

RENATA DUTRA DE PAULA

ESTUDO DE MECANISMOS DEPENDENTES E
NÃO DEPENDENTES DO RECEPTOR MAS NA
POTENCIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR DA
BRADICININA PELA ANGIOTENSINA-(1-7)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2011

RENATA DUTRA DE PAULA

ESTUDO DE MECANISMOS DEPENDENTES E
NÃO DEPENDENTES DO RECEPTOR MAS NA
POTENCIAÇÃO DO EFEITO HIPOTENSOR DA
BRADICININA PELA ANGIOTENSINA-(1-7)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2011

*"...Liberdade, essa palavra
que o sonho humano alimenta
que não há ninguém que explique
e ninguém que não entenda..."*

Cecília Meireles

Dedico esta tese a todos que no seu silêncio e, com amor,
negam as estruturas de dominação.

*"Quando uma criatura humana desperta para um grande
sonho e sobre ele lança toda força de sua alma, todo o
universo conspira a seu favor."*

Johann Wolfgang Goethe

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram dos trabalhos e do processo construtivo que os anos de pós-graduação me proporcionaram. Vou listar algumas que me marcaram pela conduta admirável, pela amizade e companheirismo ou pelo apoio e incentivo em algum momento dessa jornada.

Ao Prof Robson, meu orientador, obrigada pela oportunidade, incentivo, apoio, confiança, paciência, atenção e amizade nestes anos de convivência e aprendizado.

A todos os professores do Depto de Fisiologia e Biofísica do ICB-UFMG, especialmente: Marco Antonio P Fontes, Andrea S Haibara, Maria José Campagnole-Santos, Leonor T da Mata Machado; e, colaboradores do Prof Robson, Dr Michael Bader e Dr Mihail Todiras. Agradeço pela referência de compromisso com o trabalho e pela imensa ajuda e suporte.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial a Maria da Glória R Machado e a Giancarla A Botelho-Santos e, também, a Sílvia Heringer-Walter pelo carinho, amizade, compreensão e conselhos.

A todos os funcionários, especialmente o nosso querido José Roberto Silva (Zezé), a batalhadora Marilene L Oliveira, a Ilma, pelo zelo com os camundongos e pela simpatia, e a inesquecível e querida Maria Célia S Costa (Celinha).

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779 – antagonista seletivo da Ang-(1-7), [D-Ala⁷]Ang-(1-7)

Ang A – Angiotensina A, ou [Des-Asp¹]Ala¹-Ang-(1-8)

Ala-Ang-(1-7) – [Des-Asp¹]Ala¹-Ang-(1-7)

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(2-7) – Angiotensina-(2-7)

Ang-(3-7) – Angiotensina-(3-7)

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III, Angiotensina-(2-8)

Ang IV – Angiotensina IV, Angiotensina-(3-8)

ANOVA – Análise de variância

BK – Bradicinina

CHO – Células de ovário de hamster

CHO-Mas – Células de ovário de hamster transfectadas com o receptor Mas

[D-Pro⁷]Ang-(1-7) – antagonista seletivo da Ang-(1-7)

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECA2 – enzima conversora de angiotensina 2

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

Fig – figura

FVBN – linhagem de camundongos transgênicos

ia – intra-arterial

iv – intravenoso (a)
ip – intraperitoneal
LNAME – inibidor da síntese de óxido nítrico
Mas – receptor da Ang-(1-7)
Mas-KO – camundongo ou célula *knockout* do receptor Mas
NO – Óxido Nítrico
NOS – Sintase de Óxido Nítrico
Pag – Página
PA – pressão arterial
PAM – pressão arterial média
PG – prostaglandina
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
SCC – Sistema Calicreína-Cininas
SHR – ‘*spontaneously hypertensive rats*’, ratos espontaneamente hipertensos
SRA – Sistema Renina-Angiotensina
Tab – Tabela
UP – Unidade Potenciadora
WT – camundongo ou célula *Wild Type*, tipo selvagem para o receptor Mas.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig I: Sistema Renina Angiotensina, visão clássica e visão atualizada, segundo a figura de Burrell e cols., 2004. Pag 32.

Fig II: Figura esquemática do receptor MAS na membrana celular. Pag 33.

Fig III: Pressão arterial dos camundongos Mas-KO e WT, FVBN anestesiados. Pag 42.

Figura IV: Foto ilustrativa do gel de agarose revelado em luz UV, mostrando a presença de banda correspondente ao receptor Mas, ou a ausência da mesma em animais Mas-KO. Pag 44.

Tab 1: Unidade Potenciadora (UP) e Concentração de Inibição (IC50). Pag 37.

Tab 2: Sequência de oligonucleotídeos correspondentes ao receptor MAS e seu antisense. Pag 44.

Fig 4.1: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos das linhagens FVBN e Black C57. Pag 47.

Fig 4.2: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) em camundongos FVBN anestesiados. Pag 48.

Fig 4.3: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) em camundongos FVBN anestesiados. Pag 49.

Fig 4.4: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ala¹Ang-(1-7) em camundongos FVBN anestesiados. Pag 50

Fig 4.5: Gráfico que compara grupos de estudo de curvas dose-resposta de Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala-Ang-(1-7) associada a BK em camundongos FVBN WT e FVBN MAS-KO a esquerda e direita respectivamente. Pag 52.

Fig 4.6: Efeito hipotensor da BK associado a curvas dose-resposta de Ang-(1-7) em camundongos fêmeas FVBN acordadas. Pag 54.

Fig 4.7: Efeito da inibição aguda da ECA pelo pré-tratamento com captopril de camundongos FVBN WT (esquerda, n=7) e MAS-KO (direita, n=9) acordados. Pag 56.

Fig 4.8: Efeito da inibição aguda da síntese de NO pelo pré-tratamento com L-NAME de camundongos FVBN WT (esquerda, n=8) e MAS-KO (direita, n = 8) acordados. Pag 58.

Fig 4.9: Efeito hipotensor da BK associado a curvas dose-resposta de Ang-(1-7) e de seu inibidor, [D-Pro⁷]Ang-(1-7), em camundongos fêmeas FVBN WT anestesiadas. Pag 60.

RESUMO

A Ang-(1-7) potencia o efeito hipotensor da BK em ratos normotensos e hipertensos. Os antagonistas específicos da Ang-(1-7), A-779 ou [D-Pro⁷]-Ang-(1-7), inibem a potenciação da BK em ratos. Os efeitos do heptapeptídeo Ang-(1-7) são mediados principalmente pelo receptor Mas, que é acoplado a uma proteína G relacionada à sinalização intracelular da Ang-(1-7).

Comparamos a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala¹-Ang(1-7) em camundongos pertencentes às linhagens FVBN e Black C56, WT ou Mas-KO. As respostas hipotensoras de injeções *in bolus* de BK (40 ng) associada a doses diferentes de cada peptídeo (80, 160 and 320 ng) foram comparadas ao efeito de doses simples de BK (40 and 80 ng). O mesmo protocolo foi executado em camundongos pré-tratados com captopril e L-NAME. Em outro grupo, avaliamos o efeito do antagonista da Ang-(1-7), o [D-Pro⁷]Ang-(1-7) associado a curva dose-resposta de Ang-(1-7) e BK em injeções *in bolus*.

Tanto a Ang-(1-7) quanto os peptídeos derivados dela não alteraram a PAM quando administrados isoladamente, mas potenciaram de forma significativa o efeito hipotensor da BK em camundongos WT. A Ang-(1-7) (160 ng) transformou o efeito de uma dose simples de BK (40 ng) no equivalente do efeito de uma dose dupla (80 ng) nos camundongos WT, Black C56 e FVBN. Em ambas as linhagens, a potenciação da BK pela Ang(1-7) não foi significativa nos animais Mas-KO e esse foi o principal

achado desse estudo. O pré-tratamento dos animais WT com L-NAME resultou na diminuição significativa da potenciação da BK pela Ang-(1-7).

Assim, esses estudos demonstraram que a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) depende de mecanismos mediados pelo receptor Mas e pela síntese e liberação de NO.

ABSTRACT

Ang-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin (BK) in normotensive and hypertensive rats. Ang-(1-7) specific antagonists, A-779 or [D-Pro7]-Ang-(1-7), prevented the BK potentiation in rats. Ang-(1-7) effects are mainly mediated by Mas receptor. Mas codes for a G protein-coupled receptor that is implicated in Ang-(1-7) signaling.

We evaluate the role of Mas receptor in the potentiation of BK hypotensive effect by Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) or Ala-Ang(1-7) in FVBN and Black C56 mice, WT or Mas-KO female mice. The hypotensive effect of bolus injections of BK (40 ng) combined with different doses of each peptide (80, 160 and 320 ng) were compared to the effect of single doses of BK alone (40 and 80 ng). The same protocol was performed in mice pre-treated with Captopril and L-NAME. In other group, we evaluated the effect of Ang-(1-7) antagonist [D-Pro7]Ang-(1-7) combined to Ang-(1-7) and BK *in bolus* injections.

Ang-(1-7) or Ang-(1-7) related peptides alone did not change MAP but significantly potentiated the hypotensive effect of BK in WT mice. Ang-(1-7) (160 ng) transformed the effect of a single dose of BK (40 ng) to the effect of its double (80 ng) when the experiments were performed either in Black C56 or FVBN WT mice but it was not significant in Mas-KO mice, which was the most important finding of this study. L-NAME pre-treatment of mice attenuated the BK potentiation of Ang-(1-7).

In summary those results have demonstrated that potentiation of the hypotensive effect of BK of Ang-(1-7) relies on Mas receptor and NO synthesis and releasing mechanisms.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
SUMÁRIO.....	XV
1. INTRODUÇÃO	
1.1– O Endotélio.....	18
1.2– O Endotélio e o Sistema Renina-Angiotensina.....	22
1.3– A importância da Ang-(1-7) no SRA.....	29
2. ESTUDOS PRELIMINARES E OBJETIVO.....	34
2.1 – Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 – Animais.....	38
3.2 – Drogas utilizadas.....	38
3.3 – Procedimentos cirúrgicos.....	39
3.3.1. Experimentos com animais anestesiados.....	39

3.3.2. Experimentos com animais não anestesiados.....	39
3.4 – Medidas de pressão arterial.....	40
3.5 – Administração de drogas.....	40
3.6 – Cálculo da Unidade Potenciadora e análise estatística.....	40
3.7 – Gráficos.....	41
3.8 – Controle hemodinâmico.....	42
3.9 – Controle por genotipagem.....	43
4. RESULTADOS	
4.1 – A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos anestesiados não difere entre as linhagens FVBN e Black C56.....	45
4.2 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos anestesiados.....	48
4.3 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) em camundongos anestesiados.....	49
4.4 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) em camundongos anestesiados.....	50
4.5 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ala ¹ -Ang-(1-7) em camundongos anestesiados.....	51
4.6 – Gráfico comparativo da potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala ¹ -Ang-(1-7) em	

camundongos anestesiados.....	53
4.7 – Papel da ECA na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7)	55
4.8 – Efeito do inibidor de NOS, L-NAME, na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7).....	57
4.9 – Efeito do antagonista, [D-Pro ⁷]Ang-(1-7), na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7)	59
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1– O Endotélio

O endotélio é o tecido que reveste internamente os vasos sanguíneos (artérias e veias), o coração e vasos linfáticos. É constituído por uma monocamada de células que se comportam como um órgão endócrino envolvido na geração e regulação de múltiplos processos fisiológicos e fisiopatológicos como coagulação, inflamação, aterosclerose e angiogênese. O endotélio contribui para a homeostase cardiovascular, mantendo a fluidez do sangue e ajustando o calibre dos vasos sanguíneos às constantes mudanças no ambiente hemodinâmico e humoral. A célula endotelial tem a capacidade de “detectar” alterações nas forças hemodinâmicas (físicas) e responder às substâncias vasoativas (circulantes ou produzidas localmente) e mediadores liberados de células sanguíneas e plaquetas. Esses estímulos provocam a síntese/secreção de substâncias biologicamente ativas do endotélio que modulam o tônus (estado de contração) e a estrutura do músculo liso vascular subjacente (Fleming e cols., 1999; Rubanyi, 1993). A modulação do tônus muscular liso é mediada pela síntese e secreção de fatores relaxantes derivados do endotélio, como a prostaciclina (PGI_2), óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e fatores contráteis como os metabólitos do ácido aracdônico, PGH_2 , TXA_2 , a endotelina I e a angiotensina II (Rubanyi, 1993; Luscher & Barton, 1997).

Os estudos de Furchgott e Zawadski (1980) que demonstraram a vasodilatação induzida pela acetilcolina dependente da presença do

endotélio foram um marco relevante. Posteriormente, estudos de bio-ensaio demonstraram que este efeito era mediado por um fator humoral difusível, lábil, com meia vida de poucos segundos. Este fator relaxante derivado do endotélio foi identificado como o NO (Ignarro e cols., 1988; Furchgott, 1993). Além de sua ação vasodilatadora, o NO controla diversos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, proliferação celular, apoptose, inflamação, adesão e agregação de plaquetas e leucócitos à parede vascular (Moncada e cols., 1991). O NO é um radical livre produzido pela NO sintase (NOS) que catalisa a oxidação do átomo terminal de nitrogênio guanido da L-arginina, formando óxido nítrico e L-citrulina (Palmer & Moncada, 1989). Esta reação requer cofatores essenciais como a calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina (BH4) (Marletta, 1993), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida NADPH), heme e íons zinco. (Fleming & Busse, 2003). Como molécula sinalizadora, o NO é produzido por duas isoformas da NOS expressas constitutivamente e cálcio dependentes: a NO sintase neuronal (nNOS) e a NO sintase endotelial (eNOS). Como agente inflamatório e na resposta imune, o NO é produzido pela NO sintase induzida (iNOS) sendo sua ativação independente dos níveis de cálcio intracelular (Forstermann e cols., 1993; Forstermann e cols., 1994; Alderton e cols., 2001), e podendo ser observada em vários tipos de células em situações patológicas, como em processos inflamatórios ou após tratamento com endotoxina, fator de necrose tumoral (FNT) e outras citocinas (Forstermann e cols., 1994; Rubanyi, 1993). Porém, trabalhos posteriores mostraram que a eNOS também pode ser ativada por uma via independente

do aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Fleming e cols., 1999). Em 1999, Dimmeler e cols., Fulton e cols. e Mitchell e cols. demonstraram que o principal mecanismo de ativação da eNOS dependia da sua fosforilação pela proteína quinase B (PKB/Akt). Após a liberação pelas células endoteliais, o NO atua localmente sobre o músculo liso subjacente onde ativa a guanilato ciclase solúvel que, por sua vez, provoca aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc modifica o tônus vascular por diversos mecanismos, por exemplo diminuindo a concentração de Ca^{+2} livre no citosol, fosforilando a proteína sensível ao calor HSP20, importante modulador do processo cíclico de formação de pontes entre os filamentos contráteis durante o processo de contração muscular (Fleming & Busse, 2003) e ativando a proteína quinase G (PKG) que por diversos mecanismos promove o relaxamento da musculatura lisa vascular. A PKG pode ativar canais de potássio (K^+) induzindo hiperpolarização ou estimular a saída de Ca^{+2} do citoplasma da célula, o que leva a vasodilatação. A PKG pode, igualmente, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{+2} , diminuindo a contração muscular. A ativação de canais de K^+ diretamente pelo NO sem envolver a participação do GMPc também já foi descrita (Carvalho e cols., 2001).

A liberação de NO pelas células endoteliais ocorre em resposta à ativação de receptores por substâncias vasoativas como acetilcolina, bradicinina, Ang II, substância P e trombina. Além disso, estímulos físicos, tais como, a força de arraste provocada pelo fluxo sanguíneo, a pressão do sangue na parede do vaso e a tensão de cisalhamento (*shear stress*) são estímulos fisiológicos que aumentam a produção de NO (Moncada e cols.,

1991; Palmer e cols., 1987; Angus & Cocks, 1989). O NO liberado possui meia-vida de poucos segundos e é inativado através de sua ligação com o grupo heme da hemoglobina ou por oxidação a nitrito e nitrato, o que resulta em perda de sua capacidade vasodilatadora (Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

Além do NO, a célula endotelial libera prostaciclina (PGI_2), um metabólito do ácido aracdônico, derivado dos fosfolípidos da membrana por ação da fosfolipase A_2 , potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, (Moncada e cols., 1977). Os efeitos fisiológicos da PGI_2 são mediados pela ativação da enzima adenilato ciclase e consequente aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). A célula endotelial libera PGI_2 em resposta a tensão de cisalhamento, hipóxia, e diversas substâncias (acetilcolina, bradicinina, trombina e fator de crescimento derivado de plaquetas) que também provocam liberação de NO. (Luscher & Barton, 1997; Gryglewski e cols., 1988).

A partir de observações em vasos da circulação coronariana de que os inibidores da via da L-arginina e da cicloxigenase não aboliam totalmente o relaxamento dependente do endotélio e, que as células do músculo liso vascular eram hiperpolarizadas durante o relaxamento não dependente de NO, a atuação de outros mediadores relaxantes quimicamente diferentes foi proposta (Rubanyi & Vanhoutte, 1987; Rubanyi e cols., 1987; Busse e cols., 2002), incluindo um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os mecanismos envolvidos nesta ação indicaram que o EDHF poderia ser um ativador endógeno dos canais K^+ o que provocaria um aumento do efluxo do K^+

celular. Este efeito aumenta, conseqüentemente, o número de cargas negativas na superfície interna da membrana e reduz o influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem, levando à diminuição do Ca^{2+} livre no citosol e conseqüente relaxamento da célula muscular lisa (Felétou & Vanhoutte, 1999; Hecker, 2000).

1.2 – O Endotélio Vascular e o Sistema Renina-Angiotensina

Os peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA) desempenham papel importante no controle do tônus vascular. As ações do SRA são mediadas não apenas pela Ang II, mas por outros peptídeos angiotensinérgicos, como a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] cujos efeitos são, na maioria das vezes, opostos ou distintos aos da Ang II (Ferrario e cols., 1998; Santos e cols., 2000; Kucharewicz e cols., 2002; Ferrario e cols., 2004). Ang II e Ang-(1-7) exercem influência modulatória dentro do próprio SRA (Ferrario e cols., 1997) e em outros grupos de substâncias vasoativas, como os peptídeos do SCC, especialmente a bradicinina (BK), ativando diferentes vias de sinalização intracelular, as quais interagem entre si, permitindo a sintonia fina das atividades celulares necessárias para a manutenção do tônus vascular (Santos e cols., 2001; Almeida e cols. 2000; Li e cols., 1997).

Tradicionalmente, o SRA é visto como um sistema endócrino típico cujo principal efector, a Ang II, é um potente vasoconstritor (Brosnihan e cols., 1988; Ferrario e cols., 1990a e b). A Ang II é um dos produtos de uma cascata enzimática que se inicia com a ação da renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, sobre um substrato plasmático, o

angiotensinogênio, produzido no fígado, que, quando hidrolisado, libera angiotensina I (Ang I), decapeptídeo sem atividade direta conhecida. A Ang I é posteriormente clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente principalmente nas células endoteliais do território vascular pulmonar, liberando o octapeptídeo biologicamente ativo Ang II (Dzau, 1986). Ang II também pode ser formada independentemente da ECA por vias envolvendo calicreína ou cininases tipo serino proteases (Arakawa, 1996). Serino proteases também podem ativar a pró-renina e metabolizar angiotensinogênio diretamente para Ang II (Campbell, 1993). A Ang II assim produzida passaria a exercer suas funções interagindo com receptores, em órgãos alvo distantes do sítio de produção. A Ang II causa contração e hipertrofia da musculatura lisa vascular, aumento da atividade simpática e liberação de hormônios adrenomedulares (Ferrario e cols., 1986), secreção de aldosterona (Peach, 1977), liberação de hormônios hipofisários (ACTH e Vasopressina) (Ferrario e cols., 1986) e conservação de sódio e água através de seus efeitos sobre a hemodinâmica renal e reabsorção tubular (Zanchetti, 1985; Hall, 1991). A Ang II também estimula o comportamento de ingestão de água provocando sede e apetite por sódio (Fitzsimons, 1998). A liberação de renina, e conseqüente formação de Ang II, é estimulada quando há diminuição da pressão de perfusão renal ou redução da concentração de sódio em nível da mácula densa, aumento da atividade simpática renal mediada por receptores β_1 adrenérgicos ou, por fatores circulantes, como catecolaminas, prostaglandinas e prostaciclina. Por outro lado, a Ang II, o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a vasopressina reduzem a liberação de renina.

A visão tradicional da cascata de formação da Ang II mostra o processamento linear do angiotensinogênio e a Ang II como o produto biologicamente ativo mais importante, desconsiderando outras possibilidades metabólicas.

A biotransformação de Ang I e Ang II em outras angiotensinas pode ser catalisada por diversas enzimas. Entre elas: a prolil-endopeptidase, a endopeptidase neutra, a prolil-carboxipeptidase e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Donoghue e cols., 2002). O surgimento de novas técnicas de biologia molecular possibilitou a confirmação da existência de síntese local dos componentes do SRA em vários tecidos além dos rins e do fígado (Ganten, e cols., 1986; Dzau e cols., 1986). Deschepper, e cols. (1986) mostraram que o mRNA para renina está presente em vasos sanguíneos, miocárdio, adrenais, rins, glândulas endócrinas, cérebro e órgãos do sistema reprodutor. O SRA, além de possuir funções endócrinas, pode agir na célula que produz o peptídeo (funções intrácina e autócrina) ou sobre células vizinhas (função parácrina).

Assim, uma nova conceituação do sistema renina-angiotensina (SRA) aponta para uma multiplicidade de mediadores biológicos capazes de modular o funcionamento de sistemas em diferentes níveis e em diferentes órgãos e tecidos. Atualmente, considera-se que as ações biológicas do SRA não dependem unicamente da formação de Ang II, já que tanto o decapeptídeo angiotensina I [Ang-(1-10)] quanto o octapeptídeo Ang II [Ang(1-8)], podem sofrer processo de biotransformação dando origem a outros peptídeos bioativos menores [(Ang III, Ang IV e Ang-(1-7)] (Brosnihan e cols., 1988; Santos e cols.,

1988; Ferrario e cols.,1991; Fitzsimons, 1998). A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang II pela ação da ECA2, ou por uma via independente da ECA, a partir da Ang I. A Ang-(1-7) tem sido apontada como mediador importante do SRA, pois possui ações biológicas usualmente opostas à Ang II. Estudos recentes têm detalhado a formação das diversas angiotensinas de interesse fisiológico e farmacológico: Ang-(2-8), ou (Ang III); Ang-(3-8), ou (Ang IV); Ang-(1-7); Ang-(2-7) e a Ang-(3-7) (Fig I). Também foram descritas a Ang A e a Ala¹-Ang-(1-7) (Jankowski e cols, 2006; Lautner e cols, 2009).

Os SRA pode ser compreendido detalhadamente com o uso de inibidores que bloqueiam vários estágios da cascata de formação de angiotensinas (inibidores da renina e inibidores da ECA) ou que impedem sua ligação aos receptores (moduladores de afinidade ou antagonistas de receptores). Eles possibilitaram a caracterização das ações dos peptídios angiotensinérgicos (Timmermans e cols.,1993). Inicialmente, Pals e cols. (1971), mostraram que [Sar¹, Val⁵, Ala⁸]Ang II (Saralasin) e [Sar¹, Thr⁸]Ang II (Sartran), análogos da angiotensina II, agem como antagonistas competitivos dos efeitos pressóricos, miotrópicos e dipsogênicos da Ang II. No entanto conservam parte da atividade agonista, são inativos por via oral e rapidamente degradados, o que limita seu uso tanto em pesquisa como em terapêutica (Peach e Chiu, 1974; Timmermans e cols., 1993).

Estudos mais detalhados dos receptores angiotensinérgicos (Murphy e cols.,1991; Sasaki e cols.,1991) e a síntese de seus antagonistas farmacológicos seletivos (Chiu e cols., 1986; Blankley e cols., 1991; Duncia e cols., 1992) levaram à identificação de pelo menos dois sub-tipos

de receptores para angiotensina, classificados em AT1 e AT2 (Bumpus e cols., 1991). O receptor AT1 é antagonizado pelo derivado imidazólico DUP 753 (Losartan), enquanto o receptor AT2 é sensível aos compostos PD123319, PD123177 ou ao peptídeo modificado CGP42112A (Chiu e cols., 1986; Whitebread e cols., 1989; Bumpus e cols., 1991; Bottari e cols., 1993). Os dois subtipos de receptores também podem ser diferenciados pela sua sensibilidade a agentes redutores como o ditioneitol (DTT), que inativa os receptores AT1, mas não afeta, nem aumenta a sensibilidade dos receptores AT2 (Chiu e cols., 1989; Speth *et al*, 1991).

Os efeitos da Ang II sobre a contratilidade cardíaca, vasoconstrição, hipertrofia vascular, fluxo renal e transporte de sódio, liberação de aldosterona e vasopressina, sede, produção de radicais livres, diminuição dos níveis plasmáticos de adiponectina (Ran e cols., 2006), aumento da secreção de insulina (Ramracheya e cols., 2006), apoptose de células beta (Chu e cols., 2006), diminuição da gliconeogênese e liberação da glicose pelo fígado (Assimacopoulos-Jeannet e cols. 1982) e elevação dos triglicerídeos plasmáticos (Ran e cols., 2004), assim como suas ações sobre o cérebro são mediadas por receptores AT1 que são encontrados no cérebro, coração, vasos, fígado, rins e glândulas adrenais. Os receptores AT2 são expressos, em níveis elevados, no feto e também em adultos em certas circunstâncias patológicas, sugerindo um possível papel na diferenciação celular, crescimento e regeneração (Chung e cols., 1998; Csikos e cols., 1998), entretanto a expressão em adultos é, geralmente, mais restrita, sendo limitada ao coração, endotélio, glândulas adrenais, ovários, útero e algumas partes do cérebro. Seus efeitos são geralmente

descritos como opostos aos mediados pelos receptores AT1, exemplo vasodilatação, liberação de NO, inibição da proliferação e do crescimento celular e da apoptose (Unger e cols., 1996). Entretanto, estudos mais recentes, mostram os receptores AT2 mediando efeitos neurotróficos no sistema nervoso central (Culman e cols., 2001) e sofrendo *upregulation* em áreas cerebrais com isquemia pós choque o que sugere uma atividade neuroprotetora (Li e cols.,2005). No rim, parece participar do controle da natriurese e regulação da pressão sanguínea, através do efeito contraregulatório ao receptor AT1, envolvendo bradicinina, óxido nítrico, GMPc e a via do citocromo P-450 (Gallinat e cols., 2000; Siragy, 2000).

A clonagem do receptor AT1 mostrou que ele possui sete segmentos hidrofóbicos transmembrana formando alfa-hélices na bicamada lipídica, sendo acoplados à proteína G (Bumpus e cols., 1991; Inagami e cols., 1992; Inagami e Harris, 1993; Bottari e cols., 1993; Hunyady e cols., 1996) e que em ratos pode ser subdividido em dois subtipos AT1A e AT1B (Elton e cols., 1992; Iwai e Inagami, 1992; Kakar e cols., 1992; Ye e Healy,1992). Os receptores AT1A mostram maior afinidade pelo Dup 753, enquanto os receptores AT1B são mais sensíveis ao PD 123319. A ativação do receptor AT1 provoca a ativação das fosfolipases C (PLC), D (PLD) e A2 (PLA2). A PCL causa formação de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol levando a um aumento dos níveis de cálcio livre no citosol (Pheilschifter e Bauer, 1986; Douglas, 1987) e ativação da proteína quinase C (PKC) (Alexander e cols., 1985). Os metabólitos da PLD estimulam a formação de ânions superóxido, ativam tirosino quinases e modulam o cálcio intracelular (Touyz & Schiffrin, 1999). A ativação da PLA2 leva à

liberação de metabólitos do ácido aracdônico (AA) dos fosfolípidos da membrana. O AA é metabolizado por diversas enzimas com a consequente produção de PGI₂, tromboxano, leucotrienos e ácidos epoxieicosatrieenólicos (Bonventre, 1992).

A clonagem do receptor AT₂ em ratos, camundongos e humanos mostrou a organização estrutural típica dos receptores acoplados a proteína-G e a existência de aproximadamente 34% de homologia com o receptor AT₁ (Kambayashi e cols., 1993; Mukoyama e cols., 1993; Nahmias e Strosberg, 1995) mas, não forneceu dados que ajudem a explicar os mecanismos de ação intracelulares e as funções fisiológicas associadas com este receptor. Estudos de Nahmias e Strosberg (1995) mostraram que seu mecanismo de ação intracelular parece envolver a ativação da tirosina fosfatase (PTP) ou a inibição da tirosina quinase (TK).

Outros receptores para Ang II são identificados em células de neuroblastoma de camundongo (Inagami e Harris, 1993), nos quais a ligação de Ang II marcada não foi afetada nem por Dup 753 ou por PD 123319.

A Ang IV foi inicialmente descrita como ativadora de um receptor específico por Wright e Harding, em 1992. Atualmente, sabe-se que a Ang-IV é ativadora da aminopeptidase reguladora de insulina (IRAP) (Wong e cols, 2011).

1.3 – A importância da Ang-(1-7) no SRA

Os primeiros antagonistas da Ang-(1-7), A779 e o [D-Pro⁷]Ang-(1-7), evidenciaram ações fisiológicas específicas deste peptídeo como vasodilatação em diversos leitos vasculares, efeito antiproliferativo, efeito anti-arritmogênico e antitrombogênico descritos nos últimos anos. Ela induz a vasodilatação coronariana (Brosnihan e cols, 1996), dos vasos mesentéricos, rins e pele (Sampaio e cols, 2003; Machado e cols, 2002). A Ang-(1-7) também estimula a vasodilatação de vasos neoformados na pele (Machado e cols, 2002). Entre os diversos efeitos da Ang-(1-7), destacam-se a capacidade de potencializar o efeito hipotensor da bradicinina (BK) e sua contribuição para os efeitos dos inibidores da ECA (Paula e cols, 1995, 1999 e 2004; Fernandes e cols, 2001 e 2005). Essas ações são reforçadas por produtos do metabolismo da Ang-(1-7), pois a capacidade de potencializar o efeito hipotensor da BK e atividade inibitória da ECA permanece nos fragmentos de Ang-(1-7): Ang-(2-7) e Ang(3-7) (Paula e cols, 1999).

Uma enzima de destaque no SRA na geração de Ang-(1-7) é a ECA2. Essa carboxipeptidase possui alta eficiência catalítica para a quebra da Ang II em Ang-(1-7) e é a principal via enzimática formadora de Ang-(1-7) (Fig I).

Santos e cols (2003, 2004) identificaram o receptor órfão acoplado a proteína G, codificado pelo proto-oncogene MAS, como receptor específico para a Ang-(1-7) (Fig II). Foi demonstrado que a deleção genética do receptor Mas aboliu a ligação específica da ¹²⁵I-Ang-(1-7) em rins de camundongos. Além disso, a ¹²⁵I-Ang-(1-7) ligou-se com alta

afinidade às células COS transfectadas com receptor Mas e houve liberação de ácido aracdônico após o tratamento de células CHO e COS transfectadas com Mas. Tanto a ligação da ^{125}I -Ang-(1-7) quanto o efeito da liberação de ácido aracdônico foram bloqueados pelo antagonista de Ang-(1-7), o A-779. O RNAm para o receptor Mas foi detectado no coração, testículos, rins e cérebro por Metzger e cols, em 1995.

Em conjunto, a formação de Ang-(1-7) pela ação da ECA2 sobre a Ang II e os efeitos da Ang-(1-7) via receptor Mas configuram um vetor de contrarregulação da Ang II. O eixo Ang-(1-7)-ECA2-Mas tem se revelado um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas que atuam no sistema cardiovascular.

As indicações clínicas de terapia com inibidores da ECA multiplicaram-se além de suas propriedades enquanto medicamentos anti-hipertensivos. Eles possuem amplo uso no tratamento de doenças cardiovasculares não somente pelo controle dos níveis pressóricos mas, também, por sua notória redução do risco cardiovascular e contribuição no tratamento de comorbidades como o diabetes mellitus.

É sabido que parte dos efeitos benéficos dos IECA se deve a seus efeitos no sistema caliceína-cininas, uma vez que a ECA é a principal via de inativação da bradicinina. No entanto, fisiologia dos sistemas peptidérgicos tem se mostrado mais complexa. Rastelli e cols, 2007, descreveram que a potenciação do efeito hipotensor da BK estaria prejudicada no diabetes e que a insulina é capaz de reverter essa interação.

Assim, contrastando com a frequência e multiplicidade de indicações terapêuticas dos inibidores da ECA, sabe-se relativamente pouco a respeito

dos mecanismos envolvidos nos diversos níveis de interação entre os sistemas caliceína-cininas e renina-angiotensina, no que diz respeito à potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7), que tem sido foco de nossos estudos.

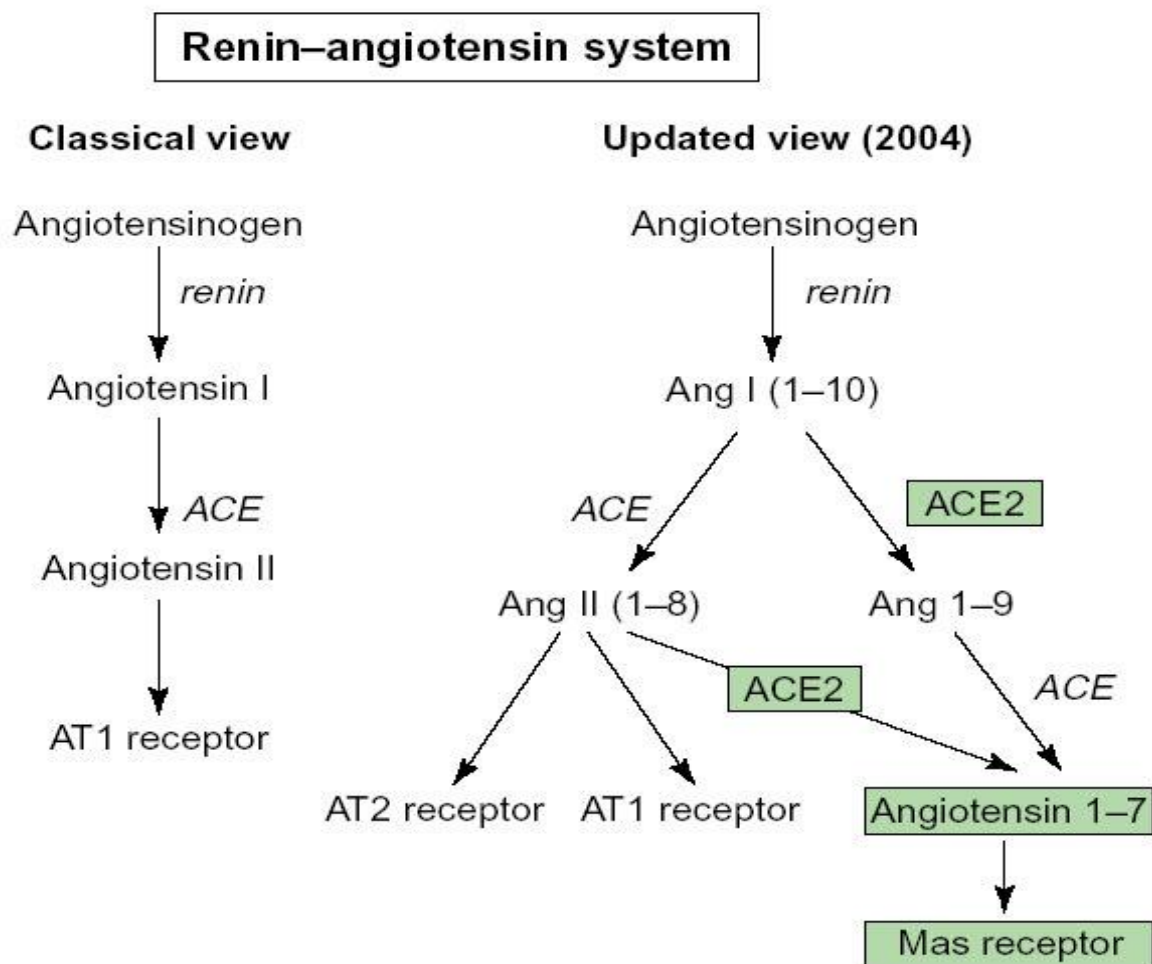


Fig I: Sistema Renina Angiotensina, visão clássica e visão atualizada, segundo a figura de Burrell e cols., 2004. A figura mostra as etapas de formação da Ang-(1-7) segundo uma visão clássica do SRA à esquerda em contraposição com a ampliação dos conhecimentos após a descrição da ECA2 e seu papel de destaque na formação da Ang-(1-7).

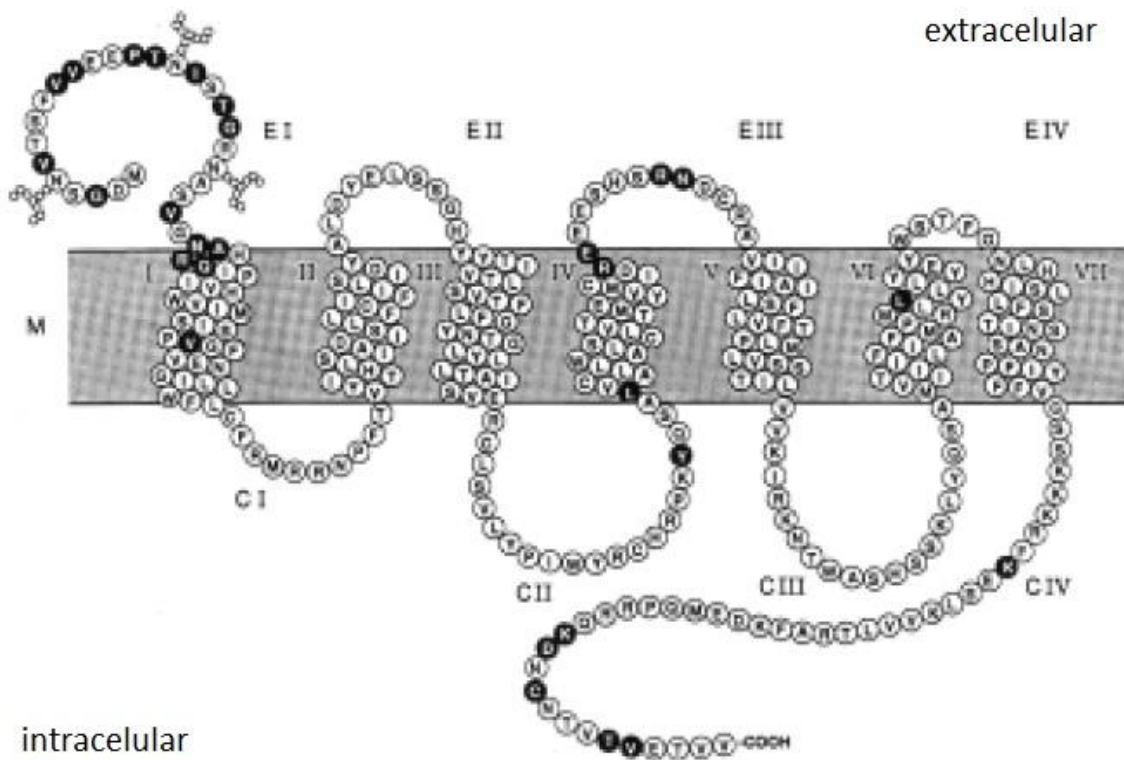


Fig II: Figura esquemática do receptor MAS na membrana celular: a figura mostra a composição de aminoácidos do receptor MAS e seus domínios transmembrana.

2. ESTUDOS PRELIMINARES E OBJETIVO

Nossos estudos se iniciaram com a demonstração da potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em ratos, em 1995. A Ang-(1-7) também inibiu a atividade da ECA plasmática em ensaios fluorimétricos ($IC_{50} \sim 2,92 \mu M$).

A ECA é uma enzima que participa do metabolismo da BK, trata-se de uma cininase. Nos estudos *in vivo*, a potenciação da BK pela Ang-(1-7) em animais pré-tratados agudamente com inibidores da ECA foi ainda mais importante e sugeriu a presença de mecanismos diferentes da diminuição da ação de cininase da ECA. Além disso, a inibição aguda da síntese de prostaglandinas e da síntese de NO diminuíram significativamente a atividade potenciadora de BK da Ang-(1-7). Nos estudos subsequentes (1997), os resultados foram confirmados em ratos hipertensos renais e espontaneamente hipertensos (SHR).

Estudos *in vivo* de Oliveira e cols, em 1999, demonstraram a interação da Ang-(1-7) e a BK na microcirculação mesentérica. A aplicação tópica de Ang-(1-7) induziu vasodilatação nos microvasos. Também houve potenciação da vasodilatação induzida pela BK, que foi abolida pelo A-779, pela indometacina e pelo antagonista da síntese de NO. O pré-tratamento com enalapril acentuou a potenciação da vasodilatação induzida pela Ang-(1-7), confirmando nossos estudos em ratos (Paula, 1995). Em 2001, Fernandes e cols demonstraram que a potenciação da BK pela Ang-(1-7) nos microvasos mesentéricos de animais espontaneamente

hipertensos (SHR) e animais SHR tratados, por curto ou longo período, com inibidores da ECA também é inibida pelo A-779.

Em 1999, nosso estudo estrutura-atividade confirmou que o biometabolismo da Ang-(1-7) nos peptídeos Ang-(2-7) e Ang-(3-7) não elimina a sua atividade potenciadora de BK, nem a capacidade de inibir o efeito da ECA (Tabela 1, Paula, 2004). Estes peptídeos menores destacaram-se pela melhor inibição da atividade ECA *in vitro*, amplificando a ação metabólica da Ang-(1-7) (Paula e cols, 1999).

Nos estudos que progressivamente caracterizaram o papel da Ang-(1-7) dentro do SRA, os antagonistas A779 (Santos e cols, 1994) e o [D-Pro⁷]Ang-(1-7) (Santos e cols, 2003) foram ferramentas importantes e amplamente usadas nestes trabalhos.

Atualmente, muitas das ações biológicas da Ang-(1-7) têm sido descritas como ausentes em camundongos com deleção do gene que codifica o receptor Mas. No entanto, a Ang-(1-7) poderia apresentar efeitos não dependentes de seu receptor e ampliar o leque de contribuições terapêuticas desse peptídeo. Assim, o objetivo central deste estudo é caracterizar o papel do receptor Mas e seus possíveis mecanismos de ação na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang(1-7).

2.1 – *Objetivos específicos*

– Comparar a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos do tipo selvagem e camundongos com deleção genética do receptor Mas.

– Identificar a possível atividade dos peptídeos relacionados ao metabolismo da Ang-(1-7): Ang-(2-7), Ang-(3-7) e [Des-Asp¹]Ala¹-Ang-(1-7), sobre o efeito hipotensor da BK em camundongos Mas-KO e WT.

– Avaliar a contribuição da inibição da ECA para a potenciação do efeito hipotensor da BK em camundongos com deleção genética do receptor Mas.

– Determinar o efeito do inibidor de NOS, L-NAME, na potenciação do efeito hipotensor da BK em camundongos Mas-KO e WT.

A Tab 1 mostra os valores da Unidade Potenciadora (UP) e Concentração de Inibição (IC₅₀). Os dados sumarizam a UP, dose de cada peptídeo capaz de transformar o efeito de uma dose simples de BK (1 nmol) no equivalente ao de uma dose dupla de BK (2 nmol). A IC₅₀ foi calculada em um ensaio fluorimétrico que mediu a inibição da atividade da ECA *in vitro* em presença dos diferentes peptídeos.

Unidade Potenciadora e Inibição da Atividade da ECA em ratos WK		
Peptídeo	UP, nmol	IC ₅₀ , μM
Ang-(1-7)	2,2	2,92
Ang-(2-7)	~ 2,4	0,75
Ang-(3-7)	~ 3,6	0,92
Ang-(4-7)	> 9,5	> 100
Ang-(1-6)	> 25	> 100
Ang-(1-5)	> 7,5	100
[D-Ala ⁷]Ang-(1-7)	> 5,7	> 100
[D-Ala ⁷]Ang-(1-7) 10 ⁻⁶ M + Ang-(1-7) ^a	ND	2,59
[D-Ala ⁷]Ang-(1-7) 10 ⁻⁵ M + Ang-(1-7) ^b	ND	2,3
[D-Pro ⁷]Ang-(1-7)	ND	> 100

Tabela 1: Os valores da IC₅₀ foram a média de 3 experimentos onde cada concentração (10⁻⁸ a 10⁻⁴) foi testada em duplicata.

ND = não determinado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Camundongos: fêmeas, linhagem Black C57 e linhagem FVBN, com e sem deleção do protooncone gene MAS, Mas-KO (Alenina e cols, 2008, revisão). Os animais controle foram da linhagem do tipo selvagem, WT. A idade dos animais variou de 18 a 24 semanas. Esses animais foram gerados no “Max-Delbrück Center for Molecular Medicine” e cedidos ao nosso laboratório para fins de pesquisa. Eles se reproduziram e permaneceram no biotério de transgênicos do laboratório de Hipertensão, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O controle por genotipagem das linhagens é feito segundo a rotina do laboratório.

3.2 – Lista de drogas utilizadas

Bradicinina (BK)

Ang-(1-7)

Fragmentos de angiotensina: Ang-(2-7), Ang-(3-7)

Ala¹Ang-(1-7)

Inibidor da ECA: Captopril

Inibidor da NOS: L-NAME

Antagonista da Ang-(1-7): [D-Pro⁷]Ang-(1-7)

Anestésicos: uretana, cetamina e xylasina, nas doses recomendadas pelo fabricante.

3.3 – Procedimentos anestésico-cirúrgicos

3.3.1: Experimentos com animais anestesiados

Os camundongos receberam uretana na dose de 1,2 mg/ Kg, ip, e mantido em ventilação espontânea. A canulação, imediatamente antes do experimento, da artéria carótida com cânula de polietileno destinou-se ao registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). A veia jugular externa foi a via de administração de drogas *in bolus*.

Nos animais utilizados para protocolos experimentais sob anestesia geral, a cânula foi confeccionada a partir da conexão de 3 a 4 cm de polietileno PE50 à 1 cm de polietileno PE5 preenchidos com solução fisiológica (NaCl 0.9%) contendo heparina (50 U.I./mL). Após posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região cervical. Após a incisão da pele, com o auxílio de lupa cirúrgica a artéria carótida foi cuidadosamente isolada e a cânula introduzida a partir de um pequeno orifício. A seguir, a veia jugular ipsilateral foi isolada e canulada com cânula de mesmo material.

Ao final de cada experimento, o camundongo foi sacrificado com overdose de uretana intravenosa.

3.3.2: Experimentos com animais não anestesiados

Cirurgias de canulação da artéria e veia femorais foram realizadas 24 horas antes dos experimentos sob anestesia com a solução de Ketamina® (4.5 mg/Kg) + Rompum® (Xilazina; 0,2 mg/Kg).

Nesses protocolos experimentais, o registro da PA era feito via artéria femoral. As drogas foram injetadas *in bolus* na veia femoral, de acordo com cada protocolo experimental. A duração do intervalo mantido entre as injeções era sempre de um tempo mínimo de 3 minutos para que

houvesse tempo de reestabelecimento dos níveis pressóricos basais após a hipotensão causada pela BK.

3.4 – *Medidas de pressão arterial (PA)*

As cânulas arteriais foram conectadas a um transdutor de pressão acoplado a um sistema digital de aquisição de dados, Biopac ou Powerlab. A pressão artéria média (PAM) e pulsátil dos animais foram monitorizadas antes dos experimentos, durante o tempo de adaptação dos animais que variava de 30 minutos a uma hora. Durante os experimentos, a PAM e pulsátil foram registradas continuamente.

3.5 – *Administração de drogas*

As drogas usadas nos experimentos *in vivo* são de natureza hidrossolúvel em solução salina isotônica estéril (NaCl 0,9%). Quando a via utilizada for intraperitoneal, para a administração de uretana nos camundongos, o volume administrado não ultrapassou 1 ml/100 g de peso corporal. O volume das injeções venosas *in bolus* não ultrapassou 50 µl a cada injeção.

3.6 – *Cálculo da Unidade Potenciadora (UP) e análise estatística*

A análise estatística das médias das variações de pressão arterial, para cada dose, em cada animal, foi feita através de Análise de Variância (ANOVA) seguida de “Dunnett's Multiple Comparison Test”, um pós-teste que compara cada coluna experimental com a coluna controle. Para todas as análises foi usado o programa “Prism 5”, da GraphPad Software. Os

valores numéricos dos gráficos de linhas e barras foram expressos em valores de média das variações de PAM (Δ) \pm EPM.

$$\Delta = (\text{valor da PAM após a injeção de BK}) - (\text{PAM antes da injeção de BK})$$

A significância estatística foi padronizada em $p < 0,05$.

A UP segundo Ferreira e cols (1965) corresponde a dose de um peptídeo capaz de transformar o efeito de uma dose simples de BK no equivalente ao efeito de uma dose dupla (Tabela 1).

3.7 – Gráficos de barras:

Os gráficos de barras foram padronizados para representarem as variações de pressão arterial no eixo Y em mmHg. As curvas dose-resposta das drogas estudadas encontram-se no eixo X de cada gráfico.

À esquerda de cada figura, encontra-se o gráfico dos resultados obtidos no grupo controle de animais do tipo selvagem. Os gráficos referentes aos grupos de animais Mas-KO estarão sempre localizados do lado direito de cada figura.

3.8 – Controle hemodinâmico (variação da PA dos camundongos anestesiados):

A redução da pressão arterial secundária a anestesia foi discretamente maior nos camundongos Mas-KO quando comparadas aos animais WT. No entanto, essas variações de PA não foram significativas durante e após o experimento, nem desencadearam intercorrências hemodinâmicas durante a administração dos peptídeos nos camundongos FVBN (Figura III).

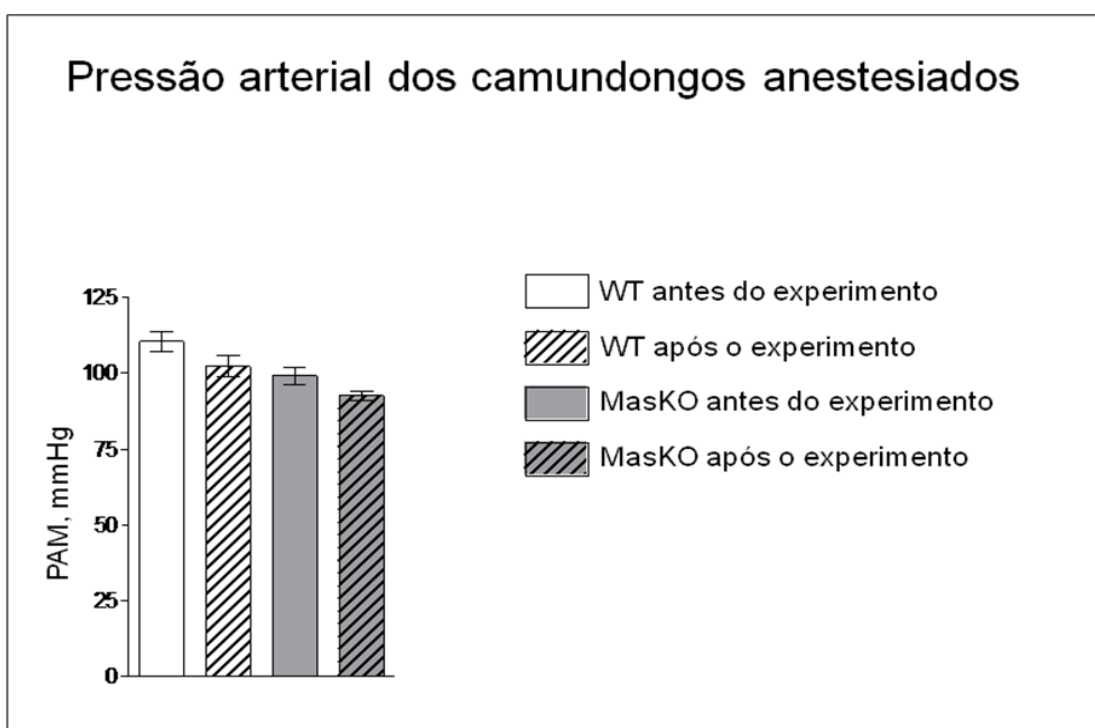


Fig III: O gráfico de barras mostra as médias dos valores de PA, mmHg, dos grupos de camundongos FVBN: WT e Mas-KO, antes e após o experimento, respectivamente. Não houve diferença significativa nas médias dos valores de PA entre estes grupos ($p > 0,05$).

3.9 – Controle dos animais transgênicos por genotipagem:

Após finalização dos protocolos experimentais, os animais foram sacrificados por overdose anestésica e foi coletada uma amostra de tecido da cauda para posterior confirmação da alteração genética através da técnica de amplificação do DNA (Polymerase Chain Reaction – PCR).

A PCR foi realizada com 2 μ l da amostra de DNA extraído dos tecidos dos camundongos utilizados nos experimentos em um volume final de 50 μ l de meio contendo 1 μ M dos óligos sense e anti-sense correspondente ao gene do receptor Mas (Tabela 2), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq polimerase, 2 mM de $MgCl_2$ e 5 μ l de 10x PCR Buffer minus Mg. A reação de PCR foi realizada em quatro etapas, a saber: primeiro, 95° C durante 4 minutos; segundo, 30 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 56° C na 1 minuto a 72° C; terceiro, 7 minutos 72° C e quarto, 4° C infinito. A localização do óligo foi definida de modo que o produto da amplificação foi uma sequência característica e única. Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação. Na PCR controle foi utilizada água ao invés de DNA genômico. Após a reação de PCR 10 μ l de cada amostra dos camundongos controles e com deleção do receptor Mas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Esse gel foi preparado com tampão de eletroforese TAE 1x acrescido de brometo de etídio. O brometo de etídio se liga a moléculas de DNA e quando ativado pela luz ultravioleta emite fluorescência. A leitura do gel foi realizada em aparelho sob luz ultravioleta (Figura IV).

	Seqüência de nucleotídeos		
Receptor MAS	Sense 5' ACT GTC GGG CGG TCA TCA TC 3' Antisense 5' GGT GGA GAA AAG CAA GGA GA 3'		
Temperatura de anelamento	56° C	Tamanho do fragmento	262 bp

Tab 2: Sequência de oligonucleotídeos correspondentes ao receptor MAS e seu antisense respectivamente, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos.

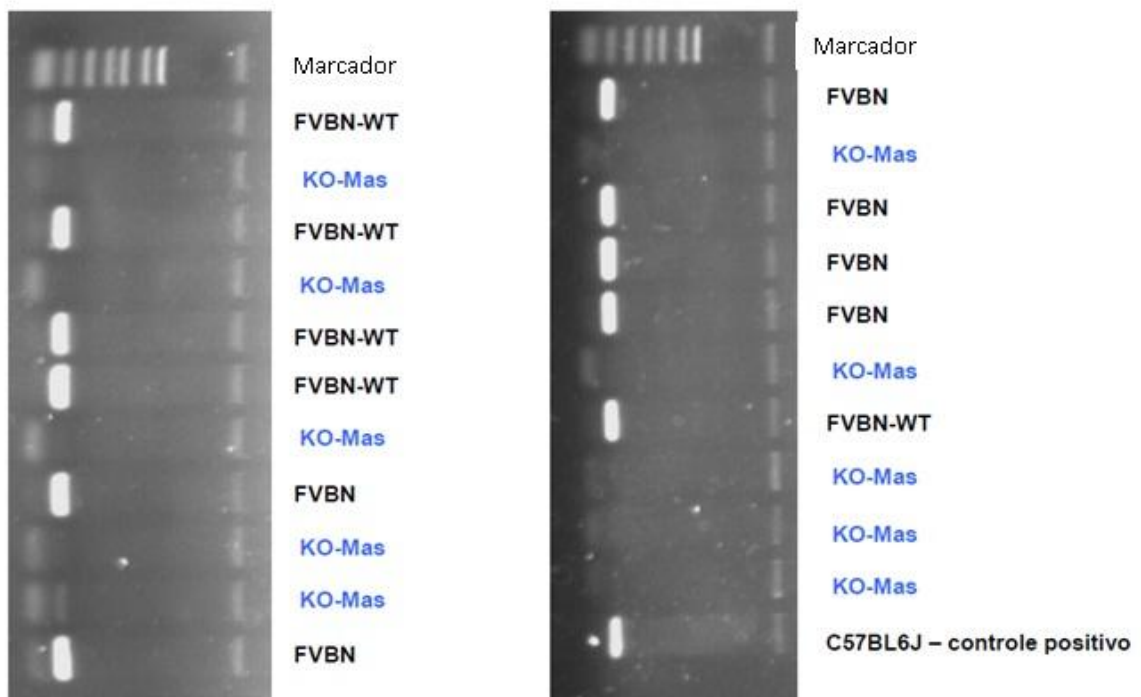


Figura IV: Foto ilustrativa do gel de agarose revelado em luz UV, mostrando a presença de banda correspondente ao receptor Mas, ou a ausência da mesma em animais Mas-KO.

4. RESULTADOS

4.1 – A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos anestesiados não difere entre as linhagens FVBN e Black C57.

A administração de Ang-(1-7) em injeções *in bolus*, em doses desprovidas de efeito sobre a pressão arterial ou frequência cardíaca, aumentou significativamente o efeito hipotensor da BK em camundongos do tipo selvagem, nas duas linhagens estudadas, Black C57 e FVBN (Fig 4.1A e Fig 4.1C, respectivamente). A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi semelhante entre os grupos de animais WT (Fig 4.1A e Fig 4.1C). Em animais Mas-KO (Fig 4.1B e Fig 4.1D), Black C57 e FVBN, respectivamente, a curva dose-resposta da Ang-(1-7) foi expressivamente deslocada para a direita. A comparação em cada linhagem do grupo controle com seu respectivo grupo KO, ou seja, entre os grupos Black C57, WT (Fig 4.1A) e Mas-KO (Fig 4.1B), assim como entre os grupos FVBN, WT (Fig 4.1C) e Mas-KO (Fig 4.1D), mostra que a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) é dependente do receptor Mas em ambas as linhagens de camundongos.

A Unidade Potenciadora, dose de Ang-(1-7) capaz de transformar o efeito de uma dose simples de BK (40 ng) no equivalente a de uma dose dupla (80 ng) em ambos os grupos controle (4.1A e 4.1C) foi de aproximadamente 160 ng. Na curva dose-resposta de Ang-(1-7) em animais Mas-KO de ambas as linhagens, houve atenuação da resposta hipotensora e

ausência de potenciação significativa do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7).

A UP da Ang-(1-7) calculada para os camundongos foi de 160 pmol/30 g, considerando que 30 g foi a média de peso corporal dos camundongos em todos os grupos. Esse valor de UP da Ang-(1-7) nos camundongos foi equivalente a 5,3 nmol/ Kg. Em estudos previamente realizados em ratos, sumarizados na Tabela 1 (Paula, 2004), a UP da Ang-(1-7) foi de aproximadamente 2,2 nmol/ 300 g, equivalente a 7,3 nmol/ Kg, 38 % maior que a UP em camundongos.

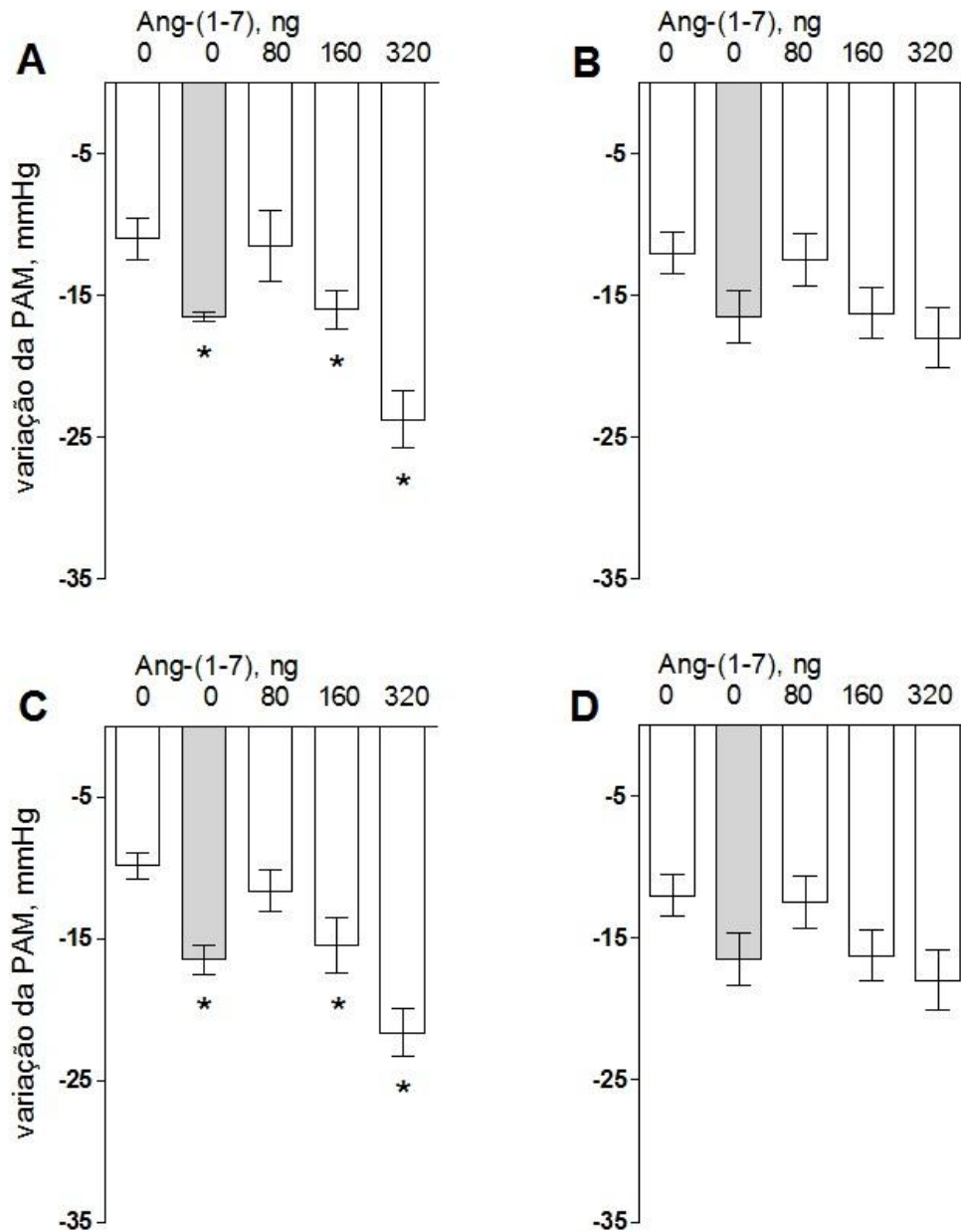


Fig 4.1: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos das linhagens FVBN e Black C57. Os gráficos mostram o efeito hipotensor da BK (40ng: barras brancas, 80ng: cinza) em camundongos. **4.1A:** Black C57 WT, n=4; **4.1B:** Black C57 Mas-KO, n=4; **4.1C:** FVBN WT, n=8; **4.1D:** FVBN Mas-KO, n=4. As barras mostram as variações da PAM em resposta à administração de BK (40 ng) associada a doses crescentes de Ang-(1-7) (80, 160 e 320 ng). As figuras 4.1A e 4.1C mostram a potenciação significativa do efeito hipotensor da BK quando associada a Ang-(1-7) de maneira dose-dependente em camundongos WT Black C57 e WT FVBN, respectivamente. * = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.2 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) em camundongos anestesiados

A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) também foi significativa em animais FVBN WT quando injeções de BK, 40 ng, foram associadas a Ang-(2-7) (Fig 4.2, esquerda). Por outro lado, enquanto nos grupos de animais Mas-KO (Fig 4.2, direita) as curvas dose-resposta da Ang-(2-7) foi semelhante a da Ang-(1-7) e não demonstrou potenciação do efeito hipotensor da BK significativa.

Assim, os mecanismos de potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) e Ang-(2-7) mostram dependência do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK.

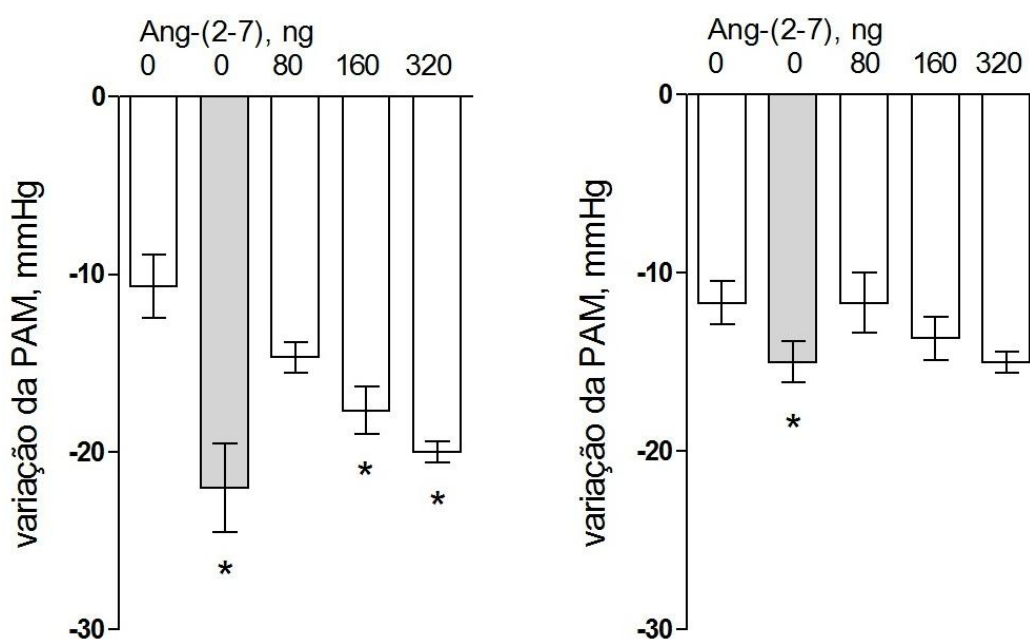


Fig 4.2: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) em camundongos FVBN anestesiados. Os gráficos mostram as variações da PAM em resposta à administração de BK (40ng: barras brancas, 80ng: cinza) e da BK, 40ng, associada a doses crescentes de Ang-(2-7) (80, 160 e 320 ng). Esquerda: FVBN WT, n=4; Direita: FVBN Mas-KO, n=4. * = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.3 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) em camundongos anestesiados

A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) foi significativa em animais FVBN WT (Fig 4.3 esquerda) e em animais FVBN Mas-KO (Fig 4.3 direita).

Assim, a associação de Ang-(3-7) à BK também contribuiu para a potenciação do efeito hipotensor da BK por algum mecanismo independente do receptor Mas.

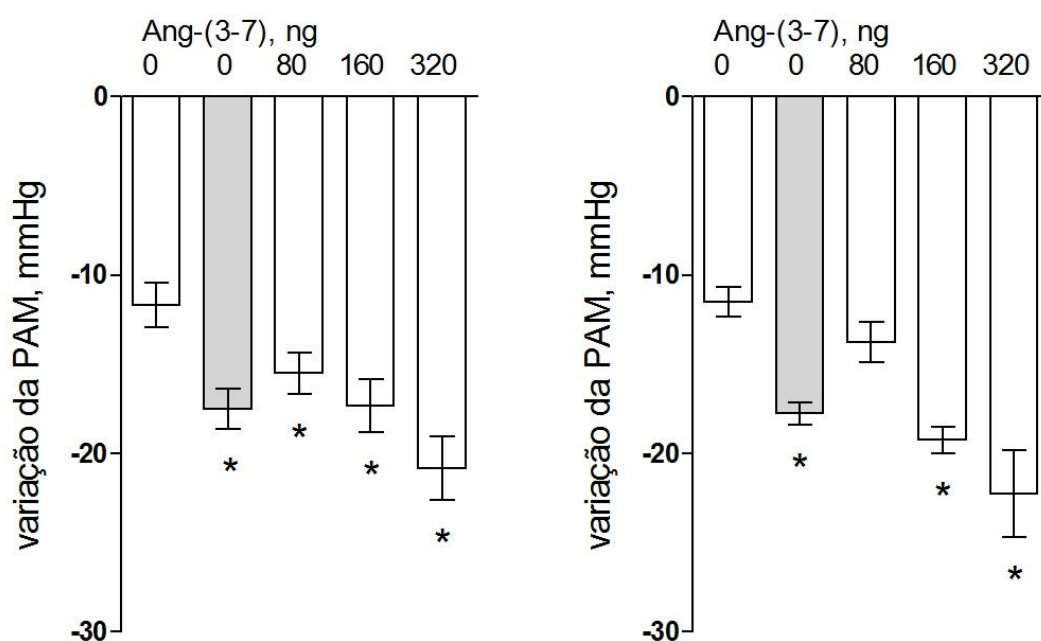


Fig 4.3: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) em camundongos FVBN anestesiados. Os gráficos mostram as variações da PAM em resposta à administração de BK (40ng: barras brancas, 80ng: cinza) e da BK, 40ng, associada a doses crescentes de Ang-(3-7) (80, 160 e 320 ng). **Esquerda:** FVBN WT, n=6; **Direita:** FVBN Mas-KO, n=4.

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.4 – Papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ala¹Ang-(1-7) em camundongos anestesiados

A potenciação do efeito hipotensor da BK pela AlaAng-(1-7) foi significativa em animais FVBN WT (Fig 4.4 esquerda) e em animais FVBN Mas-KO (Fig 4.4 direita).

Assim, a associação de Ala¹Ang-(1-7) à BK também contribuiu para a potenciação do efeito hipotensor da BK por algum mecanismo independente do receptor Mas.

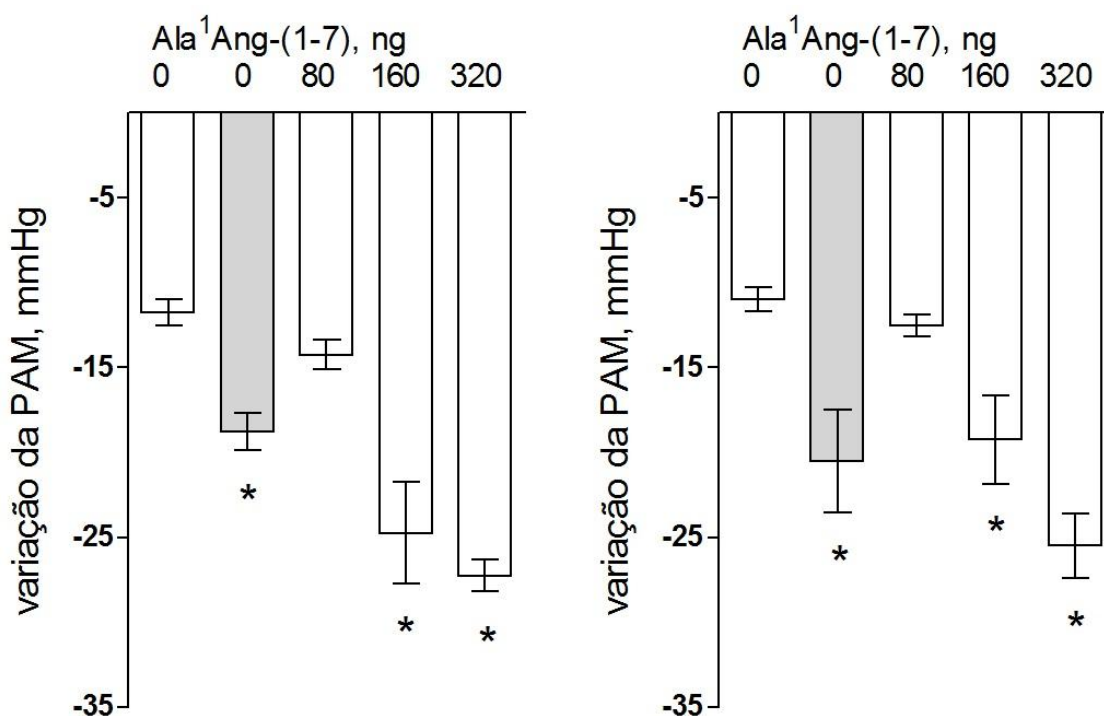


Fig 4.4: Potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ala¹Ang-(1-7) em camundongos FVBN anestesiados. Os gráficos mostram as variações da PAM em resposta à administração de BK (40ng: barras brancas, 80ng: cinza) e da BK, 40ng, associada a doses crescentes de Ang-(3-7) (80, 160 e 320ng). **Esquerda:** FVBN WT, n=4; **Direita:** FVBN Mas-KO, n=4.

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.5 – Comparação do papel do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala¹-Ang-(1-7)

Comparando-se os resultados obtidos com a administração de BK associada a Ang-(1-7) e os peptídeos relacionados ao seu metabolismo, ficou evidente que a potenciação da BK foi significativa em animais FVBN WT quando injeções de BK, 40 ng, foram associadas aos peptídeos relacionados ao metabolismo da Ang-(1-7) (Fig 4.5, esquerda).

Por outro lado, nos grupos de animais Mas-KO (Fig 4.5, direita) as curvas dose-resposta da Ang-(1-7) e da Ang-(2-7) foram deslocadas para a direita, enquanto as curvas dose-resposta de BK associada a Ang-(3-7) e Ala¹-Ang-(1-7) mantiveram sua inclinação. A análise estatística mostrou que houve potenciação significativa do efeito hipotensor da BK pela Ang-(3-7) e pela Ala¹-Ang-(1-7) (UP de aproximadamente 5 nmol/ Kg) nos grupos Mas-KO.

Assim, os mecanismos de potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) e Ang-(2-7) mostram dependência do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK, enquanto a Ang-(3-7) e a Ala¹-Ang-(1-7) contribuem com a potenciação da BK por mecanismos predominantemente alternativos.

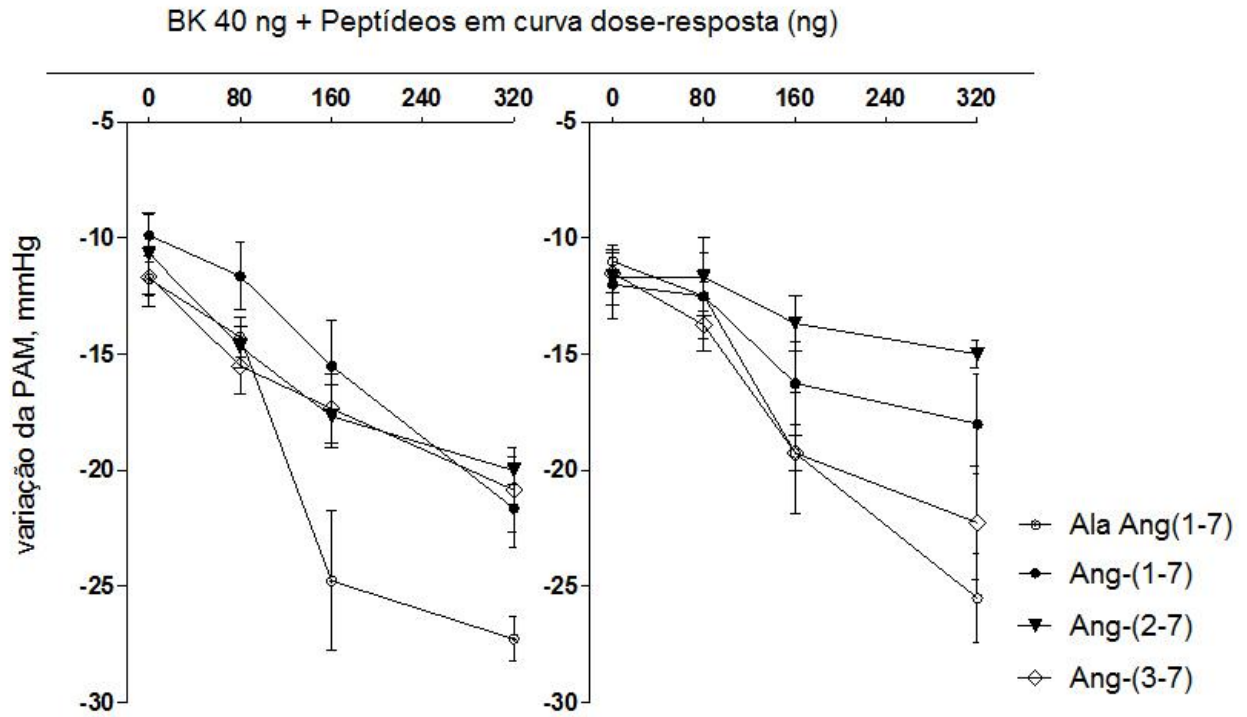


Fig 4.5: Gráfico que compara grupos de estudo de curvas dose-resposta de Ang-(1-7), Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala-Ang-(1-7) associada a BK em camundongos FVBN WT e FVBN MAS-KO a esquerda e direita respectivamente. A dose de BK em cada injeção em todos os grupos foi de 40 ng. A BK foi associada a Ang-(1-7) (WT, n=8; MAS-KO, n=4); Ang-(2-7) (WT, n=4; MAS-KO, n=4); Ang-(3-7) (WT, n=6; MAS-KO, n=4); e AlaAng-(1-7) (WT, n=4; MAS-KO, n=4); em doses crescentes (80, 160 e 320 ng) para cada peptídeo, com intervalo mínimo de 3 minutos entre cada injeção *in bolus*.

4.6 – A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) é dependente do receptor Mas

Em camundongos FVBN não anestesiados, a administração de Ang-(1-7) em injeções *in bolus*, em doses desprovidas de efeito sobre a pressão arterial ou frequência cardíaca, aumentou significativamente o efeito hipotensor da BK (40 ng) no grupo WT (Fig 4.6, esquerda). No grupo Mas-KO (Fig 4.6, direita), a curva dose-resposta de Ang-(1-7) potenciando o efeito hipotensor da BK (40 ng) foi deslocada para a direita. Assim, a potenciação do hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi dependente do receptor Mas em animais acordados. A UP foi semelhante a de animais anestesiados, aproximadamente 160 pmol/ 30 g, ou 5,3 nmol/ Kg.

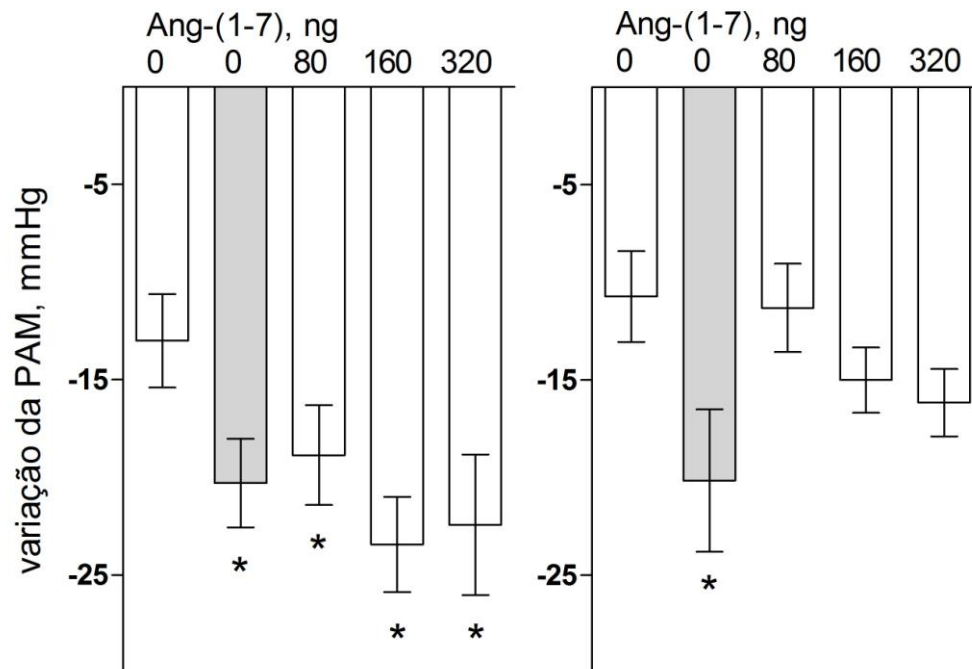


Fig 4.6: Efeito hipotensor da BK associado a curvas dose-resposta de Ang-(1-7) em camundongos fêmeas FVBN acordadas. Esquerda: FVBN WT, n=7, Direita: FVBN MAS-KO, n=7. Os gráficos de barras mostram as variações de PAM com a administração *in bolus* de BK (40 ng, branco; 80 ng, cinza) isoladamente ou de BK (40 ng) associada a Ang-(1-7) em doses crescentes de (80, 160 e 320 ng).

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.7 – Papel da ECA na potenciação do efeito hipotensor da pela Ang-(1-7)

A inibição aguda da ECA com a administração de captopril, 10 mg/Kg, em camundongos FVBN não anestesiados, resulta em diminuição da degradação da BK e aumenta seu efeito hipotensor. Além disso, a concentração da Ang-(1-7) plasmática aumenta, pois a Ang-(1-7) pode ser formada diretamente a partir da Ang I, por uma via independente da ECA. Esses resultados foram inicialmente obtidos em ratos, onde se constatou que a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) aumenta cerca de dez vezes na presença de inibidores da ECA (Paula e cols, 1995).

A Fig 4.7 mostra que a inibição aguda da ECA em camundongos aumentou o efeito hipotensor da BK em animais WT (esquerda) e Mas-KO (direita) de maneira semelhante. As doses de BK foram reduzidas pela metade, de 40 e 80ng para 20 e 40ng, respectivamente, para se obter o efeito hipotensor equivalente ao de animais acordados não tratados com captopril (Fig 4.6). A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) também foi maior em camundongos WT. E, embora a sensibilidade à BK tenha aumentado duas vezes, a dose de Ang-(1-7) necessária para transformar o efeito de uma dose simples de BK no equivalente ao de uma dose dupla foi quatro vezes menor. Assim, a UP caiu de 5,3 nmol/ Kg para 1,3 nmol/ Kg.

No grupo Mas-KO (Fig 4.7, direita) pré-tratado com captopril, o deslocamento da curva dose-resposta de Ang-(1-7) associada à BK (20 ng) foi totalmente abolido e esse dado não diferiu dos animais Mas-KO não tratados. A inibição da ECA pode constituir um fenômeno metabólico

coadjuvante e independente do receptor Mas na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7).

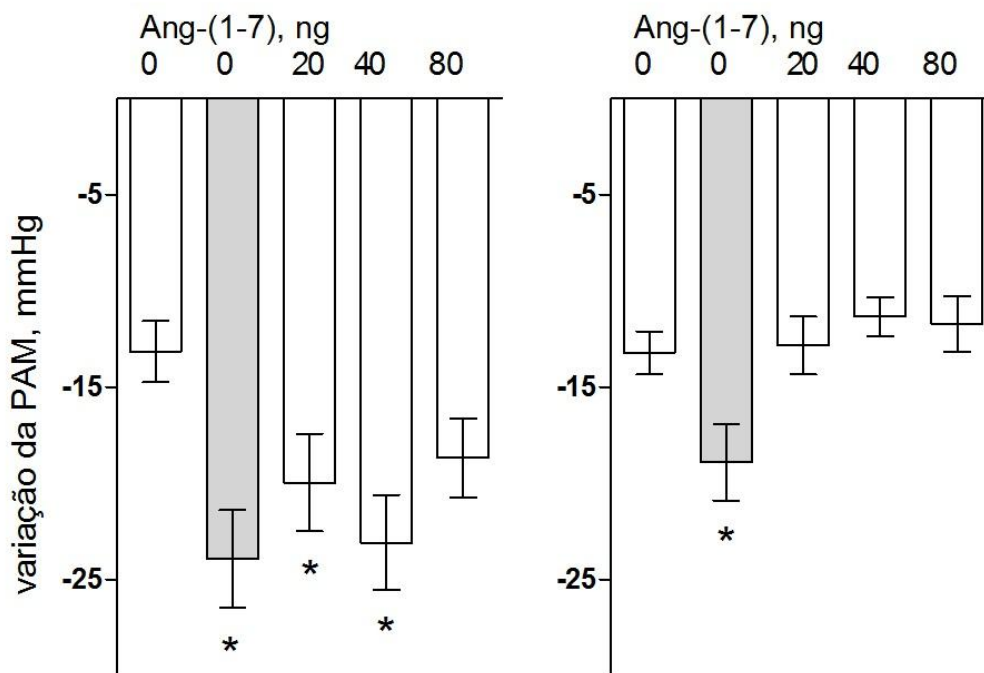


Fig 4.7: Efeito da inibição aguda da ECA pelo pré-tratamento com captopril de camundongos FVBN WT (esquerda, n=7) e MAS-KO (direita, n=9) acordados. Os gráficos de barras mostram as variações de PAM com a administração *in bolus* de BK (20ng, branco; 40ng, cinza) isoladamente ou de BK (20ng) associada a Ang-(1-7) em doses crescentes de (20, 40 e 80ng) em camundongos pré-tratados com captopril, 10 mg/Kg, 30 minutos antes do experimento.

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 20ng isoladamente).

4.8 – Efeito do inibidor de NOS, L-NAME, na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7)

A administração de L-NAME, 30 mg/ Kg, resulta em diminuição do efeito hipotensor da BK devido a inibição da síntese de NO, de maneira semelhante em camundongos FVBN WT (Fig 4.8: esquerda) e Mas-KO (Fig 4.8: direita) não anestesiados. A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) também não foi significativa tanto em animais WT e Mas-KO. Isto sugere que os mecanismos de potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) dependem fortemente da sinalização via NO. Em ratos, a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi abolida pela inibição simultânea da síntese de NO e de prostaglandinas (Paula e cols 1995).

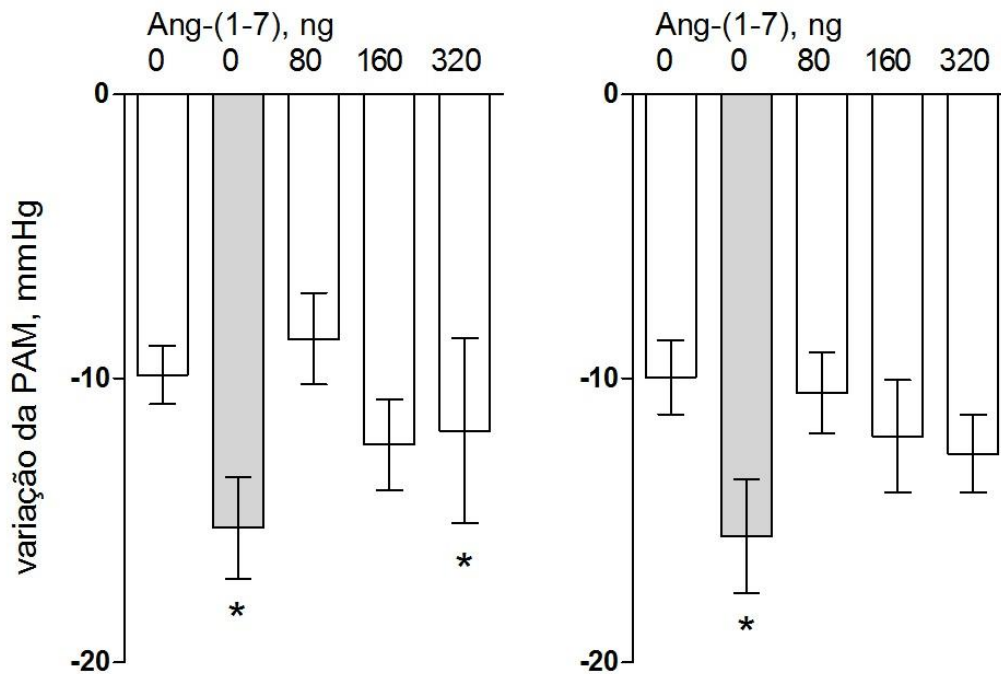


Fig 4.8: Efeito da inibição aguda da síntese de NO pelo pré-tratamento com L-NAME de camundongos FVBN WT (esquerda, n=8) e MAS-KO (direita, n = 8) acordados. Os gráficos de barras mostram as variações de PAM com a administração *in bolus* de BK (40ng, branco; 80ng, cinza) isoladamente ou de BK (40ng) associada a Ang-(1-7) em doses crescentes de (80, 160 e 320ng) em camundongos pré-tratados com L-NAME, 10 mg/Kg, 30 minutos antes do experimento.

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

4.9 – Efeito do antagonista de Ang-(1-7), [D-Pro⁷]Ang-(1-7), na potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7)

A Fig 4.9, esquerda, mostra a potenciação do efeito hipotensor da BK de maneira dose-dependente pela Ang-(1-7), em camundongos FVBN WT não anestesiados. À direita, a dose de BK 40 ng foi administrada simultaneamente com a curva dose-resposta da Ang-(1-7) associada ao seu inibidor [D-Pro⁷]Ang-(1-7), em doses que seguiram a proporção de 1:6, respectivamente. A Ang-(1-7) não potenciou o efeito hipotensor da BK, nas doses regulares, na presença do [D-Pro⁷]Ang-(1-7). Houve uma tendência não significativa de potenciação do efeito hipotensor da BK na presença de altas doses do [D-Pro⁷]Ang-(1-7).

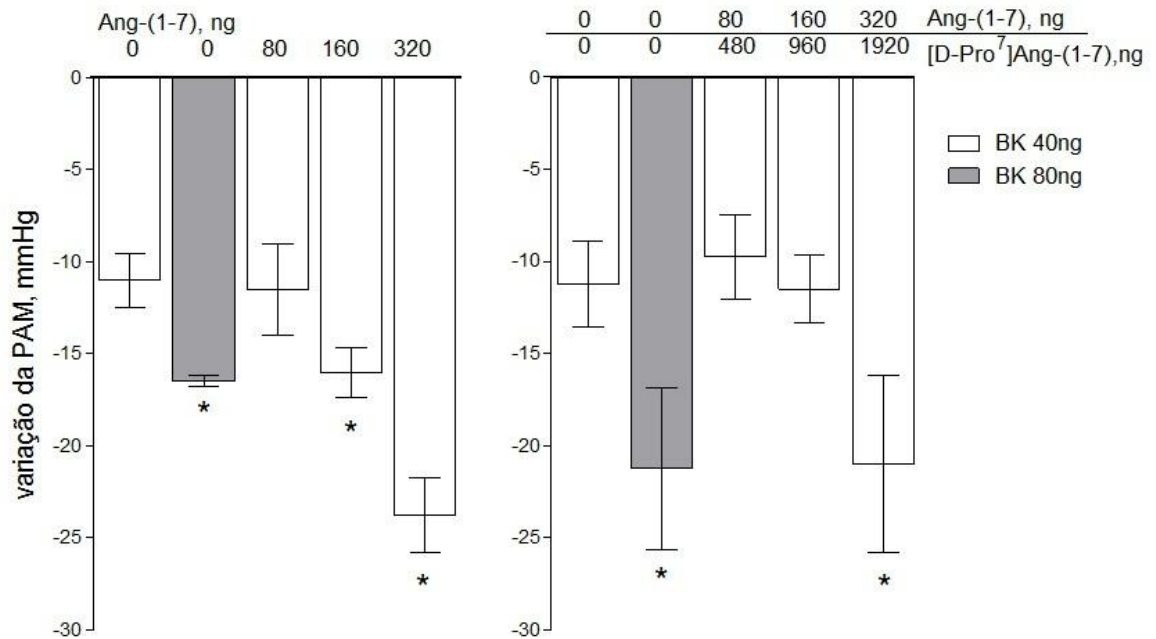


Fig 4.9: Efeito hipotensor da BK associado a curvas dose-resposta de Ang-(1-7) e de seu inibidor, [D-Pro⁷]Ang-(1-7), em camundongos fêmeas FVBN WT anestesiadas. Os gráficos de barras mostram as variações de PAM com a administração *in bolus* de BK (40ng, branco; 80ng, cinza) isoladamente ou de BK (40ng) associada a Ang-(1-7) em doses crescentes de (80, 160 e 320ng), esquerda, n = 5, ou de BK (40ng) associada a doses crescentes de Ang-(1-7) (80, 160 e 320ng), associadas respectivamente a doses crescentes de [D-Pro⁷]Ang-(1-7) na proporção de 1:6, direita, n = 5.

* = $P < 0,05$ em relação ao controle (BK 40ng isoladamente).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O principal achado deste estudo é a demonstração de que a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) depende do receptor Mas. Os dados que dão suporte a essa conclusão são:

1 – A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) não foi significativa em camundongos Mas-KO de linhagens Black C57, ou FVBN.

2 – A administração do inibidor [D-Pro⁷]Ang-(1-7) inibiu significativamente a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) em camundongos.

Outros dados importantes obtidos nesse estudo foram:

3 – Os fragmentos de angiotensina Ang-(2-7), Ang-(3-7) e Ala¹-Ang-(1-7) apresentaram atividade potenciadora de BK em camundongos anestesiados do tipo selvagem.

4 – A potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) não foi significativa em camundongos Mas-KO, de maneira semelhante a Ang-(1-7). Por outro lado, as angiotensinas Ang-(3-7) e Ala¹-Ang-(1-7) também apresentaram atividade potenciadora de BK significativa em animais Mas-KO.

5 – A anestesia não interferiu com a atividade potenciadora de BK pela Ang-(1-7). Em animais acordados, houve potenciação do efeito hipotensor da BK dependente do receptor Mas semelhante a curva de potenciação obtida em camundongos anestesiados.

6 – O pré-tratamento dos animais com captopril aumentou o efeito hipotensor da BK de maneira semelhante em animais do tipo selvagem e Mas-KO. No entanto, a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) não ocorreu em animais Mas-KO.

7 – Em camundongos FVBN do tipo selvagem e Mas-KO, pré-tratados com o inibidor da síntese de NO, L-NAME, não houve potenciação significativa do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7).

Antagonistas são ferramentas bastante úteis para identificação de receptores e esclarecimento da relevância fisiopatológica de substâncias endógenas. Alguns anos após a caracterização do antagonista específico para a Ang-(1-7), A-779 (Santos e cols, 1994), Santos e cols, em 2003, descreveram um novo antagonista da Ang-(1-7), o [D-Pro⁷]Ang-(1-7).

Adicionalmente, foi demonstrado o antagonismo de várias outras ações fisiológicas e competição do [D-Pro⁷]Ang-(1-7) com a Ang-(1-7) pela ligação em rins de ratos. A semelhança da molécula de [D-Pro⁷]Ang-(1-7) com a Ang-(1-7) é quase total. No entanto, estas moléculas diferem na orientação espacial do último resíduo, o que altera totalmente sua função. O [D-Pro⁷]Ang-(1-7) não interferiu com a PAM ou FC, nem mesmo alterou o efeito hipotensor da BK nas doses administradas em camundongos nesse estudo. O bloqueio da potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) com a injeção simultânea do [D-Pro⁷]Ang-(1-7) com a Ang-(1-7) reforça a idéia de um sítio específico para a Ang-(1-7), sensível ao antagonismo competitivo com o composto [D-Pro⁷]Ang-(1-7).

Considerando que a potenciação da BK pela Ang-(1-7) também foi grandemente atenuada em camundongos KO para o receptor Mas, os dados

obtidos com o [D-Pro⁷]Ang-(1-7) indicam que esse antagonista atua bloqueando esse receptor. Existem evidências de que o [D-Pro⁷]Ang-(1-7) pode bloquear um outro sítio de ligação para a Ang-(1-7) em ratos Sprague Dawley (Silva e cols, 2007). No entanto, em camundongos, a existência desse outro sítio ainda não foi evidenciada.

Assim como a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) depende do receptor Mas, a participação do NO ficou evidente como mecanismo neste estudo. O pré-tratamento com o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME promoveu hipertensão arterial sistêmica aguda nos animais. As respostas hipotensoras às injeções *in bolus* de BK foram atenuadas. No entanto, a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi abolida em animais do tipo selvagem. Nos animais KO não foram observadas alterações significativas no efeito da BK controle ou em presença de Ang-(1-7). Além deste importante mecanismo envolvido na potenciação da BK pela Ang-(1-7), é importante lembrar da ampla variedade de mecanismos pelos quais a BK promove vasodilatação em animais inteiros, diferentemente das respostas obtidas em estudos mais específicos de leitos vasculares isolados ou estudos *in vitro*. Assim, os efeitos vasodilatadores da BK são mediados por vários fatores dependentes da espécie e do leito vascular, como NO, prostaglandinas, derivados do metabolismo do citocromo P-450 e do ácido aracdônico e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Nossos dados, no entanto, sugerem que o efeito potencializador de BK da Ang-(1-7) em camundongos é altamente dependente da liberação de NO, mediada pelo receptor Mas.

A potenciação do efeito hipotensor da BK também pode ocorrer por

vias independentes do receptor Mas e isto está de acordo com a multiplicidade de mecanismos e mediadores deste fenômeno. A Ang-(1-7), assim como produtos de seu metabolismo, Ang-(2-7) e Ang-(3-7), são capazes de inibir a atividade da ECA plasmática *in vitro*. Estes fragmentos de angiotensina também potenciam o efeito hipotensor da BK, contribuindo para os efeitos mediados pelo receptor Mas. A Ang-(3-7) ainda preservou sua capacidade de potencializar a BK significativamente em animais Mas-KO, assim como a Ala¹-Ang-(1-7), outro peptídeo relacionado ao metabolismo da Ang-(1-7). Interessantemente, como a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(2-7) foi abolida em camundongos Mas-KO, há ainda a possibilidade deste fragmento também se ligar ao receptor Mas. Essa observação contrasta com a ausência de efeito desse peptídeo em outras preparações nas quais o receptor Mas está presente, como o rim. É importante salientar que a divisão conceitual entre mecanismos “dependentes do Mas” ou “não dependentes do Mas” é meramente didática, pois todos os fenômenos observados nestas circunstâncias contribuem para a potenciação do efeito hipotensor da BK e para o papel do eixo ECA2–Ang-(1-7)–Mas.

Em presença de inibidor da ECA, as respostas hipotensoras da BK encontram-se aumentadas e isto pode ser atribuído a diminuição da hidrólise desse peptídeo. No entanto, evidências de que os iECA agem nos receptores B2 de BK ou estimulariam um *crossstalk* entre a ECA e os receptores B2 tem se acumulado. A possibilidade de que a Ang-(1-7) e as demais angiotensinas relacionadas a potenciação da BK possam ligar-se a ECA e promover *crossstalk* com o receptor de BK não pode, portanto, ser

descartada. Um outro possível sítio de ação da Ala¹-Ang-(1-7) e da Ang-(3-7) seria um receptor angiotensinérgico diferente do Mas (Lautner e cols, 2007).

A atividade potenciadora de BK da Ang-(1-7) aumenta significativamente durante a inibição da ECA (Paula e cols, 1995; Lima e cols, 1997). Busse e cols, em 1993, demonstraram que em culturas de células endoteliais humanas a presença de inibidores da ECA promoveu aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e facilitou o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela BK, o qual está associado com a acentuada produção de cGMP e 6-keto-PGF_{1α}, sugerindo uma formação elevada de NO e PGI₂. No entanto, o antagonista de receptor B₂ de BK, HOE 140, impediu tanto o aumento inicial da produção de cGMP e PGF_{1α} produzido pelos inibidores de ECA quanto o aumento induzido pela BK. Pensou-se que apenas a BK encontrava-se envolvida naqueles efeitos. Gohlke e cols, em 1993, demonstraram que o aumento do cGMP em aorta de ratos cronicamente tratados com o iECA ramipril também foi bloqueado pelo HOE 140. A possibilidade de que o HOE 140 possa interferir com os efeitos dos inibidores da ECA não relacionados a BK, embora pouco provável, não pode ser descartada.

Hecker e cols, em 1994, apontaram evidências de que os inibidores da ECA interagem diretamente com os receptores de BK em vasos da circulação coronária e veias jugulares de coelhos. Erdös e cols descreveram interações entre os inibidores da ECA e a BK independentes do metabolismo da BK, resultando em potenciação desta cinina. O mecanismo atribuído ao efeito acentuado da BK e outros ligantes em B₂ é de *crosstalk* entre a enzima e o receptor, mas não exclui a possibilidade de que os

inibidores da ECA possam ligar-se diretamente aos receptores de BK (Erdös e col, 1999).

Mais recentemente, Erdös e cols mostraram que inibidores da ECA podem interagir com receptor B₁ de BK. Eles demonstraram que houve ativação direta do receptor B₁ pelos inibidores da ECA enalaprilato, captopril e ramiprilato. Com a ativação de B₁, houve aumento do [Ca²⁺]_i e liberação de NO em células endoteliais e células transfectadas com B₁ (Erdös e col, 2002). Machado (2009) demonstrou que a Ang-(1-7) provocou liberação de nitrito em células transfectadas com o receptor Mas (CHO-Mas). Esse efeito da Ang-(1-7) foi abolido pelo pré-tratamento com o A-779 e com L-Name e não foi influenciado pelo inibidor da ECA, captopril. Nas células endoteliais humanas (HAEC) a estimulação com BK ou Ang-(1-7) provocou liberação significativa de NO sendo este efeito potencializado pela associação dos dois peptídeos. Esta interação foi abolida pelo pré-tratamento com os antagonistas do receptor B₂ da BK (BK-B₂) e da Ang-(1-7) (HOE 140 e A779 respectivamente) e pelo inibidor da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), L-Name. A potenciação da BK pela Ang-(1-7) foi preservada após inibição da ECA. A estimulação com BK e a Ang-(1-7) provocou a fosforilação/ desfosforilação coordenada do sitio estimulatório/inibitório da eNOS (S1177/Thr 495). Sendo este efeito potenciado pela associação dos dois peptídeos. Em conjunto, esses resultados demonstram que a potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7) depende da co-expressão dos receptores B₂ e Mas na célula e envolve o aumento da fosforilação/desfosforilação coordenada da eNOS nos sítios estimulatório/inibitório (S1177/Thr 495).

Como foi mencionado anteriormente, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada pela ECA e formar a Ang-(1-5). A Ang-(1-5) não possui atividade potenciadora de BK ou de inibição da atividade da ECA. Assim, um fator adicional que pode acentuar a atividade potenciadora da Ang-(1-7) em camundongos tratados com captopril corresponde a redução da inativação da Ang-(1-7) pela ECA. Além disso, maior biodisponibilidade de Ang-(1-7) também pode resultar em maior biossíntese de seus fragmentos Ang-(2-7), Ang-(3-7), ou ainda, a Ala¹-Ang-(1-7), que também são capazes de potenciar o efeito hipotensor da BK em doses desprovidas de qualquer influência sobre a PAM ou FC. A Ang-(2-7) e Ang-(3-7) também inibem a atividade da ECA de forma mais eficaz que a Ang-(1-7) *in vitro* (Paula e cols, 1999).

A infusão de baixas doses de Ang-(1-7) aumentou significativamente o fluxo sanguíneo nos rins, mesentério, cérebro e pele, segundo Sampaio e cols, em 2003, que avaliaram os efeitos hemodinâmicos regionais e sistêmicos da Ang-(1-7) em ratos anestesiados. A Ang-(1-7) também produziu aumento de 30% do índice cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica total. O fluxo sanguíneo esplênico, em músculos, pulmões e adrenais, assim como a pressão arterial sistêmica e a frequência cardíaca não foram alterados com a dose de Ang-(1-7) usada. A infusão do antagonista seletivo da Ang-(1-7), o A-779, reduziu o fluxo sanguíneo em rins, cérebro, mesentério e pele e, também, bloqueou a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) nesses leitos vasculares. Isto sugere um papel fisiológico importante da Ang-(1-7) endógena nesses órgãos. Por outro lado, os efeitos da Ang-(1-7) sobre o fluxo sanguíneo cerebral, o índice

cardíaco, o volume sistólico e a resistência periférica total não foram totalmente abolidos pelo A-779 (Sampaio e cols, 2003). Os camundongos Mas-KO apresentam volume sistólico e índice cardíaco significativamente menores, resistência vascular periférica total e resistência vascular para rins, adrenais, pulmões, mesentério, baço, testículos e tecido adiposo marrom significativamente maiores quando comparados aos animais do tipo selvagem (Santos, 2008). Portanto, as respostas fisiológicas à Ang-(1-7) possivelmente são evocadas por diferentes mecanismos em diferentes órgãos e tecidos. O metabolismo da Ang-(1-7) nos diversos leitos vasculares, ao gerar metabólitos ativos como a Ang-(2-7) e Ang-(3-7), também poderia justificar a multiplicidade de mecanismos e mediadores. Dessa forma é possível que o mecanismo de potenciação da BK pela Ang-(1-7) possa diferir de um território para outro. Essa hipótese necessita ser testada em experimentos adicionais.

Recentemente, foi descrito que os iECA intensificam as funções dos receptores B1 e B2 de BK por fenômenos alostéricos (Erdös e cols, 2010). Assim como os iECA exógenos, peptídeos endógenos como a Ang-(1-7) e a Ang-(1-9) seriam ativadores alostéricos indiretos dos receptores B2. Eles aumentariam a eficácia colateral dos iECA ao induzir mudanças de conformação via ECA-receptor B2 nas membranas celulares. Isto levaria a liberação acentuada de mediadores como NO, fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou prostaglandinas. Os iECA também podem ativar diretamente os receptores B1 em um sítio alostérico que difere do sítio que pertence aos peptídeos ligantes. A consequência dessa ativação equivale a

uma elevada produção de NO pela NOS indutível como foi demonstrado inicialmente em células endoteliais humanas (Ignjatovic e cols, 2002).

Finalmente, os iECA também podem potencializar as ações diretas das calicreínas nos receptores B2 na ausência de liberação de cininas (Biyashev, 2006).

A ligação da Ang-(1-7) em fatias de rim foi abolida em animais KO para o receptor Mas. Da mesma forma, a ligação da Ang-(1-7) em rins de ratos foi bloqueada pelo seu antagonista específico [D-Pro7]Ang-(1-7) (Santos e cols, 2003). Isto sugere que o [D-Pro7]Ang-(1-7) compete com a Ang-(1-7) pelo receptor Mas.

Nesse estudo, correlacionamos parcialmente os mecanismos de potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) descritos previamente em vários estudos que apontam para a liberação de óxido nítrico e prostaglandinas vasodilatadoras como consequência direta da ativação do receptor Mas, ou da interação e favorecimento das ações das cininas em diversos graus e níveis pelas angiotensinas. Nosso foco foi evidenciar a importância da síntese de NO para a potenciação do efeito hipotensor da BK em camundongos.

A relevância fisio-farmacológica de nossos achados pode ser ilustrada por recentes estudos envolvendo o papel da Ang-(1-7) na potenciação da BK. Fernandes e cols demonstraram que a potenciação da BK pela Ang-(1-7) foi preservada com o bloqueio da ECA, em concordância com nossos estudos anteriores (Paula e cols, 1995), do bloqueio do receptor AT1, ou da combinação de ambos em arteríolas de ratos SHR estudadas in vivo. A potenciação da vasodilatação induzida pela

BK pela Ang-(1-7) foi revertida pelo antagonista específico da Ang-(1-7), A-779. Mais importante, a potenciação da BK por inibidores da ECA pode ser revertida (Fernandes e cols, 2001) ou atenuada (Maia e cols, 2004) pelo antagonista da Ang-(1-7), A-779.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochim. J.* 2001; 357: 593 – 615.

Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7). *Exp Physiol.* 2008 May; 93(5):528-37. Review.

Alexander RW, Brock TA, Gimbrone-JR MA, Ritterhouse SE. Angiotensin increases inositol triphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1985; 7: 447 – 451.

Almeida AP, Frabregas BC, Madureira MM, Santos RJS, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2000; 33(6): 709-713.

Ardailou R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997; 6(1): 28-34.

Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1995; 269: H313-H319.

Biyashev D, Tan F, Chen Z, Zhang K, Deddish PA, Erdös EG, Hecquet C. Kallikrein activates bradykinin B2 receptors in absence of kininogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290:H1244–H1250.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Ang-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*. 1996; 27: 523-528.

Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, Degasparo M, Goodfriend T, Hussain A, Peach MJ, Taylor DG, Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 17: 720-723, 1991.

Busse R, Fleming I, Hecker M. Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22(suppl 5): S31-S36.

Carvalho MB, Duarte FV, Faria-Silva R, Fauler B, da Mata Machado LT, de Paula RD, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Evidence for Mas-mediated bradykinin potentiation by the angiotensin-(1-7) nonpeptide mimic AVE 0991 in normotensive rats. *Hypertension*. 2007 Oct;50(4):762-7.

Carvalho, MHC; Nigro, D; Lemos, VS; Tostes RA; Fortes, ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001; 8: 76 – 88.

Chappell MC, Piro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1998; 31(1Pt 2): 362-367.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002; 417:822-828.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399: 601 – 605.

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.

Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme. *Circ. Res*. 1975; 36: 247-255.

Erdös EG, Jackman HL, Brovkovynch V, Tan F, Deddish PA. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34:1569-1576.

Erdös EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I_Converting Enzyme Inhibitors Are Allosteric Enhancers of Kinin B1 and B2 Receptor Function. *Hypertension*. 2010; 55:214-220.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the

bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regul Pept.* 2005 Apr 15;127(1-3):183-9.

Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RCA, Santos RAS, Carvalho MHC. Potentiation of Bradykinin by Angiotensin-(1-7) on Arterioles of Spontaneously Hypertensive Rats Studied In Vivo. *Hypertension.* 2001; 37[part 2]:703-709.

Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9:1716-22.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1997; 30(pt 2):535-541.

Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother.* 1965; 24:163-169.

Fleming I. Myoendothelial Gap Junctions. The gap is there, but does EDHF go through it?. *Circulation Research*, **86**: 249-250, 2002b.

Fleming I, Baurisachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces de Ca^{2+} - independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(3):1123-8 -1128, 1999.

Fleming I & Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular Research*, **43**: 532 – 541, 1999.

Fleming I. & Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284: R1 – R12, 2003.

Forstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollack JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *European Heart Journal*. 1993; 14(Suppl I): 10 – 15.

Forstermann U, Closs EI, Pollack JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1993; 23(6 Pt 2):1121– 1131.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999; 399(6736):597-601.

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1996; 28(1):104-108.

Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.

Furchgott RF. The Discovery of Endothelium-Dependent Relaxation. *Circulatio*. 1993; 87: v-3 – v8.

Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Summers C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**: E357 – E374, 2000.

Ganten D, Ludwig G, Hennhoefer C. Genetic control of rennin in the tissues of different strains of mice. *Naunyn schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1986; 332: R59.

Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension.* 1988; 12: 530 – 548.

Hecker M, Pörsti I, Busse R. Mechanisms involved in the angiotensin II independent hypotensive action of ACE inhibitors. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27:1917-1921.

Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In Vanhoutte P.M.ed. *Mechanisms of vasodilatation.* 427 – 435, 1988.

Inagami T and Harris RC. Molecular insights into angiotensin II receptor subtypes. *News Physiol. Sci.*, **8**:215-218,1993

Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdös EG. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors. Direct activation of bradykinin B1 receptor. *J Biol Chem.* 2002; 277:16847–16852.

Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M,

Schlüter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Feb;27(2):297-302. Epub 2006 Nov 30.

Lautner RQ; Jankowski V, Jankowski J; Pessoa DCP; Andrade CRA; Prates JB; Santos RAS. The novel ACE2 product peptide, Ala¹-Ang-(1-7), is present in human plasma and possess unique vasodilator properties. 63rd Annual High Blood Pressure Research Conference 2009. *Hypertension* 2009; 54:e26-e127.

Lima CV, Paula RD, Resende FL, Khosla MC, Santos RAS. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 1997; 30:542-548.

Luft FC. Meet the 'other' angiotensins. *J Mol Med.* 1997; 75(3):157-9.

Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997; Nov;20(11 Suppl 2):II-3-10. Review.

Mata-Machado LT. Avaliação dos mecanismos envolvidos na potenciação dos efeitos da Bradicinina pela Angiotensina-(1-7). 2009. Tese de doutorado em Fisiologia e Farmacologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Machado RD, Ferreira MA, Belo AV, Santos RA, Andrade SP. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regul Pept.* 2002 Jul 15;107(1-3):105-13.

Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci.* 2000;66(1):67-76.

Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, Carvalho MHC, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) Antagonist A-779 Attenuates the Potentiation of Bradykinin by Captopril in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43(5):685-691.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 1993; **268**: 12131 – 12234.

Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1991; 43(2):109 – 120.

Oliveira MA, Fortes ZB, Santos RAS, Khosla MC, Carvalho MHC. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin induced vasodilation on rat mesenteric microvessels in vivo. *Peptides.* 1999; 20: 1195–1201.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122): 524 – 526.

Palmer RM & Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1989; 158(1): 348 – 352.

Pals DT, Mascucci FD, Dinning GS, Sipos F, Fessler DC. Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. *Circ. Res.* 1971; 29: 673 – 681

Paula RD. Estudo dos mecanismos envolvidos na potenciação do efeito hipotensor da bradicinina pela angiotensina-(1-7). 2004. Dissertação de mestrado em Fisiologia e Farmacologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Paula RD, Lima CV, Britto RR, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Santos RAS. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7)-related peptides. *Peptides.* 1999;20:493-500.

Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* 1995;26:1154-1159.

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos RA. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 2004 Oct;44(4):490-6. Epub 2004 Aug 23.

Rastelli VM, Oliveira MA, dos Santos R, de Cássia Tostes Passaglia R, Nigro D, de Carvalho MH, Fortes ZB. Lack of potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) in a type 2 diabetes model: role of insulin. *Peptides.* 2007 May;28(5):1040-9. Epub 2007 Feb 14.

Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of Angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 2002; 39:799-802.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1993; vol. **22**(4): 1-14.

Rubanyi GM, Vanhoute PM. Oxygen-derived free radical, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*, **2**(4): 1-14, 1986.

Rubanyi GM, Vanhoute PM. Nature of endothelium derived relaxing factor are there two relaxing mediators? *Circulation Research*, **61**: 1161-1167, 1987.

Rubanyi GM, McKinney M, Vanhoute PM. Biphasic release of endothelium-derived relaxing factor(s) by acetylcholine from perfused canine femoral arteries. Characterization of muscarinic receptors. *Journal Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**: 802 – 808, 1987.

Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; vol. **22**(4): 1-14,1993.

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284(6):H1985-94.

Sampaio WO, Santos RA; Faria-Silva R, Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial

nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, **49**: 185 – 192, 2007.

Santos GAB. Avaliação do papel do eixo Ang-(1-7)/Mas no controle da resistência vascular sistêmica e regional de animais anestesiados. 2008. Tese de doutorado em Fisiologia e Farmacologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero JL, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988;11:153-157.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:1033-47.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues ARV, Gropen C Jr, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 1994;35:293-298.

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, Ferreira AJ. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006. May;47(5):996-1002.

Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, Leite MF, Lemos VS, Silva DMR, Guerra MT, Khosla MC. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), [D-Pro⁷] angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2003; 41[part 2]:737-43.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, 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. *PNAS* 2003; 100:8258-8263.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Speth R, Machado RP, Pinheiro SVB, Lopes MT, Mendes EP, Bader M, Schultheiss HP, Campagnole-Santos MJ, Walther T. Evidence that angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. *Hypertension* 2002; 40:387.

Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 2007 Mar;28(3):702-7. Epub 2006 Nov 28.

Silva LCS, Fontes MAP, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Campos Jr RR, Guertzenstein PG, Santos RAS. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res*. 1993; 613:321-325.

Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1999; 34: 950-957.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Saye JAM, Smith DR. Angiotensin II Receptors and Angiotensin II Receptors Antagonists. *Pharmacol*. 1993; 45 (2): 205-251

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275:33238–33243.

Toda N, Miyazaki M. Angiotensin-induced relaxation in isolated dog renal and cerebral arteries. *Am J Physiol*. 1981;240:H247-H254.

Whitebread S, Melle M, Kamber B, Degasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem BioPhys Res. Comum*, 163: 284 – 291, 1989.

Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a non peptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*. 2002; 40:847-852.

Wong YC, Sim MK, Lee KO. Des-aspartate-angiotensin-I and angiotensin IV improve glucose tolerance and insulin signalling in diet-induced hyperglycaemic mice. *Biochem Pharmacol*. 2011 Jul 23.

Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev.* 1992;17:227-62.