

## SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: da Fisiologia ao Tratamento

\* Katya Vianna Rigatto, \*\* Maristela Böhlke, \*\*\* Maria Cláudia Irigoyen

\* Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

\*\* Escola de Medicina, Universidade Católica de Pelotas

\*\*\* Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração – São Paulo

A pressão arterial (PA) depende de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco, a resistência periférica e a capacitância venosa, e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos. A manutenção (componente tônico), bem como a variação momento a momento da PA (componente fásico) dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados nesses componentes, de maneira a manter a PA o mais estável possível. Dessa forma, os mecanismos que promovem desequilíbrio entre os fatores pressores e depressores e induzem alteração do calibre das arteríolas merecem especial atenção.

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com a homeostasia hidroeletrolítica do organismo e o controle da PA (1), estimulando também a liberação de aldosterona pelo córtex da supra renal. No entendimento clássico do SRA, a substância ativa angiotensina II (Ang II) é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados e exerce suas ações em órgãos-alvo, distantes do local de produção (2).

A importância do rim na hipertensão surgiu após os primeiros experimentos, realizados por Robert Tigerstedt e Peter Bergman, em 1898, demonstrando que o extrato renal possuía uma substância capaz de elevar a pressão arterial (3). O envolvimento da PA no controle da liberação de renina foi mostrado pela primeira vez pelo grupo de Goldblatt, em 1934, quando ficou estabelecido que uma substância vasopressora era liberada pelo rim em resposta a hipovolemia e/ou hipotensão. Esta substância foi posteriormente identificada como sendo a renina liberada pelo aparelho justaglomerular (4).

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada como pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina, e posteriormente em renina ativa, a qual é armazenada e liberada de imediato após estímulo. Quando é liberada na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio, formando a angiotensina I. Esta, por sua vez é clivada pela enzima de conversão da angiotensina I (ECA), produzindo a angiotensina II, que é um hormônio biologicamente ativo (5). Apesar da angiotensina II ser a substância ativa mais importante do SRA, outras angiotensinas produzidas têm ações específicas e, entre as melhores caracterizadas até o momento, estão as angiotensinas III, IV e a angiotensina (1-7) (6). Todas estas angiotensinas podem ser produzidas a partir do mesmo precursor, o angiotensinogênio, por ação da renina e outras reações enzimáticas.

A rápida expansão das técnicas de biologia molecular permitiu que os componentes do SRA fossem clonados e seqüenciados (7), o que possibilitou a determinação da distribuição tecidual de seus componentes. Por isso, de modo diferente visão endócrina clássica, hoje se fala em sistemas renina-angiotensina teciduais, com funções parácrinas, autócrinas e epícrinas (8), tendo-se observado todos ou quase todos os seus componentes em tecidos como o coração (9), vasos (10), rim (11) entre outros. A angiotensina II formada nestes tecidos regula a expressão de fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão, as quais estão envolvidas no crescimento celular/apoptose, na fibrose e inflamação (2).

Há décadas a angiotensina II é estudada, e acreditava-se que seu efeito fosse mediado por um único receptor. No final dos anos

80, estudos com antagonistas específicos identificaram os subtipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (12). Até o início da década de 90, as ações da angiotensina II eram atribuídas ao receptor AT<sub>1</sub>, sendo as funções do AT<sub>2</sub> pouco conhecidas (13). Em 1992, Sasamura e colaboradores (14) clonaram e caracterizaram duas isoformas do AT<sub>1</sub>: AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub>. Hoje sabemos que existem vários tipos de receptores AT envolvidos em ações específicas da angiotensina II ou das outras angiotensinas. Recentemente foi demonstrado que os receptores AT<sub>1A</sub> têm papel essencial no desenvolvimento da hipertensão 2 rims 1 clipe de Goldblatt (15). Além disso, algumas ações dos receptores AT<sub>2</sub> funcionalmente se opõem às ações dos receptores AT<sub>1</sub> (16) podendo a própria angiotensina II agir de modo simultâneo sobre ambos os receptores, de modo a permitir uma modulação de seus efeitos (17).

Estudos recentes têm ampliado nosso conhecimento sobre eventos celulares mediados pela angiotensina II, sugerindo que seu papel biológico é tão amplo que vai do intracelular ao tecido ou ao sistema (18).

Outra importante função do SRA refere-se ao seu envolvimento na modulação da biodisponibilidade do óxido nítrico por meio do estímulo à produção de ânion superóxido. A diminuição do NO avaliável é encontrada em várias formas de lesão vascular e a redução do NO, *per se* ou de seu efeito vasodilatador, são fatos comuns na disfunção endotelial devida à hipertensão (19), à hipercolesterolemia (20) e ao diabetes (21). A vasodilatação NO-dependente ocorrerá em função da quantidade de NO disponível, e isto depende do aumento na sua produção ou da redução de sua degradação.

As células endoteliais estão em posição estratégica na parede do vaso, recebendo sinais hemodinâmicos e humorais e funcionando como efetoras de respostas adaptativas locais (22). As espécies ativas de oxigênio (EAO), principalmente o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) participam do processo de disfunção endotelial (23) por reduzirem a biodisponibilidade de NO. O NO é retirado pela reação com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> produzindo a molécula peroxinitrito, altamente deletéria e que reduz os efeitos vasodilatador, antiproliferativo, antiinflamatório e antiaterogênico do óxido nítrico (24). Esta idéia fica mais clara quando se provoca a superexpressão da enzima superóxido dismutase *in vivo*, que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), retirando o O<sub>2</sub><sup>-</sup> e revertendo a disfunção endotelial (25). Além disso, a Ang II é um importante fator de crescimento celular estando correlacionada com o surgimento da hipertrofia vascular e cardíaca, que acompanham os quadros hipertensivos.

Nos vasos, a ativação dos receptores AT<sub>1</sub> promove aterogênese e induz estresse oxidativo (26). De fato, a angiotensina II em células vasculares endoteliais humanas provoca a formação de espécies reativas de oxigênio como o O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, via ativação da NADH/NADPH oxidases. Como consequência aparecem hiperplasia e hipertrofia da célula muscular lisa (27-28).

A atividade das oxidases vasculares é aumentada de modo substancial pela angiotensina II que, via NADH e NADPH, aumenta a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> em cultura de células musculares lisas (29) bem como em células endoteliais (30). Importantes achados *in vivo* confirmam as observações feitas *in vitro*, mostrando que a infusão de angiotensina resulta em hipertensão acompanhada de disfunção endotelial e aumento da produção vascular de O<sub>2</sub> (29).

O SRA também é modulado por hormônios sexuais. O estradiol

apresenta efeitos vasculares com importante redução da síntese de potentes vasoconstritores como a angiotensina II, endotelina-1 e catecolaminas (31). Ao contrário da testosterona, o estrogênio apresenta no músculo cardíaco, propriedades antioxidantes (32), o que, em parte, contribuiu para o maior número de eventos cardiocirculatórios em homens do que em mulheres. O estrogênio ainda diminui a atividade da enzima NADPH oxidase (33), efeito que contrapõe o da Ang II, diminuindo a formação de ânion superóxido. Fisiologicamente, como as principais ações hipertensivas da angiotensina II no sistema cardiovascular são mediadas pela interação do hormônio com o receptor do tipo AT<sub>1</sub>, o uso de seus bloqueadores e inibidores da ECA tem sido preconizado como potentes antioxidantes (34).

A produção de mediadores autócrinos e parácrinos como o NO, prostaglandinas, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, endotelina e Ang II, determinam o balanço entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, trombose e anticoagulação além da modulação da resposta inflamatória (35). Nas lesões ateroscleróticas humanas, o SRA local está ativado, com o vaso comprometido expressando altos níveis de ECA, Ang II e AT<sub>1</sub> (36). Além disso, os monócitos/macrófagos presentes nas lesões vasculares expressam elevada atividade ECA (37).

Estudos recentes têm demonstrado que a Ang II atua como potente agente pró-inflamatório, modulando respostas como quimiotaxia, proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos, por meio do aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas (38). A Ang II induz a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais (39). Em ratos *knockout* para apolipoproteína E, a infusão de Ang II causa patologia vascular caracterizada por aterosclerose e aneurisma na ausência de hipertensão, mas dependente de estado hiperlipêmico (40), mostrando que os efeitos da Ang II podem ser diretos e independentes de alterações na pressão arterial. A potencial explicação é de que a Ang II promove reação inflamatória na parede vascular pela da ativação de múltiplos tipos celulares. Provavelmente os efeitos inflamatórios deste hormônio são mediados pela ativação do fator nuclear kB (NF-kB), o qual induz a expressão de genes pró-inflamatórios, como IL-6, VCAM-1 e MCP-1 (38,41).

Estes achados experimentais podem explicar os resultados obtidos no estudo *Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE), o qual mostrou que o uso crônico de inibidor da ECA pode reduzir as taxas de eventos cardiovasculares de forma independente de faixa etária, sexo, infarto prévio, presença de hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes ou microalbuminúria (42).

Os inibidores da ECA pertencem a uma categoria de drogas com uso crescente em uma variedade de doenças, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, nefropatia diabética e outras formas de nefropatia (43). Além de converter Ang I em Ang II, a ECA também inativa as cininas (44); portanto os inibidores da ECA aumentam os níveis de bradicinina, o que contribui para seu efeito anti-hipertensivo. Além de reduzir a pressão arterial, os inibidores da ECA promovem regressão da hipertrofia ventricular (45), melhoram a disfunção endotelial (46), diminuem a morbi-mortalidade associada à insuficiência cardíaca (47), reduzem a mortalidade e melhoram a função cardíaca pós-infarto (48) e reduzem a progressão da nefropatia diabética (49) e de outras nefropatias (50). Estes marcantes sucessos dos inibidores da ECA estimularam a busca por drogas alternativas para o bloqueio do SRA, com o desenvolvimento dos antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> da Ang II. Como o receptor AT<sub>1</sub> parece ser o mediador dos efeitos fisiológicos da Ang II no sistema circulatório, supunha-se que estas drogas bloqueariam os efeitos cardiovasculares da Ang II de forma mais completa, específica e durável quando comparados aos inibidores da ECA. Além disso, a incidência de para-efeitos deveria ser menor em função da especificidade do bloqueio. Com o uso clínico dos bloqueadores AT<sub>1</sub>, sua farmacologia tornou-se melhor conhecida. Estas drogas bloqueiam o AT<sub>1</sub>, mas não o AT<sub>2</sub>. Ao mesmo tempo, os níveis de Ang II aumentam, podendo ocorrer estimulação exagerada dos receptores AT<sub>2</sub>. Evidências preliminares sugerem que a estimulação do AT<sub>2</sub> pode contribuir para o efeito vasodilatador do medicamento (51). No entanto, achados mais recentes apontam para efeitos pró-inflamatórios, fibróticos e proliferativos da estimulação do AT<sub>2</sub> (52). Além disso, o AT<sub>2</sub> tem uma expressão maior em tecidos humanos em relação a tecidos de ratos, dificultando a extrapolação de resultados obtidos com estas drogas em modelos experimentais (43).

Atualmente um grande número de bloqueadores AT<sub>1</sub> está aprovado para uso clínico; no entanto, devem ser usados com reserva. Como são medicamentos mais recentes, um menor número de estudos

está disponível. Embora os inibidores da ECA e os antagonistas AT<sub>1</sub> bloqueiem o mesmo sistema, evidências experimentais sugerem que seus mecanismos de ação diferem em vários aspectos, como aumento dos níveis de bradicinina e Ang 1-7 com inibidores da ECA e ativação do receptor AT<sub>2</sub> com bloqueadores AT<sub>1</sub>. A significância clínica destas diferenças permanece em grande parte desconhecida e, na prática, a única vantagem comprovada do antagonista AT<sub>1</sub> sobre os inibidores da ECA é a ausência da tosse como para-efeito (43). Além disso, por se tratar de medicamentos patenteados, apresentam um custo significativamente mais elevado em relação aos inibidores da ECA.

Achados clínicos recentes sugerem que o uso combinado destas duas classes de medicamentos oferece efeitos aditivos na redução da pressão arterial, da proteinúria na nefropatia e na melhora do prognóstico na insuficiência cardíaca (53). No entanto, alguns estudos mostram resultados desfavoráveis, como o ensaio clínico Val-HeFT, o qual mostrou uma tendência a aumentar o risco de morte ou hospitalização quando o valsartan foi prescrito a pacientes portadores de insuficiência cardíaca em uso prévio de inibidor da ECA e b bloqueador (54).

## O futuro dos Sistemas Renina-Angiotensina

Sabe-se hoje que, além da Ang II (ou Ang 1-8), vários outros peptídeos formados a partir da clivagem do decapeptídeo inativo angiotensina I (Ang I ou Ang 1-10), tais como Ang 1-9, Ang 1-7, Ang IV, Ang III (55,56) e Ang 1-5 (57), apresentam efeitos fisiológicos. A conversão da Ang I no potente octapeptídeo vasoconstritor Ang II é realizada pela ECA. Esta enzima também promove a inativação da bradicinina, importante vasodilatador (58), o que confere a ECA propriedades duplamente vasoconstritoras.

Outro importante peptídeo derivado da Ang I é a Ang IV ou Ang II-(3-8) que se liga com especificidade aos receptores AT<sub>4</sub> produzindo uma série de efeitos fisiológicos, entre eles: aumento do fluxo sanguíneo renal cortical (59), natriurese (60) e relaxamento da artéria pulmonar (61). O receptor AT<sub>4</sub> é farmacologicamente diferente dos bem caracterizados AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> para Ang II. Possui alta afinidade pela Ang IV e baixa afinidade pela Ang II e ainda não reconhece o Losartan (seletivo antagonista AT<sub>1</sub>) e o PD123319 (seletivo antagonista AT<sub>2</sub>) (62,63).

O angiotensinogênio também dá origem ao peptídeo Ang III que apresenta muitas funções fisiológicas similares às ações da Ang II nos sistemas nervoso e cardiovascular, incluindo resposta pressórica, liberação de vasopressina, consumo de água e atividade pró-inflamatória (64). Alguns dados recentes sugerem que a Ang III possa estar envolvida também em alguns processos patológicos. Em doenças como hipertensão, diabetes melitos e nefrites, a atividade renal da aminopeptidase A (enzima que degrada Ang II em Ang III) está aumentada (65). Nas células mesangiais, a Ang III aumenta a expressão de genes relacionados ao crescimento, pró-fibróticos e pró-inflamatórios, possivelmente contribuindo para a progressão do dano renal nestas doenças (66). A Ang III exerce suas atividades fibróticas e inflamatórias ativando o NF-kB, assim como ocorre com a Ang II. No entanto, a atividade da Ang III sobre o NF-kB é mediada pelo receptor AT<sub>2</sub>, enquanto a mesma ação da Ang II ocorre via AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (67). Embora sejam necessários mais estudos, este achado poderia explicar as diferenças observadas entre inibidores da ECA e antagonistas AT<sub>1</sub> nas respostas inflamatórias em modelos experimentais de doença renal (65).

Fica claro que a partir dos novos conhecimentos sobre o SRA, abrem-se novos horizontes, tanto na prevenção quanto no futuro tratamento da doença cardiocirculatória. De igual importância é a recente descoberta da enzima ECA2 (68), que contribui para as importantes modificações pela qual a visão clássica do SRA, vem passando. O reconhecimento da atividade biológica de outros peptídeos do SRA com importante repercussão fisiológica, tais como o efeito vasodilatador da Ang 1-7 (69), e o potencial envolvimento da ECA2 tanto na degradação da Ang II para formar Ang 1-7 (70), quanto seu efeito na clivagem da Ang I para formar Ang 1-9 (71), aumentam a complexidade do SRA.

Os efeitos da ECA2, que apresenta apenas um sítio enzimático ativo e funciona como uma carboxipeptidase, consistem tanto na remoção de um resíduo aminoácido da Ang I para gerar a Ang 1-9, um peptídeo ainda com função desconhecida (68), como degradar a Ang II para forma o peptídeo biologicamente ativo Ang 1-7 (72). A Ang 1-7 teve seu efeito cardioprotetor recentemente reconhecido, apresentando ação vasodilatadora, antiproliferativa (69) e diurética (55). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a

eficiência catalítica da ECA2 para clivar a Ang II e formar Ang 1-7 é 400 vezes maior do que para a Ang I (72), além de não ter efeito catalítico sobre a bradicinina (68,72). Esses resultados indicam que provavelmente limitar a ação vasoconstritora da Ang II e ao mesmo tempo facilitar o efeito vasodilatador da bradicinina, sejam seus efeitos fisiológicos mais importantes.

Ainda não se sabe se os substratos *in vivo* da ECA2 são os mesmos até agora demonstrados *in vitro*, indicando a necessidade de mais estudos para esclarecer o papel fisiológico da ECA2. Esses estudos podem ser realizados tanto em animais *knockout* (73) como transgênicos (74) para ECA2; ou mediante uso de seus agonistas ou antagonistas seletivos (75). É possível que o balanço entre os peptídeos vasodilatadores e vasoconstritores da angiotensina sejam importantes na modulação dos efeitos hemodinâmicos e tróficos desses peptídeos no contexto da doença cardíaca isquêmica (71).

A identificação da ECA2 no coração e no rim, sua modulação na insuficiência cardíaca e diabetes, e a recente descrição dessa enzima na geração e degradação dos peptídeos da angiotensina, são fatos provocativos na condução de novos estudos para tentar compreender a fisiopatologia da isquemia miocárdica, insuficiência renal, aterosclerose e diabetes.

Além disso, a intervenção no sistema RAS com terapia genética pode representar uma possibilidade de reverter hipertensão já estabelecida. A injeção intracardíaca de particular virais contendo oligonucleotídeos anti-senso para angiotensinogênio ou receptor AT<sub>1</sub> em ratos adultos espontaneamente hipertensos resultou em uma redução de 30 a 60 mmHg na pressão arterial, com resposta sustentada por 36 dias. Este efeito foi acompanhado por melhora na reatividade vascular e reversão da disfunção endotelial em arteríolas renais (76). A liberação de ECA anti-senso por meio de retrovírus em ratos espontaneamente hipertensos produziu uma resposta anti-hipertensiva modesta que persistiu até 100 dias (77). Uma avaliação otimista destes resultados é prejudicada pela natureza transitória e modesta da resposta terapêutica, o que pode refletir a natureza multifatorial da doença, assim como a eficiência ainda limitada da transferência gênica. Apesar das dificuldades envolvidas, o uso de terapia genética combinada talvez possa ser uma forma mais efetiva e racional de obter melhores efeitos terapêuticos.

Considerando que as doenças cardiovasculares serão em 2020 a principal causa de morte, embora os atuais tratamentos para bloquear as ações do SRA tenham sido muito proveitosos, fica claro que outras vias e enzimas podem modular os efeitos da Ang II (71), abrindo novas alternativas no tratamento da hipertensão.

## Referências Bibliográficas

1. Menard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens* 1993; Suppl 11:S3-11
2. Dzau VJ, Pratt RE. Renin angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. In: *The heart and cardiovascular system*. New York: Raven Press, 1986:1631-62
3. Inagami T. A memorial to Robert Tiegerstedt - the centennial of renin discovery. *Hypertension* 1998;32:953-7
4. Phillips MI, K. M. Schmidt-Ott. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci* 1999;14:271-4
5. Tamura K, Umemura S, Fukamizu A, Ishii M, Murakami K. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. *Hypertens Res* 1995;18:7-18
6. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): un update. *Regul Pept* 2000;91:45-62
7. Dzau VJ, Krieger JE, Hutchinson H. Molecular mechanisms in hypertension. In: Haber E, eds. *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific American Inc, 1995: 225-42
8. Beevers DG, Lip GH, O'Brien E. ABC of hypertension – the pathophysiology of hypertension. *BMJ* 2001;322:912-6
9. Danser AHJ, Saris JJ, Schuijt MP, Van Kats JP. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res* 1999;44:252-65

10. Samani NJ, Swales JD. Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system. *Blood Vessels* 1991;28:210-6

11. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, Lalouel JM. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 1999;34:1265-74

12. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000;35:155-63

13. Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:S30-S9.

14. Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Cloning, characterization and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:253-9.

15. Èervenka L, Horàèek V, Vanièková I, Hubàèek JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar LG. Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 2002;40:735-41

16. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 2000;239:316-22

17. Arima S, Ito S. New insights into actions of the renin-angiotensin system in the kidney: concentrating on the Ang II receptors and the newly described Ang-(1-7) and its receptor. *Semin Nephrol* 2001;21:535-43.

18. Taubman MB. Angiotensin II – a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. *Circ Research* 2003;92:9-11

19. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-7

20. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990;86:228-34.

21. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992;90:2548-54

22. Irigoyen MC, Oliveira AR, D'Ávila KAL, Fiorino P, Dall'Ago P, Lacchini S. Alterações funcionais do sistema cardiovascular durante o envelhecimento. In: Jeckel-Neto EA, da Cruz IB, eds. *Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000: 337-70

23. Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 1997;30:934-41

24. Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82:1298-305

25. Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, Hamilton CA, Alexander MY, Nicklin SA, Heistad DD, Baker AH, Dominiczak AF. Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther* 2002;9:110-7

26. Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 1996;334:1649-54

27. Zhang H, Schmeisser A, Garlachs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 1999;44:215-22

28. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998;32:488-95
29. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-23
30. Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ Res* 2000;86:463-9
31. Schunkert H, Danser AHJ, Hense HW et al. Effects of estrogen replacement therapy on renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 95:39-45
32. Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(9):1075-81
33. Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002;39:405-11
34. Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T. Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann NY Acad Sci* 1999;874:386-400
35. Faxon DP et al. Atherosclerotic vascular disease conference. *Circulation* 2004;109:2617-25
36. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H 2000 Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 101:1372-1378
37. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ 1996 Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary disease. *Circulation* 94:2756-2767
38. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J 2001 Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypert* 10:321-329
39. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL 1996 Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 226:862-868
40. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR 2001 Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 23: 448-454
41. Han Y, Runge MS, Brasier AR 1999 Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- $\kappa$ B transcription factor. *Circ Res* 84:695-703
42. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G 2000 Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril on cardiovascular events in high risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145-153
43. Cheung BMY. Blockade of the renin-angiotensin system. *HKMJ* 2002;8:185-91
44. Gavras H. Corcoran Lecture. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension* 1994;23:813-8
45. Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens* 1992;5:95-110
46. Mancini GB, Henry GC, Macaya C et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996;94:258-65
47. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429-35
48. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyet LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992;327:669-77
49. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1456-62
50. Maschio G, Alberti P, Janin G. ACE inhibition in progressive renal insufficiency study group: effect of the angiotensin-converting-enzyme benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 1996;334:939-45
51. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999;33:613-21
52. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RAK. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 1997;100:1047-58
53. Stergiou GS, Skeva II. Renin-angiotensin system blockade at the level of the angiotensin converting enzyme or the angiotensin type-1 receptor: similarities and differences. *Curr Top Med Chem* 2004;4(4):473-81
54. Cohn JN, Tognoni G, for the Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of angiotensin-receptor blocker Valsartan in chronic heart failure. *N Eng J Med* 2001;345:1667-75
55. Ferrario CM, Chappel MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function and natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1716-22
56. Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci* 1989;5:151-3
57. Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D. Local rennin-angiotensin system in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology* 1995;86: 2-8.
58. Erdos EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med* 1976;60:749-59
59. Coleman JK, Krebs LT, Hamilton TA, Ong B, Lawrence KA, Sardinia MF et al. Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. *Peptides* 1998;19:269-77
60. Hamilton TA, Handa RK, Harding JW, Wright JW. A role of the angiotensin IV-AT<sub>4</sub> system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides* 2001;22:935-44
61. Chen S, Patel JM, Block ER. Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L849-56
62. Bernier SG, Fournier A, Guillermette G. A specific binding site recognizing a fragment of angiotensin II in bovine adrenal cortex membranes. *Eur J Pharmacol* 1994;271:55-63
63. Rival L, Galzin AM. Pharmacological characterization of a specific binding site for angiotensin IV in culture porcine aortic endothelial

64. Ardailou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* 1997;52:1458-68
65. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Mezzano S, Egido J. Renin angiotensin system and renal damage: emerging data on angiotensin II as a proinflammatory mediator. *Contribution Nephrology* 2001;135:123-37
66. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III upregulates genes involved in kidney damage in cultured mesangial cells and renal interstitial fibroblast. *Kidney Int* 1998;54:S41-S45
67. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J 2001 Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases – Expanding the field. *Hypertension* 38:1382-1387
68. Donoghue M et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87: E1-E9
69. Ferrario CM et al. Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension* 1997;30:535-41
70. Oudit GY et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:93-101
71. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Endocrinology and Metabolism* 2004;15:166-9
72. Vickers C et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:14838-43
73. Crackower MA et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-8
74. Donoghue M et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1043-53
75. Huang L et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 2003;278:15532-40
76. Katovich MJ, Gelband CH, Reaves PY, Wang H, Raizada MK. Reversal of hypertension by angiotensin II type 1 receptor antisense gene therapy in the adult SHR. *Am J Physiol* 1999;46:1260-4  
Gelband CH, Wang H, Gardon ML, Keene K, Goldberg DS, Reaves PY, Katovich MJ, Raizada MK. ACE antisense prevents altered renal vascular reactivity, but not high blood pressure in the SHR. *Hypertension* 2000;35:209-13