



INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Niveles urinarios de angiotensina-(1-7) y angiotensina II en pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica

César López-de la Vega,¹ Martín Rosas-Peralta,¹ Catalina Lomelí-Estrada,¹ Gustavo Pastelín-Hernández,² Leonardo del Valle-Mondragón.²

¹Unidad de Estudios Avanzados en Hipertensión Arterial y Factores de Riesgo Cardiovascular.

²Departamento de Farmacología.

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Recibido el 20 de enero de 2010; aceptado el 18 de agosto de 2011.

PALABRAS CLAVE

Angiotensina-(1-7);
Angiotensina II; Estenosis
aórtica; México.

Resumen

Objetivo: Reforzar el conocimiento sobre la fisiopatología de la estenosis aórtica. **Métodos:** Se compararon los niveles urinarios de angiotensina II y angiotensina-(1-7) entre dos muestras: a) 45 pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica, sin hipertensión arterial sistémica y con funciones renal y sistólica ventricular izquierda normales; b) grupo de control con 21 voluntarios sin patología cardiovascular. **Hipótesis nula:** no habría diferencia entre los niveles urinarios.

Resultados: El promedio de la concentración urinaria de angiotensina-(1-7) en pacientes con estenosis aórtica fue 2.102 pmoles/mL y de 5.591 pmoles/mL para el grupo control. La media obtenida en concentración urinaria de angiotensina II fue de 0.704 pmoles/mL en los pacientes con estenosis aórtica y 0.185 pmoles/mL en el grupo control. Utilizando la prueba *t* de Student determinamos que la diferencia en la concentración urinaria de angiotensina-(1-7) ($p = 0.633$) y la diferencia en la concentración urinaria de angiotensina II ($p = 0.631$), fueron estadísticamente significativas.

Conclusión: Se documentó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles urinarios de angiotensina II y angiotensina-(1-7) dentro del grupo de pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica.

KEYWORDS

Angiotensin- (1-7);
Angiotensin II; Aortic
stenosis; Mexico.

Urinary levels of angiotensin-(1-7) and angiotensin II in patients with severe aortic stenosis

Abstract

Objective: Strengthen knowledge about the pathophysiology of aortic stenosis. **Methods:** Urinary levels of angiotensin-(1-7) and angiotensin II were compared between two samples: A) forty five patients with severe aortic stenosis, without systemic arterial hypertension and

Correspondencia: César Gerardo López de la Vega. Juan Badiano, Colonia Sección XVI. Delegación Tlalpan No. 1, 140080. Jefatura de Residentes, 8º piso. Teléfono: 55732911, ext: 1377, fax: 55730994. Correo electrónico: cezarecglv@yahoo.com

with normal kidney and normal left ventricular systolic function; B) control group: twenty one persons without cardiovascular disease. Null hypothesis: there would be no difference between urinary levels. Results: The average of angiotensin-(1-7) urinary concentration in severe aortic stenosis patients was 2.102 pmol/mL and 5.591 pmol/mL for the control group. The average of Ang II was 0.704 pmol/mL and 0.185 pmol/mL respectively. Using t-Student test, we determine that the difference in urinary concentration of angiotensin-(1-7) [$p = 0.633$] and the difference of angiotensin II ($p = 0.631$), were statistically significant. Conclusion: documented a statistically significant difference in urinary levels angiotensin II and angiotensin-(1-7) within the group of patients with severe aortic stenosis.

Introducción

En la estenosis aórtica (EAo) el aumento progresivo de la postcarga es el principal factor desencadenante de mecanismos compensatorios en el miocardio, inicialmente apropiados, que favorecen el aumento del tamaño de los cardiomocitos y del componente intersticial para permitir un adecuado soporte estructural.¹ Al perpetuarse la sobrecarga hemodinámica, existe una regulación al alza del sistema renina angiotensina-aldosterona, la endotelina, el sistema neuroendocrino, junto a un estado proinflamatorio que en conjunto, pueden hacer que el sujeto llegue a la disfunción contráctil del ventrículo izquierdo.²⁻⁵

Como parte de los mecanismos compensadores mencionados al estrés hemodinámico, existe un aumento en la síntesis y conversión de angiotensina I (Ang I) en angiotensina II (Ang II) de manera autocrina y paracrína en el tejido miocárdico;⁶⁻⁸ que promueve, junto a otros factores, la formación de áreas de fibrosis en el miocardio, lo que es un paso fundamental para que los pacientes con estenosis aórtica desarrollen disfunción contráctil.⁵ Además de esto, la Ang II ha sido relacionada con la progresión en la estrechez de la válvula aórtica, favoreciendo su calcificación y degeneración.⁹

Lejos de ser muy simple, el sistema renina angiotensina-aldosterona cada día se torna más complejo de como se había descrito hasta el momento, encontrando moléculas derivadas de sus componentes básicos descritos y que en las últimas dos décadas han surgido como factores esenciales en funciones celulares de muchos tejidos.¹⁰⁻¹²

La angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], una de las moléculas recientemente descritas dentro del sistema renina angiotensina-aldosterona, parece ser uno de los principales contra-reguladores de los efectos deletéreos de la Ang II.¹³ El ámbito en que más se ha estudiado a este heptapeptido es entorno a la hipertensión arterial sistémica, por distintos grupos de investigadores. Ferrario y colaboradores documentaron en un grupo de voluntarios normotensos, una correlación directa entre los niveles urinarios de Ang-(1-7) vs. su concentración sérica (relación 2.5:1); en este mismo estudio documentaron que esta relación se pierde al disminuir significativamente las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) en pacientes con hipertensión arterial esencial no tratada.¹⁴

Inclusive se ha descrito un aumento de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA-2) en leucocitos de pacientes pre-hipertensos y por ende la mayor concentración de Ang-(1-7) plasmática.¹⁵ Zisman y colaboradores documentaron *in vivo* una correlación directa equiparable entre los niveles tisulares de Ang II y

Ang-(1-7) en miocardio de pacientes sin enfermedad estructural.¹⁶ Existe una mayor concentración de Ang-(1-7) en el endotelio vascular y cardiomocitos de pacientes infartados¹⁷ o con insuficiencia cardiaca.^{18,19}

Fielitz y colaboradores describieron desde 2001 el aumento de la expresión tisular local de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y Ang-II en pacientes con estenosis aórtica,⁷ pero hasta el momento no existía en la bibliografía actual una descripción del comportamiento o determinación de la concentración de Ang-(1-7) en pacientes con estenosis aórtica. En este estudio se presentan datos obtenidos dentro de una muestra de pacientes con indicación quirúrgica para la estenosis aórtica debido a la sobrecarga hemodinámica impuesta, pero sin falla contráctil asociada.

Métodos

Estudio tipo analítico, de casos y controles, transversal, prolectivo. El período de recolección de datos se llevó a cabo de diciembre de 2007 a diciembre de 2008. El grupo de casos se obtuvo de la población mexicana, de cualquier género y con mayoría de edad, atendida en los servicios de Cardiología de Adultos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH) por diagnóstico de estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica y que fueron sometidos a reemplazo valvular aórtico. El grupo control consistió en sujetos voluntarios, sin enfermedad cardiovascular o renal, activas durante el período de recolección de datos.

Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos sexos comprendidos entre las edades de 18 y 90 años.
- Área valvular aórtica $<1 \text{ cm}^2$, con fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) $\geq 45\%$
- Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI) $<50 \text{ mm}$.
- Coronariografía sin lesiones significativas ($<50\%$).
- Sujetos aceptados para tratamiento quirúrgico y reemplazo valvular aórtico.

Criterios de exclusión:

- Presencia de alguna de las siguientes patologías: a) cardiopatía isquémica; b) insuficiencia cardiaca crónica c) hipertensión arterial sistémica; d) insuficiencia renal crónica (creatinina $>1.5 \text{ mg/dL}$) o; e) hipertensión arterial pulmonar severa (presión sistólica de la pulmonar por ecocardiografía $>60 \text{ mmHg}$).

- Tratamiento vigente con inhibidores de la ECA o antagonistas de los receptores de Ang II.
- Valvulopatías asociadas aórtica o no aórticas de grado severo.
- Dilatación del ventrículo izquierdo (DDVI >50 mm).

Procedimiento: Despues de detectar un caso o control, se obtuvo el consentimiento informado. El análisis ecoardiográfico fue realizado en el INCICH mediante equipo VIVID 3000. Las determinaciones del perfil bioquímico y hematológico fueron realizadas en el laboratorio clínico del INCICH mediante equipos debidamente regulados.

Los niveles de Ang-II y Ang-(1-7), fueron determinados simultáneamente en la muestra de la primera orina de la mañana, mediante electroforesis capilar de zona.²⁰ La orina se trató con ácido acético al 4% (v/v), se centrifugó a 3000 rpm durante cinco minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). Posteriormente se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 0.1 M, se filtró con cartuchos de extracción en fase sólida (Sep-Pak Classic C-18, Waters Co., Milford, MA, USA) y se analizó directamente. Para tal efecto, se utilizó el sistema de electroforesis capilar P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). El análisis se realizó por detección UV por arreglo de diodos a una longitud de onda de 200 nm. Los resultados se expresaron en pmoles/mL en contraste con una curva estándar de angiotensina II y angiotensina-(1-7) en un rango de 0 a 10 pmoles/mL de cada uno de los analitos de interés.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de paquete estadístico BioStat 2008 (v.5.0.1.1), para las variables categóricas se presentan proporciones, porcentajes y/o frecuencias, analizándose en casos meritorios mediante diferencia de proporciones. Las variables continuas se evaluaron mediante la prueba de *t* de Student para la diferencia de medias en grupos no relacionados. La significancia estadística se estableció en 95%.

Resultados

Se realizó un escrutinio de la población de pacientes operados por estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica en el INCICH; estos fueron 90 pacientes, de los cuales 50 cumplieron con los criterios de inclusión. Cuarenta y cinco de ellos autorizaron su participación en el presente estudio. En todos se realizaron niveles urinarios de Ang-(1-7) y en 30 de los casos se determinaron niveles urinarios de Ang II. Se comparó esta muestra con un grupo control de 21 sujetos, sin factores asociados de activación del sistema renina angiotensina aldosterona. Sus características demográficas (**Tabla 1**) evidencian grupos homogéneos respecto a edad, género, antecedentes médicos y similares condiciones clínicas al momento de la evaluación.

La patología valvular aórtica en la muestra de interés fue documentada, como crítica en 70% de los pacientes y grave en 30% restante. La fracción de expulsión del ventrículo izquierdo promedio fue de 62% en los pacientes con EAO, de los 45 pacientes, en 39 se documentó una FEVI ≥50%, y seis pacientes con FEVI entre 45% y 50%. Ninguno con disfunción sistólica grave ni dilatación de cavidad ventricular izquierda (**Tabla 2**).

El grupo control conservó una distribución esperada dentro del rango normal de las determinaciones de niveles urinarios de Ang-II y Ang-(1-7). En el grupo de pacientes con estenosis aórtica se determinó claramente un alza en la concentración de niveles urinarios de angiotensina II (medias: 0.704 vs. 0.185 pmoles/mL) así como una concentración urinaria de Ang-(1-7) menor al límite inferior considerado como normal (medias: 2.102 vs. 5.591 pmoles/mL)

La diferencia de medias aplicada para nuestra hipótesis nula que indicaba que no existiría una diferencia significativa en la concentración urinaria de Ang-(1-7), mostró una *t* obtenida (5.763) mayor a la *t* crítica (2.05). La *p* obtenida fue de 0.633, por lo que consideramos que la

Tabla 1. Características demográficas de las muestras.

Característica	Pacientes con Estenosis Aórtica (n = 45)		Controles (n = 21)	
Edad	Promedio	55.8 (19-76)*	53.6 (22-74)*	<i>p</i> >0.05
Sexo	Masculino	88%	70%	
	Femenino	22%	30%	
Lugar de residencia	Distrito Federal	20%	90%	
	Provincia	80%	10%	
Antecedentes patológicos	Diabetes Mellitus	8 (17.7%)	5 (16.7%)	<i>p</i> >0.05
	Hipertensión Arterial Sistémica	0	0	
	Infarto del Miocardio	0	0	
	Insuficiencia Renal Crónica	0	0	
Características clínicas	Tensión arterial sistólica (mmHg)	119	115 mmHg	<i>p</i> >0.05
	Tensión arterial diastólica (mmHg)	74	70 mmHg	<i>p</i> >0.05
	Creatinina (mg/dL)	0.96 (0.5 – 1.19)*	0.88 (0.4 - 1.1)*	<i>p</i> >0.05

*Representan los valores mínimo y máximo de la variable indicada.

Tabla 2. Características ecocardiográficas de la enfermedad valvular aórtica.

Característica	Pacientes con Estenosis Aórtica (n = 45)	Controles (n = 21)	
Área valvular aórtica	Promedio (cm ²)	0.61 (0.4 - 1.0)*	
	Crítica	70%	
Fracción de expulsión del VI	Promedio (%)	62.3% (45 - 74)	65% <i>p</i> >0.05
Fracción de acortamiento	Promedio (%)	37%	38% <i>p</i> >0.05
Diámetro diastólico del VI	Promedio (mm)	43	41 <i>p</i> >0.05
Masa ventricular izquierda	Promedio (g)	250 (176 - 444) *	
Velocidad del flujo aórtico	Promedio (m/seg)	4.5	1.1 <i>p</i> <0.05
Gradiente máximo	Promedio (mmHg)	96	
Gradiente medio	Promedio (mmHg)	60	
Presión sistólica arterial pulmonar	Promedio (mmHg)	39	27 <i>p</i> >0.05

*Valor mínimo y máximo de la variable indicada.

diferencia en la excreción renal de Ang-(1-7) en los pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica, comparado con un grupo control sin estrechez valvular aórtica es estadísticamente significativa (**Tabla 3**).

Después de comparar las medias de excreción urinaria de Ang II entre ambos grupos, el resultado de la *t* obtenida fue 7.71 y la *t* crítica de 2.019. Con *p* = 0.631, lo que rechaza nuestra hipótesis nula y concuerda con nuestra hipótesis que perseguía confirmar que la diferencia en la excreción de Ang II en los pacientes con estenosis aórtica con importante repercusión hemodinámica, fue estadísticamente significativo.

En el análisis de sub-grupos (**Tabla 3**) se tomaron como parámetros de comparación: la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI), la fracción de acortamiento porcentual (FAct) y el área valvular aórtica respecto a ser crítica (<0.74 cm²) o grave (0.75 cm² a 1 cm²). En relación a la FEVI se utilizó como punto de corte una FEVI ideal mayor de 50% pues prácticamente todos los pacientes analizados presentaron una FEVI en rango normal (>50%). La fracción de acortamiento utilizó 33% como valor de cohorte. No existió una diferencia significativa entre los grados de obstrucción de la válvula aórtica y los niveles de Ang-(1-7) y Ang II excretados por la orina. Tampoco existió diferencia en los niveles urinarios de estas dos moléculas y la reducción de la fracción de acortamiento, ni en relación con la FEVI <60%.

Discusión

Con base en los resultados obtenidos, se estableció significancia estadística en la diferencia de concentración urinaria de Ang-(1-7) y Ang II de los pacientes con EAo de importante repercusión hemodinámica y con función sistólica del ventrículo izquierdo normal o límitrofe, en comparación con el grupo control de pacientes sanos. La presencia de disfunción sistólica del VI ligera, con un rango entre 45% y 50% en seis de los pacientes con estenosis aórtica, no influyó en el análisis de resultados, al compararse con la muestra de controles, pues en el análisis

de subgrupos la diferencia en la concentración urinaria de Ang-(1-7) y Ang II de estos pacientes, no fue significativa a la documentada en el subgrupo de pacientes con FEVI >50%. (*p* >0.05) Podríamos especular que esta disminución documentada de la FEVI podría deberse al "mismatch" condicionado por el grado de estrechez.

Consideramos que la activación de los componentes tisulares del sistema renina angiotensina, como parte de los mecanismos compensatorios locales del miocardio inducidos por la sobrecarga hemodinámica impuesta por la estenosis aórtica, fueron tan drásticos como para modificar las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) y Ang II de una manera significativa.

La secuencia lógica de acontecimientos puede ser la siguiente: La mayor concentración tisular de Ang II por la regulación a la alta de la ECA en los cardiomiositos de pacientes con EAo^{7,8} conlleva a una mayor síntesis local de Ang-(1-7) a través de la expresión de ACE2¹³ en busca de un efecto contrarregulador, semejante a lo que se ha reportado en pacientes con infarto sin disfunción sistólica o aquellos con insuficiencia cardiaca crónica.¹⁹

Es probable que el comportamiento observado en las concentraciones urinarias de estas dos moléculas sea análogo al de los pacientes hipertensos sin disfunción sistólica, pues la característica documentada es la disminución de la concentración en la eliminación renal de Ang-(1-7)¹⁴ y esto podría explicarse por alguna o una combinación de las siguientes opciones: una menor expresión capilar renal de ACE2, que influye directamente en la cantidad de Ang-(1-7) urinaria pues normalmente la produce *de novo* a partir de la Ang II excretada; o una disminución en la filtración glomerular de la Ang-(1-7).¹⁸

No se encontró influencia entre el grado de estrechez valvular y la disminución de la concentración urinaria de la Ang-(1-7), esto mediante la comparación del subgrupo de pacientes con estenosis crítica (<0.75 cm²) vs. estenosis grave (0.76 a 1.0 cm²). Podríamos inferir que el grado de alteración en el sistema renina angiotensina tisular no se ve influido en mayor proporción, después de que se alcanza un área valvular aórtica con menos de 1 cm². Habrá que establecer en estudios posteriores el

comportamiento del sistema renina angiotensina tisular en pacientes con estenosis aórtica captados en estadios más tempranos y su evolución en la historia natural de la enfermedad.

Ahora bien, utilizando la FAct como parámetro de diferenciación para una adecuada función contráctil del VI tampoco se logró documentar una relación directa con la disminución de este parámetro por debajo de 33%, estos hallazgos pueden estar en relación con el tamaño del subgrupo con menos de 33% de FAct, es pequeño y de estos pacientes 50% presentaban una FEVI normal.

Un aporte extra del estudio fue corroborar la distribución dentro del rango establecido como normal en los niveles urinarios de Ang II y Ang-(1-7) de la población latina a partir de una muestra de 21 personas normales de origen mexicano, tomando en cuenta que la prueba se basa en método obtenido de población anglosajona.

Dentro de las limitaciones del estudio se incluyen las propias de los estudios de casos y controles. Aunque consideramos que la principal limitación de nuestro estudio se fundamenta en no haber medido las concentraciones séricas de Ang-(1-7) y Ang II, pues nos basamos en la relación

Tabla 3. Resumen del análisis estadístico.

	Niveles urinarios de angiotensina -(1-7)	Niveles urinarios de angiotensina II
Estenosis aórtica	n = 45	n = 31
Grupo control sano	n = 21	n = 21
Método estadístico	<i>t</i> Student de dos colas para grupos independientes	
Significancia	95%	95%
Media en el grupo EAo	2.102 pmoles/mL	0.704 pmoles/mL
Media en grupo control	5.591 pmoles/mL	0.185 pmoles/mL
T obtenida	5.763	7.710
T crítica	2.05	2.019
Valor de <i>p</i>	0.633	0.631
Hipótesis nula	Niveles no son diferentes en pacientes con estenosis aórtica	
Estenosis aórtica crítica	n = 32	n = 22
Estenosis aórtica grave	n = 13	n = 8
Media en EAo crítica	2.20 pmoles/mL	0.71 pmoles/mL
Media en EAo grave	2.00 pmoles/mL	0.83 pmoles/mL
T obtenida	1.38	0.603
T crítica	2.04	2.05
Valor de <i>p</i>	0.05	0.05
Hipótesis nula	Niveles no son diferentes en estenosis aórtica crítica	
EAo FEVI >50%	n = 39	n = 25
EAo FEVI <50%	n = 6	n = 5
Media EAo-FEVI >50%	2.082 pmoles/mL	0.700 pmoles/mL
Media EAo-FEVI <50%	2.356 pmoles/mL	0.722 pmoles/mL
T obtenida	0.781	0.907
T crítica	2.04	2.05
Valor de <i>p</i>	0.05	0.05
Hipótesis nula	Niveles no son diferentes en estenosis aórtica c/ FEVI <60%	
EAo FAct >33%	n = 35	n = 24
EAo FAct <33%	n = 10	n = 6
Media en EAo-FAct >33%	2.136 pmoles/mL	0.712 pmoles/mL
Media en EAo-FAct <33%	2.027 pmoles/mL	0.673 pmoles/mL
T obtenida	0.854	0.765
T crítica	2.04	2.05
Valor de <i>p</i>	0.05	0.05
Hipótesis nula	Niveles no son diferentes en estenosis aórtica c/ FA <33%	

EAo: estenosis aórtica; FEVI: fracción de expulsión del ventrículo izquierdo; FAct: fracción de acortamiento

netamente establecida de 2.5:1 (urinario:sérico) en pacientes normales en estudios previos.¹⁴

Consideramos nuestro estudio como punto de partida para la realización de nuevas investigaciones en el grupo de pacientes con estenosis aórtica, una población sin estudios hasta el momento con respecto a la participación de la Ang-(1-7) dentro de su fisiopatología. En el futuro cercano nuestro grupo pretende establecer si el equilibrio de las dos moléculas de nuestro interés medidas en orina, tiende a restablecerse en la población de posoperados de cambio valvular aórtico.

Conclusiones

En la muestra analizada de pacientes con EAo de importante repercusión hemodinámica y con características de adecuada función contráctil del ventrículo izquierdo, el estrés condicionado al miocardio parece modificar el grado de activación de los elementos tisulares del sistema renina angiotensina tisular, de tal manera que es capaz de modificar las concentraciones urinarias de Ang II y Ang-(1-7). Esto en comparación con sujetos sanos desde el punto de vista cardiovascular.

Referencias

1. Guadalajara J. Entendiendo la hipertrofia ventricular izquierda. *Arch Cardiol Mex* 2007;77:175-180.
2. Otto C, Bonow R. Valvular Heart Disease. En: Libby P, Bonow R, Mann D, Zipes D (eds.) *Braunwald's Heart Disease a Textbook of Cardiovascular*. 8th Ed. Philadelphia, Saunders, Elsevier. Chp 62. 2007,pp.1625-1635.
3. Steckelings U, Daschma E, Unger T. The AT2 receptor: a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26:1401-1409.
4. Timothy L. A place in our hearts for the lowly angiotensin-(1-7) peptide? *Hypertension* 2006;47:811-815.
5. Escudero E, Pinilla O. Paradigmas y paradojas de la hipertrofia ventricular izquierda: desde el laboratorio de investigación a la consulta clínica. *Arch Cardiol Mex* 2007;77:237-248.
6. Martin P, Poyan A, Kreutz R. Physiology of local angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006;86:747-803.
7. Fielitz J, Hein S, Mitrovic V. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *JACC* 2001;37:1443-1449.
8. Weber K. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 1997;96:4065-4082.
9. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:483-491.
10. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, et al. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 1991;18:III126-III133.
11. Zisman L. ACE and ACE2: a tale of two enzymes. *Eur Heart J* 2005;26:3222-3224.
12. Chai S. The angiotensine IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2728-2737.
13. Ferrario CM, Chappell M, Tallant E, et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7) *Hypertension* 1997;30:535-538.
14. Ferrario C, Martell N, Yunis C, et al. Characterization of angiotensin - (1-7) in urine of normal essential hypertensive subjects. *Am J Hypertension* 1998;11:137-146.
15. Keidar S, Strzelevsky A, Raz A, et al. ACE2 activity is increased in monocyte-derived macrophages from prehypertensive subjects. *Nephrol Dial Transpl* 2007;22:597-601.
16. Zisman L, Meixell G, Bristow M, et al. Ang-(1-7) formation in the intact human heart. *Circulation* 2003;108:1679-1681.
17. Risvanis J, Kubota E. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 2005;26:369-375.
18. Danilczyk U, Penninger J. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res* 2006;98:463-471.
19. Zisman L, Keller R, Weaver B, et al. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles evidence for up-regulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2 Background—the formation of angiotensin-(1-7) from either angiotensin (Ang) I or Ang II in failing human hearts. *Circulation* 2003;108:1707-1712.
20. Tenorio-López A, Zarco-Olvera G, Sánchez-Mendoza A, et al. Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta* 2010;15;80:1702-1712.