

SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, NOVAS EVIDÊNCIAS NA FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO: IMPORTÂNCIA PARA A PRÁTICA CLÍNICA

RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM, NEW EVIDENCE IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF HYPERTENSION: CRITICAL ROLE FOR THE CLINICAL PRACTICE

Resumo

Ingrid Kazue Mizuno Watanabe¹,
Dulce Elena Casarini¹

1. Disciplina de Nefrologia,
Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo
Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino,
CEP: 04023-900, São Paulo, Brasil

Correspondência:
Dulce Elena Casarini
Email: decasarini@gmail.com;
casarini.elena@unifesp.br

O Sistema Renina Angiotensina é reconhecidamente um poderoso determinante da homeostase e da hemodinâmica renal e cardiovascular. Nos últimos anos, os estudos têm focado o eixo angiotensina II (Ang II)/receptor AT1 e o eixo angiotensina 1-7 (Ang 1-7)/receptor Mas, evidenciando que a atividade dos peptídeos é modulada com a Ang1-7 antagonizando as ações da Ang II. As ações da Ang II, via receptor AT1, relacionadas à vasoconstrição, estresse oxidativo, inflamação, proliferação e fibrose são equilibradas pelas ações da Ang 1-7, mediadas pelo receptor Mas, que levam à vasodilatação, inibem o estresse oxidativo, a proliferação e a fibrose tecidual. O balanço obtido entre os eixos parece conduzir as ações do sistema para condições fisiológicas ou para o desenvolvimento de patologias, e sobretudo, tem dissociado o sistema circulante do tecidual. O conhecimento de marcadores biológicos que possam ser utilizados no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares é de extrema importância para o desenvolvimento e aprimoramento de métodos terapêuticos e profiláticos incluindo novas drogas.

Palavras-chave: Hipertensão, Sistema Renina- Angiotensina, Biomarcadores.

Abstract

The Renin Angiotensin System has a critical role in renal and cardiovascular homeostasis and hemodynamics. In recent years, studies have focused in the two main axes of RAS: angiotensin II (Ang II)/AT1 receptor and angiotensin 1-7 axis (Ang 1-7)/Mas receptor, evidencing that the peptide activity is modulated with Ang1-7 antagonizing the actions of Ang II. The actions of Ang II, via the AT1 receptor, related to vasoconstriction, oxidative stress, inflammation, proliferation and fibrosis, are balanced by the actions of Ang 1-7. These, in turn, are mediated by the Mas receptor, but lead to vasodilation and inhibit oxidative stress, proliferation and tissue fibrosis. The balance obtained between the axes of the system appears to lead to physiological conditions or pathologies, and above all, has disassociated the circulatory system from the tissue system. The discovery of biomarkers that may be useful in the diagnosis and prognosis of cardiovascular diseases is critical for the development and improvement of therapeutic and prophylactic approaches, including new drugs.

Keywords: Hypertension, Renin-Angiotensin System, Biomarkers.

Introdução

A hipertensão arterial é uma doença complexa, multifatorial e poligênica dependente da dieta, fatores demográficos e genéticos, resultante do desequilíbrio de vários sistemas, sendo considerada um problema de saúde pública e um fator de risco para doenças cardiovasculares, promovendo a insuficiência cardíaca, renal e acidente vascular cerebral¹.

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é reconhecido como um poderoso determinante da homeostase e da hemodinâmica renal e cardiovascular. A relação entre a

fisiologia do SRA e diversas doenças cardiovasculares e renais está longe de ser compreendida. As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior parte das taxas de morbidade e mortalidade na maioria dos países. Dentre os diversos fatores de risco estão hipertensão, obesidade, diabetes. A influência do SRA sobre as funções cardiovasculares e renais é extremamente ampla e complexa, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular variados.

A associação entre hipertensão, obesidade e diabetes é atualmente um importante problema de saúde pública. O conhecimento de marcadores biológicos que possam ser utilizados no diagnóstico e prognóstico dessas doenças é de extrema importância para o desenvolvimento e aprimoramento de métodos terapêuticos e profiláticos incluindo novas drogas. O SRA foi descrito há mais de 100 anos como uma cascata enzimática formada pela renina, responsável pela clivagem do angiotensinogênio hepático e subsequente geração da angiotensina I (Ang I), que é convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina I (ECA)². Nos últimos anos, esse conceito sofreu inúmeras alterações, principalmente pela descoberta de novos peptídeos, enzimas e receptores que foram incorporados ao sistema, tornando-o bastante complexo, porém, originando possibilidades de desenvolvimento de novas terapias anti-hipertensivas e cardioprotetoras (Figura 1)^{3,4}.

A descoberta da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)⁵, responsável pela formação da angiotensina 1-7 (Ang 1-7) a partir da Ang II, ampliou o escopo dos mecanismos regulatórios que governam o SRA. Novos peptídeos também foram incorporados no sistema, incluindo a angiotensina III (Ang III), angiotensina IV (Ang IV) e a angiotensina 1-12 (Ang 1-12). Os níveis plasmáticos da Ang 1-12, isolada do intestino, coração, aorta e rim, não são alterados após a inibição da renina ou nefrectomia bilateral, sugerindo que existe um efeito local desse peptídeo nos tecidos, independente da circulação sistêmica^{6,7}. A complexidade do sistema ainda engloba os receptores MAS para a Ang 1-7, da pró-renina (PPR) e do peptídeo Ang IV, o AT4 (Figura 1).

Estudo recentes demonstraram que a hidrólise da Ang 1-12, no plasma de ratos normais ou hipertensos, gera Ang I e é resultado da ação da ECA⁸. A conversão da Ang 1-12 em Ang I parece ser tecido-específica, uma vez que há indicativos de que a quimase é a enzima capaz de clivar a Ang 1-12 no coração⁹. Um novo peptídeo foi descrito em plasma humano de pacientes com doença renal crônica denominado alamandina, um heptapeptídeo com propriedades similares a Ang 1-7¹⁰.

Não podemos deixar de relatar que a aldosterona interage com Ang II fazendo parte do SRA e exercendo seus efeitos através de um receptor específico, acarretando efeitos variados tais como retenção de sódio, conservação de potássio durante a hipovolemia e secreção de potássio na hipercalemia, sendo o rim, portanto, seu principal alvo. A ação da aldosterona nas porções terminais do néfron engloba o cotransportador Na⁺Cl⁻, o canal transportador de Na⁺ (Enac) e o transportador de K⁺ (ROMK)^{11,12}.

Nos últimos anos, os estudos têm focado o eixo Ang II/receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) e o eixo Ang 1-7/Mas, evidenciando que a atividade dos peptídeos é modulada com a Ang1-7 antagonizando as ações da Ang II. Nesse contexto, as ações da Ang II, via receptor AT1, relacionadas a vasoconstrição, estresse oxidativo, inflamação, proliferação e fibrose são equilibradas pelas ações da Ang 1-7, mediadas pelo receptor Mas, que levam à vasodilatação, inibem o estresse oxidativo, a proliferação e a fibrose tecidual. O balanço obtido entre os eixos parece conduzir as ações do sistema para condições fisiológicas ou para o desenvolvimento de patologias, e sobretudo, tem dissociado o sistema circulante do tecidual.

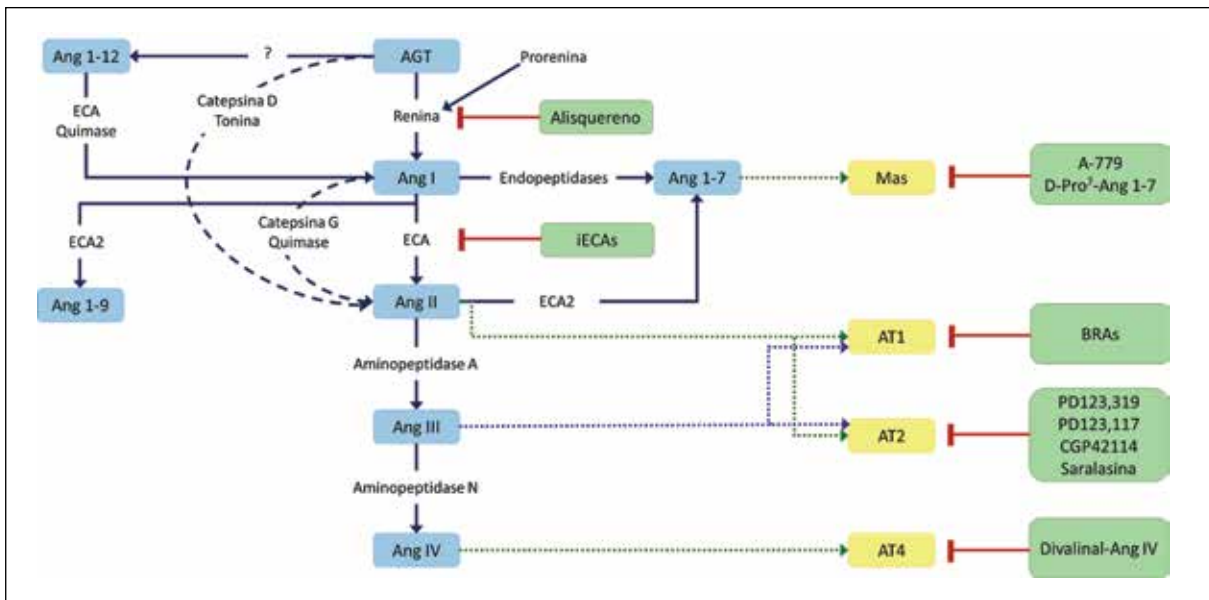


Figura 1 – O angiotensinogênio (AGT), único precursor das angiotensinas, é clivado pela renina produzindo a angiotensina I (Ang I), que, por sua vez, é processada pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) gerando angiotensina II (Ang II), ou pela ECA2 originando a angiotensina 1-7 (Ang 1-7). A Ang II pode ser posteriormente clivada em angiotensinas III e IV (Ang III e IV). Vias alternativas de produção de Ang I a partir da Ang I ou diretamente do AGT estão indicadas em linhas tracejadas. As angiotensinas geradas se ligam em seus receptores e eliciam inúmeras respostas biológicas com o intuito de se manter os níveis de pressão sanguínea e a homeostase eletrolítica e de fluidos. A desregulação do SRA está associada a doenças cardiovasculares e renais, incluindo a hipertensão. Dessa forma, consideráveis esforços e recursos são despendidos com o objetivo de se desenvolver fármacos capazes de antagonizar os efeitos deletérios do SRA ou mimetizar as ações benéficas do SRA. Tradicionalmente, os antagonistas do SRA incluem os inibidores de ECA (IECAs) e os bloqueadores de receptor AT1 (BRAs). Outros bloqueadores do SRA recentemente descritos são capazes de inibir os receptores Mas, AT2 e AT4. (Adaptado de George e cols.⁴⁶)

Todas as novas descobertas são importantes considerando as doenças cardiovasculares e os altos índices de prevalência da hipertensão arterial, apesar da eficácia das drogas farmacológicas utilizadas no controle da doença, incluindo os inibidores da ECA (iECAs), os bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) e mais recentemente os inibidores da renina.

Bloqueio do SRA

iECAs e BRAs são os anti-hipertensivos mais efetivos, capazes de reduzir riscos para doenças cardiovasculares e renais. Após 2007, a introdução do alisquereno na gama de bloqueadores do SRA possibilitou a inibição da enzima passo limitante do SRA, a renina.

O bloqueio do SRA causa um aumento dos níveis de renina e de seu precursor, a pró-renina, decorrente de mecanismos de retroalimentação negativa entre Ang II e liberação de renina. Essa elevação dos níveis da renina e pró-renina resulta em ligação destas ao PRR levando a geração de Ang I. A afinidade da pró-renina pelo receptor é cerca de quatro vezes maior do que a da renina¹³. A ligação da pró-renina ao receptor produz uma modificação na conformação deste precursor resultando numa ativação não proteolítica levando também a produção de Ang I¹⁴.

A retroalimentação negativa entre Ang II e renina ocorre de forma mais intensa com a combinação de bloqueadores do SRA, acarretando níveis elevados de formação de renina. Estudos com modelos experimentais de hipertensão em dieta baixa de sal confirmaram tais observações, uma vez que observaram-se níveis de renina plasmático e renal elevadíssimos e subsequente diminuição do angiotensinogênio¹⁵.

O estudo clínico ALTITUDE, realizado com o intuito de avaliar os efeitos do inibidor direto da renina (alisquereno), mostrou a eficácia deste tratamento em pacientes com *diabetes melito* tipo 2 e com disfunção renal comparados com placebo tratamento com um ou dois bloqueadores do SRA, iECA e/ou BRA. Apesar da normalização da pressão sanguínea, o estudo foi interrompido devido aos efeitos adversos, tais como hipotensão, hipercalemia e complicações renais nos pacientes que receberam alisquereno. Os efeitos adversos podem estar relacionados à depleção de Ang II e/ou aldosterona, ou ainda à estimulação do PRR em resposta aos elevados níveis de renina e pró-renina durante o tratamento combinado de alisquereno e iECA ou alisquereno e BRA¹⁶.

Muitos estudos clínicos evidenciaram o papel renoprotetor do bloqueio do SRA, comparado com outras drogas anti-hipertensivas, sugerindo um papel importante da ativação do SRA intrarrenal nas doenças renais humanas. Em pacientes hipertensos com doença renal, o tratamento com iECAs e BRAs associado a diuréticos, em condições de restrição de ingestão sódica, leva a uma redução da pressão sanguínea com diminuição do ritmo de filtração glomerular quando o volume extracelular está reduzido. Já em pacientes com doença glomerular, sabe-se que é difícil manter o ritmo de filtração glomerular, uma vez que a pressão glomerular é reduzida pelo tratamento com iECAs e BRAs¹⁷.

Dados recentes evidenciam a existência de um SRA intrarrenal independente do SRA circulante. Estudos em modelos experimentais demonstraram que pequenos aumentos nos níveis plasmáticos de Ang II são capazes de elevar os níveis intrarrenais de Ang II^{18,19}. Em 2008, Prieto-Carrasquero e cols.

descreveram uma regulação da pressão sanguínea independente da elevação da pressão sanguínea, associada à renina produzida no ducto coletor em ratos hipertensos dois-rins, um *clip* Goldblatt²⁰. Sadjadi e cols. descreveram que a produção de Ang II independente da ECA pela enzima quimase está elevada no rim isquêmico na hipertensão renovascular²¹.

A ECA intrarrenal é responsável pela produção de Ang II não somente a partir da Ang I resultante da circulação, mas também da Ang I gerada no compartimento intrarrenal, uma vez que ocorre a síntese da ECA nos túbulos proximal e coletor e angiotensinases são encontradas na borda em escova do néfrons²²⁻²⁵.

Estudos clínicos no passado sugeriram que a elevada produção de Ang II intrarrenal tem um papel importante na fisiopatologia da hipertensão e diabetes, bem como no envelhecimento²⁶. Postula-se que novas drogas que interfiram na produção intrarrenal de Ang II ou que bloqueiem as vias de sinalização ativadas pela Ang II possam emergir como tratamento de primeira linha nos quadros de hipertensão, diabetes e várias doenças renais.

Outras evidências indicam a existência e independência do SRA intrarrenal em relação ao SRA circulante. Ratos Sprague-Dawley tratados com alisquereno apresentam concentração do inibidor 46 vezes maior no rim do que no plasma, sugerindo que o fármaco pode ser internalizado nos compartimentos renais, em especial no glomérulo. A compartimentalização do alisquereno no glomérulo sugere que o inibidor da renina pode acessar as células mesangiais e os podócitos, inibindo potencialmente o SRA nessas células e conferindo renoproteção estrutural e funcional observada nos animais²⁷. Vaneckova e cols. observaram a redução dos níveis plasmáticos e renais de Ang II em ratos transgênicos hipertensos tratados com alisquereno (10mgKg⁻¹ por dia) por quatro semanas²⁸. Além da normalização da pressão sanguínea o alisquereno diminuiu o conteúdo de Ang II renal, sugerindo que este inibidor inibe o SRA intrarrenal.

Ativação benéfica do SRA

A Ang (1-7) causa vasodilatação no túbulo renal e contrabalança os efeitos da ativação do receptor AT1 em muitas doenças renais, tais como fibrose tubulointersticial, nefropatia diabética e glomerulonefrite. Estudos com enfoque sobre a insuficiência cardíaca humana mostraram que a ECA2 possui um papel importante no metabolismo da Ang II e conseqüente geração da Ang 1-7²⁹. Dessa forma, atualmente, postula-se que a ativação dessa enzima possa ser utilizada no tratamento da hipertensão. A Ang 1-7, no entanto, pode ser metabolizada rapidamente nos tecidos e no plasma, não podendo ser ministrada diretamente para pacientes. A Ang 1-7 cíclica (cAng 1-7), um análogo da Ang 1-7, por sua vez, é resistente a clivagem por enzimas e age no receptor MAS, mostrando ser atualmente o mais promissor composto para terapia cardiovascular³⁰. Durik e cols. demonstraram os efeitos benéficos do tratamento com cAng 1-7 por 8 semanas sobre a função endotelial e o remodelamento cardíaco em modelo experimental de infarto do miocárdio³¹. Postula-se que a cAng 1-7 pode recrutar células progenitoras angiogênicas, e, dessa forma, induzir a neovascularização suprimindo o remodelamento precoce e prevenindo a doença cardíaca³².

Marcadores do SRA na hipertensão

Anormalidades fenotípicas do SRA parecem estar associadas à hipertensão. Observou-se em humanos uma associação entre o nível da ECA no soro e a pressão sanguínea, indicando a participação da ECA na regulação da pressão sanguínea e seu papel como possível marcador de elevação da pressão sanguínea em humanos³³.

Diferentes isoformas da ECA são descritas na literatura. A forma somática com massa molecular que varia de 130 a 180 kDa possui dois domínios homólogos, domínio N- e C-terminal, cada um contendo um sítio funcional. A forma germinal da ECA, com baixa massa molecular variando de 90 a 100 kDa em humanos, possui estrutura primária completamente idêntica à porção C-terminal da enzima somática, e uma sequência específica N-terminal de 67 aminoácidos que inclui o peptídeo sinal e uma região rica em serina e treonina, correspondendo aos sítios potenciais de glicosilação³⁴.

Os dois domínios da ECA somática podem apresentar características comuns ou que diferem entre si. Ambos os sítios hidrolisam angiotensina I e bradicinina quase com a mesma eficiência catalítica³⁵. O N-domínio cliva especificamente dois substratos fisiológicos, a Ang 1-7³⁶ e o N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (AcSDKP), um peptídeo hemoregulatório³⁷.

As ECAs encontradas no fluido seminal, plasma e cefalorraquidiano³⁴, fluido amniótico, homogenato da próstata²³, fluido ileal³⁸ e urina^{39,40} são exemplos de formas solúveis da enzima.

Dois formas de ECA de urina de indivíduos normais foram purificadas por Casarini e cols³⁹. Uma semelhante à forma somática de alta massa molecular (190 kDa) e outra de baixa massa molecular (65 kDa), fragmento da ECA N-domínio. Nesse mesmo estudo com pacientes hipertensos essenciais não tratados, duas atividades da ECA também foram detectadas: uma de massa molecular de 90 kDa e outra 65 kDa, ambas as formas, fragmentos N-terminais da ECA. A urina de pacientes hipertensos (tratados ou não) apresentou uma enzima de 90 kDa, que não foi encontrada na urina de indivíduos normais. Esses resultados sugeriram que a forma N-domínio com 90 kDa pode ter um importante papel no desenvolvimento da hipertensão e é um possível marcador precoce da hipertensão. Num estudo prospectivo

com voluntários da população da cidade de Vitória, Espírito Santo, verificamos que indivíduos sem histórico familiar de hipertensão apresentavam somente as ECAs com 190 e 65 kDa, indivíduos hipertensos apresentavam as ECAs com 90 e 65 kDa e finalmente, os indivíduos com histórico familiar de hipertensão mas normotensos apresentavam as ECAs com 190/90/65 kDa. Nosso estudo sugeriu que a isoforma com 90 kDa é um marcador biológico da hipertensão que poderá contribuir para nova e eficiente estratégia para prevenir e tratar hipertensão.

Nos últimos anos, o papel do SRA intrarrenal na fisiopatologia tanto da hipertensão quanto de lesões renais tornou-se foco de interesse da comunidade científica. Inúmeros estudos são realizados com o intuito de se avaliar os SRAs locais em diferentes tecidos, incluindo cérebro, coração, glândulas adrenais, vasculatura e rins. A Ang II, principal efetor do SRA, não é estável na urina, impossibilitando a sua utilização como um marcador confiável da atividade do SRA intrarrenal. Estudos experimentais demonstraram que os níveis renais de angiotensinogênio (AGT) refletem a atividade do sistema intrarrenal^{17,41-43}. Dessa forma, a concentração urinária de AGT pode servir como um índice do status do SRA intrarrenal e, conseqüentemente, fornecer informações relevantes em relação aos níveis de AGT no rim, incluindo o seu impacto sobre o progresso da hipertensão e doenças renais^{44,45}.

O fator regulador da pressão arterial e determinante na progressão de lesões renais decorrentes da hipertensão mais bem estudado é o SRA. A superexpressão e a hiperatividade do sistema predispõe indivíduos à hipertensão e lesões relacionadas à elevação da pressão arterial. A validação de componentes do SRA e de seus reguladores moleculares como biomarcadores da hipertensão em larga escala e o aprimoramento de combinações terapêuticas são processos contínuos que dependem de extensos e acurados estudos populacionais e experimentais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não possuir conflitos de interesse na realização deste trabalho.

Referências

1. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med.* 2003;139(9):761-76.
2. Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956;103(3): 295-9.
3. Ferrario CM, Ahmad S, Joyner J, Varagic J. Advances in the renin-angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol.* 2010; 59: 197-233.
4. Giani JF, Shah KH, Khan Z, Bernstein EA, Shen XZ, McDonough AA, et al. The intrarenal generation of angiotensin II is required for experimental hypertension. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;21C:73-81.
5. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5): E1-9.
6. Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350(4): 1026-31.
7. Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K. Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 and components of the renin-angiotensin system (RAS) following low- or high-salt feeding in rats. *Peptides.* 2010;31(5): 889-92.
8. Ferrario CM, Ahmad S, Nagata S, Simington SW, Varagic J, Kon N, et al. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(7): 461-9.
9. Ahmad S, Simmons T, Varagic J, Moniwa N, Chappell MC, Ferrario CM. Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. *PLoS One.* 2011;6(12): e28501.
10. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 2013;112(8): 1104-11.
11. Chai W, Garred IM, de Vries R, Batenburg WW, van

- Kats JP, Danser AH. Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. *Hypertension*.2005;46(4): 701-6.
12. Chai W, Hofland J, Jansen PM, Garrelds IM, de Vries R, van den Bogaerd AJ, et al. Steroidogenesis vs. steroid uptake in the heart: do corticosteroids mediate effects via cardiac mineralocorticoid receptors? *J Hypertens*.2010;28(5): 1044-53.
 13. Lu X, Danser AH, Meima ME. HRP and prorenin: focus on the (pro)renin receptor and vacuolar H⁺-ATPase. *Front Biosci (Schol Ed)*.2011;3: 1205-15.
 14. Krop M, Danser AH. Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hypertens Rep*.2008;10(2): 112-8.
 15. Richer-Giudicelli C, Domergue V, Gonzalez MF, Messadi E, Azizi M, Giudicelli JF, et al. Haemodynamic effects of dual blockade of the renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats: influence of salt. *J Hypertens*.2004;22(3): 619-27.
 16. de Boer RA, Azizi M, Danser AJ, Nguyen G, Nussberger J, Ruilope LM, et al. Dual RAAS suppression: recent developments and implications in light of the ALTITUDE study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*.2012;13(3): 409-12.
 17. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*.2007;59(3): 251-87.
 18. Von Thun AM, Vari RC, el-Dahr SS, Navar LG. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. *Am J Physiol*.1994;266(1 Pt 2): F120-8.
 19. Zou LX, Hymel A, Imig JD, Navar LG. Renal accumulation of circulating angiotensin II in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1996; 27(3 Pt 2): 658-62.
 20. Prieto-Carrasquero MC1, Botros FT, Pagan J, Kobori H, Seth DM, Casarini DE, et al. Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*.2008;51(6): 1590-6.
 21. Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Welborn MB 3rd, Modrall JG. Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. *J Surg Res*. 2005;129(2): 272-7.
 22. Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension*.1993;21(6 Pt 1): 827-35.
 23. Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*.1990;16(4): 363-70.
 24. Casarini DE, Boim MA, Stella RC, Krieger-Azzolini MH, Krieger JE, Schor N. Angiotensin I-converting enzyme activity in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol*.1997;272(3 Pt 2): F405-9.
 25. Mei Wang PH, Andrade MC, Quinto BM, Di Marco G, Mortara RA, Vio CP, et al. N-domain angiotensin-I converting enzyme is expressed in immortalized mesangial, proximal tubule and collecting duct cells. *Int J Biol Macromol*. 2015;72: 380-90.
 26. Anderson S. Ageing and the renin-angiotensin system. *Nephrol Dial Transplant*.1997;12(6): 1093-4.
 27. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension*.2008;52(1):130-6.
 28. Rakusan D, Kujal P, Kramer HJ, Husková Z, Vanourková Z, Vernerová Z, et al. Persistent antihypertensive effect of aliskiren is accompanied by reduced proteinuria and normalization of glomerular area in Ren-2 transgenic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*.2010;299(4): F758-66.
 29. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation*.2003;108(14): 1707-12.
 30. Kluskens LD, Nelemans SA, Rink R, de Vries L, Meter-Arkema A, Wang Y, et al. Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther*.2009;328(3): 849-54.
 31. Durik M, van Veghel R, Kuipers A, Rink R, Haas Jimoh Akanbi M, Moll G, et al. The effect of the thioether-bridged, stabilized Angiotensin-(1-7) analogue cyclic ang-(1-7) on cardiac remodeling and endothelial function in rats with myocardial infarction. *Int J Hypertens*.2012;2012: 536426.
 32. Pessôa BS, Becher PM, Van Veghel R, De Vries R, Tempel D, Sneep S, et al. Effect of a stable Angiotensin-(1-7) analogue on progenitor cell recruitment and cardiovascular function post myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*.2015;4(2).
 33. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med*.1991; 117(1): 33-9.
 34. Hooper NM. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int J Biochem*. 1991;23(7-8): 641-7.
 35. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*.1993;268(13):9496-503.
 36. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 1998;31(4): 912-7.
 37. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*.1995;270(8): 3656-61.
 38. Deddish PA, Wang J, Michel B, Morris PW, Davidson NO, Skidgel RA, et al. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1994; 91(16): 7807-11.
 39. Casarini DE, Carmona AK, Plavnik FL, Zanella MT, Juliana L, Ribeiro AB. Calcium channel blockers as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Hypertension*. 1995;26(6 Pt 2): 1145-8.
 40. Casarini DE, Plavnik FL, Zanella MT, Marson O, Krieger JE, Hirata IY, et al. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(1): 75-85.
 41. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2): 316-22.
 42. Kobori H, Ozawa Y, Suzuki Y, Prieto-Carrasquero MC, Nishiyama A, Shoji T, Young Scholars Award Lecture: Intratubular angiotensinogen in hypertension and kidney diseases. *Am J Hypertens*.2006;19(5): 541-50.
 43. Kobori H, Ozawa Y, Satou R, Katsurada A, Miyata K, Ohashi N, et al. Kidney-specific enhancement of ANG II stimulates endogenous intrarenal angiotensinogen in gene-targeted mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(3): F938-45.
 44. Kobori H, Alper AB Jr, Shenava R, Katsurada A, Saito T, Ohashi N, et al. Urinary angiotensinogen as a novel biomarker of the intrarenal renin-angiotensin system status in hypertensive patients. *Hypertension*. 2009; 53(2): 344-50.
 45. Kobori H, Ohashi N, Katsurada A, Miyata K, Satou R, Saito T, et al. Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of chronic kidney diseases. *J Am Soc Hypertens*. 2008. 2(5): 349-54.
 46. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11): 745-59.