

MODIFICACIÓN DE LOS NIVELES EXCRETADOS POR ORINA DE ANGIOTENSINA II Y ANGIOTENSINA-(1-7) EN PACIENTES CON ESTENOSIS AÓRTICA GRAVE O CRÍTICA, SOMETIDOS A REEMPLAZO VALVULAR AÓRTICO

Dr. Cesar López de la Vega*, Dr. Martín Rosas**, Dr. Gustavo Pastelín ***, Catalina Lomelí C. **** QF. Leonardo del Valle*****
*Residente III de Cardiología Clínica, **Jefe de la Unidad de Estudios Avanzados en Hipertensión Arterial y Factores de Riesgo Cardiovascular, ***Jefe de la Unidad de Investigación en Farmacología, ****Médica Adscrita de Cardiología de Adultos III, *****Encargado de la División Diagnóstica de la Unidad de Investigación en Farmacología Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México - Distrito Federal

RESUMEN

Antecedentes: La postcarga elevada y el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) se han relacionado a la progresión de la enfermedad en estenosis aórtica, pero su elemento contra regulador, la angiotensina-(1-7), no ha sido estudiada en este contexto. **Objetivo y Metodología:** Establecer si existe diferencia significativa a través de prueba U de Mann-Whitney en las concentraciones urinarias de angiotensina-(1-7) y angiotensina-II de pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica y sin disfunción contráctil del ventrículo izquierdo (Grupo A), en comparación con sujetos normales (Grupo C) y con sujetos sometidos a reemplazo valvular aórtico en condiciones de sobrecarga hemodinámica similar al grupo de casos (Grupo B).

Resultados: Las concentraciones promedio de Ang-(1-7) y Ang II fueron respectivamente: para el Grupo A, 2.09 pmol/mL (DE 1.61 pmol/mL) y 0.727 pmol/mL (DE 0.365 pmol/mL); para el Grupo B: 6.98 pmol/mL (DE 5.2 pmol/mL) y 0.371 pmol/mL. Para el Grupo C: 5.591 pmol/mL y 0.186 pmol/mL. Existió una diferencia significativa en las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) al comparar los grupos A y B ($p < 0.0001$), así como al comparar los grupos A y C ($p < 0.0001$) pero no al comparar los grupos B y C ($p: 0.8229$). El análisis de las concentraciones urinarias de Ang II, evidenció diferencia significativa entre los grupos A y B ($p < 0.0001$), al comparar los grupos A y C ($p < 0.0001$) pero no existió diferencia al comparar los grupos B y C ($p: 0.1455$). **Conclusión:** los resultados sugieren que las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) y Ang II en los pacientes con estenosis aórtica sin disfunción ventricular izquierda y sin factores de activación de la fase sistémica del SRAA tienden a normalizarse después de un cambio valvular aórtico.

ANTECEDENTES

La estenosis aórtica (EAO) es una de las valvulopatías más frecuentes, (1) existiendo un repunte en el número de pacientes que tienen una etiología degenerativa de la enfermedad, secundario a la mayor expectativa de vida dentro de la población. (1, 2) El pivote inicial de su fisiopatología concierne a la sobrecarga sistólica que se impone al ventrículo izquierdo debido a la obstrucción de su flujo de salida (3) El segundo elemento importante en la evolución natural de la enfermedad por EAO es el llamado eje o sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA). (3-5)

Cuando el ventrículo izquierdo se somete a sobrecargas de presión o volumen, el aumento del tamaño de los cardiomiocitos se acompaña de un aumento del componente intersticial de manera más o menos equilibrada, lo cual ofrece un soporte estructural a la hipertrofia miocárdica, y esto permite de manera inicial aumentar la función contráctil para enfrentar la sobrecarga, sin activar la fase sistémica del eje renina angiotensina. (6) Las altas concentraciones de Ang II, endotelina, aldosterona y el sistema neuroadrenérgico se potencian entre sí a través del tiempo para promover efectos tóxicos y tróficos en el tejido miocárdico, desencadenando disfunción celular y contráctil, así como alterando su viabilidad. (7, 8)

En los eventos iniciales de la EAO, la fase sistémica del SRAA no se encuentra activada, debido a que se conserva un gasto cardíaco normal y el flujo renal es adecuado, la fase local tisular sí que se encuentra activa. Existe un aumento de la concentración miocárdica de renina, (9) hay expresión aumentada de RNAm de la ECA en los cardiomiocitos de pacientes con EAO, (10) así el tejido muscular cardíaco se propone como sintetizador y liberador de angiotensinógeno y

angiotensina II, en respuesta al estrés mecánico (11). Todo esto induce la síntesis de proteínas contráctiles e hipertrofia adaptativa que normaliza el estrés sistólico del ventrículo izquierdo (12, 13) Cuando se perpetúan los cambios ultraestructurales en los cardiomiocitos, se presentan modificaciones que favorecen la fibrosis, (10, 14, 15, 16, 17, 18) un hallazgo morfológico temprano y determinante mayor de la disfunción diastólica y falla contráctil en los pacientes con EAO (19).

La Ang II parece estar implicada también en la progresión de la estrechez valvular en los casos relacionados con degeneración y calcificación de la misma, estableciendo algunos autores que dicha progresión tiene la misma base inflamatoria crónica de la aterosclerosis (20, 21).

En respuesta a la activación del SRAA, se incrementa la expresión genética y proteínica de contra reguladores como las quimasas, que se han tipificado en enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2) y/o la endopeptidasa neutra (NEP), que disminuyen la concentración de Ang II a través de su hidrolización a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], (22) cuyos efectos aparecen descritos de manera experimental desde hace un poco más de dos décadas y su involucro en humanos desde hace 18 años (23, 24).

La ECA2 también influye en la concentración de Ang II de manera indirecta, al disminuir su concentración por medio de la hidrolización de la Ang I y obtener angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] (22, 25). La ECA2 también ejerce efectos catalíticos sobre otros sustratos como los péptidos vasoactivos: neurotensina, apelinas, la kintensina, la des-Arg bradiginina; y favorece la degradación de opioides endógenos con efectos protectores en el sistema nervioso central por la disminución del tono adrenérgico (26). La ACE2 se ha encontrado principalmente en corazón, riñón, testículos e intestinos, con menos proporción en otros tejidos (26).

La Ang-(1-7) media una gran gama de procesos a través de su receptor específico, el producto del oncogén mas (MAS), el cual se encuentra acoplado a la proteína G: (22, 23, 27)

- * Aumento de la síntesis de óxido nítrico (ON), (28)
- * Reacción cruzada con el receptor de angiotensina

tipo 2 (AT₂R), con efecto contra regulador (22).
* Disminuye la liberación de norepinefrina desde el hipotálamo, disminuyendo el tono simpático sistémico y obteniendo un efecto antihipertensivo (29).

* Puede inhibir la vía MAPK, que provoca una disminución en la síntesis de proteínas en los cardiomiocitos post infarto (30).

* Se le han atribuido propiedades antiangiogénicas, antitrombóticas y antitumorales (31, 32).

* Probablemente favorezca la sensibilidad a la insulina en los tejidos vascular y miocárdico, mediante las vías JAK2, el receptor de sustrato de insulina y la vía Akt (33).

In Vivo, en el miocardio intacto, Zisman y colaboradores demostraron que la concentración tisular miocárdica de Ang-(1-7) se encuentra en proporción directa a la de Ang II (34). Esta relación se mantiene después de una lesión, documentándose aumento de la expresión de ACE2 en el endotelio vascular coronario y las células miocárdicas que rodean la zona de lesión tisular como en el infarto, relacionándose con un efecto antiinflamatorio local (35, 36, 37).

En el grupo ampliamente estudiado de pacientes hipertensos se han encontrado múltiples hallazgos. Existe una mayor expresión y actividad de ACE2 en los macrófagos de personas prehipertensas, sugiriendo un probable efecto protector a través de la degradación del vasopresor Ang II (38). Ferrario y colaboradores documentaron una correlación directa de 2.5:1 en el valor de Ang-(1-7) urinaria versus la concentración sérica para un grupo de personas normotensas en contraste con un grupo de pacientes hipertensos esenciales no tratados, en quienes documentaron una disminución significativa en los niveles urinarios de Ang-(1-7). (39) Esta paradójica disminución en las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) de pacientes hipertensos puede estar en relación a una menor expresión actividad de la ACE2 en los capilares renales de los pacientes hipertensos (40).

En los pacientes con insuficiencia cardíaca hay evidencia de que aumenta la concentración de Ang-

(1-7), por la sobreactividad de ACE2 en los cardiomiocitos, (41) asociada a un aumento de la fracción soluble de ACE2 que intenta ser un factor compensador directamente proporcional al grado de deterioro de la función sistólica (42). La falta de expresión de ECA2 en corazones de ratas knockout, se relaciona con dilatación ventricular y falla contráctil (43).

Existe evidencia desde hace más de 10 años que los pacientes que se someten a cambio valvular aórtico en un momento oportuno, cambia de sobremanera la historia natural de la enfermedad (3). Sabemos inclusive que puede existir mejoría en parámetros hemodinámicos como la recuperación de la fracción de expulsión ventricular izquierda (FEVI) inclusive en pacientes que tienen un deterioro moderado de base (FEVI entre 30 y 50%) (15), la normalización de las propiedades de relajación diastólica ventricular a través de la regresión de la hipertrofia y la regresión de la fibrosis intersticial (18, 43).

No existe en la literatura actual una descripción de la Ang-(1-7) en los pacientes con estenosis aórtica.

METODOLOGÍA

El estudio es del tipo analítico, de casos y controles, transversal, y ambispectivo. La recolección de datos se llevó a cabo de diciembre de 2007 a enero de 2009 para el grupo de casos con estenosis aórtica con indicación quirúrgica por importancia en la repercusión hemodinámica y el grupo de controles sanos. De octubre de 2008 a febrero de 2009 se recopiló la muestra de pacientes controles ya intervenidos quirúrgicamente por cambio valvular aórtico.

* Muestra - Casos: se obtuvieron 31 sujetos con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica, detectados en el momento previo a cirugía de cambio valvular y sin factores médicos asociados que modificaran el sistema renina angiotensina sistémico, como se describe en criterios de inclusión.

* Muestra - Controles: dos grupos control. El grupo de controles sanos constó de 21 pacientes mayores de edad de ambos géneros. El segundo grupo control

consistió en 31 pacientes con el antecedente de estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica y con características clínicas similares al grupo de casos, quienes fueron intervenidos quirúrgicamente con un intervalo de tiempo al menos mayor a 18 meses. Los criterios de inclusión fueron: Pacientes de ambos géneros comprendidos entre las edades de 18 a 90 años. Estenosis aórtica con área valvular menor o igual a 1 cm² con fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) \geq 50%. Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI), dentro de límites normales ($<$ 50mm) Coronariografía sin lesiones angiográficas significativas ($<$ 50%). Sujetos aceptados para tratamiento quirúrgico y reemplazo valvular aórtico. Los criterios de exclusión fueron: Cardiopatía isquémica, Insuficiencia cardíaca crónica FEVI $<$ 50%. Hipertensión arterial sistémica. Insuficiencia renal crónica (creatinina $>$ 1.5 mg/dL). Hipertensión arterial pulmonar grave (por Ecocardiografía transtorácica $>$ 60 mmHg). Tratamiento con inhibidores de la ECA o antagonistas de los receptores de Ang II que no pueda suspenderse dos semanas antes de la toma de muestras. Valvulopatías asociadas aórtica o no aórticas de grado importante. Dilatación del ventrículo izquierdo (DDVI $>$ 50 mm)

PROCEDIMIENTO

Después de detectar un caso o control, se obtuvo el consentimiento informado del mismo. El análisis ecocardiográfico fue realizado en el departamento de Ecocardiografía del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH) mediante equipo VIVID 3000. Las determinaciones del perfil bioquímico y hematológico fueron realizadas en el laboratorio del INCICH mediante equipos debidamente regulados.

La determinación de Ang-II y Ang-(1-7), fueron determinadas simultáneamente en muestras de primer orina de la mañana, mediante electroforesis capilar de zona. La orina se trató con ácido acético al 4% (v/v), se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m (Millipore, Billerica, MA, USA). Posteriormente se diluyó 1:10 con hidróxido de sodio 0.1 M, se filtró con cartuchos de extracción

consistió en 31 pacientes con el antecedente de estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica y con características clínicas similares al grupo de casos, quienes fueron intervenidos quirúrgicamente con un intervalo de tiempo al menos mayor a 18 meses. Los criterios de inclusión fueron: Pacientes de ambos géneros comprendidos entre las edades de 18 a 90 años. Estenosis aórtica con área valvular menor o igual a 1 cm² con fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) \geq 50%. Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI), dentro de límites normales ($<$ 50mm) Coronariografía sin lesiones angiográficas significativas ($<$ 50%). Sujetos aceptados para tratamiento quirúrgico y reemplazo valvular aórtico. Los criterios de exclusión fueron: Cardiopatía isquémica, Insuficiencia cardíaca crónica FEVI $<$ 50%. Hipertensión arterial sistémica. Insuficiencia renal crónica (creatinina $>$ 1.5 mg/dL). Hipertensión arterial pulmonar grave (por Ecocardiografía transtorácica $>$ 60 mmHg). Tratamiento con inhibidores de la ECA o antagonistas de los receptores de Ang II que no pueda suspenderse dos semanas antes de la toma de muestras. Valvulopatías asociadas aórtica o no aórticas de grado importante. Dilatación del ventrículo izquierdo (DDVI $>$ 50 mm)

PROCEDIMIENTO

Después de detectar un caso o control, se obtuvo el consentimiento informado del mismo. El análisis ecocardiográfico fue realizado en el departamento de Ecocardiografía del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH) mediante equipo VIVID 3000. Las determinaciones del perfil bioquímico y hematológico fueron realizadas en el laboratorio del INCICH mediante equipos debidamente regulados.

La determinación de Ang-II y Ang-(1-7), fueron determinadas simultáneamente en muestras de primer orina de la mañana, mediante electroforesis capilar de zona. La orina se trató con ácido acético al 4% (v/v), se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se filtró con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m (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/ACETM 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 analito de interés.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de paquete estadístico Analyse-It para Microsoft Excel. Para cada variable a estudiar se estableció que tipo de distribución presentaba en los datos, mediante la prueba contraste de Shapiro Wilk, presentando las gráficas de distribución de datos en la sección de resultados. Para las variables categóricas se presentan proporciones, porcentajes y/o frecuencias, analizándose en casos meritorios mediante diferencia de proporciones. Las variables continuas se analizaron mediante medidas de tendencia central y dispersión. Este tipo de variables se evaluaron mediante la prueba de t de Student para diferencia de medias en grupos no relacionados, en caso de que los grupos de datos cumplieran con curtosis sugestiva de normalidad en su distribución. El análisis para las variables con curtosis sugestiva de no tener una distribución normal se analizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La significancia estadística se estableció en 95%. El poder estadístico al comparar se determinó $>$ 0.9 al comparar los grupos entre sí mediante las medidas de tendencia central. En el análisis de grupos se compararon los pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica aún no intervenidos quirúrgicamente (Grupo A) versus pacientes en seguimiento post cambio valvular aórtico (Grupo B) y versus un grupo de pacientes control sanos (Grupo C). Además se comparó al grupo de pacientes post cambio valvular aórtico versus controles sanos. Dentro del análisis de subgrupos se organizó arbitrariamente a los pacientes postoperados de cambio valvular aórtico en intervalos de tiempo desde su evento quirúrgico hasta el momento de la muestra y se compararon de la siguiente manera: menores o iguales a 2 años, entre 2 y 5 años y mayores a 5 años del recambio

valvular aórtico, cada uno contra el grupo de pacientes controles sanos.

RESULTADOS

Durante el período de recolección de datos se realizó escrutinio de 95 pacientes incluidos en el programa de cirugía para cambio valvular aórtico del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, encontrando en 31 de ellos (Grupo A) las características descritas como criterios de inclusión y sin cumplir ningún criterio de exclusión (sin hipertensión arterial, sin cardiopatía isquémica, sin insuficiencia renal, sin insuficiencia cardíaca y sin uso de medicamentos moduladores del sistema renina angiotensina-aldosterona, SRAA). Del total de pacientes de este grupo se procesaron 31 muestras para niveles urinarios de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] y 30 muestras para niveles urinarios de angiotensina II (Ang II), debido a problemas técnicos en el procesamiento de éste último parámetro para una de las muestras obtenidas. Dentro de los pacientes monitorizados periódicamente en la Clínica de Anticoagulación de la Consulta Externa del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, se realizó el escrutinio de 150 pacientes con seguimiento por cambio valvular aórtico con un intervalo mayor o igual a 18 meses desde el evento quirúrgico, encontrando 31 pacientes (Grupo B) con las características descritas como criterios de inclusión y sin cumplir ningún criterio de exclusión. Todas las muestras se procesaron para la medición de niveles urinarios de Ang-(1-7) y Ang II.

Las características demográficas, clínicas relevantes y hemodinámicas de la estenosis valvular aórtica de los pacientes incluidos en los grupos descritos en el párrafo anterior fueron similares al compararse, y se encuentran plasmadas en las tablas 1 y 2. El promedio de edad fue de 56.4 años para el Grupo A y 54.2 años para el grupo B. El 80% de los pacientes en ambos grupos fueron de género masculino. Se documentó la presencia de Diabetes Mellitus tipo 2 en el 19.3% de pacientes del Grupo A y en el 16.3% de pacientes del Grupo B (p:0.247).

Las características clínicas respecto a niveles de tensión arterial y creatinina sérica fueron similares

al compararse ambos grupos, inclusive con las características actuales y en el momento prequirúrgico del Grupo B. El grado de estrechez valvular aórtica y repercusión hemodinámica fue muy similar (Tabla 2) comparando el Grupo A con los pacientes del Grupo B en su momento prequirúrgico, tomando en cuenta el área valvular aórtica (0.62 cm² versus 0.65 cm²; p: 0.522), el gradiente medio (61.3 mmHg versus 61 mmHg p: 0.938) y la velocidad de flujo aórtico (4.3 m/seg versus 4.5 m/seg; p: 0.673). La función sistólica del ventrículo izquierdo en base a la fracción de expulsión (FEVI) y la fracción de acortamiento (FAct) fue normal en los grupos A y B, sin existir diferencia significativa al compararse los valores referidos del Grupo A contra el Grupo B, en sus momentos prequirúrgico (FEVI p:0.052 ; Fact p: 0.701) y postquirúrgico (FEVI p:0.069 ; Fact p: 0.968)

Dentro del grupo de pacientes postoperados de cambio valvular aórtico, se obtuvo un promedio de intervalo de seguimiento de 6.9 años (DE: 4.9 años) desde el evento quirúrgico hasta el momento de la toma de muestra. Con valores mínimo y máximo de 2 a 25 años para dicho intervalo de tiempo. El 16.2% de los pacientes de este grupo tuvo un intervalo menor o igual a 2 años desde su evento quirúrgico hasta la toma de muestra. El 48% tenía al menos 5 años de seguimiento postquirúrgico y un 19.3% tenía más de 10 años de este intervalo. La muestra de pacientes controles sanos (Grupo C) consistió en 21 pacientes con un promedio de edad de 53.6 años (p: 0.45), obtenidos del personal que labora en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y familiares de pacientes del grupo de casos, todos sin características descritas como criterios de exclusión y en quienes se realizó Ecocardiografía transtorácica documentando adecuada función sistólica del ventrículo izquierdo y ausencia de patología valvular de cualquier tipo. El 70% de los miembros de este grupo fueron del género masculino. Se documentaron cuatro casos con Diabetes Mellitus tipo 2 (p: 0.833). Las características demográficas y clínicas de este grupo son comparablemente similares a los grupos de pacientes caso con estenosis aórtica y de los pacientes en estado postquirúrgico tardío de cambio valvular aórtico. (Ver tablas 1 y 2)

Tabla 1. Características Demográficas

Característica	Pacientes con Estenosis Aórtica (n:31)	Post CVAo n: 31	p	Controles Sanos (n: 21)	p	
Edad	Promedio	56.4 (14.4)*	54.2 (11.7)*	0.3	53.6 (13.2)*	0.45
Género	Masculino	25 (80%)	25 (80%)		14 (70%)	
	Femenino	6 (20%)	6 (20%)		7 (30%)	
Lugar de Residencia	Distrito Federal	6 (20%)	11 (35%)		19 (90%)	
	Provincia	25 (80%)	20 (65%)		2 (10%)	
Antecedentes Patológicos	Diabetes Mellitus	6 (19.3%)	5 (16.3)	0.247	4 (19.04%)	0.83
	HAS	0	0		0	
	Infarto del Miocardio	0	0		0	
	IRC	0	0		0	
Características Clínicas	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	121.2 (10.5)*	116.3 & (12.7)*	0.109	115.4 (14)*	0.08
			118.5 (8.3)*	0.112		
	Presión Arterial Diastólica (mmHg)	75.1 (6.5)*	72.0 & (7.07)*	0.083	72.3 (6.1)*	0.09
			74.5 (5.3)*	0.686		
	Creatinina (mg/dL)	0.96 (0.21)*	1.04 & (0.16)*	0.087	0.88 (0.4-1.1)*	0.20
			0.92 (0.14)*	0.458		

* Representan la desviación estándar del parámetro analizado. & Representan los valores de tensión arterial o niveles de creatinina sérica en la población de controles postoperados de cambio valvular aórtico en su momento quirúrgico. Abreviaturas: IRC: insuficiencia renal crónica. HAS: hipertensión arterial sistémica

Tabla 2. Características de la Enfermedad Valvular Aórtica

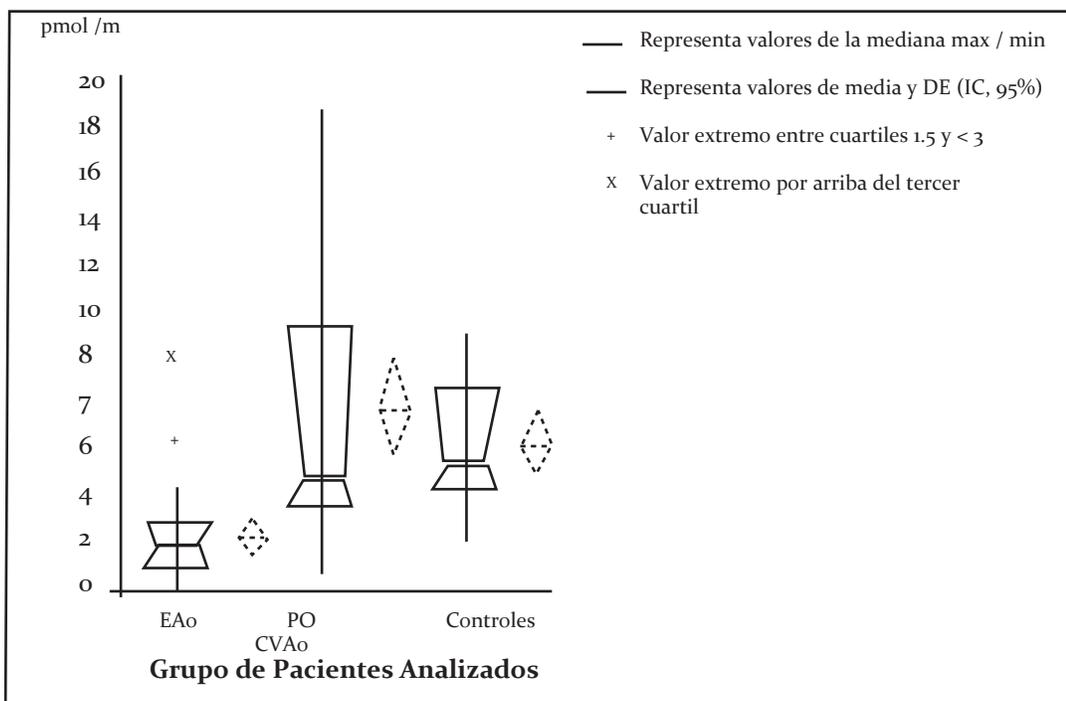
Parámetro	Pacientes con Estenosis Aórtica (n:31)	Controles					
		PO CVAo PreQx (n:31)	p Actual (n:31)	PO CVAo	p	Sanos (n:21)	P
Área Valvular Aórtica (cm ²)	0.62 (0.182)*	0.65 (0.191)*	0.522	ND	NA	ND	NA
Fracción de Expulsión del VI (%)	64.6 (5.35)*	61.5 (7.1)*	0.052	62.1 (5.6)*	0.069	64	0.45
Fracción de acortamiento (%)	37% (7.2)*	38.8 (5.6)*	0.701	38.13 (4)*	0.968	39.1	0.53 (5.3)
Velocidad del flujo Aórtico (m/seg)	4.3 (0.56)*	4.5 (0.44)*	0.673	1.2 (0.3)	<0.01	1.1 (0.2)	< 0.01
Gradiente medio (mmHg)	61.3 (12.7)*	61 (18.4)*	0.938	NG	NA	NG	NA

* Representa la desviación estándar de la medición descrita.

- Abreviaturas: ND (no datos), NA (no aplica), NG (no gradiente) VI (ventrículo izquierdo)

GRAFICO 1

Niveles Urinarios de Angiotensina - (1-7) Según Grupo de Pacientes



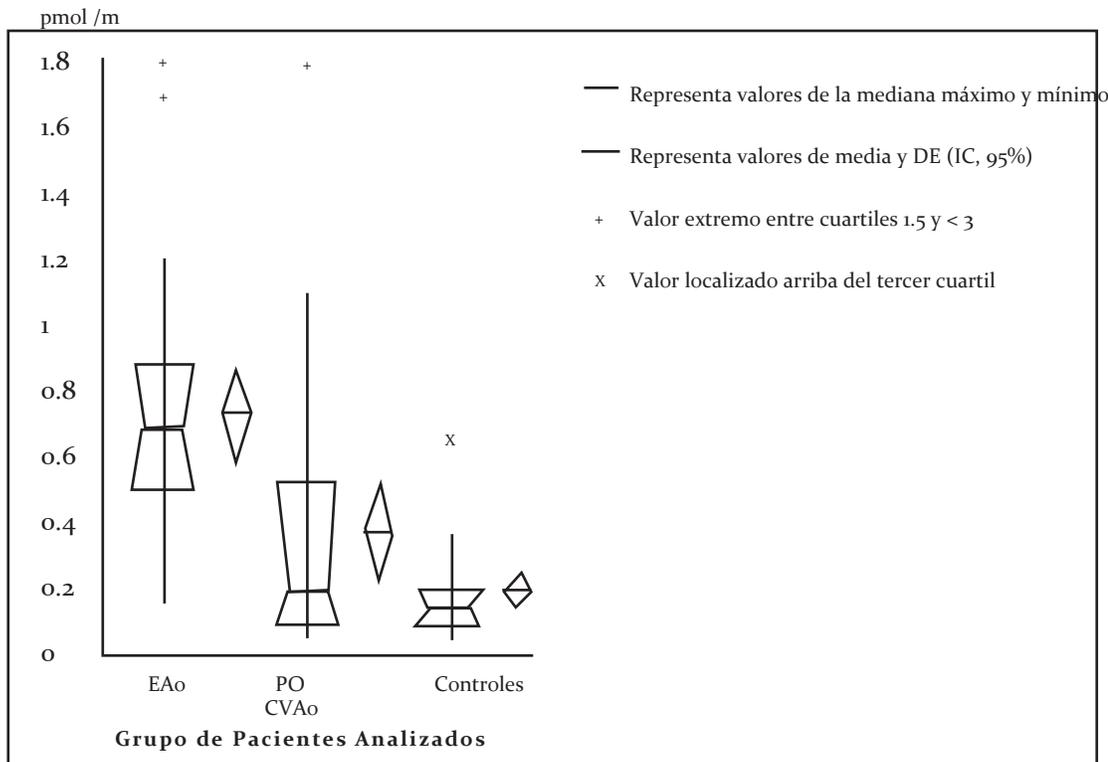
Abreviaturas Utilizadas en Gráficos 1 y 2: IC: intervalo de confianza, DE: desviación estándar, EAo: grupo con estenosis aórtica en momento quirúrgico. PO CVAo: grupo de postoperados de cambio valvular aórtico.

Dirigimos ahora nuestra descripción al objetivo de la presente investigación (ver resumen de análisis estadístico- Tablas 3 y 4; Gráficos 3 y 4). Para el Grupo A el promedio de concentración de Ang-(1-7) fue de 2.09 pmol/mL (DE 1.61 pmol/mL) y una mediana de 1.78 pmol/mL, del total de 31 pacientes solamente el 6% presentaba una concentración normal. La concentración promedio de niveles urinarios de Ang II en el Grupo A fue de 0.727 pmol/mL (DE 0.365 pmol/mL), con solamente el 3% (1 caso) con una concentración dentro del rango normal de Ang II (0.01-0.25 pmol/mL).

Para el Grupo B el promedio de concentración urinaria de Ang-(1-7) fue de 6.98pmol/mL (DE 5.2 pmol/mL) con un 71% de los controles en un rango estrictamente normal (4-8 pmol/mL) solamente un 12% de los pacientes presentaba niveles

importantemente disminuidos (< 3 pmol/L) y sólo el 6% estaba por debajo del promedio descrito para el Grupo A. Las concentraciones urinarias de Ang II en el Grupo B tuvieron un promedio de 0.371pmol/mL. Aunque el promedio de valores se encontró por arriba del rango normal (0.01 a 0.25 pmol/mL), el 57% de los pacientes presentó concentraciones urinarias de Ang II dentro de rango normal.

Dentro del grupo de controles sanos (Grupo C) el promedio para las concentraciones urinarias de Ang II y Ang-(1-7) estuvieron dentro del rango normal, 0.186 pmol/mL (DE 0.15 pmol/mL) y 5.591 pmol/mL (DE 2.576 pmol/mL) respectivamente. El 14% de los pacientes controles sanos presentó un valor de Ang-(1-7) menor al esperado como valor mínimo normal. El 6.5% de estos mismos presentaron una concentración de Ang II por arriba del rango normal. En ningún paciente control coincidió la presencia de valores anormales de Ang-(1-7) y Ang II.



Encontramos que existe una diferencia significativa en las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) al comparar los grupos A y B (n: 31 para ambos, M1-M2: -3.1, U: 825, p: <0.0001, IC: -6.185 a -1.808), así como al comparar los grupos A y C (nA: 31 nC: 21, M1-M2: -3.229, U:585, p: <0.0001, IC: -4.671 a -2.121). No existió una diferencia significativa entre las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) de las muestras B y C (nB: 31 nC: 21, M1-M2: 0.267, U:313, p: 0.8229, IC: -1.44 a 2.931).

En el análisis ejecutado para las muestras de concentraciones urinarias de Ang II, encontramos que también existe una diferencia significativa entre los grupos A y B (nA: 30 nB: 31, M1-M2: 0.4, U: 191, p: <0.0001, IC: 0.23 a 0.55), así como al comparar los grupos A y C (nA: 30 nC: 21, M1-M2: 0.505, U:32, p: <0.0001, IC: 0.38 a 0.65). No existió una diferencia significativa entre las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) de las muestras B y C (nB: 31 nC: 21, M1-M2: 0.06, U:247, p: 0.1455, IC: -0.02 a 0.17).

Como subgrupos (SG) se analizaron a los pacientes contenidos dentro del grupo B, formando conjuntos definidos por intervalo de tiempo entre 18 meses y 2 años (SG B1), entre 2 y 5 años (SG B2) y más de 5 años (SG B3) desde el cambio valvular aórtico hasta el momento de la toma de muestra. Estos tres subgrupos se compararon contra el Grupo C para determinar de manera indirecta si las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) y Ang II, tendían a ser semejantes entre los grupos confrontados, dependiendo del intervalo de tiempo.

Se estableció que la diferencia en las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) del SG B1 no eran significativamente distintas a las del Grupo C (n B1: 5 nC: 21, M1-M2: -3.1, U: 825, p: <0.0001, IC: -6.185 a -1.808). Esta relación estadística se conservó en la comparación entre subgrupos SGB2 contra Grupo C y SGB3 contra C.

Gráfico 6
Proporción de Pacientes con Niveles Urinarios Normales de Angiotensina II

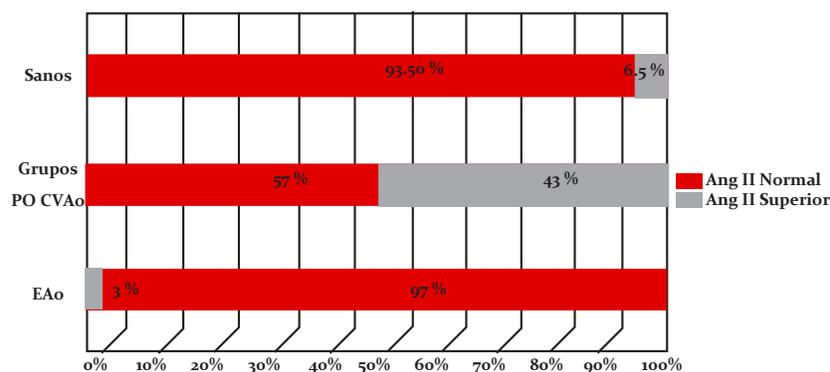
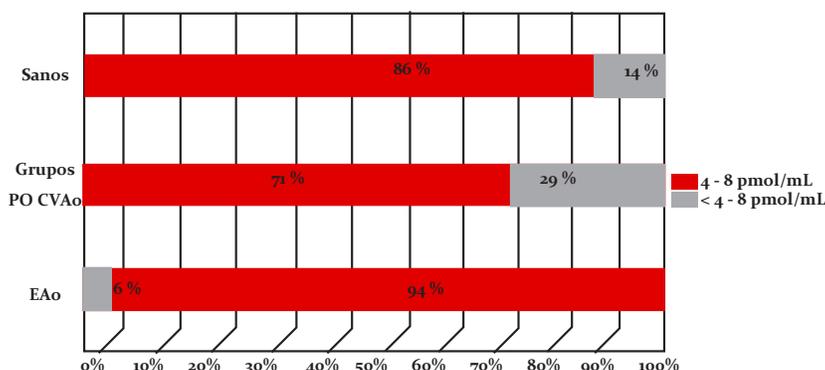


Gráfico 7
Proporción de Pacientes con Valores Normales en Concentración de Angiotensina (1-7)



Abreviaturas: PO CVAo: postoperados de cambio valvular aórtico, EAo: pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica

Tabla 3. Resumen de Análisis Estadístico

	Niveles Urinarios Ang-(1-7)	Niveles Urinarios Ang II
Valores rango normal	4-8 pmol/mL	0.01-0.25 pmol/mL
Estenosis Aórtica (Grupo A)	n: 31	n: 30
• Media	2.087 pmol/mL	0.727 pmol/mL
• Mediana (M)	1.775 pmol/mL	0.69 pmol/mL
• Desviación Estándar	1.617 pmol/mL	0.365 pmol/mL
• Curtosis	4.478	1.949
Controles Post CVAo(Grupo B)	n: 31	n: 31
• Media	6.980 pmol/mL	0.371 pmol/mL
• Mediana	4.330 pmol/mL	0.2 pmol/mL
• Desviación Estándar	5.206 pmol/mL	0.396 pmol/mL
• Curtosis	0.144	4.279
• Seguimiento < 2 años	n: 5	n: 5
• Seguimiento 2-5 años	n: 11	n: 11
• Seguimiento > 5 años	n: 15	n: 15
Grupo Control Sano (Grupo C)	n: 21	n: 21
• Media	5.591 pmol/mL	0.186 pmol/mL
• Mediana	4.879 pmol/mL	0.15 pmol/mL
• Desviación Estándar	2.576 pmol/mL	0.133 pmol/mL
• Curtosis	-1.084	7.133
Análisis Estadístico Significancia Hipótesis nula No. 1	Prueba No paramétrica de Mann-Whitney (U) para muestras independientes 95%	
	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	EAo = Controles PO CVAo	EAo = Controles PO CVAo
• M1-M2	-3.1800	0.4
• IC	-6.185 a -1.808	0.230 a 0.55
• Estadístico U	825	191
• Valor de p	< 0.0001	< 0.0001
Hipótesis nula No. 2	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	EAo = Controles Sanos	EAo = Controles Sanos
• M1-M2	-3.229	0.505
• IC	-4.67 a -2.121	0.380 a 0.650
• Estadístico U	585	32
• Valor de p	< 0.0001	< 0.0001
Hipótesis nula No. 3	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	PO CVAo = Sanos	PO CVAo = Controles Sanos
• M1-M2	0.267	0.06
• IC	-1.44 a 2.931	-0.02 a 0.17
• Estadístico U	313.5	247.5
• Valor de p	0.8229	0.1455
Análisis Estadístico de Subgrupos Significancia Hipótesis nula	Prueba No paramétrica de Mann-Whitney (U) para muestras independientes 95%	
	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	PO CVAo < 2 años = Sanos	PO CVAo < 2 años = Sanos
• IC	-1.699 a 3.79	0.03 a 0.32
• Estadístico U	160	85
• Valor de p	0.8063	0.0108
Hipótesis nula	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	PO CVAo 2-5 años = Sanos	PO CVAo 2-5 años = Sanos
• IC	-1.479 a 4.545	0.01 a 0.25
• Estadístico U	100	61
• Valor de p	0.5386	0.0304
Hipótesis nula	Niveles urinarios de Ang-(1-7)	Niveles urinarios de Ang II
	PO CVAo > 5 años = Sanos	PO CVAo > 5 años = Sanos
• IC	-1.91 a 3.25	-0.06 a 0.16
• Estadístico U	153.5	152
• Valor de p	0.8979	0.8598

EAo: pacientes con estenosis aórtica; PO CVAo: pacientes post cambio valvular aórtico
M1-M2: diferencia de medianas; IC: intervalo de confianza; U: prueba de Mann-Whitney

DISCUSIÓN

El campo de estudio de la Ang-(1-7) es muy amplio y se encuentra en pañales en muchos aspectos. El involucro del SRAA en la fisiopatología de la estenosis de la válvula aórtica ya ha sido documentado al analizar tanto la progresión del daño miocárdico (18) como el valvular en sí (10), así como su participación sistémica (3) y local (21).

Como primicia en el presente trabajo de tesis se ha intentado determinar de manera indirecta el comportamiento del sistema renina angiotensina local miocárdico, en sus dos principales exponentes antagónicos, la Ang II versus la Ang-(1-7), en un grupo de pacientes que no había sido estudiado hasta el momento. Estos pacientes son aquéllos con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica en quienes se supone que no existió una participación del SRAA sistémico debido a que nuestra muestra fue muy selectiva al escoger pacientes que cumplieran con no presentar patologías plenamente relacionadas con la activación de dicho sistema: hipertensión arterial sistémica, insuficiencia renal crónica, cardiopatía isquémica o insuficiencia cardíaca. Además, las características demográficas y clínicas de los pacientes casos con estenosis aórtica y controles postoperados de cambio valvular aórtico fueron muy homogéneos al compararse contra la muestra de controles sanos. (Ver en sección de resultados las Tablas 1 y 2)

La activación de los mecanismos compensatorios locales del miocardio debido a 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 importante.

Observando las proporciones presentadas en los gráficos 4 y 5, existió una diferencia en el porcentaje de pacientes con valores normales en las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) y Ang II del grupo de pacientes que se analizaron en su momento posquirúrgico (grupo B) respecto al grupo de pacientes con estenosis aórtica no corregida (Grupo A), sugiriendo que sus proporciones tienden a parecerse más al grupo de pacientes controles sanos (Grupo C).

La diferencia obtenida al comparar las medidas de tendencia central de las concentraciones urinarias de Ang-(1-7) y Ang II en los grupos A contra C y al comparar A contra B fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$ para cada confrontación de hipótesis). El comportamiento de las concentraciones urinarias de Ang II en el grupo A fue: ser mayor en comparación con la tendencia de B y también mayor que la tendencia en C, pero las concentraciones de Ang-(1-7) tendieron a ser menores comparando los mismos grupos entre sí.

Pero, ¿por qué presentar este patrón en el comportamiento de las concentraciones urinarias de Ang II y Ang-(1-7) en los pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica? si la secuencia esperada de eventos sería:

- a. Debido a la sobrecarga hemodinámica crónica impuesta al miocardio del ventrículo izquierdo, la inducción de una regulación al alta de la ECA local y por ende una mayor concentración tisular de Ang II (8, 10, 12).
- b. La sobreproducción de Ang II estimula la expresión de vías alternas para su degradación, como lo es una mayor síntesis local de Ang-(1-7) a través del aumento en la producción de la ECA₂ (13, 22, 34) en busca de un efecto contra regulador, semejante a lo que se ha reportado en pacientes con infarto sin disfunción sistólica o aquellos con insuficiencia cardíaca crónica (18, 35, 44).
- c. Entonces a mayor concentración tisular, se espera mayor concentración sérica y por ende mayor concentración en orina.

Al no tener un antecedente del análisis en el comportamiento de las concentraciones séricas ni urinarias de Ang-(1-7) en pacientes con estenosis aórtica, se considera tomar como premisa el patrón referido por Ferrario y colaboradores, quienes documentaron para la década de los 90 que los niveles urinarios/séricos de Ang-(1-7) en personas normales conservaba una relación de 2.5/1. Así mismo esta relación disminuía importante y significativamente en pacientes con hipertensión arterial sistémica sin disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (39) esto podría explicarse por

alguna combinación de las siguientes opciones: una menor expresión capilar renal de ACE2 o una disminución en la filtración glomerular de la Ang-(1-7) (35).

Al analizar el comportamiento de las concentraciones de Ang II y Ang-(1-7) a través de las medidas de tendencia central entre los grupos B contra C, no se encontró una diferencia significativa ($p: 0.1455$ y $p: 0.8229$ respectivamente). Este hallazgo sugiere que al liberar la sobrecarga hemodinámica secundaria a la obstrucción mecánica del flujo de salida del ventrículo izquierdo permite al menos en cierto grado una regresión en los mecanismos de producción de Ang II y Ang-(1-7) locales, pudiendo llegar inclusive a un estado de balance normal del SRAA en una buena parte de los pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica sometidos a cambio valvular que conservan su función sistólica dentro de límites normales.

Los datos obtenidos en el presente estudio parecen indicarnos que la normalización en la expresión de la ECA y la ECA2 no sigue un comportamiento igual en los postoperados de reemplazo valvular aórtico, pues el 57% del total de pacientes presentaron una concentración urinaria normal de Ang II y el 71% tenía un nivel normal de Ang-(1-7) medida en orina.

Mediante el análisis de subgrupos de los pacientes sometidos previamente a reemplazo de la válvula aórtica, agrupándolos en intervalos de tiempo, nos muestra como la diferencia en las concentraciones de Ang-(1-7) en comparación con los pacientes sanos no es significativa desde al menos 2 años posterior al cambio valvular. A diferencia de este hallazgo, las concentraciones urinarias de Ang II tienden a ser significativamente similares al grupo control sano después de al menos 5 años de seguimiento.

Dentro de las limitaciones del presente estudio se puede mencionar que idealmente, para complementar la descripción del estado del SRAA en pacientes con estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica, debería haberse determinado las concentraciones séricas de Ang II y Ang-(1-7), e inclusive siendo más agresivos mediante la determinación tisular de la expresión tisular de ECA y ECA2, a través de biopsia

endomiocárdica transoperatoria. Además para evidenciar el beneficio de la intervención quirúrgica oportuna para normalizar el estado del SRAA en este tipo de pacientes el mejor diseño podría optimizarse a ser comparativo en una cohorte en diferentes momentos del seguimiento postquirúrgico, también con mediciones urinarias y séricas de concentraciones de Ang II y Ang-(1-7). Estas limitaciones encuentran cierto grado de justificación en las siguientes explicaciones: las determinaciones séricas de Ang II y Ang-(1-7) subían los costos de manera importante para poder llevar a cabo el estudio y se tenía ya documentado con evidencia una relación establecida entre los niveles de Ang II y Ang-(1-7) en pacientes normales (35). El seguimiento periódico en un estudio de tipo cohorte también elevaba los costos para el grupo de investigación y para los pacientes, pues se debe tomar en cuenta de que el 80% de los pacientes intervenidos quirúrgicamente durante el período del estudio eran foráneos y su seguimiento en clínica de anticoagulación era llevado en sus lugares de origen, presentándose al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con intervalos prolongados en consulta externa. Además el estudio se considera como pivote para estudios de mayor complejidad y mejor diseño metodológico. El análisis de los datos del presente estudio es el punto de partida para despertar el interés y más dudas científicas que pueden ahondarse en investigaciones posteriores, como por ejemplo: Sería interesante determinar en qué momento los pacientes con estenosis aórtica de repercusión hemodinámica ligera o moderada alteran la expresión de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) y por ende modifican las concentraciones de Ang-(1-7). Así mismo puede ser de interés describir el comportamiento periódico del SRAA en el seguimiento de los pacientes sometidos a cambio valvular aórtico.

Si se sabe que los IECA pueden también aumentar las concentraciones de Ang-(1-7) (45) y además existe evidencia de que la Ang-(1-7) inhibe el crecimiento de los cardiomiocitos (31) además de que la Ang II se implica en el proceso inflamatorio local de la progresión del grado de estenosis (10), no suena descabellado pensar en que podría ser una opción terapéutica para evitar la progresión de la enfermedad valvular aórtica en pacientes en fases

tempranas o con repercusión hemodinámica moderada de la estenosis; ya que no se demostró reducción de la progresión del grado de estenosis con el uso de Estatinas (simvastatina) en combinación con ezetimiba en el estudio SEAS (46) se puede suponer que el uso combinado podría tener algún efecto añadido al proceso inflamatorio valvular (47) y producir un efecto benéfico significativo, pues apenas el 14% de los pacientes en este estudio se encontraban utilizando IECAS.

CONCLUSIONES

La activación de los mecanismos compensatorios locales del miocardio debido a la sobrecarga hemodinámica impuesta por la estenosis aórtica de importante repercusión hemodinámica, fueron tan drásticos como para modificar las concentraciones urinarias de angiotensina-(1-7) y angiotensina II, en comparación con el grupo de casos de control sanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonow, R., et al. 2008 Focused Update Incorporated into the ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. *JACC*. Vol 52 No.13 sept. 2008 e18-e25.
2. Alva C., Gómez F., Yáñez L. Estenosis Valvular Aórtica Congénita. Actualización del Tratamiento. *Arch Cardiol Méx* Vol 76 Supl 4/Oct-Dic 2006:152-157
3. Douglas P. Zipes, Md et al Braunwald's Heart Disease a Textbook of Cardiovascular 8th Edition Capitulo 21.
4. Lawrence . S Zisman.. ACE and ACE2: a tale of two enzymes. *Euro Heart Jour*, 2005; 26; 3222-324
5. Chai S y cols. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61;2728-2737
6. Guadalajara J. Entendiendo la Hipertrofia Ventricular Izquierda. *Arch Cardiol Méx* Vol 77 Núm 3. julio- sept 2007:175-180)
7. Steckelings U. and Daschina E and Unger T. The AT₂ receptor: a matter of love and hate. *Peptides* 2005; 26; 1401-1409
8. Timothy L. Reudelhuber A Place in Our Hearts for the Lowly Angiotensin 1-7 Peptide? *Hypertension* 2006;47;811-815
9. Martin P. , Poyan A and Kreutz R. Physiology of Local Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 2006 :86; 747-803.
10. Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, et al. Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 1443-1449.
11. Weber, K. Extracellular matrix remodeling in Heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*. 1997;96:4065-4082)
12. Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y: Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 1999; 83: 53H57H
13. Escudero E. Pinilla O. Paradigmas y paradojas de la hipertrofia ventricular izquierda: desde el laboratorio de investigación a la consulta clínica *Arch Cardiol Méx*. Vol 77No. 3 2007:237-248
14. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of fibrosis by transforming growth factor- β 1. *Mol Gen Metab*. 2000; 71: 418-435.
15. Martínez M. Remodelación cardiaca e inflamación. *Arch Cardiol Mex* Vol 76 Supl 4 2006: S4, 58-66
16. Victoria. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44:1609-1618
17. Stefan Hein, et al Progression From Compensated Hypertrophy to Failure in the Pressure-Overloaded Human Heart Structural Deterioration and Compensatory Mechanisms *Circulation*. 2003;107:984
18. Cam Patterson, The Bitter End The Ubiquitin-Proteasome System and Cardiac Dysfunction *Circulation*. 2007;115:1456-1463
19. Celina M., Hita .A., Gelpi R. Fisiología Integrada de la Hipertrofia Cardíaca. *Rev. Arg. Cardio* 1999; 67; 377-388

20. Helse S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process.. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Oct;18(5):483-91.
21. Helse S, Lindstedt KA, Laine M, Mäyränpää M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Nov 2;44(9):1859-66
22. Carlos M. Ferrario; Mark C. Chappell; E. Ann Tallant; K. Bridget Brosnihan; Debra I. Diz. Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7) Hypertension. 1997;30:535.
23. Shrivane MT, Santos RAS, Broanihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from rat hypothalamo-nerohypophysis system by angiotensina-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:4095-4098.
24. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension.* 1991;18(suppl III):III-126 -III-133
25. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87:E1-E9.
26. Ursula Danilczyk, Josef M. Penninger. Angiotensin-Converting Enzyme II in the Heart and the Kidney *Circ Res.* 2006;98:463-471.
27. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8258-8263.
28. Walkyria Oliveira Sampaio, Robson Augusto Souza dos Santos, Raphael Faria-Silva, Leonor Tapias da Mata Machado, Ernesto L. Schiffrin and Rhian M. Touyz. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways *Hypertension* 2007;49:185-192
29. Mariela M. Gironacci, Mari'a S. Valera, Irene Yujnovsky, Clara Peña. Angiotensin-(1-7) Inhibitory Mechanism of Norepinephrine Release in Hypertensive Rats *Hypertension* 2004;44:783-787
30. E. Ann Tallant, Carlos M. Ferrario, and Patricia E. Gallagher. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1560-H1566, 2005.
31. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280:R994-R1000.
32. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2002;40:774 -779.
33. Jorge F. Giani, Mariela M. Gironacci, Marina C. Muñoz, Clara Peña, Daniel Turyn, and Fernando P. Dominici. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1154-H1163, 2007.
34. Zisman L; Meixell G; Bristow M; Canver Ch.. Ang-(1-7) formation in the Intact Human Heart. *Circulation.* 2003;108:1679-1681
35. LM, Risvanis J, Kubota E et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart Jour* 2005;26: 369-375.
36. Michikado Iwata,¹ Randy T. Cowling,¹ Devorah Gurantz,¹ Cristina Moore, Shen Zhang, Jason X.-J. Yuan, and Barry H. Greenberg. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2356-H2363, 2005.
37. Grobe JL, Der Sarkissian S, Stewart JM, Meszaros JG, Raizada MK, Katovich MJ.. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond)* 2007 Oct;113(8):357-64.
38. Shlomo Keidar, Alexander Strizevsky, Ayelet Raz and Aviva Gamliel-Lazarovich. ACE2 activity is increased in monocyte-derived macrophages from prehypertensive subjects *Nephrol Dialysis Transplant* 2007 22(2):597-601
39. Ferrario C. et al. Characterization of Angiotensin - (1-7) in Urine of Normal Essential Hypertensive Subjects. *Am J Hypertension* 1998;11: 137-146
40. Ursula Danilczyk, Josef M. Penninger. Angiotensin-Converting Enzyme II in the Heart and the Kidney *Circ Res.* 2006;98:463-471.
41. Lawrence S. Zisman, et al. Increased Angiotensin-(1-7)-Forming Activity in Failing Human Heart Ventricles Evidence for Upregulation 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.
42. Epelman S. et al. Detection of Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Heart Failure. *JACC* Vol.52, No.9, 2008:750-54.
43. Burrell Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med* 2004;2:19.
44. Haulica I., Bild W. and Serban D. Review: Angiotensin Peptides and their Pleiotropic Actions. *J Renin Ang Aldost Syst* 2005; 6; 121
45. Chappell, Mark C.; Ferrario, Carlos M. Angiotensin-(1-7) in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypert* :Volume 8(2) March 1999pp 231-235
46. Rossebo A. et al. Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. *NEJM.* Sept 27, 2008 . Vol 359; 1343-1356.
47. D E Newby, S J Cowell and N A Boon. Emerging medical treatments for aortic stenosis: statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, or both? *Heart* 2006;92:729-734