/H⁺ isoforma 3
NO - Óxido nítrico
OM - Região medular externa renal
PCP - Prolil-carboxipeptidase
PEP - Prolilendopeptidase
pH - potencial hidrogeniônico [concentração de hidrogênio (pH= -log₁₀ [H⁺])]

pHi - pH intracelular

PKC - Proteína quinase C

PLA2 - Fosfolipase A2

S3226 - Inibidor da isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+

SHR - Rato espontaneamente hipertenso

SRA - Sistema renina angiotensina

t/2 - Meia-vida de acidificação tubular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações gerais	15
1.2 Regulação do pH intracelular (pHi) no túbulo proximal	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Trocador Na^+/H^+ - Isoforma 3 (NHE3)	17
2.2 O sistema renina angiotensina	20
2.2.1 ECA2	22
2.2.2 Receptor MAS	25
2.2.3 Ação da Ang II sobre os rins	26
2.2.4 Ação da Ang II e $[\text{Ca}^{2+}]_i$	30
2.2.5 Ação da Ang-(1-7) sobre os rins	31
2.3 SRA e Fisiopatologia	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Microperfusão	37
4.1.1 Preparação dos animais	37
4.1.2 Microeletrodos e micropipetas	37
4.1.3 Método de Microperfusão Tubular	39
4.1.4 Medidas do pH intratubular	40
4.1.5 Análise das curvas de pH	41
4.2 Medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência	42
4.2.1 Curva de calibração da $[\text{Ca}^{2+}]_i$	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Ação da Ang-(1-7) na acidificação tubular proximal	46
5.1.1 Efeito do A779 (antagonista do receptor MAS)	48
5.1.2 Efeito do S3226 (inibidor da isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+)	49
5.2 Ação da Ang-(1-7) na concentração de cálcio citosólico	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A regulação precisa da concentração de H^+ no organismo é essencial para a vida, pois a atividade da grande maioria dos sistemas enzimáticos do organismo é influenciada pelo pH intracelular (pHi). Essa precisão reflete o quanto a regulação da concentração de H^+ dentro de níveis estritos é fundamental para a manutenção das funções celulares.

Com base em diferenças anatômicas e funcionais, considera-se que o túbulo proximal é formado por três segmentos: S1, S2 e S3. O segmento S1 se estende até cerca da metade da porção convoluta; o S2 inclui a parte final da porção convoluta e a metade inicial da reta; o segmento S3 corresponde o restante da parte reta (AIRES et al., 2008).

O segmento S2 é o utilizado na técnica de microperfusão *in vivo* por ser mais superficial e, portanto, de fácil acesso as micropipetas e microeletrodos.

1.2 Regulação do pH intracelular (pHi) 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 1).

Em condições normais, praticamente todo o bicarbonato filtrado é reabsorvido ao longo do néfron. Cerca de 80% da reabsorção do bicarbonato ocorrem no túbulo proximal, principalmente na sua porção inicial.

O íon H^+ secretado para a luz tubular 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_3 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 (AIRES et al., 2008).

Pelo menos três transportadores podem promover a secreção celular de H^+ pela membrana apical da célula tubular renal: o trocador Na^+/H^+ (cerca de 70 % da secreção total), a H^+ -ATPase (em torno de 30 % da secreção total) e a H^+/K^+ -ATPase (presente principalmente, em casos de acidose). Já a reabsorção de bicarbonato pela membrana basolateral ocorre por meio do cotransportador $Na^+-HCO_3^-$ e o trocador Cl^-/HCO_3^- .

Figura 1 - Representação esquemática dos principais mecanismos de transporte de H^+ , luminal e basolateral, em célula do túbulo proximal renal: ac, anidrase carbônica.

Fonte: Modificada de Aires (2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

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

O NHE3 é uma das 9 isoformas conhecidas da família de genes do trocador Na^+/H^+ (NHE) de mamíferos. Os NHEs de mamíferos consistem de isoformas presentes primariamente na membrana plasmática de células ou de organelas citoplasmáticas (BRETT; DONOWITZ; RAO, 2005). A isoforma NHE3 esta presente no intestino, pâncreas, túbulos proximais renais e no segmento descendente fino da alça de Henle (DONOWITZ; LI, 2007). Em túbulos proximais de rim é a principal responsável pelo mecanismo de acidificação tubular luminal contribuindo com cerca de 70% da reabsorção do bicarbonato filtrado.

As isoformas de NHE apresentam um longo domínio citoplasmático N-terminal hidrofóbico, 10 a 12 segmentos transmembrana e um domínio C-terminal relativamente hidrofílico (que não atravessa a membrana) dirigido ao citoplasma (Figura 2) (ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004). O domínio hidrofóbico é altamente conservado (40 a 70%) entre as diferentes isoformas e compõe o núcleo catalítico da proteína, enquanto a porção citoplasmática hidrofílica é menos conservada (10 a 20%) e participa da modulação do transporte por diversos agentes, tais como fatores de crescimento, hormônios e alterações de osmolalidade (CHOW et al., 1999; GOYAL et al., 2003).

Figura 2 - Modelo estrutural do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3).

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

O trocador apresenta 831 aminoácidos, 12 domínios transmembrânicos, e algumas alças intra e extracelulares. Seus grupamentos aminoterminal (NH_2 , 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).

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. 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 (WAKABAYASHI et al., 1992).

Todas as isoformas do NHE possuem uma estequiometria de 1:1 para a troca Na^+/H^+ , sendo, portanto, não eletrogênicas. 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

pH_i 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 pH_i. No entanto, com o aumento da concentração de H⁺ intracelular, o trocador é ativado, atingindo sua taxa máxima de transporte (AIRES et al., 2008).

O trocador Na⁺/H⁺ não participa apenas da regulação do pH_i, mas também do volume e divisão celular. As células do túbulo proximal expressam além do NHE1 na membrana basolateral, o NHE3 na membrana luminal.

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 (MOE, 1997). 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. 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 (DONOWITZ; LI, 2007).

A regulação aguda do NHE3 pode ocorrer dentre minutos a horas. Está presente nos mecanismos fisiológicos digestivos e renais, na regulação por alterações da dieta, na regulação neuro-humoral do intestino e rim, como também em estados patológicos, como diarreia (MOE, 1993). Os mecanismos envolvidos nesta regulação a curto prazo incluem alterações: na taxa de transporte, no nível de fosforilação dos sítios da alça C-terminal citoplasmática, na quantidade de NHE3 expressa na membrana plasmática (por alterar os mecanismos de tráfego da proteína) e na sua meia-vida. Já a regulação crônica do NHE3, ocorre na maioria dos casos por mecanismos mais lentos e persistentes (tais como ativação transcricional), promove processos de adaptação a longo prazo e pode ser mais importante em processos patológicos (tipo hipertensão) (BOBULESCU; MOE, 2009).

2.2 O sistema renina angiotensina

O sistema renina angiotensina é um dos mais importantes mecanismos de controle cardiovascular e da patogênese de doenças cardiovasculares. Portanto, é alvo de fármacos de muito sucesso para a terapia dessas doenças. No entanto, as angiotensinas são geradas não só no plasma, mas também localmente em tecidos, a partir de precursores e substratos localmente expressos ou importados a partir da circulação.

O sistema renina-angiotensina (SRA) foi descoberto há mais de um século e ainda é amplamente estudado. Em 1897, Tigerstedt e Bergmann isolaram do rim de coelho uma substância capaz de elevar a pressão arterial, que eles denominaram de renina. Em 1940, Braún-Menéndez e cols isolaram do sangue venoso renal de cão com constrição da artéria renal uma substância vasoconstritora, denominada por eles de hipertensina. Na mesma época, Page e Helmer, após infusão dessa substância em um animal normal, observaram sua resposta vasoconstritora, e a denominaram angiotonina. Posteriormente, outros grupos de pesquisadores mostraram tratar-se do mesmo componente, um peptídeo. Como era a mesma substância, suas prévias denominações foram agregadas e adotou-se o termo angiotensina. Estudos que se seguiram contribuíram para esclarecer o mecanismo de formação das angiotensinas e sua importância na fisiologia cardiovascular (HANDA et al., 2000).

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. Além 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 pulmonar e sistêmica. 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 geração de outro importante componente desse sistema, o heptapeptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], ocorre através de 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).

O SRA influencia amplamente as funções cardiovasculares e renais por meio de múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular. A identificação recente de novos componentes do SRA amplia sua complexidade, permitindo melhor entendimento desse sistema. Atualmente, é clara a existência no SRA de um eixo contra-regulatório intrínseco, formado pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), pela angiotensina-(1-7) e pelo seu receptor Mas. As funções desse eixo são, na maioria das vezes, opostas às funções atribuídas àquele considerado principal componente do SRA, a Ang II (VICKERS et al., 2002).

Em relação às vias metabólicas, classicamente é admitido que o SRA é composto de uma cascata linear de reações que resulta na formação da Ang II, seu principal mediador. Dessa forma, a renina, sintetizada predominantemente nas células justaglomerulares dos rins, cliva o angiotensinogênio, oriundo do fígado, produzindo Ang I, que é convertida pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II. Outras enzimas, além da renina (tonina e catepsina), são capazes de formar Ang I. Em adição, a enzima quimase também pode formar Ang II a partir da Ang I. A quimase e outras enzimas envolvidas nas vias alternativas de produção da Ang II são expressas nas células intersticiais do coração, dos rins e de outros órgãos. Com o advento de modernas técnicas de biologia molecular nos últimos anos, demonstrou-se que os genes para a maioria dos componentes do SRA estão presentes em inúmeros tecidos. De acordo com a nova visão do SRA, o precursor angiotensinogênio é processado tanto na corrente sanguínea quanto nos tecidos, gerando diversos peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos, entre os quais se destacam a Ang II e a Ang-(1-7). Essas angiotensinas, por sua vez, podem ser novamente clivadas por amino, carbóxi ou endopeptidases (DILAURO; BURNS, 2009).

A Figura 3 ilustra o conceito clássico, admitido até cerca de uma década, para o SRA.

Figura 3 - Conceito clássico do Sistema renina angiotensina aldosterona intravascular.

O Angiotensinogênio, precursor de todos os peptídeos da Angiotensina, é sintetizada pelo fígado. Na circulação é clivado pela renina, que é secretada no lúmen do 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).

2.2.1 ECA2

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo da “família” das angiotensinas que possui atividade biológica, sendo formada por uma via independente da ECA somática. Recentemente, foi descoberta, em humanos e roedores, uma nova enzima análoga a ECA com alta especificidade para clivar angiotensinas. A ECA2, como foi denominada, possui 805 aminoácidos, uma sequência N-terminal e um único sítio catalítico; apresenta 42% de homologia com a ECA somática, possuindo diferenças no que diz respeito à especificidade de substrato e sua atividade não ser alterada pelos inibidores clássicos da ECA. No sistema vascular, a expressão da ECA2 ocorre predominantemente nas células endoteliais das artérias, arteríolas e vênulas, além de ocorrer no coração e no rim. Em humanos, a ECA2 foi também descrita no trato gastrointestinal e, em camundongos, foi descrita também no pulmão (GEMBARDT et al., 2005).

A ECA2 funciona como uma carboximonopeptidase, com hidrólise preferencial entre resíduos de prolina e região C-terminal da molécula. A afinidade catalítica da ECA2 não está limitada aos peptídeos do SRA. Ela também possui alta eficiência catalítica em outros peptídeos (tais como apelina-13 e apelina-32), em alguns metabólitos de cininas, neurotensina e peptídeos relacionados, e em peptídeos opióides (como dimorfina). Esses produtos têm uma variedade de funções e assim a ECA2 pode ter um papel chave na inflamação, neurotransmissão e funções cardiovasculares (KATOVICH et al., 2005).

No sistema cardiovascular, a ECA2 cliva a Ang I gerando o peptídeo, até o momento considerado inativo, a Ang-(1-9) (Figura 4). Posteriormente, a Ang-(1-9) pode ser convertida a Ang-(1-7) e essa, por sua vez, pode ser inativada pela ECA somática (ou outras peptidases) ao resíduo inativo Ang-(1-5). A ECA2 pode também metabolizar diretamente a Ang II para gerar Ang-(1-7). Nem a Ang-(1-9) nem a Ang-(1-7) podem ser hidrolisadas pela ECA2. Essas ações sugerem que a ECA2 é a principal via de formação da Ang-(1-7) (DONOUGHE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000; VICKERS et al., 2002). Atualmente, Ang-(1-7) juntamente com a Ang II, são considerados os principais efetores do SRA.

Tanto o decapeptídeo Ang I quanto o octapeptídeo Ang II, podem sofrer processo de biotransformação dando origem a outros peptídeos bioativos menores, como por exemplo, a Ang III, Ang IV e a Ang-(1-7), a qual será foco do presente estudo. Além da enzima conversora de angiotensina, outras enzimas são capazes de formar Ang II, tanto a partir da Ang I como diretamente do angiotensinogênio (SANTOS et al., 2000). No entanto, a real importância dessas diferentes vias para a formação da Ang II ainda não está totalmente estabelecida. A clivagem da Ang I e Ang II em outras angiotensinas depende de vias enzimáticas diversas, entre elas, a endopeptidase neutra, prolil-endopeptidase, prolil-carboxipeptidase e finalmente a ECA2 (DONOUGHE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000), sendo esta última amplamente estudada a partir dos anos 2000.

Por muito tempo, a Ang II e Ang III eram consideradas como os únicos fragmentos biologicamente ativos do SRA. Cadeias menores resultantes da degradação destes peptídeos eram até então considerados fragmentos inativos, uma vez que nenhuma atividade biológica era atribuída a eles. Entretanto, a descoberta da existência da Ang-(1-7) (SANTOS et al., 1988) e de seus efeitos cardiovasculares e cerebrais (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1989; SCHIAVONE et al., 1988) levaram a uma nova percepção dos mecanismos pelos quais o SRA regula a homeostasia cardiovascular. A partir destes estudos, a Ang-(1-7) se tornou alvo de importantes pesquisas nas últimas décadas, principalmente por ter sido observado que

possui vários efeitos benéficos e opostos aos efeitos deletérios produzidos pela Ang II (FERRARIO et al., 1997; SANTOS et al., 2000).

Atualmente, várias evidências apontam para um novo conceito do SRA (SANTOS; FERREIRA, 2007), que seria formado por duas vias enzimáticas distintas (Figura 4):

- uma vasoconstritora/hipertrófica/proliferativa, tendo como principal mediador a Ang II;
- outra via vasodilatadora/anti-hipertrófica/anti-proliferativa, mediada principalmente pela Ang-(1-7), através da ligação em seu receptor Mas acoplado a proteína G (SANTOS et al., 2003) e/ou a outro possível subtipo de receptor (SILVA et al., 2007).

Recentemente, vários estudos têm apontado o coração e os vasos sanguíneos como os principais alvos para as ações da Ang-(1-7), as quais incluem alterações bioquímicas e funcionais levando à vasodilatação e melhora da função cardíaca (BOTELHO-SANTOS et al., 2007; BROSNIHAN et al., 1996; CASTRO et al., 2005; FERRARIO et al., 1997; FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA; 2002; PORSTI et al., 1994; SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

A Figura 4 ilustra o conceito atual do SRA.

Figura 4 - Conceito atual do Sistema renina-angiotensina, indicando as vias de formação das diversas angiotensinas e seus receptores.

AP, Aminopeptidases; ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2, Enzima Conversora de Ang II; NEP, Endopeptidase Neutra; PCP, Prolil-carboxipeptidase; PEP, Prolilendopeptidase; AT, Receptor de Ang II ou IV e MAS, receptor de Ang-(1-7).
 Fonte: Modificado de SANTOS (2008).

2.2.2 Receptor MAS

Em um número cada vez mais crescente de estudos, vem sendo mostrado que os efeitos da Ang-(1-7) não são abolidos pelo bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂, sugerindo a presença de um receptor específico para a Ang-(1-7) (BENTER; DIZ; FERRARIO, 1993; BROSNIHAN; LI; FERRARIO, 1996; PORSTI et al., 1994). Em concordância com estes achados, uma forma modificada da Ang-(1-7), a [D-Ala⁷]-Ang-(1-7), na qual a prolina da

posição 7 é substituída pela D-Ala, bloqueia seletivamente os efeitos da Ang-(1-7) (SANTOS et al., 1994; SIMÕES E SILVA et al., 1997).

As ações dos peptídeos angiotensinérgicos são mediadas por receptores de membrana. Em relação à Ang-(1-7), apenas recentemente, Santos e cols. (2003) mostraram evidências funcionais de que este peptídeo age via receptor Mas. O receptor Mas foi primeiramente caracterizado como um receptor órfão, acoplado a proteína G, com sete domínios transmembrana e baixa atividade oncogênica. Nos estudos de Santos e cols. (2003), foi mostrado (através de experimentos de binding no rim de camundongos knockout para o receptor Mas) que a Ang-(1-7) apresenta baixa afinidade; porém, em experimentos em células de linhagem transfectadas com o receptor Mas, a Ang-1-7 se liga com alta afinidade. Em adição, foi verificado que a Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas promovendo a liberação de ácido aracdônico, efeito que não é bloqueado pelos antagonistas dos receptores AT1 e AT2, sendo bloqueado apenas pelo antagonista específico do receptor Mas, o A779.

A Ang-(1-7) é encontrada em elevada concentração em diversos segmentos do néfron, incluindo os túbulos proximais e distais e os ductos coletores isolados. A Ang-(1-7) é excretada na urina em concentrações mais elevadas do que a própria Ang II. Ressalta-se ainda que a ECA2 está distribuída no tecido renal de forma similar à Ang-(1-7) e parece ser a principal enzima responsável pela formação intra-renal da Ang-(1-7) (BROSNIHAN et al. 2003; FERRARIO et al. 1998; LI et al. 2005).

2.2.3 Ação da Ang II sobre os rins

A Ang II exerce efeitos importantes na hemodinâmica intra-renal e na homeostase hidrossalina (Figura 5). Sua vasoconstrição renal, predominantemente exercida sobre a arteríola eferente, aumenta a pressão de filtração glomerular mesmo com o grande decréscimo na perfusão renal. Ao nível do túbulo proximal, a Ang II ativa diretamente o trocador Na^+/H^+ (NHE3) e indiretamente (via Aldo) ativa a bomba Na^+/K^+ . A somatória dos seus efeitos hemodinâmicos e sobre a membrana basal glomerular resulta em efeito proteinúrico, o qual pode ser bloqueado por inibição da enzima de conversão. Sob sua ação, o Kf (coeficiente de ultrafiltração glomerular) aumenta, enquanto que a área de superfície disponível para a filtração glomerular é reduzida, mediante contração das células mesangiais. Quando a vasoconstrição induzida pela Ang II sobre a arteríola aferente é exagerada, a nutrição dos túbulos renais fica prejudicada, uma vez que os capilares peritubulares são oriundos do sistema porta renal, especificamente, da arteríola eferente.

Para evitar a necrose tubular aguda, que seria inevitável toda vez que os níveis de Ang II atingissem um valor crítico, os rins passam a produzir vasodilatadores locais (prostaglandinas) que determinam insensibilidade parcial aos vasoconstrictores sistêmicos, de modo a adequar a perfusão renal com a sobrevivência tubular.

Figura 5 - Ações da Ang II sobre o rim.

No rim, a Ang II é formada a partir de angiotensinogênio e Ang I sistêmicos, bem como angiotensinogênio formado localmente em células tubulares proximais. A Renina é secretada pelas células justaglomerular (JGA) para o interstício renal e para a circulação. Além disso, a produção de renina pode ocorrer também em células tubulares proximais. A ECA está localizada nas células endoteliais da vasculatura renal e na borda em escova da membrana tubular proximal. Esses componentes interagem no interstício renal para sintetizar Ang II. No lúmen tubular proximal, a Ang II é gerada a partir angiotensinogênio e ECA oriundos das células tubulares, bem como da Ang I oriunda do filtrado glomerular. Receptores AT1 presentes nas membranas luminal dos túbulos são ativados e aumenta a reabsorção de sódio pela ativação do trocador sódio-hidrogênio. Receptores AT1 presentes nas células mesangiais e fibroblastos intersticiais estimulam a proliferação dessas células e a síntese de proteínas relacionadas à fibrose, como o colágeno, bem como citocinas e quimioatrativos por leucócitos, como a proteína quimiotática de monócitos (MCP) 1. A Ang II via receptores AT1 contrai a arteríola eferente mais intensamente do que a aferente, aumentando assim a pressão de filtração glomerular. ECA = enzima de conversão da Ang II; JGA cell = célula do aparelho justaglomerular.

Fonte: Bader (2010).

A Ang II desempenha um papel importante na regulação dos fluidos do corpo e no balanço de sódio, através da modulação de funções tubulares renais. Em particular, a Ang II é reconhecida por regular o transporte proximal renal de uma maneira bastante específica. Em

1977, Harris e Young informaram que Ang II regula a reabsorção de água de túbulos proximais de rato em uma maneira bifásica: estimulação – quando em baixa concentração (picomolar para nanomolar) ou inibição – quando em altas concentrações (nanomolar para micromolar) (HARRIS; YOUNG, 1977). Estudos subsequentes não só revelaram o seu efeito em diferentes condições experimentais, mas também confirmaram sua regulação bifásica luminal (HOULLIER et al., 1996; SCHUSTER; KOKKO; JACOBSON, 1984).

Ang II é geralmente tida como estimuladora do transporte proximal; adicionalmente, o líquido tubular proximal contém concentrações acentuadamente elevadas de Ang II (NAVAR et al., 1999) que podem ter relevância fisiológica para a regulação proximal de funções tubulares *in vivo*.

Tradicionalmente, a estimulação por Ang II tem sido atribuída à ativação da proteína quinase C e/ou a diminuição do nível de cAMP intracelular, enquanto que a inibição por Ang II tem sido atribuída à ativação da fosfolipase A2 (PLA2) e liberação subsequente do ácido araquidônico (HAN et al., 2000; LIU; COGAN, 1989; NAVAR et al., 1999).

O túbulo proximal contém toda a maquinaria sintética para a produção de Ang II. O mRNA e a proteína de angiotensinogênio são produzidos pelo túbulo proximal. O mRNA de renina foi detectado em culturas primárias de células do túbulo proximal de coelho, usando transcrição reversa e reação de cadeia da polimerase, e em dissecação de túbulos proximais de coelhos que receberam enalapril, um inibidor da enzima conversora de Ang II. A renina também foi encontrada em células de túbulo proximal de coelho, em cultura (MOE et al., 1993).

A atividade da enzima conversora de Ang II está presente na borda em escova do túbulo proximal. Evidências diretas para a produção de Ang II pelo túbulo proximal vieram de estudos de micropunção e microperfusão *in vivo* em ratos, que descrevem concentrações de Ang II luminal, 100 vezes maior do que no plasma (BOER et al., 1997; BRAAM et al., 1993).

Também há estudos indicando que a Ang II produzida endogenamente modula a absorção de volume na superfície de túbulos proximais convolutos de ratos hipovolêmicos (QUAN; BAUM, 1996); assim, em ratos com depleção de volume, a Ang II atua de forma autócrina ou parácrina para modular o transporte tubular proximal.

Em adição, a Ang II participa na regulação renal de sódio e excreção de água através de uma variedade de mecanismos fisiológicos. Estes incluem efeitos indiretos sobre a hemodinâmica renal, a taxa de filtração glomerular e a regulação da secreção de Aldo; já os efeitos diretos da Ang II, dizem respeito ao transporte tubular renal hidrosalino, através de interações com receptores de membrana (BURNS; HOMMA; HARRIS, 1993). Além de seus

efeitos para promover a retenção de sódio renal, Ang II estimula a secreção de H^+ e a reabsorção proximal e distal de HCO_3^- (GEIBEL; GIEBISCH; BORON, 1990), regula a atividade da H^+ -ATPase no túbulo coletor cortical (TOJO; TISHER; MADSEN, 1994), e influencia a produção e secreção de amônio por segmentos de túbulo proximal (NAGAMI, 1992).

Estes achados sugerem que, além do seu claro papel no controle da excreção de sódio e volume de líquido extracelular, a Ang II também pode influenciar a excreção de ácido na urina e participar da regulação do equilíbrio ácido-base.

A Ang II também atua na alça de Henle espessa ascendente, pois: 1) o ramo espesso ascendente expressa receptores de Ang II (BOUBY et al., 1997); 2) a Ang II influencia a atividade de canais para K^+ na membrana apical (LU et al., 1996); 3) regula uma variedade de vias de sinalização nesse segmento tubular, incluindo a modulação na $[Ca^{2+}]_i$, a produção de óxido nítrico (NO), a atividade da proteína quinase C (PKC) e o metabolismo de ácido araquidônico (AA) (LU et al., 1996; BOUBY et al., 1997).

Estudos em túbulos proximal e distal mostraram que a Ang II estimula a reabsorção de HCO_3^- através da estimulação do trocador Na^+/H^+ na membrana apical (BURNS, HOMMA, HARRIS, 1993; GEIBEL; GIEBISCH; BORON, 1990).

2.2.4 Ação da Ang II e $[Ca^{2+}]_i$

Foi demonstrado que o domínio citoplasmático C-terminal, regulador do trocador Na^+/H^+ , tem dois sítios de ligação á calmodulina que modulam sua atividade: um sítio de alta afinidade ao cálcio - que é tonicamente inibidor do trocador, e outro de baixa afinidade ao cálcio - que é estimulador do trocador (WAKABAYASHI et al., 1994). Quando há um 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 um 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.

Confirmando esse achado, 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 $[Ca^{2+}]_i$. Assim, baixas doses

(10^{-12} - 10^{-9} M) de Ang II, Aldo ou AVP causam pequeno aumento da $[Ca^{2+}]_i$, estimulando o trocador, enquanto que alta dose (10^{-6} M) de Ang II, Aldo ou AVP causam grande aumento da $[Ca^{2+}]_i$, inibindo o trocador.

2.2.5 Ação da Ang-(1-7) sobre os rim

Na vasculatura a Ang-(1-7) exerce um efeito vasodilatador que envolve aumento da produção de NO ou de prostaglandinas (HEITSCH et al., 2001). Entretanto, o papel da Ang-(1-7) na regulação da hemodinâmica renal não é completamente compreendido e os dados da literatura são conflitantes. Van der Wouden et al. (2006) avaliaram, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos da Ang-(1-7) na vasculatura renal de ratos. Seus estudos indicaram que, apesar da Ang-(1-7) por si só não afetar a função vascular, ela impede que a Ang II induza vasoconstrição das artérias renais isoladas *in vitro*. Este achado está de acordo com pesquisas realizadas por Ren, Garvin e Carretero (2002), mostrando que a Ang-(1-7) provoca dilatação na arteriola aferente, mediada pela produção de NO. Em ratos anestesiados *in vivo*, no entanto, mostram que a Ang-(1-7) não afeta o efeito da Ang II na constrição das arteríolas aferentes e eferentes (VAN DER WOUTEN et al., 2006). Da mesma forma, estudos em ratos Wistar, demonstraram que a Ang-(1-7) não afeta a diminuição do fluxo sanguíneo renal induzida pela injeção intrarenal de Ang II (HANDA; FERRARIO; STRANDHOY, 1996). Estas conclusões ressaltam a dificuldade em prever os efeitos hemodinâmicos renais de Ang-(1-7) *in vivo*. Contudo, uma vez que o fluxo sanguíneo renal é regulado por numerosos vasoconstritores e tem influências de vários vasodilatadores, é possível que, *in vivo* os efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) no rim possam ser mascarados (NAVAR et al., 1996).

O papel da Ang-(1-7) na regulação da excreção de sal e água foram objeto de vários estudos e, como as respostas hemodinâmicas desse heptapeptídeo, os dados são difíceis de conciliar. Em ratos anestesiados, a administração de Ang-(1-7) aumenta o fluxo urinário e a excreção de sódio, efeito que é abolido por A779 (um antagonista do receptor MAS) (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 (EXP 3174), não o é pelo antagonista do receptor AT2 (PD123319), 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. Em culturas de

células tubulares proximais de coelho, a Ang-(1-7) inibe o fluxo de sódio, um efeito associados com a ativação da fosfolipase A2 (ANDREATTA-VAN LEYEN et al., 1993).

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 absorção de água: em baixas concentrações (10^{-12} M), a Ang-(1-7) aumenta a absorção de fluido (Jv), enquanto que em altas concentrações (10^{-8} M), inibe o Jv. Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) promove natriurese e diurese através da ativação de receptores Mas, embora possa ter também o envolvimento de receptores AT1 e AT2. Em contraste, Santos et al. (1996) demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) diminui o volume urinário, um efeito revertido pelo antagonista do receptor Mas. 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 (A779) em ratos normais ou hipertensos (SHR) causa diurese e natriurese (SIMOES; SILVA, 1998).

Além de regular a excreção de água e sal no túbulo proximal, a Ang-(1-7) pode modular o transporte salino em outros segmentos dos néfrons. Em ratos Wistar-Munich anestesiados, experimentos de micropunção renal mostraram que a Ang-(1-7) (10^{-8} M) aumenta a secreção de potássio e a reabsorção de sódio na alça de Henle, sendo esta resposta abolida por antagonista do receptor AT1. Já, a infusão de Ang-(1-7), em concentrações fisiológicas (10^{-12} a 10^{-8} M) não afeta a reabsorção de fluido tubular no túbulo contorcido distal ou proximal (VALLON et al., 1997). Em ductos coletores medulares isolados (IMCD), a perfusão com Ang-(1-7) (10^{-9} M) aumenta o transporte de água, via receptor Mas (SANTOS et al., 1996) e a produção de cAMP (MAGALDI et al., 2003); esta última resposta é atenuada pelo antagonista do receptor Mas e pelo bloqueio farmacológico do receptor V2 da vasopressina. Vistos em conjunto, estes dados fornecem evidências de que a Ang-(1-7) regula o transporte de água no ducto coletor medular, possivelmente, através de um mecanismo de cross-talk entre o receptores Mas e V2, envolvendo a ativação da guanilato ciclase.

As discrepâncias entre os estudos sobre o papel da Ang-(1-7) na regulação da função hemodinâmica renal, bem como na excreção renal de sal e água podem ser explicadas por diferenças na metodologia experimental e por utilização de preparações *in vitro* e *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 WOUDE et al., 2006; YAMADA et al., 1998).

Em conclusão, parece que, apesar dos receptores Mas mediarem muitos dos efeitos da Ang-(1-7) ao longo do néfron, os receptores de Ang II (e talvez os de vasopressina?) também podem estar envolvidos e influenciar os efeitos hormonais tubulares. 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 (JOYNER et al., 2007).

2.3 SRA e Fisiopatologia

O SRA possui papel relevante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares e renais. Diversos estudos demonstram a eficácia de fármacos que bloqueiam o SRA no tratamento de enfermidades como a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o infarto agudo do miocárdio, a doença renal crônica e as nefropatias proteinúricas. Nesse contexto, a Ang II, considerada o principal mediador biológico do SRA, atua seletivamente em receptores angiotensinérgicos (AT) dos tipos 1 e 2. O receptor AT1 é responsável pela maioria das ações fisiológicas e fisiopatológicas do SRA, cuja ativação resulta em vasoconstrição renal e sistêmica, secreção de Aldo, potenciação da atividade do sistema nervoso simpático, retenção renal de Na^+ e água, estimulação da secreção de arginina vasopressina (AVP) e hipertrofia e hiperplasia das células-alvo (SANTOS; FAGUNDES-MOURA; SIMÕES E SILVA, 2000). Além desses efeitos que culminam com a elevação da pressão arterial, a Ang II produz ações lesivas nos vasos sanguíneos, tais como:

- aumento do potencial oxidativo do tecido vascular;
- efeitos pró-trombóticos intrínsecos;
- estímulo à adesão, migração e proliferação de leucócitos e outras células inflamatórias aos sítios de lesão, levando à formação de fibrose da camada vascular neo-íntima e de placas ateroscleróticas (SANTOS; FERREIRA, 2007).

Crescente importância vem sendo atribuída à 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 et al., 2005).

A Figura 6 resume os efeitos (opostos) da Ang II e da Ang-(1-7) no Sistema Cardiovascular.

Figura 6 - Efeitos opostos da Ang II e da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular.

AT₁, receptor de Ang II; MAS, receptor de Ang-(1-7).
 Fonte: Modificado de Santos e Ferreira (2007).

Assim, nas últimas décadas, a Ang-(1-7) tem se tornado alvo de importantes estudos, principalmente por terem sido observados vários efeitos benéficos e opostos aos efeitos deletérios produzidos pela Ang II (FERRARIO et al., 1997; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000). Vários estudos vêm apontando o coração e os vasos sanguíneos como os principais alvos para as ações da Ang-(1-7), as quais incluem alterações

bioquímicas e funcionais que levam à vasodilatação e melhora da função cardíaca (BOTELHO-SANTOS et al., 2007; BROSNIHAN; LI; FERRARIO, 1996; CASTRO et al., 2005; FERRARIO et al., 1997; FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2002; PORSTI et al., 1994; SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Em conclusão, o grande número dos efeitos benéficos da Ang-(1-7) via receptor Mas demonstram que a ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas pode se tornar uma estratégia terapêutica importante no tratamento de diversas doenças renais e/ou cardiovasculares. Desta forma, além da relevância do conhecimento dos mecanismos fisiológicos básicos que envolvem as ações da Ang-(1-7) é de extrema importância clínica o melhor conhecimento dos diferentes efeitos deste heptapeptídeo e de seus diversos agonistas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Considerando que:

- os dados da literatura atual são conflitantes com respeito a ação da Ang-(1-7) no transporte tubular renal de água e eletrólitos;
- estudos de nosso Laboratório demonstram que o efeito bifásico dose dependente da Ang II, da Aldo ou da AVP sobre o trocador Na^+/H^+ está associado com aumentos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

O presente estudo objetiva avaliar os efeitos agudos de diferentes doses de Ang-(1-7) na reabsorção de bicarbonato via trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), em túbulo proximal convoluto (segmento S2), *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a ação da Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) sobre o trocador Na^+/H^+ .
- Avaliar o papel do receptor Mas na ação da Ang-(1-7) sobre o trocador, utilizando o A779 (10^{-6} M, um antagonista do receptor Mas).
- Determinar que essa ação da Ang-(1-7) se dá via isoforma NHE3 do trocador, utilizando o S3226 (10^{-6} M, um antagonista do NHE3).
- Avaliar a concentração de cálcio citosólico $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em segmentos S3 de túbulos proximais incubados com Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) e/ou A779.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microperfusão

A atividade do trocador Na^+/H^+ foi avaliada pela velocidade de acidificação tubular proximal *in vivo*, analisada pelo fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-), medido por meio do microeletrodio de resina sensível a H^+ .

4.1.1 Preparação dos animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 300g, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas, USP. Os animais eram preparados para a microperfusão *in vivo*, sendo pré-anestesiados com uma injeção subcutânea de sulfato de atropina, na dose de 0,05 mg/kg de peso corpóreo; posteriormente, foram anestesiados com injeção intramuscular de Tiletamina + Zolezepam (Virbac), na dose de 20-30 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). Após as microperfusões, eram coletadas amostras de sangue para a medida de pH e PCO_2 (Radiometer BMS3/MK2).

4.1.2 Microeletródios e micropipetas

Para a medida do pH intratubular usamos o microeletródio duplo, que continha 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) (Figura 7). 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% (Figura 8). As micropipetas, bem como os microeletródios, eram manipulados por micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar).

Quadro 1 - Soluções usadas no microeletrodo duplo.

<i>Solução de complemento*</i>		<i>Solução de referência</i>	
<i>Reagentes</i>	<i>Concentração</i>	<i>Reagentes</i>	<i>Concentração</i>
NaCl	130 mM	KCl	1 M
Na ₂ HPO ₄	10 mM		
NaH ₂ PO ₄	10 mM		
* A solução tinha seu pH ajustado para 7, com 0,1 de NaOH ou de HCl.			

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Quadro 2 - Solução perfusora tubular luminal.

<i>Reagentes</i>	<i>Concentração</i>
NaCl	100 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Rafinose*	0,6 g/10ml
* A rafinose foi utilizada para a solução alcançar a osmolalidade de 300 mOsm (no sentido de minimizar a reabsorção do fluído perfusor).	

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Figura 7 - Microeletrodos duplos, utilizados para a medida do pH intratubular *in vivo*.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Figura 8 - Micropipeta dupla, usada para a microperfusão tubular estacionária *in vivo*.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

4.1.3 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).

O pH intratubular era medido através do microeletrodo duplo introduzido numa alça do túbulo proximal. A solução perfusora foi injetada por um dos ramos da micropipeta e o óleo mineral corado com sudan negro, por outro ramo. Como indicado na Figura 9, a solução perfusora ficava isolada do fluido tubular, por 2 gotas de óleo. As medidas foram feitas na vigência de perfusão sanguínea capilar normal.

Figura 9 - Esquema do sistema de microperfusão estacionária in vivo, para medidas de pH luminal, em túbulos proximais convolutos (segmento S2).

A esquerda, microeletrodo duplo com resina de troca iônica (H^+) e solução de KCl 1M (referência). A direita, micropipeta dupla, com solução perfusora luminal em um dos ramos (em verde) e óleo mineral (em preto) no outro. Mais detalhes no texto.
 Fonte: Castelo-Branco (2012).

4.1.4 Medidas do pH intratubular

A diferença de potencial entre os dois ramos do microeletrodo era função do pH do fluido onde o microeletrodo estava imerso. Enquanto que a diferença de potencial transepitelial correspondia à diferença entre o ramo de referência que estava no lúmen do

túbulo e o fluido extracelular do animal, que estava ligado á terra. 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 foram 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 foram calculados por interpolação, a partir da curva de calibração do microeletrodo (Figura 10). Os valores de concentração de bicarbonato na luz tubular eram calculados em intervalos de 1 segundo, pela equação de Henderson-Hasselbach, usando o pK de 6,1. Para este cálculo foi suposto que a PCO_2 intratubular cortical é igual à plasmática (MELLO-AIRES; LOPES; MALNIC, 1990).

Figura 10 - Curva de calibração do microeletrodo de pH.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

4.1.5 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° 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 μm) e

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

Com base na equação n°1, 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. 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).

4.2 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 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 11.

Figura 11 - Localização do segmento S3 proximal na região medular externa (OM) do rim.

À esquerda temos o esquema de um néfron, com a indicação da localização do segmento S3 proximal (em amarelo) na região medular externa. À direita temos um corte longitudinal do rim, com destaque para a região medular externa, onde era realizado o procedimento de microdissecção do segmento S3.

Fonte: Schafer et al., (1997).

Procuramos separar um único túbulo ou no máximo 2 ou 3 túbulos 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 °C , 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 nos experimentos para medida da $[Ca^{2+}]_i$.

	Solução (Tyrode)	Solução (Tyrode 0Ca²⁺)
NaCl	137	137
CaCl ₂	1.36	-
MgCl ₂	0.49	0.49
Glicose	5.6	5.6
HEPES	5.0	5.0
KCl	2.68	2.68
NaHCO ₃	12	12
Na ₂ HPO ₄	0.36	0.36
pH	7.4	7.4
As concentrações dos reagentes estão expressas em mM. HCl ou NaOH foram utilizados para calibração do pH das soluções.		

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Após excitação, a amostra iniciava seu ciclo de emissão de fluorescência, sendo esta detectada por uma câmara de vídeo (CCD), onde era gerada a imagem do tecido analisado. As imagens foram 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, selecionamos 10 áreas ao longo de cada túbulo. O valor médio da intensidade de fluorescência do cálcio destas 10 áreas foi considerado o valor da intensidade de fluorescência de cada túbulo. Esses valores foram utilizados para o cálculo da $[Ca^{2+}]_i$, a partir da equação de Grynkiewicz (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985):

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

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,

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

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

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

A transformação do sinal de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$ foi feita através da 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 foram 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 foram 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 $[Ca^{2+}]_i$.

5 RESULTADOS

No total, utilizamos 31 ratos, sendo 25 empregues para a avaliação do JHCO_3^- e 6 para a medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

5.1 Ação da Ang-(1-7) na acidificação tubular proximal

Na Tabela 1 são dados os valores médios dos parâmetros de acidificação tubular proximal, para todos grupos experimentais estudados.

Tabela 1 - Efeito da perfusão intratubular de Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) e/ou do antagonista de receptor MAS e/ou do inibidor da NHE3, nos parâmetros de acidificação do túbulo proximal convoluto (segmento S2) de rato, *in vivo*.

	<i>t</i> /2 (segundo)	JHCO_3^- (nmol/cm ⁻² .s ⁻¹)	DP (mV)
Controle	3.23 ± 0.095 (49/19)	2.84 ± 0.079 (49/19)	-2mV
Ang-(1-7) (10^{-12} M)	7.51 ± 1.4 (52/14) ^{\$}	1.80 ± 0.21 (52/14) ^{\$}	-1mV
Ang-(1-7) (10^{-9} M)	6.31 ± 0.57 (78/15) ^{\$}	1.11 ± 0.119 (78/15) ^{\$}	-2mV
Ang-(1-7) (10^{-6} M)	2.32 ± 0.491 (80/21) ^{\$}	4.43 ± 0.523 (80/21) ^{\$}	-3mV
A779 (10^{-6} M)	2.94 ± 0.228 (64/20)	3.68 ± 0.394 (64/20) ^{\$}	-2mV
Ang-(1-7) (10^{-12} M) + A779	2.086 ± 0.201(58/21)*	3,52 ± 0.50 (58/21)*	-1mV
Ang-(1-7) (10^{-9} M) + A779	2.13 ± 0.159 (30/14) *	2.81 ± 0.44 (30/14) *	-1mV
Ang-(1-7) (10^{-6} M) + A779	2.57 ± 0.379 (75/14)	4.01 ± 0.591 (75/14)	-2mV
S3226 (10^{-6} M)	5.81 ± 0.466 (53/11) ^{\$}	1.56 ± 0.168 (53/11) ^{\$}	-2mV
Ang-(1-7) (10^{-9} M) + S3226	5.97 ± 0.647 (30/11)	1.47 ± 0.149 (30/11)	-2mV
Ang-(1-7) (10^{-6} M) + S3226	4.61 ± 0.539 (47/15) *	1.98 ± 0.358 (47/15) *	-3mV

Meia vida de acidificação tubular = *t*/2; fluxo reabsortivo de bicarbonato = JHCO_3^- ; diferença de potencial transtubular = DP; antagonista específico do receptor Mas = A779 (10^{-6} M); inibidor da NHE3 = S3226 (10^{-6} M). Os valores correspondem à média ± erro padrão (n° de perfusões / n° túbulos). ^{\$}p < 0,01 vs controle; *p < 0,01 vs Ang-(1-7) na dose respectiva.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Os resultados indicam que a diferença de potencial transtubular encontrada nos túbulos perfundidos foi em média $-2 \pm 0,211$ mV (175).

Os resultados mostram que o JHCO_3^- do túbulo proximal na situação controle é 2.84 ± 0.079 ($\text{nmol}/\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (49/19). Na Figura 12 podemos observar que, em relação ao controle, a Ang-(1-7) na concentração 10^{-12} ou 10^{-9} M causa queda significativa do JHCO_3^- (respectivamente, de 35 % ou 61 %); porém, na concentração de (10^{-6} M) o eleva significativamente (56 % em relação ao controle). Ou seja, nossos dados indicam que a Ang-(1-7) tem efeito bifásico sobre o JHCO_3^- , dose dependente.

Figura 12 - Efeito da perfusão luminal de Ang-(1-7) sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato no segmento S2 do túbulo proximal, *in vivo*.

N = número de perfusões / número de túbulos)
 Fonte: Castelo-Branco (2012).

5.1.1 Efeito do A779 (antagonista do receptor MAS)

A Figura 13 mostra que a inibição do receptor Mas eleva cerca de 30 % o JHCO_3^- em relação ao controle, indicando que na situação controle há Ang-(1-7) intratubular, inibindo o JHCO_3^- . Adicionalmente, a figura indica que a inibição do receptor Mas abole o efeito inibidor da Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M) sobre o JHCO_3^- , mas não afeta o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M) na estimulação do JHCO_3^- .

Figura 13 - Efeito da perfusão luminal da Ang-(1-7) e/ou A779 (10^{-6} M; antagonista do receptor Mas) sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato em túbulo proximal convoluto (segmento S2), *in vivo*.

\$p < 0,01 vs controle
 #p < 0,01 vs respectiva dose de Ang-(1-7)

N = número de perfusões / número de túbulos)
 Fonte: Castelo-Branco (2012).

5.1.2 Efeito do S3226 (inibidor da isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+)

A Figura 14 mostra que a inibição da isoforma NHE3 diminui o JHCO_3^- 45 % em relação ao controle, indicando que na situação controle essa isoforma é, em parte, responsável pelo JHCO_3^- . A figura também indica que a inibição da isoforma NHE3 não altera o efeito inibidor da Ang-(1-7; 10^{-9} M) sobre o JHCO_3^- , mas transforma o efeito estimulador da Ang-(1-7; 10^{-6} M) em inibidor do JHCO_3^- . Portanto nossos resultados indicam que o efeito bifásico dose dependente da Ang-(1-7) sobre o JHCO_3^- é via isoforma NHE3.

Figura 14 - Efeito da perfusão luminal da Ang-(1-7) e/ou S3226 (10^{-6} M; inibidor do NHE3) sobre o fluxo reabsortivo de bicarbonato em túbulo proximal convoluto (segmento S2), *in vivo*.

\$p < 0,01 vs controle

N = número de perfusões / número de túbulos)
 Fonte: Castelo-Branco (2012).

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

A Figura 15 exibe o valor da intensidade fluorescente do cálcio continuamente ao longo do tempo, em três experimentos individuais representativos dos grupos na vigência de Ang-(1-7) nas doses (10^{-12} , 10^{-9} M ou 10^{-6} M). Notamos que no controle a intensidade fluorescente se mantém constante ao longo do tempo. Entretanto, após cerca de 20 segundos da adição de Ang-(1-7) a intensidade fluorescente tem um significativo aumento, dose dependente; esse efeito hormonal é transiente e dura em torno de 3 minutos, retornando ao valor basal.

Figura 15 - Experimentos representativos da razão de fluorescência do cálcio citosólico em segmentos S3 do túbulo proximal de ratos.

As imagens foram adquiridas continuamente na presença da solução controle e após adição da Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M), indicada pela seta.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Na Tabela 2 são dados os valores médios da concentração do cálcio citosólico para os grupos experimentais estudados.

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

Grupos Experimentais	$[Ca^{2+}]_i$ nM	N
Controle	$100 \pm 2,47$	35
Ang-(1-7) (10^{-12} M)	$252 \pm 8,38^*$	5
Ang-(1-7) (10^{-9} M)	$203 \pm 3,32^*$	6
Ang-(1-7) (10^{-6} M)	$153 \pm 7,88^*$	5
A779 (10^{-6} M)	$126 \pm 2,14$	5
Ang-(1-7) (10^{-12} M) + A779	$114 \pm 7,32^\#$	5
Ang-(1-7) (10^{-9} M) + A779	$96 \pm 3,76^\#$	5
Ang-(1-7) (10^{-6} M) + A779	$105 \pm 4,50^\#$	5

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão. N corresponde ao número de túbulos (cada túbulo corresponde á média de 10 áreas). *p < 0,001 vs controle, $^\#$ p < 0,01 vs respectiva dose de Ang-(1-7).

Fonte: Castelo-Branco (2012).

Nossos achados revelam que a $[Ca^{2+}]_i$ do túbulo proximal na situação controle é $100 \pm 2,47$ nM (35).

A Figura 16 indica que a Ang-(1-7) tem efeito dose dependente no aumento da $[Ca^{2+}]_i$: doses hormonais baixas (10^{-12} M ou 10^{-9} M) causam grande aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (respectivamente, de 152 % ou 103 % em relação ao controle), enquanto com a dose alta de Ang-(1-7; 10^{-6} M) o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é bem menor, porém significante (53 % em relação ao controle). A Figura 16 também indica que a inibição do receptor Mas pelo A779 causa um pequeno aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao controle, mas inibe o efeito estimulador de todas doses de Ang-(1-7); ou seja, na presença da inibição do receptor Mas todos grupos se comportam como o controle.

Figura 16 - Efeito após 1 minuto de incubação com Ang-(1-7) e ou A779 (10^{-6} M; antagonista do receptor Mas), na concentração do cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), em segmentos S3 isolados do túbulo proximal de ratos.

N corresponde ao número de túbulos (cada túbulo corresponde á média de 10 áreas).
 Fonte: Castelo-Branco (2012).

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas relevantes publicações vêm conferindo á Ang-(1-7) importante papel na função cardiovascular. Entretanto, até o momento, as pesquisas sobre seus efeitos nos túbulos renais são conflitantes, destacando-se apenas um único estudo do seu papel vasodilatador em arteríolas aferentes renais de coelho (REN; GARVIN; CARRETERO, 2002). Considerando que: 1) esse heptapeptídeo é encontrado em elevada concentração em túbulos proximais, distais e coletores, 2) é excretado na urina em concentrações relativamente elevadas e 3) a ECA2 está distribuída no tecido renal de forma similar a esse heptapeptídeo e parece ser a principal enzima responsável pela sua formação intra-renal, nosso presente estudo pretendeu verificar os efeitos agudos da Ang-(1-7) no trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) do túbulo proximal convoluto (segmento S2), *in vivo*. Para tal, utilizamos a técnica de microperfusão tubular, que nos permite avaliar a acidificação tubular *on line*, em condições em que o efeito hormonal é local e sem provocar alterações homodinâmicas sistêmicas, vista a insignificante quantidade de hormônio que é microperfundida nos túbulos.

O valor médio da diferença de potencial transtubular encontrada nos túbulos perfundidos *in vivo* foi $-2 \pm 0,211$ mV (175). Esse dado confirma que nossos experimentos foram realizados no segmento S2 do túbulo proximal cortical, pois esse valor de DP transtubular é característico desse segmento tubular (AIRES et al., 2008).

Nossos resultados indicam que na situação controle o JHCO_3^- do segmento S2 é cerca de 2.84 ± 0.079 nmol/cm².s⁻¹) (49/19), valor estatisticamente semelhante ao encontrado por outros autores nesse segmento tubular (GIEBISCH et al., 1977).

Nossos dados também indicam que a Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M) causa significativa queda do JHCO_3^- em relação ao controle (respectivamente, de 35 % ou 61 %), enquanto que na concentração de (10^{-6} M) o eleva significativamente (para 56 % acima do controle). Portanto, nossos resultados indicam que no Segmento S2 do túbulo proximal de rato a Ang-(1-7) tem um efeito bifásico sobre o trocador Na^+/H^+ , isto é, em doses baixas o inibe e em dose alta o estimula.

Adicionalmente, nossos dados evidenciam que o S3226, inibidor do trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3), causa significativa queda do JHCO_3^- . Esse dado está em concordância com achados da literatura que indicam que a isoforma NHE3 luminal é responsável pela maior parte da secretação de H^+ para a luz tubular proximal (AIRES et al., 2008). Os presentes resultados também indicam que o efeito da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ se faz primordialmente via isoforma NHE3, uma vez que o S3226 mantém o efeito inibidor da Ang-

(1-7; 10^{-9} M) sobre o JHCO_3^- e muda o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M) de estimulador para inibidor do JHCO_3^- , o que é de se esperar, uma vez que nesta última condição o trocador está inibido.

A ação bifásica da Ang-(1-7) que estamos encontrando sobre o trocador Na^+/H^+ é inversa à ação bifásica descrita para a Ang II (COPPOLA; FRÖMTER, 1994; GEIBEL; GIEBISCH; BORON, 1990; HOUILLIER et al, 1996; MELLO-AIRES; OLIVEIRA-SOUZA, 2000; MUZA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005). Ou seja, é amplamente aceito que a Ang II em doses baixas (10^{-12} ou 10^{-9} M) estimula o trocador Na^+/H^+ e em dose elevada (10^{-6} M) o inibe. Portanto, nossos resultados são coerentes com: 1) a idéia da literatura atual que admite que ambas, Ang-(1-7) e Ang II, tenham efeitos opostos em vários mecanismos cardiovasculares (Figura 6) e 2) com o fato amplamente reconhecido que, em doses fisiológicas, a Ang-(1-7) é vasodilatadora, enquanto que a Ang II é vasoconstritora.

A Ang II em doses baixas estimula o trocador Na^+/H^+ 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, estimulam o trocador. Enquanto que em dose elevada a Ang II, também via receptor AT1, estimula a fosfolipase A2 (PLA2), com estimulação do ácido araquidônico e consequente grande elevação do cálcio citosólico, que via ligação cálcio-calmodulina, inibem o trocador (EGUTI DMN et al., 2010; MELLO-AIRES; OLIVEIRA-SOUZA, 2000; MUZA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005).

A ação bifásica da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ é também inversa à ação bifásica descrita para a Aldosterona (LEITE-DELLOVA et al., 2008) ou para a AVP (OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2001).

Os resultados que obtivemos demonstram que o A779, antagonista específico do receptor Mas, aumenta significativamente (cerca de 30 %) o JHCO_3^- em relação ao controle, indicando que na situação controle deve existir Ang-(1-7) intratubular endógena. Esse nosso achado confirma dados da literatura que afirmam que: 1) a Ang-(1-7) é encontrada em elevada concentração em diversos segmentos tubulares do néfron, 2) a Ang-(1-7) é excretada na urina em concentrações mais elevadas do que a própria Ang II, 3) a ECA2 é encontrada na superfície luminal do epitélio tubular e 4) 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).

Nossos dados também demonstram que o efeito bifásico da Ang-(1-7) sobre o trocador se faz via receptor Mas, uma vez o A779, abole o efeito inibidor da Ang-(1-7) em baixas

doses (10^{-12} ou 10^{-9} M) sobre o trocador Na^+/H^+ , parecendo não atuar na ação estimuladora do trocador efetuada pela Ang-(1-7) na dose (10^{-6} M), uma vez que nesta situação pode haver pequena, mas significativa elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Nossos achados também apoiam dados indicadores que a Ang-(1-7) em dose normal (relativamente baixa) se liga ao receptor Mas, promovendo a liberação de ácido araquidônico. Assim, está descrito que a ativação da fosfolipase A2 (com consequente liberação de ácido araquidônico e via metabolitos dependentes da cytochrome epoxigenase P450) eleva muito a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (por ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes existentes na membrana) que inibe o trocador, também via complexo Ca-calmodulin binding sites (LEITE-DELLOVA et al., 2008; MUSA-AZIZ; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2005; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2000; OLIVEIRA-SOUZA; MELLO-AIRES, 2001).

A grande coerência de nossos atuais achados com os dados da literatura acima expostos é que encontramos que a Ang-(1-7) em doses baixas (10^{-12} ou 10^{-9} M) causa grande elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (respectivamente, de 152 % ou 103 % em relação ao controle) e inibe o trocador Na^+/H^+ ; enquanto que Ang-(1-7) em dose alta (10^{-6} M) causa pequena elevação do cálcio citosólico (53 % em relação ao controle) e estimula o trocador Na^+/H^+ . Já a inibição do receptor Mas causa um pequeno aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em relação ao controle e estimula o trocador Na^+/H^+ cerca de 30 % em relação ao controle. Enquanto que a inibição do receptor Mas abole o efeito estimulador de todas as doses de Ang-(1-7) sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ impedindo o efeito inibidor da Ang-(1-7; 10^{-12} ou 10^{-9} M) sobre o JHCO_3^- , mas não afetando o efeito da Ang-(1-7; 10^{-6} M) na estimulação do JHCO_3^- . A Figura 17 resume esses nossos achados.

Figura 17- Resumo dos efeitos da Ang-(1-7) (10^{-12} , 10^{-9} ou 10^{-6} M) e/ou A779 (10^{-6} M, antagonista do receptor Mas) sobre o JHCO_3^- e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Fonte: Castelo-Branco (2012).

7 CONCLUSÕES

Estudamos os efeitos da Ang-(1-7) sobre o JHCO_3^- e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no segmento S2 do túbulo proximal de ratos, *in vivo*. Os dados encontrados nos permitem concluir que:

- A Ang-(1-7) tem efeito bifásico no JHCO_3^- : em doses baixas (10^{-12} , 10^{-9} M) o inibe, mas em alta dose (10^{-6} M) o estimula;
- Esse efeito hormonal se faz via isoforma NHE3 do trocador Na^+/H^+ ;
- Na situação controle existe Ang-(1-7) endógena intratubular inibindo esse trocador;
- 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;
- O efeito da Ang-(1-7) sobre o trocador Na^+/H^+ e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se faz via receptor Mas;
- 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.

Pretendemos continuar nossos estudos analisando os efeitos da Ang-(1-7) em:

- ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles (Wistar-Kyoto),
- as vias de sinalização ativadas pela Ang-(1-7) no túbulo proximal de ratos normotensos (Wistar) e
- o papel do receptor AT1 nessa ação hormonal intratubular.

REFERÊNCIAS*

- AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- 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.
- 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. 932-936, 1993.
- ANDREATTA-VAN, S. et al. Modulation of phospholipase A2 activity and sodium transport by angiotensin-(1-7). **Kidney Int.**, v. 4, p. 932-936, 1993.
- ANIL, K. et al. Protective Importance of the Myogenic Response in the Renal Circulation. **Hypertension**, v. 54, p. 393-398, 2009.
- BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, p. 439-465, 2010.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J. Mol. Med.**, v. 86(6), p. 615-621, 2008.
- BENTER, I. F.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Cardiovascular actions of angiotensin(1-7). **Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 679-84, 1993.
- BOBULESCU, I. A.; MOE, O. W. Luminal Na/H Exchange in the proximal tubule. *Pfluger Arch.*, v. 458, n. 1, p. 5-21, 2009.
- BOER, W. H.; BRAAM, B.; FRANSEN, R.; BOER, P.; KOOMANS, H. A. Effects of reduced renal perfusion pressure and acute volume expansion on proximal tubule and whole kidney angiotensin II content in the rat. **Kidney Int.**, v. 51, p. 44-49, 1997.
- BOTELHO, L. M; BLOCK, C. H.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. Plasma angiotensina(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v.15, n.4, p.723-9, 1994.
- BOTELHO-SANTOS, G. A., SAMPAIO, W. O., REUDELHUBER, T. L., BADER, M., CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J., AND SOUZA DOS 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, p. H2485-2490, 2007.
- BOUBY, N.; HUS-CITHAREL, A.; MARCHETTI, J.; BANKIR, L.; CORVOL, P.; LIORENS-CORTES, C.. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 8, p. 1658-1667, 1997.

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

- BRAAM, B.; MITCHELL, K. D.; FOX, J.; NAVAR, G. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 264, n.5, p. F891-F898, 1993.
- BRETT, C. L.; DONOWITZ, M.; RAO, R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 288, p. C223-C239, 2005.
- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v. 27, p. 523-528, 1996.
- BROSNIHAN, K. B.; NEVES, L. A.; JOYNER, J.; AVERILL, D. B.; CHAPPELL, M. C.; SARAO, R.; PENNINGER, J.; FERRARIO, C. M. C. **Hypertension**, v. 42, p. 749-753, 2003.
- BURG, M. J.; GRANTHAM, J.; ABRAMOW, M.; ORLOFF, J. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. **Am. J. Physiol.**, v. 210, p. 1293-1298, 1966.
- BURNS, K. D.; HOMMA, T.; HARRIS, R. C. The intrarenal rennin-angiotensin system. **Semin. Nephrol.**, v. 13, p. 13-30, 1993.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DIZ, D. I.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. H324-329, 1989.
- CASTELO-BRANCO, R. C. **Efeito da angiotensina-(1-7) no fluxo reabsortivo de bicarbonato (JHCO_3^-) e na concentração citosólica de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$): estudo por microperfusão tubular proximal, *in vivo*.** 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- CASTRO, C. H.; SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; BADER, M.; ALLENINA, N.; ALMEIDA, A. P. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v. 46, p. 937-942, 2005.
- 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 Ca^{2+} in mesangial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v.414, n.2-3, p.165-75. 2001.
- COPPOLA, S.; FRÖMTER, E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO_3 cotransport and K conductance in renal proximal tubules. I. Effect of picomolar concentrations. **Pflügers Arch.** v. 427, p. 143-50, 1994.
- COPPOLA, S.; FRÖMTER, E. An electrophysiological study of angiotensin II regulation of Na-HCO_3 cotransport and K conductance in renal proximal tubules. II. Effect of micromolar concentrations. **Pflügers Arch.** v. 427, p. 151-6, 1994.
- CHOW, C. W.; KHURANA, S.; WOODSIDE, M.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. The Epithelial $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$ Exchanger, NHE3, Is Internalized through a Clathrin-mediated Pathway. **J. Biol. Chem.** V. 274, n. 53, p. 37551-37558, 1999.
- 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.

DAVID, W.; GOOD, T. G.; DONNA H. W. Angiotensin II inhibits HCO₃²⁻ absorption via a cytochrome P-450-dependent pathway in MTAL. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 276, p. F726-F736, 1999.

DEDDISH, P. A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H. L.; WANG, H. Z.; SKIDGEL, A. R.; ERDOS, E. G. N-domain specific substrate and c-domain inhibition of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, p. 912-917, 1998.

DILAURO, M.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. **Sci. World J.**, 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, p. E1-9, 2000.

DONOWITZ, M.; LI, X.; Regulatory binding partners and complexes of NHE3. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 825-872, 2007.

EGUTI D. M.; THIEME, K.; LEUNG, G. P.; 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.

FARIA-SILVA, R.; DUARTE, F. V.; SANTOS, R. A. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 948-952, 2005.

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, p. 535-541, 1997.

FERRARIO, C. M.; MARTELL, N.; YUNIS, C.; FLACK, J. M.; CHAPPELL, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; DEAN, R. H.; FERNANDEZ, A.; NOVIKOV, S. V.; PINILLAS, C.; LUQUE, M. Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. **Am. J. Hypertens.**, v. 11, p. 137-146, 1998.

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. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, p. 665-668, 2001.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 4, p.499-507. 2005.

- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, p. 1083-1090, 2002.
- FRAGA-SILVA, R. A.; PINHEIRO, S. V.; GONÇALVES, A. C.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves Mas-mediated NO release from platelets. **Mol. Med.**, v. 14, p. 28-35, 2008.
- 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, p. 1133-1138, 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.
- GEMBARDT, F.; STERNER-KOCK, A.; IMBODEN, H.; SPALTEHOLZ, M.; REIBITZ, F.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. **Peptides**, v.26, n.7, p.1270-1277. 2005.
- GIEBISCH, G.; MALNIC, G.; DE MELLO, G. B.; MELLO-AIRES, M. Kinetics of luminal acidification in cortical tubules of the rat kidney. **J. Physiol.**, v. 267, p. 571-600, 1977.
- GOOD, D. W.; WATTS, B. A. Functional roles of apical membrane Na^+/H^+ exchange in rat medullary thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 270, p. F691-F699, 1996.
- GOYAL, S.; VANDER, H. G.; ARONSON, P. S. Renal expression of novel exchanger isoform NHE8. **Am. J. Renal Physiol.**, v. 284, n.3, p. F467-F473, 2003.
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; MAO, H.; KATOVICH, M. J. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, n. 6, p. H2417-H2423, 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
- HAN, H. J.; PARK, S. H.; KOH, H. J.; TAUB, M. Mechanism of regulation of Na transport by angiotensin II in primary renal cells. **Kidney Int.**, v. 57, p. 2457-2467, 2000.
- HANDA, R. K. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 8, p. 1377-1386, 2000.
- 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. F141-147, 1996.
- HARRIS, P. J.; YOUNG, J. A. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. **Pflugers Arch.**, v. 367, p. 295-297, 1977.

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.; MALY, J.; CERVENKA, L.; HORACEK, V. Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) in the dog. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 23, p. 89-94, 2000.

HORITA, S.; ZHENG, Y.; HARA, C.; YAMADA, H.; KUNIMI, M.; TANIGUCHI, S.; UWATOKO, S.; SUGAYA, T.; GOTO, A.; FUJITA, T.; SEKI, G. Biphasic regulation of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter by angiotensin II type 1A receptor. **Hypertension**, v. 40, p. 707-712, 2002.

HOUILLIER, 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.

JOYNER, J.; NEVES, L. A.; GRANGER, J. P.; ALEXANDER, B. T.; MERRILL, D. C.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M.; DAVIS, W. P.; BROSNIHAN, K. B. Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, p. R169-177, 2007.

JOYNER, J.; NEVES, L.; FERRARIO, C.; BROSNIHAN, K. Administration of D-alanine-[Ang-(1-7)] (A-779) prior to pregnancy in Sprague Dawley rats produces antidiuresis in late gestation. **J. Am. Soc. Hypertens.**, v. 2, p. 425-430, 2008.

KATOVICH, M. J.; GROBE, J. L.; HUENTELMAN, M.; RAIZADA, M. K. Angiotensin-converting enzyme 2 as a novel target for gene therapy for hypertension. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 3, p. 299-305, 2005.

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.

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. F353-362, 2005.

LIU, F. Y.; COGAN, M. G. Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 83-91, 1989.

LOOT, A. E., Roks, A. J., Henning, R. H., Tio, R. A., Suurmeijer, A. J., Boomsma, F., and van GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, p. 1548-1550, 2002.

LU, M.; ZHU, Y.; BALAZY, M.; REDDY, K. M.; FALCK, J. R.; WANG, W. Effect of angiotensin II on the apical K^+ channel in the thick ascending limb of the rat kidney. **J. Gen. Physiol.**, v. 108, p. 537-547, 1996.

MAGALDI, A. J.; CESAR, K. R.; DE ARAUJO, M.; SIMOES 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, p. 223-230, 2003.

MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 220, p. 1759-1767, 1971.

MELLO-AIRES, M.; LOPES, M. J.; MALNIC, G. PCO_2 in renal cortex. **Am. J. 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.

MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; 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, n. 11, p. 1319-1326, 2008.

MOE, O. W. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.10, n. 11, p. 2412-2425, 1999.

MOE, O. W.; KAZUTOMO, U.; STAR, R. A.; MILLER, R. T.; WILDELL, J.; ALPERN, R. J.; HENRICH, W. L. Renin expression in renal proximal tubule. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 774-779, 1993.

MOE, O. W.; Sodium-hydrogen exchange in renal epithelia: mechanisms of acute regulation. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.6, n.5, p. 440-446, 1997.

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.**, v. 205, p. 49-60, 2005.

NAGAMI, G. T. Effect of angiotensin II on ammonia production and secretion by mouse proximal tubules perfused in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 925-931, 1992.

NAVAR, L. G.; HARRISON-BERNARD, L. M.; WANG, C. T.; CERVENKA, L.; MITCHELL, K. D. Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 10, p. S189-S195, 1999.

NAVAR, L. G.; INSCHO, E. W.; MAJID, S. A.; IMIG, J. D.; HARRISON-BERNARD, L. M.; MITCHELL, K. D. Paracrine regulation of the renal microcirculation. **Physiol. Rev.**, v. 76, p. 425-536, 1996.

OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of arginine vasopressin and ANP on intracellular pH and cytosolic free $[Ca^{2+}]$ 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 pH_i regulation in MDCK cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. F944-F953, 2000.

ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. **Pflugers Arch: Eur. J. Physiol.**, v. 447, p. 549-65, 2004.

PINHEIRO, S. V. B.; FERREIRA, A. J.; KITTEN, G. T.; DA SILVEIRA, K. D.; DA SILVA, D. A.; SANTOS, S. H.; GAVA, E.; CASTRO, C. H.; MAGALHÃES, J. A.; DA MOTA, R. K.; BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A.; SIMOES 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.

PORSTI, I.; BARA, A. T.; BUSSE, R.; HECKER, M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 111, p. 652-654, 1994.

QUAN, A.; BAUM, M. Endogenous production of angiotensin II modulates rat proximal tubule transport. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 2878-2882, 1996.

REN, Y.; GARVIN, J. L.; CARRETERO, O. A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. **Hypertension**, v. 39, p. 799-802, 2002.

REN, Y.; GARVIN, J. L.; CARRETERO, O. A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. **Hypertension**, v. 39, p. 799-802, 2002.

ROKS, A. J. M. et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 34, p. 296-301, 1999.

SAMPAIO, W. O.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS, R. A. S. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 284, p. H1985-1994, 2003.

SAMPAIO, W. O.; SANTOS, R. A. S.; SILVA, R. F.; MACHADO, L. T. M.; SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Angiotensin-(1-7) through receptor MAS mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-192, 2007.

SANTOS, R. A.; SIMOES 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, p. 8258-63, 2003.

SANTOS, R. A. S.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; AND FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, p. 1153-157, 1988.

SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul. Pept.**, v. 91, p. 45-62, 2000.

SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BARACHO, N. C.; FONTES, M. A.; SILVA, L. C.; NEVES, L. A.; OLIVEIRA, D. R.; CALIGIORNE, S. M.; RODRIGUES, A. R.; GROPEN, J. C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res. Bull.**, v. 35, p. 293-298, 1994.

SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; SIMÕES E SILVA, A. C. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 3, p. 227-236, 2000.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the rennin angiotensin system. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.16, p. 122-128, 2007.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N.; DE ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BALATU, O.; ILIESCU, R.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiol. Genomics**, v. 17, p. 292-299, 2004.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES E SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp. Physiol.**, v. 93, p. 519-527, 2008.

SANTOS, R. A.; SIMOES 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. 875-884, 1996.

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.

SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 11, p. 4095-98, 1988.

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.

SILVA, D. M.; VIANNA, H. R.; CORTES, S. F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S.; LEMOS, V. S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. **Peptides**, v. 28, p. 702-707, 2007.

SIMÕES E SILVA, A. C.; BARACHO, N. C. V.; PASSAGLIO, K. T.; SANTOS, R. A. S. 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. 177-184, 1998.

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, p. 2212-2218, 2006.

TAKAHASHI, A.; CAMACHO, P.; LECHLEITER, J. D.; HERMAN, B. Measurement of intracellular calcium. **Physiol. Rev.**, v. 79, 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, p. H1560-H1566, 2005.

THOMSON, S. C.; DENG, A.; WEAD, L.; RICHTER, K.; BLANTZ, R. C.; VALLON, V. An unexpected role for angiotensin II in the link between dietary salt and proximal reabsorption. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1110-1116, 2006.

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, p. 33238-33243, 2000.

TOJO, A.; TISHER, C. C.; MADSEN, K. M. Angiotensin II regulates H1-ATPase activity in rat cortical collecting duct. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 267, p. F1045-F1051, 1994.

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, 1997.

VAN DER WOUDE, E. A.; OCHODNICKY, P.; VAN DOKKUM, R. P.; ROKS, 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, p. 1971-1978, 2006.

VELKOSKA, E.; DEAN, R. G.; BURCHILL, L. J.; LEVIDIOTIS, V.; BURRELL, L. M. Reduction in renal ACE2 expression in subtotal nephrectomy is ameliorated with ACE inhibition. **Clin. Sci.**, v. 118, p. 269-279, 2010.

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, p. 14838-43, 2002.

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.

WAKABAYASHI, S.; FAFOURNOUX, C.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J. The Na^+/H^+ antiport cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls “ H^+ -sensing”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2424-2428, 1992.

WEBER, K. T. Aldosterone in congestive heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 23, p. 1689-1697, 2001.

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, p. 496-502, 1998.