

**LEONOR TAPIAS DA MATA MACHADO**

***AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRADICININA PELA  
ANGIOTENSINA-(1-7)***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LEONOR TAPIAS DA MATA MACHADO**

***AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA  
POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS 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

2009

**“ Não envelhecemos enquanto buscamos”**

**Mario Quintana.**

**“A felicidade não está em fazer o que a gente quer, mas querer o que a gente faz.” Jean-Paul Sartre.**

*À minha família, pelo amor e compreensão nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho. A Aninha, raio de luz nas nossas vidas, cuja presença angelical é e sempre será motivo de inspiração. Obrigada!.*

## **AGRADECIMENTOS**

Os agradecimentos a seguir não se encontram listados em ordem de importância. Seria injusto estabelecer uma seqüência neste momento. Além dos citados, várias pessoas foram essenciais, não só durante a realização deste trabalho, mas também durante toda a trajetória que me conduziu até ele.

Ao Professor Robson Augusto Souza dos Santos, meu orientador, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pelo apoio, incentivo e confiança.

A Elizabeth Pereira Mendes, minha “professora”, pela bondade e paciência inesgotáveis no meu início na cultura celular.

A Walkyria Oliveira Sampaio, pelo apoio e compreensão em momentos muito difíceis. Uma grande amiga a quem devo eterna gratidão.

À Professora Maria José Campagnole-Santos, “minha irmã”, por estar sempre ao meu lado.

Às minhas amigas Jaqueline e Ninon companheiras de todas as horas.

Às meninas da “cultura celular” Sato, Jousie e Flavinha (minhas filhas do coração) pela ajuda e torcida constantes.

Aos companheiros do Laboratório de Hipertensão, Beth, Serginho, Zezé, Gisele, Gonzaga, Daniel, Guilherme, Lenice, Aline, Ana Paula, pelo companheirismo e convivência.

# INDICE

---

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Endotélio vascular.....	1
1.2 Sistema Renina-Angiotensina.....	5
1.3 Angiotensina-(1-7).....	10
1.4 Sistema Calicreína-Cinina.....	15
1.5 Interações entre Angiotensina-(1-7) e Bradicininina.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1 Cultura celular.....	22
3.2 Determinação da liberação de óxido nítrico	
3.2.1 Método fluorimétrico do DAN.....	22
3.2.2 Método fluorescente do DAF-FM.....	23
3.3 Western Blotting.....	24
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Caracterização das células.	27
.....	

• **Células CHO, CHO-B2 e CHO-Mas**

5.2 Efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang(1-7) sobre a produção de nitrito.....	28
5.3 Participação dos receptores B2 da BK e Mas da Ang-(1-7) na produção de nitrito após estimulação com BK e Ang-(1-7).....	34
5.4 Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) com captopril sobre a produção de nitrito após estimulação com BK e Ang-(1-7).....	36
5.5 Efeito da inibição da óxido nítrico sintase com L-Name sobre a produção de nitrito após estimulação com BK e Ang-(1-7) em células CHO-B2 e CHO-Mas.....	37
5.6 Efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a liberação de óxido nítrico.....	39

• **Células endoteliais de aorta torácica humanas (HAEC)**

5.7 Efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a liberação de óxido nítrico.....	41
5.8 Participação dos receptores B2 da BK e Mas da Ang-(1-7) na produção de óxido nítrico após estimulação com BK e Ang-(1-7)..	45
5.9 Efeito da inibição da sintase do óxido nítrico com L-Name sobre a produção de NO após estimulação com BK e Ang-(1-7).....	47
5.10 Efeito da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) com captopril sobre a produção de NO após estimulação com BK e Ang-(1-7).....	48



5.11 Efeito da inibição dos receptores B2 e Mas, da óxido nítrico sintase e da enzima conversora de angiotensina sobre a potencialização da Ang-(1-7) na produção de NO induzida pela BK.....	49
5.12 Avaliação da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a fosforilação/desfosforilação da eNOS.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- AA – ácido aracdônico;
- ADP – adenina difosfato
- Akt - proteína quinase B
- ANP – peptídio natriurético atrial;
- AMP<sub>C</sub> – monofosfato cíclico de adenosina;
- A-779 – antagonista seletivo da Angiotensina-(1-7);
- Ang I – angiotensina I;
- Ang II – angiotensina II;
- Ang III – angiotensina III;
- Ang IV – angiotensina IV;
- Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7);
- ANOVA – análise de variância
- AT<sub>1</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 1
- AT<sub>1A</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 1, subtipo A
- AT<sub>1B</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 1, subtipo B
- AT<sub>2</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 2
- AT<sub>3</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 3
- AT<sub>4</sub> – receptores angiotensinérgicos do tipo 4
- B<sub>1</sub> – receptores cininérgicos do tipo 1
- B<sub>2</sub> – receptores cininérgicos do tipo 2
- BK – bradicinina
- Ca<sup>+2</sup> – cálcio
- CaM – calmodulina
- CHO – Células de ovário de hamster.
- CHO-B2 – Células de ovário de hamster transfectadas com o receptor B2
- CHO-Mas – Células de ovário de hamster transfectadas com o receptor Mas
- CGP 42112A - antagonista de receptores angiotensinérgicos do tipo 2
- DAF-FM DA* – Diamino fluoresceínas
- DAN – 2,3 diaminonaftaleno

D-MEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
ECA – enzima conversora de angiotensina  
ECA2 – enzima conversora de angiotensina 2;  
EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio;  
EDTA – ácido etilenonitrilotetraacético;  
EGTA – ácido tetracético etilenoglicol;  
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial;  
EPM – erro padrão da média;  
FBS – Soro fetal bovino;  
FAD – flavina adenina dinucleotídeo;  
FNT – fator de necrose tumoral;  
GMPc – monofosfato cíclico de guanosina;  
HAECs – Células endoteliais de aorta torácica humana;  
BH<sub>4</sub> – tetrahidrobiopterina;  
HBS - *Hank's Balanced Salts*;  
HCL – ácido clorídrico;  
HEPES – ácido hidroxiecosatetraenóico;  
HOE - 140 – antagonista de receptores cininérgicos do tipo 2;  
HRP – *horseradish peroxidase*;  
HSp – *head shock protein*;  
iNOS - óxido nítrico sintase induzível;  
IP<sub>3</sub> . trifosfato de inositol;  
K<sup>+</sup> – Potássio;  
KRH - Krebs ringer hepes;  
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;  
NaF – Fluoreto de sódio;  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> – Ortovanadato de sódio;  
NaOH – hidróxido de sódio;  
NO – óxido nítrico;  
NOS – óxido nítrico sintase;  
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal;  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion superóxido;  
PD123177 - antagonista de receptores angiotensinérgicos do tipo 2;

PGI<sub>2</sub> – prostaciclina;  
PKC - proteína quinase C  
PKG – proteína quinase G;  
PLA<sub>2</sub> - fosfolipases A;  
PLC - fosfolipases C;  
PLD - fosfolipases D;  
PMSF – fenil metil sulfonil fluoreto;  
PTP - tirosina fosfatase  
SCC – sistema calicreína-cinina;  
SDS – Sódio dodecil sulfato;  
SDS-PAGE – Sódio dodecil (lauryl) sulfato-poliacrilamida;  
SRA – sistema renina angiotensina;  
TBS – tampão Tris-salino;  
TBS-T – Tampão tris salino-Tween-20  
TK - tirosina quinase

## LISTA DE FIGURAS

---

---

**Figura 1** - Caracterização, por Western Blotting, das células de ovário de hamster (CHO) e células endoteliais de aorta torácica humana (HAEC) para expressão dos receptores Mas.

**Figura 2** - Liberação de nitrito em células CHO-B2.

**Figura 3** - Liberação de nitrito em células CHO-Mas.

**Figura 4** - Liberação de nitrito em células CHO.

**Figura 5 - Células CHO-B2.** Efeito da pré-incubação com o antagonista do receptor B2 HOE 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**A**), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**B**) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (**C**), sobre a liberação de nitrito estimulada pela bradicinina ( $10^{-6}$  M).

**Figura 6 - Células CHO-Mas.** Efeito da pré-incubação com o antagonista do receptor Mas A-779 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**A**), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**B**) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (**C**), sobre a liberação de nitrito estimulada pela Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  M).

**Figura 7 - Liberação de óxido nítrico em células CHO-B2** após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M) (**A**) ou com bradicinina ( $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  M) associada à Ang-(1-7) ( $10^{-8}$ .M) (**C**) e em **Células CHO-Mas** após 5 minutos de incubação com Ang-(1-7)( $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M) (**B**).

**Figura 8 - Liberação de óxido nítrico em células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs).** Efeito da incubação com bradicinina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) (**A**). Avaliação da pré-incubação com o antagonista do receptor B2 HOE 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**B**), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**C**) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (**D**), sobre a liberação de óxido nítrico estimulada pela bradicinina ( $10^{-6}$  M).

**Figura 9 - Liberação de óxido nítrico em células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs)** Efeito da incubação com Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) (**A**). Avaliação da pré-incubação com o antagonista do receptor Mas A-779 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**B**), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**C**) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (**D**), sobre a liberação de óxido nítrico estimulada pela Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  M).

**Figura 10 - Células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs).** Liberação de NO após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-7}$  M) associada à Ang-(1-7)-(1-7) ( $10^{-9}$  M) (**A**),. ( $10^{-8}$  M) (**B**) e ( $10^{-7}$  M) (**C**).

**Figura 11 - Células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs).** Liberação de NO após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-8}$  M) associada à Ang-(1-7)-(1-7) ( $10^{-9}$  M) (**A**) e. ( $10^{-8}$  M) (**B**).

**Figura 12 - Células endoteliais de aorta torácica humana.** Efeito dos antagonistas dos receptores B2, HOE 140 (**A**) e MAS, A-779 (**B**) ( $10^{-6}$  M, 10 min de pré-incubação), do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-Name, ( $10^{-6}$  M, 10 min de pré-incubação) (**C**) e do inibidor da ECA, captopril, (50  $\mu$ mol/L, 10 min de pré-incubação)

(D) sobre a potenciação da liberação de NO induzida pela BK ( $10^{-8}$  M) em presença de Ang-(1-7) ( $10^{-8}$  M).

**Figura 13** - Células endoteliais humanas. Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células mostrando a fosforilação do sítio estimulatório da eNOS (S1177) após estimulação com BK ( $10^{-6}$  M, 5 e 10 min) (A), BK ( $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M, 5 min) (B) e BK ( $10^{-8}$  M) e Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M) (C).

**Figura 14** - Células endoteliais humanas. Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células mostrando a desfosforilação do sítio inibitório da eNOS (Thr 495) após estimulação com BK ( $10^{-6}$  M, 5 e 10 min).

**Figura 15** - Efeito da bradicinina na fosforilação/desfosforilação simultânea do sítio estimulatório/ inibitório da eNOS (S1177/Thr 495) nas células endoteliais humanas.

**Figura 16** - Células endoteliais humanas. Efeito da estimulação com BK ( $10^{-8}$  M), Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M) e BK associada à Ang-(1-7) na fosforilação do sítio estimulatório da eNOS (S1177).

**Figura 17** - Células endoteliais humanas. Efeito da estimulação com BK ( $10^{-8}$  M), Ang-(1-7) ( $10^{-8}$  M) e BK associada à Ang-(1-7) na desfosforilação do sítio inibitório da eNOS (Thr 495).

**Figura 18** - Células endoteliais humanas. Potenciação da fosforilação/ desfosforilação simultânea do sítio estimulatório/inibitório da eNOS (Ser1177/ Thr 495) após estimulação com BK ( $10^{-8}$  M) associada à Ang-(1-7) ( $10^{-8}$  M).

## RESUMO

---

---

O heptapeptídeo, Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], é um membro ativo do sistema renina-angiotensina com ações vasodilatadoras mediadas, pelo menos em parte, pela liberação de óxido nítrico (NO) via potencialização dos efeitos vasculares da bradicinina (BK). Assim, neste estudo, procuramos investigar em que níveis da sinalização intracelular essa interação acontece, mais especificamente na liberação de NO. A estimulação da célula CHO, não transfectada, com BK, Ang-(1-7) ou BK associada à Ang-(1-7) não provocou liberação significativa de nitrito. Nas células transfectadas com o receptor B2 (CHO-B2) a estimulação com BK provocou liberação significativa de nitrito, este efeito foi abolido pelo pré-tratamento com o HOE 140 e com L-Name e não foi influenciado pelo inibidor da ECA, captopril. A incubação com Ang-(1-7) ou Ang-(1-7) associada à BK não provocou liberação diferente da observada no controle. A Ang-(1-7) provocou liberação de nitrito apenas nas células transfectadas com o receptor Mas (CHO-Mas). Nenhum efeito, diferente do controle, foi observado após a estimulação com BK ou BK associada à Ang-(1-7). O 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 potencialização 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).



## ABSTRACT

---

The heptapeptide Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], is an active member of the renin-angiotensin system which has vasodilator actions mediated, at least in part, by nitric oxide (NO) release which potentiates the vascular effects of bradykinin (BK). Thus, in this study, we aimed to investigate at which levels of intracellular signaling this interaction occurs, specifically in the NO release. Stimulation of non transfected CHO cells by BK, Ang-(1-7) or BK associated with Ang-(1-7), did not cause significant release of nitrite. In cells transfected with B2 receptor (CHO-B2) there was nitrite release only after stimulation with BK, and no effect was observed after stimulation with Ang(1-7) or BK associated with Ang-(1-7). The effect of BK was abolished by pre-treating the cells with HOE 140 and L-Name and was not affected by captopril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. Ang-(1-7) caused nitrite release only in cells transfected with Mas receptor (CHO-Mas). No effect was observed after stimulation with BK or BK associated with Ang-(1-7). The effect of Ang-(1-7) was abolished by pre-treating the cells with A-779 and L-Name and was not affected by captopril. In human endothelial cells (HAEC) the stimulation with BK and Ang-(1-7) caused significant release of NO and this effect was potentiated by the association of both peptides. This interaction was abolished by pre-treating the cells with B2 receptor (BK-B2) and Mas antagonists (HOE 140 and A779, respectively) and with a nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor, L-Name. The potentiation of BK by Ang-(1-7) was preserved after ACE inhibition. The stimulation with BK and Ang-(1-7) caused a coordinated phosphorylation/dephosphorylation of the stimulatory/inhibitory site of eNOS (S1177/Thr 495). This effect was potentiated by the association of both peptides. Altogether, these results demonstrate that the potentiation of BK effects by Ang-(1-7) depends on the co-expression of B2 and Mas receptors in the cell and involves the increase of coordinated phosphorylation/ dephosphorylation of eNOS in the stimulatory/inhibitory site (S1177/Thr 495).

# 1- INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Endotélio vascular

O endotélio vascular é constituído por uma monocamada de células que reveste a superfície interna de todos os vasos sanguíneos (artérias e veias), o coração e vasos linfáticos. As células endoteliais constituem um importante órgão endócrino envolvido na geração e regulação de múltiplos processos fisiológicos e fisiopatológicos como coagulação, inflamação, aterosclerose e angiogênese. Além disso, contribuem 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 à 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 (relaxamento ou contração) e a estrutura do músculo liso vascular subjacente (Fleming *et al.*, 1999; Rubanyi, 1993). A modulação do tônus muscular liso é mediada pela síntese e secreção de fatores relaxantes [prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), fator relaxante derivado do endotélio (Óxido nítrico- NO) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)] e contráteis [metabólitos do ácido aracdônico (AA), endotelina-I e angiotensina II (Ang II)] (Rubanyi, 1993; Luscher & Barton, 1997).

Após a descoberta de Furchgott e Zawadski (1980) de que a vasodilatação induzida pela acetilcolina dependia da presença do endotélio, 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 posteriormente identificado como sendo o NO (Ignarro *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1987; 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 *et al.*, 1991; Heller *et al.*, 1999). O NO é um radical livre produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) que cataliza a oxidação do átomo terminal de nitrogênio guanido da L-arginina, formando óxido nítrico e L-citrulina (Angus & Cocks, 1989; Palmer & Moncada, 1989). Esta reação requer cofatores essenciais como a calmodulina (CaM) (Long & Stone, 1985; Griffith *et al.*, 1986), tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Marletta, 1993), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida NADPH), heme e íons zinco. (Bredt & Snyder, 1990; Hevel *et al.*, 1991; 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 *et al.*, 1993; Forstermann *et al.*, 1994; Alderton *et al.*, 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 *et al.*, 1994; Rubanyi, 1993; Kolodziejcki, *et al.*, 2003). Porém, evidências posteriores tem mostrado que a eNOS também pode ser ativada por uma via independente do aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Fleming *et al.*, 1999) e em 1999, trabalhos de Dimmeler *et al.*, Fulton *et al.* e Mitchell *et al.* demonstraram que o principal mecanismo dependia

da fosforilação da eNOS 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 *et al.*, 2001).

A liberação de NO pelas células endoteliais ocorre em resposta à ativação de receptores por substâncias vasoativas como acetilcolina, bradicinina, Angiotensina 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 *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 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 *et al.*, 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 ( $AMP_C$ ). 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 *et al.*, 1988).

A partir de observações, em vasos da circulação coronariana, de que os inibidores da via da L-arginina e  $PGI_2$  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, foi proposta, a existência de outros mediadores relaxantes não-prostanóides, quimicamente diferentes ((Rubanyi & Vanhoutte, 1987; Rubanyi *et al.*, 1987; Fleming, 2000a; Fleming, 2000b; Busse *et al.*, 2002), incluindo um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os mecanismos envolvidos nesta ação indicam que o EDHF possa ser um ativador endógeno dos canais  $K^+$  o que provocaria um aumento do efluxo do  $K^+$  celular, aumentando, consequentemente, o número de cargas negativas na superfície interna da membrana, o que por sua vez, reduziria o influxo de  $Ca^{2+}$  através de canais dependentes de voltagem, levando à diminuição do  $Ca^{2+}$  livre no citosol e consequente relaxamento da célula muscular lisa (Felétou & Vanhoutte, 1999; Hecker, 2000).

Numerosos estudos mostram os peptídeos dos sistemas renina-angiotensina (SRA) e calicreína-cinina (SCC) desempenhando papel importante no controle do tônus vascular. As ações do SRA são mediadas não apenas pela angiotensina II (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 *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2000; Kucharewicz *et al.*, 2002; Ferrario *et al.*, 2004). Ang II e Ang-(1-7) exercem influência modulatória dentro do próprio SRA (Ferrario *et al.*, 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 *et al.*, 2001; Almeida *et al.* 2000; Li *et al.*, 1997).

## **1.2. Sistema Renina-Angiotensina**

Tradicionalmente, o SRA é visto como um sistema endócrino típico cujo principal efetor, a Ang II, é um potente vasoconstritor (Brosnihan *et al.*, 1988; Ferrario *et al.*, 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 adrenomediares (Ferrario *et al.*, 1986), secreção de aldosterona (Peach, 1977), liberação de hormônios hipofisários (ACTH e Vasopressina) (Ferrario *et al.*, 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  $\beta_1$  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 mostra o processamento linear do angiotensinogênio e a Ang II como o produto biologicamente ativo mais importante, desconsiderando outras possibilidades de processamento. 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 angiotensina II [Ang(1-8)], podem sofrer

processo de biotransformação dando origem a outros peptídeos bioativos menores [(Angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina-(1-7)] (Brosnihan *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 1988; Ferrario *et al.*, 1991; Fitzsimons, 1998). A biotransformação de Ang I e Ang II em outras angiotensinas pode ser catalizada por diversas, enzimas entre elas, a prolil-endopeptidase, endopeptidase neutra, a prolil-carboxipeptidase e a recentemente descrita enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Dounogue *et al.*, 2002).

O conceito clássico do SRA circulante tem sido alterado nos últimos anos. Com o surgimento de técnicas de biologia molecular foi possível confirmar a existência de síntese local dos componentes do SRA em vários tecidos além dos rins e do fígado (Ganten, *et al.*, 1986; Dzau *et al.*, 1986). Deschepper, *et al.* (1986) mostraram que o mRNA para renina está presente em vasos sanguíneos, miocárdio, adrenais, cérebro e órgãos do sistema reprodutor. Assim, 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).

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) tem possibilitado a caracterização das ações dos peptídios angiotensinérgicos (Chiu *et al.*, 1989; Raia *et al.*, 1990; Hall, 1991; Thaisrivongs, 1992; Timmermans *et al.*, 1993).

Estudos iniciais de Pals *et al.* (1971), mostraram que [Sar<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup>, Ala<sup>8</sup>]Ang II (Saralasin) e [Sar<sup>1</sup>, Thr<sup>8</sup>] 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 *et al.*, 1993).

Estudos mais detalhados dos receptores angiotensinérgicos (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991) e a síntese de seus antagonistas farmacológicos seletivos (Chiu *et al.*, 1986; Blankley *et al.*, 1991; Duncia *et al.*, 1992) levaram à identificação de pelo menos dois sub-tipos de receptores para angiotensina, classificados em AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (Bumpus *et al.*, 1991). O receptor AT<sub>1</sub> é antagonizado pelo derivado imidazólico DUP 753 (Losartan), enquanto o receptor AT<sub>2</sub> é sensível aos compostos PD123319, PD123177 ou ao peptídeo modificado CGP42112A (Chiu *et al.*, 1986; Whitebread *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1990; Bumpus *et al.*, 1991; Timmermans *et al.* 1992; Bottari *et al.*, 1993). Os dois subtipos de receptores também podem ser diferenciados pela sua sensibilidade a agentes redutores como o ditiotreitol (DTT), o qual inativa os receptores AT<sub>1</sub>, enquanto não afeta ou aumenta a sensibilidade dos receptores AT<sub>2</sub> (Chiu *et al.*, 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 *et al.*, 2006), aumento da secreção de insulina (Ramracheya *et al.*, 2006), apoptose de células beta (Chu *et al.*, 2006), diminuição da gliconeogênese e liberação da glicose pelo fígado (Assimacopoulos-Jeannet *et al.* 1982) e elevação dos triglicerídeos plasmáticos (Ran *et al.*, 2004), assim como suas ações sobre o cérebro são mediadas por receptores AT<sub>1</sub> que são

encontrados no cérebro, coração, vasos, fígado, rins e glândulas adrenais. Os receptores AT<sub>2</sub> 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 *et al.*, 1998; Csikos *et al.* 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 AT<sub>1</sub>, exemplo vasodilatação, liberação de NO, inibição da proliferação e do crescimento celular e da apoptose (Unger *et al.*, 1996). Entretanto, estudos mais recentes, mostram os receptores AT<sub>2</sub> mediando efeitos neurotróficos no sistema nervoso central (Culman *et al.*, 2001) e sofrendo *up-regulation* em áreas cerebrais com isquemia pós choque o que sugere uma atividade neuroprotetora (Li *et al.*,2005). No rim, parece participar do controle da natriurese e regulação da pressão sanguínea, através do efeito contraregulatório ao receptor AT<sub>1</sub>, envolvendo bradicinina, óxido nítrico, GMPc e a via do citocromo P-450 (Gallinat *et al.*, 2000; Siragy, 2000).

A clonagem do receptor AT<sub>1</sub> mostrou que ele possui sete segmentos hidrofóbicos transmembrana formando alfa-hélices na bicamada lipídica, sendo acoplados à proteína G (Bumpus *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1992; Inagami e Harris, 1993; Bottari *et al.*, 1993; Hunyady *et al.*, 1996) e que em ratos pode ser subdividido em dois subtipos AT<sub>1A</sub> e AT<sub>1B</sub> (Elton *et al.*, 1992; Iwai e Inagami, 1992; Kakar *et al.*, 1992; Ye e Healy,1992). Os receptores AT<sub>1A</sub> mostram maior afinidade pelo Dup 753, enquanto os receptores AT<sub>1B</sub> são mais sensíveis ao PD 123319. A ativação do receptor AT<sub>1</sub> provoca a ativação das fosfolipases C (PLC), D (PLD) e A2 (PLA 2). A PCL causa formação de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) 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 *et al.*, 1985). Os metabólitos da PLD estimulam a formação de ânions superóxido, ativam tirosina 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 PGI<sub>2</sub>, tromboxano, leucotrienos e ácidos epoxieicosatrienóicos (Bonventre, 1992).

A clonagem do receptor AT<sub>2</sub> 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 AT<sub>1</sub> (Kambayashi *et al.*, 1993; Mukoyama *et al.*, 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 AT<sub>3</sub>, 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 e AT<sub>4</sub> identificado em hipocampo, córtex cerebral e outras regiões do cérebro (Swanson *et al.*, 1992; Wright e Harding, 1995) e que liga especificamente Ang IV.

### **1.3. Angiotensina-(1-7)**

Estudos realizados com o objetivo de sintetizar análogos da Ang II forneceram numerosas informações sobre a relação entre estrutura e atividade dos peptídios que formam o sistema renina-angiotensina. Em geral, a fenilalanina na posição 8 é considerada crítica para a maior parte da atividade agonista e a ligação ao receptor depende dos resíduos aromáticos nas posições 4 e 6, o grupo guanidino na posição 2 e que o fragmento seja carbóxi terminal (Khosla *et al.*, 1974; Bumpus, 1975). Os fragmentos amino terminal eram considerados metabólitos inativos.

As primeiras evidências apontando o fragmento N-terminal, o heptapeptídio Ang-(1-7), como produto metabolicamente ativo da hidrólise da Ang I ou Ang II surgiram dos trabalhos de Santos *et al.* (1988). Estes autores, usando homogeneizados de porções ventrolateral e dorsomedial de medula bulbar de cão, mostraram ser a Ang-(1-7) o principal produto do metabolismo tanto da <sup>125</sup>I-Ang I quanto da <sup>125</sup>I-Ang II. Também foi verificado neste trabalho que a Ang-(1-7) pode ser formada pela hidrólise direta da Ang I já que o pré tratamento do homogeneizado com enalapril, inibidor da ECA, inibiu a formação de Ang II sem afetar a produção de Ang-(1-7) o que sugere que esta angiotensina possa ser sintetizada por vias enzimáticas independentes da ECA. Resultados similares foram obtidos em outros tecidos (Chappell *et al.*, 1990; Kohara *et al.*, 1991; Welches *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1992). A localização da Ang-(1-7) em outras estruturas cerebrais, hipotálamo e neuro hipófise de ratos, foi mostrada através de técnicas de imunohistoquímica (Block *et al.*, 1988). Em ratos, o conteúdo de Ang-(1-7) no tecido hipotalâmico era consideravelmente maior que o de Ang I ou Ang II (Chappell *et al.*, 1989). Estudos posteriores verificaram a presença de Ang-(1-7), fora do tecido cerebral, em plasma de ratos (Chappell *et al.*, 1989) e cães (Santos

*et al.*, 1990; Kohara *et al.*, 1991), borda em escova do túbulo proximal (Stephenson e Kenny, 1987) e medula adrenal (Lawrence *et al.*, 1990).

A Ang-(1-7) pode ser formada pela quebra da ligação Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> da Ang I (Brosnihan *et al.*, 1988) através da hidrólise pelas enzimas prolil-endopeptidase (E.C.3.4.21.26) (Greene *et al.*, 1982), endopeptidase neutra 24.11 (E.C.3.4.24.11) (Erdös & Skidgel, 1990; Yamamoto *et al.*, 1992) e a prolil-endopeptidase ligada à membrana (Checler *et al.*, 1986). A hidrólise da ligação Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> da Ang II pela angiotensinase C (Erdös & Skidgel, 1990) ou prolil-endopeptidase (Greene *et al.*, 1982) também forma Ang-(1-7). Donoghue *et al.* descreveram em 2000 uma nova via de formação da Ang-(1-7) pela ECA2. Esta enzima está presente principalmente em células endoteliais de artérias, arteríolas, veias do coração e dos rins (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Tipnis, Hooper 2000). Em contraste com a ECA, a ECA2 (que também é uma carboxipeptidase) não é bloqueada por inibidores da enzima conversora de angiotensina. A ECA2 é responsável pela conversão da Ang I em angiotensina-(1-9), que pode ser posteriormente convertida em Ang-(1-7) pela própria ECA ou pela ação de outras peptidases. A ECA2 também promove a conversão direta da Ang II em Ang-(1-7) (Vickers, *et al.*, 2002). Essa enzima parece desempenhar um papel muito importante na fisiologia cardíaca, uma vez que encontra-se aumentada após tratamento com antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> e apresenta expressão maior em pacientes com insuficiência cardíaca (Ferreira e Santos, 2005).

A primeira evidência de que a Ang-(1-7) mimetiza algumas das ações conhecidas da Ang II foi mostrada por Schiavone *et al.* (1988). Nestes experimentos a Ang-(1-7) mostrou a mesma potência da Ang II para liberar vasopressina de explantes

hipotalâmicos de ratos. Campagnole-Santos e colaboradores, (1989 e 1990) descreveram alterações da pressão arterial e frequência cardíaca após a microinjeção de Ang-(1-7) na porção dorsomedial do bulbo. Estudos de Barnes *et al.* (1990), Felix *et al.* (1991), Diz e Pirro (1992), mostraram que o heptapeptídeo possui atividade excitatória em neurônios de núcleos bulbares e hipotalâmicos. Foi mostrado também que a Ang-(1-7) apresenta efeitos cardiovasculares semelhantes à Ang II quando injetada em diferentes áreas da superfície ventrolateral do bulbo (Silva *et al.*, 1993; Fontes *et al.*, 1994). Ao contrário do observado para Ang II, a Ang-(1-7), quando infundida intracerebroventricularmente em ratos conscientes, aumenta a sensibilidade do reflexo baroreceptor (Campagnole-Santos *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997). Outras ações da Ang-(1-7) incluem o aumento da glicemia e a redução dos níveis de prolactina plasmática após injeção intracerebroventricular (i.c.v) (Mihessen-Neto *et al.*, 1993) e liberação de prostaglandinas em culturas de astrócitos humanos (Jaiswal *et al.*, 1991; Tallant *et al.*, 1991) e células gliais C6 (Jaiswal *et al.*, 1991).

Periféricamente, a Ang-(1-7) possui potente efeito estimulador da liberação de prostaglandinas em vasos deferentes de coelhos (Trach *et al.*, 1990), ação vasodilatadora ou vasoconstritora em diversos leitos vasculares (Kumagai *et al.*, 1990; Benter *et al.*, 1992; Osei *et al.*, 1993) e importantes ações renais, relacionadas com o controle do balanço hidroeletrólítico (Santos e Campagnole-Santos, 1994).

Coração e vasos sanguíneos são locais importantes para a síntese e ações biológicas da Ang-(1-7) (Santos, *et al.*, 1992; Heitsch, Brovkovich *et al.*, 2002; Santos & Ferreira, 2007). Estudos, em modelos animais, têm mostrado que Ang-

(1-7) causa vasodilatação em artérias coronárias de cães e porcos, aorta de ratos, arteríolas renais de coelho e aumenta o fluxo coronariano (Pörsti *et al.*, 1994; Brosnihan & Ferrario, 1996; Le Tran *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 1998; Ren, Garvin *et al.* 2002; Castro *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006). Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) Lyer *et al.*, (1998) relataram que a Ang-(1-7) funciona como um hormônio vasodilatador neste tipo de hipertensão genética. Em tecidos cardiovasculares humanos, a Ang-(1-7) bloqueia a vasoconstrição induzida pela Ang II e inibe a ECA (Roks *et al.*, 1999) e exerce ação cardioprotetora por antagonizar os efeitos deletérios da Ang II (Santos *et al.*, 2005; Ferreira & Santos, 2005). Numerosos trabalhos ligam parte dos efeitos vasculares da Ang-(1-7) com a BK. Pörsti *et al.* (1994) demonstraram que a Ang-(1-7) provoca relaxamento das artérias coronárias de porco e que esta resposta é atenuada pelo antagonista do receptor B<sub>2</sub> da BK, Hoe 140, e potencializada pelos inibidores da ECA. Em ratos, foi visto que a Ang-(1-7) potencializa a ação hipotensora da BK. Este efeito também foi aumentado pelos inibidores da ECA (Paula *et al.* 1995; Lima *et al.*, 1997). Brosnihan *et al.* (1996) relataram que a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) foi bastante atenuada pelo bloqueador de receptores de BK.

A Ang-(1-7) exerce suas ações ligando-se a um receptor específico diferente de AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> o qual provoca liberação local de NO e prostaglandinas (Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Sampaio *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2001; Heitsch *et al.*, 2001; Brosnihan *et al.*, 1998; Tallant *et al.*, 1997). Em 2003, Santos *et al.* demonstraram que o receptor acoplado à proteína G, codificado pelo protooncogene *Mas*, é um receptor funcional para Ang-(1-7). Na ausência desse receptor, vários efeitos da Ang-(1-7) são abolidos. Em concordância com estes achados, muitos dos efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) podem ser bloqueados pelo A-779, antagonista

seletivo do receptor Mas (Santos *et al.*, 2000), o que confirma o importante papel do eixo Ang-(1-7)/Mas no funcionamento do sistema cardiovascular. Corroborando estes achados, Santos *et al.*, 2006, mostraram comprometimento da função cardíaca em camundongos deficientes para Mas (Mas<sup>-/-</sup>) e em 2008, Xu *et al.*, confirmaram que a deleção genética do Mas provoca prejuízo cardíaco e disfunção endotelial.

Os mecanismos moleculares implicados nos efeitos induzidos pela Ang-(1-7) via receptor Mas são complexos e pouco conhecidos. Biologicamente, a Ang-(1-7) provoca vasodilatação através de mecanismos celulares que resultam no aumento da produção de prostaglandinas vasodilatadoras, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e óxido nítrico, assim com pela amplificação das ações da bradicinina (Sampaio *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2005 ; Faria-Silva *et al.*, 2005 ; Fernandes *et al.*, 2001; Heitsch *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2000; Brosnihan *et al.*, 1998; Tallant *et al.*, 1997). Recentemente, Sampaio *et al.* (2007) em células endoteliais e Dias-Peixoto *et al.* (2008) em cardiomiócitos, demonstraram que a Ang-(1-7) causa fosforilação da eNOS e liberação de NO pela ativação da via da proteína quinase B (Akt) independentemente da elevação dos níveis intracelulares de cálcio.

#### **1.4. Sistema Calicreína-Cinina**

As cininas, bradicinina (BK) e lisil-bradicinina (calidina), são dois peptídeos formados pela ação enzimática das cininogenases sobre o cininogênio,  $\alpha_2$ -globulina plasmática sintetizado pelo fígado (Bhoola *et al.*, 1992; Rocha e Silva, 1970). Existem três cininogênios, os cininogênios de alto e baixo peso molecular e



o T-cininigênio, encontrado apenas em plasma de rato, que produz cininas por uma via independente das calicreínas (Bhoola *et al.*, 1992). Numerosas serinoproteases geram cininas, mas as proteases altamente específicas que liberam a bradicinina e a calidina são as calicreínas. Duas calicreínas agem como cininogêneses; a calicreína plasmática e a calicreína tissular (Carretero e Scicli, 1991; Bhoola *et al.*, 1992; Carretero *et al.*, 1993). Elas são enzimas distintas, ativadas por mecanismos diferentes (Bhoola *et al.*, 1992) e possuem substratos diferentes. A calicreína plasmática cliva o cininogênio de alto peso molecular liberando bradicinina. A calicreína tissular cliva os cininogênios de alto e baixo peso molecular liberando bradicinina e calidina, respectivamente.

Estudos de radioimunoensaio revelaram que a BK-(1-9) é a mais “abundante” cinina encontrada no sangue, apresentando níveis ~2 fmol/ ml os quais são muito baixos, quando comparados com os níveis teciduais ~16-340 fmol/ g encontrados em coração, tecido adiposo marron, pulmão, adrenal e cérebro (Campbell *et al.*, 1993). Embora existam evidências da síntese de cininas na parede vascular (Oza *et al.*, 1990; Wiemer *et al.*, 1991) é pouco provável que estas escapem para a circulação. Isto reforça a opinião de Carretero e Scicli (1991) que consideram as cininas como fatores hormonais locais que agem principalmente através de mecanismos intrácrinos, autócrinos e parácrinos.

As cininas tem uma meia vida curta. No sangue, a meia vida da BK e Lys-BK é menor que 30 s (Linz *et al.*, 1995). As cininas são rapidamente metabolizadas por cininases presentes no sangue, células endoteliais e outros tecidos (Campbell *et al.*, 1993). A avaliação das quantidades relativas de cada cinina forneceu importantes informações sobre as vias metabólicas de BK-(1-9). Em todos os

tecidos, BK-(1-9) e BK-(1-7) foram as cininas mais abundantes estando presentes em quantidades aproximadamente iguais. Assim, BK-(1-7) representa o maior produto do metabolismo da BK-(1-9). Numerosas enzimas estão envolvidas no metabolismo da BK-(1-9) (Erdös, 2002; Soffer, 1976; Gafford *et al.*, 1983; Orłowski *et al.*, 1983; Chu *et al.*, 1985;). BK (1-7) pode resultar da ação da Cininase II (ECA), prolil endopeptidase e endopeptidase neutra 24.11. Alguns tecidos contem níveis baixos de BK-(1-8), indicando a participação da cininase I (Carboxipeptidases M e N) no metabolismo da BK-(1-9).

Através de estudos da relação estrutura atividade, da identificação das diferenças no perfil de atividade, da medida da afinidade dos antagonistas competitivos e do conhecimento dos mecanismos envolvidos na transmissão dos sinais intracelulares, foi possível a caracterização dos receptores, sendo observado que dois tipos de receptores acoplados a proteína G, B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R, medeiam os efeitos celulares das cininas (Regoli e Barabe, 1980; Vavrek e Stewart, 1985; Roberts, 1989; Regoli *et al.*, 1990; Regoli *et al.*, 1994). O receptor B<sub>2</sub> liga seletivamente a BK e a Lys-BK e está constitutivamente presente na maioria dos tecidos normais. Os efeitos fisiológicos das cininas são mediados, em sua maioria, por receptores B<sub>2</sub>. O receptor B<sub>1</sub> liga-se seletivamente ao terminal carboxil dos metabólitos des-arg da bradicinina e da calidina, é menos abundante na maior parte dos tecidos e é regulado pela presença de processos inflamatórios, exposição a endotoxinas e citocinas, anoxia e infarto de miocárdio (Regoli e Barabe, 1980; Marceau *et al.*, 1998; Tschöpe, *et al.*, 2000). Foi sugerida por Farmer *et al.* (1989) a existência de um receptor B<sub>3</sub> que mediará a broncoconstrição induzida pelas cininas na traquéia de cobaias. Além disso, foi sugerida a existência de receptores B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub> nas células da musculatura lisa esofagiana do gambá. Estudos de Regoli *et al.* (1993)

mostraram a broncoconstrição da traquéia como um efeito, não apreciado anteriormente, do receptor B<sub>2</sub>.

A BK provoca vasodilatação, através da estimulação da liberação de óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio via ativação do receptor B<sub>2</sub> (Erdös, 2002; Busse, *et al.*, 1996; Bhoola *et al.*, 1992; Regoli e Barabé, 1980). O B<sub>2</sub>R uma vez ativado, acopla-se à proteína G $\alpha_q$  provocando a ativação da fosfolipase C- $\beta$  e subsequente produção de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (Prado *et al.*, 2002), os quais são responsáveis, respectivamente, pela movimentação do Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares para o citosol e pela translocação da proteína quinase C do citosol para a membrana plasmática. O aumento do cálcio intracelular ativa a óxido nítrico sintase, dependente de cálcio-calmodulina, resultando no aumento do óxido nítrico/cGMP responsável pelo efeito hipotensor das cininas (Blaukat, 2003). Níveis elevados de cálcio intracelular também ativam a fosfolipase A<sub>2</sub>, levando à liberação de ácido araquidônico e subsequente formação de prostaciclina (Blaukat *et al.*, 2000). Além da já bem estabelecida associação com as proteínas G, o receptor B<sub>2</sub> também interage direta e funcionalmente com moléculas sinalizadoras que incluem fosfolipase C- $\gamma$ 1 (Duchene *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 1997), enzima conversora de angiotensina (ECA) (Branislav *et al.*, 2000), Janus quinases (JAK), fatores de ativação e transcrição (STAT) (Ju *et al.*, 1998) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Fleming *et al.*, 2002; Kone, 2000; Marrero *et al.*, 1999).

As interações moleculares com a eNOS são mais complexas que a simples ligação Ca<sup>2+</sup>-CaM. Já foi demonstrado que, em condições basais, o próprio receptor B<sub>2</sub> interage diretamente com a eNOS, provocando sua inibição e que a estimulação

da eNOS pela BK, pode ser, em parte, devida à sua dissociação do receptor B2 (Kone B., 2000; Marrero *et al.*, 1999). Também, via receptor B2, a BK estimula a formação do complexo *Heat-shock protein 90/eNOS/Akt* o que facilita a fosforilação e ativação da eNOS (Fleming & Busse, 2003; Kone B., 2000; Venema R., 2002; Harris *et al.*, 2001; Garcia-Cardena *et al.*, 1998).

As cininas exercem diversas ações biológicas. A injeção intravenosa de BK provoca diminuição da pressão sanguínea, via vasodilatação arterial e arteriolar (McCarthy *et al.*, 1965; Barbé *et al.*, 1979), produzida pela estimulação de receptores B<sub>2</sub> e consequente liberação endotelial de óxido nítrico e prostaglandinas (Cherry *et al.*, 1982; Lückhoff *et al.*, 1987; McGriff *et al.*, 1991; Wiemer *et al.*, 1991; Busse e Fleming, 1993). Além da vasodilatação, outras ações biológicas têm sido bem demonstradas. As cininas estão envolvidas na nocicepção (Bhoola, 1961; Keele e Armstrong, 1964; Whalley *et al.*, 1987b), assim como na inflamação e aumento da permeabilidade capilar e formação de edema, na contração do músculo liso e na proliferação celular (Bhoola e Schachter, 1960; Bhoola *et al.*, 1960; Majno *et al.*, 1969).

## **1.5. Interações entre Angiotensina-(1-7) e Bradicinina**

A interação entre Ang-(1-7) e BK tem sido muito bem estudada em rim e vasos sanguíneos. Em numerosos estudos, as ações da Ang-(1-7) estão relacionadas às cininas (Lima *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Brosnihan *et al.*, 1996; Osey *et al.*, 1993), existindo, essencialmente, duas formas de interação entre os dois peptídeos: potencialização das ações da BK pela Ang-(1-7) e mediação da atividade vascular da Ang-(1-7) pela BK (Santos *et al.*; 2001). Evidências de que

as ações da Ang-(1-7) podem ser mediadas por cininas têm sido obtidas em numerosas preparações (Brosnihan *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 1997; Bomtempo *et al.*, 1998). Em todos estes estudos, as ações da Ang-(1-7) foram modificadas pelo antagonista do receptor B<sub>2</sub>, HOE 140.

A potencialização do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi bem estudada em ratos Wistar acordados (Paula *et al.*, 1995), normotensos e hipertensos (Lima *et al.*, 1997). A potencialização da resposta vasodilatadora foi observada *in vivo* em leito mesentérico de ratos anestesiados (Fernandes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 1999) e *in vitro* em artérias coronárias de cão (Li *et al.*, 1997), leito arteriolar mesentérico (Oliveira *et al.*, 2003) e coração isolado de rato (Almeida *et al.*, 2000). Os mecanismos envolvidos na potencialização dos efeitos da BK pela Ang-(1-7) são complexos e parecem envolver facilitação da liberação de NO (Almeida *et al.*, 2000; Heitsch *et al.*, 2001), prostaglandinas, (Fernandes *et al.*, 2001), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Fernandes *et al.*, 2001), ligação à ECA facilitando o *cross-talk* entre a ECA e o receptor B<sub>2</sub> (Marcic e Erdös, 2000; Deddish *et al.*, 1998) e inibição da ECA (Chappell *et al.*, 1998). Entretanto, não existem dados que mostrem sua interação ao nível molecular. Assim, neste estudo, investigaremos em que níveis da sinalização intracelular essa interação acontece, mais especificamente na liberação de NO.

## **OBJETIVOS**

---

---

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina pela Angiotensina-(1-7).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ✓ Avaliar o efeito da estimulação com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7) sobre a liberação de nitrito, em células CHO, CHO-Mas e CHO-B2.
- ✓ Estudar a participação dos receptores B2 da bradicinina e Mas da angiotensina-(1-7), na liberação de nitrito, em células CHO-Mas e CHO-B2 estimuladas com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7).
- ✓ Determinar o efeito da inibição da sintase do óxido nítrico, com L-NAME e da enzima conversora de angiotensina, com captopril, sobre a liberação de nitrito, em células CHO-Mas e CHO-B2 estimuladas com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7).
- ✓ Avaliar o efeito da estimulação com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7) sobre a liberação de óxido nítrico, em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAECs).

- ✓ Estudar a participação dos receptores B2 da bradicinina e Mas da angiotensina-(1-7), na liberação de óxido nítrico, em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAECs) estimuladas com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7).
- ✓ Determinar o efeito da inibição da sintase do óxido nítrico, com L-NAME e da enzima conversora de angiotensina, com captopril, sobre a liberação de óxido nítrico, em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAECs) estimuladas com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7).
- ✓ Estudar o efeito da estimulação com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7) sobre a fosforilação do sitio excitatório da eNOS, Ser<sup>1177</sup>, em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAECs).
- ✓ Estudar o efeito da estimulação com bradicinina, angiotensina-(1-7) e bradicinina associada à angiotensina (1-7) sobre a defosforilação do sitio inibitório da eNOS, Thr<sup>495</sup>, em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAECs).

## **3- MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1 *Cultura celular***

Na primeira etapa do trabalho foram utilizadas células de ovário de hamster (CHO), transfectadas ou não com vetores contendo os cDNAs do receptor B2 da BK ou o cDNA do receptor Mas para Ang-(1-7). As células foram cultivadas em meio D-MEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Millipore, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino 10% (Gibco, USA) e 1% de coquetel antibiótico-antimicótico (Sigma, USA) em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem 80% a 90% de confluência.

Na segunda etapa foram utilizadas células endoteliais humanas de aorta torácica (HAEC, Cascade Biologics, Portland, USA) cultivadas em *Medium 200*<sup>TM</sup> (Cascade Biologics, Portland, USA) suplementado com 2% v/v de soro fetal bovino (FBS), fator de crescimento epidermal humano 10 ng/ml, fator de crescimento básico de fibroblasto 3 ng/ml, hidrocortisona 1 µg/ml, heparina 10µg/ml e 1% de coquetel antibiótico/antimicótico e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem 80% a 90% de confluência.

### **3.2 *Determinação da liberação de NO***



Para avaliar se a Ang-(1-7) e a bradicinina provocam liberação de óxido nítrico e se a associação dos dois peptídeos potencializa sua liberação, foram utilizados dois ensaios:

### **3.2.1** *Ensaio fluorimétrico do DAN - Avaliação da formação de nitrito*

Células CHO, CHO-B<sub>2</sub> e CHO-Mas foram cultivadas em placas de 12 poços, até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Para os experimentos, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução *Hank's Balanced Salts* (HBS) e tratadas durante 30 minutos com BK (Bachem, Torrance, USA, 1µM-1nM), Ang-(1-7) (Bachem, Torrance, USA, 1µM-1nM) e BK associada à Ang-(1-7). Em outra série de experimentos, as células foram pré-tratadas por 15 minutos com o inibidor da BK HOE 140 (Hoechst, Alemanha, 10<sup>-4</sup> M), o inibidor específico da óxido nítrico sintase, L-NAME (Sigma, St Louis, USA, 10<sup>-5</sup>M), o antagonista específico da Ang-(1-7), A-779 (Bachem, Torrance, USA, 10<sup>-4</sup>M), o inibidor da enzima conversora de angiotensina, captopril (Sigma, St Louis, USA, 1µg/ml) e a seguir estimuladas com os peptídeos isolados ou em associação durante 30 minutos. Para a avaliação do nitrito produzido, 250µl do sobrenadante foram incubados, com 25 µl de DAN (633 µM em 0.67N de HCL) em temperatura ambiente, no escuro, por 10 minutos. Para interromper a reação, o pH da mistura foi ajustado para 11,5-12,0 com NaOH (1N). A fluorescência foi medida em fluorímetro de placa em comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 415 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de curvas padrão (0.02-3.2 µM).

### **3.2.2** *Ensaio fluorescente do DAF-FM DA – Avaliação da produção de NO.*

Células CHO, CHO-B<sub>2</sub>, CHO-Mas e HAEC foram cultivadas sobre lamínulas, em placas de 6 poços, até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Para os

experimentos, o meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com Krebs ringer hepes (KRH), e incubadas com DAF-FM DA (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos a 37°C. A seguir, o DAF foi substituído por KRH. Após 20 minutos as células foram estimuladas com BK ( $10^{-6}$ - $10^{-8}\text{M}$ ), Ang-(1-7) ( $10^{-6}$ - $10^{-8}\text{M}$ ) e BK associada à Ang-(1-7) durante trinta minutos. Após a incubação, foram lavadas com KRH, duas vezes e, imediatamente, as lamínulas montadas em lâminas com *hidromount* (National Diagnostics,USA). A visualização da produção de NO foi feita através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 laser scanning confocal, Carl Zeiss, Alemanha), em comprimento de onda de excitação de 488 nm e filtro para 500-550 nm. A fluorescência média de cada lamina foi calculada através de densidade de fluorescência (*pixels* fluorescentes por área de cada janela em  $\text{cm}^2$ ), com auxílio de *software* para análise de imagens (Scion Image Beta 4.0.2 for Windows). Os dados de fluorescência média obtidos foram comparados por análise de variância One Way ANOVA e considerados como significativos quando  $p < 0.05$ .

### **3.3 Western blotting**

Para avaliar as cascatas envolvidas na produção de óxido nítrico as células foram estimuladas por 5 minutos com BK, Ang-(1-7) e BK+Ang-(1-7), a seguir homogeneizadas em tampão de lise (50 mM pirofosfato de sódio, 50 mM de NaF, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 2mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10mM HEPES pH=7,4, 0,5% Triton 100, 1:100 de 100mM PMSF em isopropanol, 1:1000 de 1mg/ml de leupeptina, 1:1000 de 1mg/ml de aprotinina e 1:1000 de 1mg/ml de pepstatina em metanol), as proteínas quantificadas e preparadas (30 $\mu\text{g}$ ) em tampão de amostra (4X tris HCl/SDS pH 6.8, 3% glicerol, 1% SDS, 0.6%  $\beta$ -mercaptoetanol, Azul de bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (poliacrilamida 10 a 12%) e transferidas

eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose. A qualidade da transferência foi verificada através da coloração da membrana com solução de Ponceau. Após o bloqueio dos sítios de ligação não específicos com leite em pó desnatado 5%, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário específico para diferentes componentes da via de liberação de NO. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-fosfo-eNOS (ser 1177) (1:1000, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA), anti-fosfo-eNOS (Thr 495) (1:1000, BD Transduction Laboratories, San Diego, USA), anti- $\beta$ -actina (1:10000, Sigma, St Louis, MO) e anti-B<sub>2</sub> (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Em seguida, lavadas com TBS, contendo 0,2% de Tween 20 (TBS-T, 5 minutos por três vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP, BioRad Hercules, CA). Para detectar as bandas protéicas, foi utilizado um *kit* de quimioluminescência e a densidade das mesmas, avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™.

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

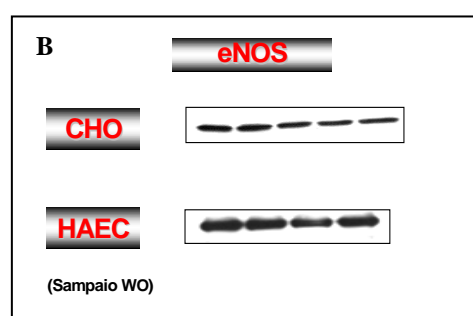
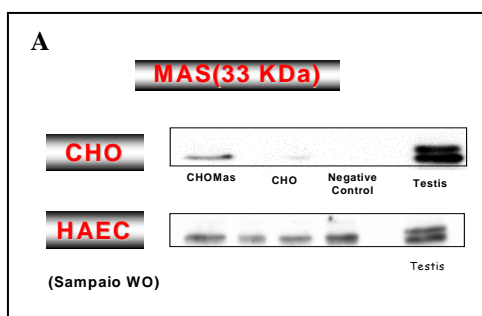
---

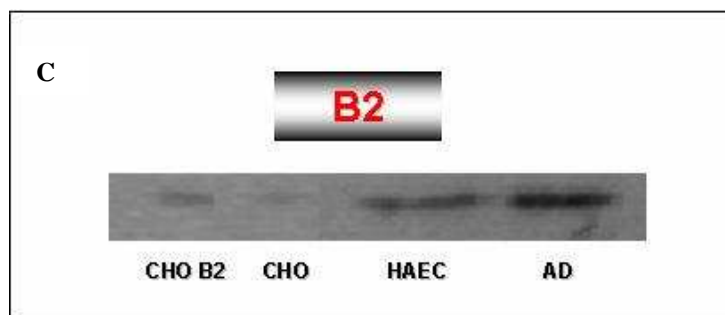
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram comparados por análise de variância One Way ANOVA sendo considerados significativos quando  $p < 0.05$ . Para a análise estatística utilizamos o programa GraphPad Prism, versão 4.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 5- RESULTADOS

---

**5.1 Caracterização das células** – A verificação da expressão dos receptores nas células transfectadas ou não foi realizada através de *Western Blotting*. Como mostrado na figura 1A, o receptor Mas está presente nas células transfectadas e nas células endoteliais. As células CHO e HAEC expressam constitutivamente a eNOS (Figura 1B). O receptor B2 é expresso nas células transfectadas e nas endoteliais (Figura 1C).





**Fig. 1** Caracterização, por *Western Blotting*, das células CHO e endoteliais humanas (HAEC) para expressão dos receptores Mas (**1A**) e B2 (**1C**) e para a expressão da eNOS (**1B**). Testículo e átrio direito (AD) foram usados como controle positivo para Mas e B2, respectivamente.

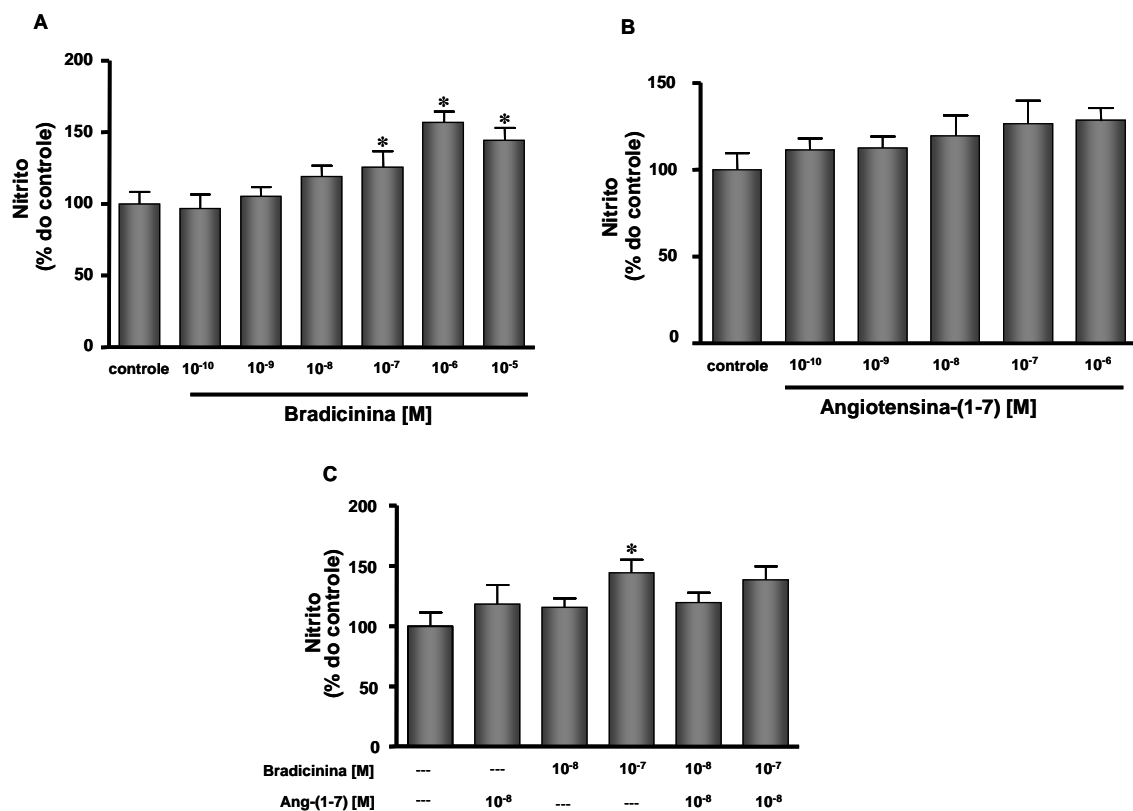
## 5.2 Efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a produção de nitrito em células CHO, CHO-B2 e CHO-Mas.

Com a finalidade de verificar se as células CHO (CHO-B2) ou CHO-Mas (CHO-B2) expressam o cDNA do receptor B2 e se produzem nitrito através da expressão do receptor B2 com BK ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M) ou com as concentrações  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M (Figura 2A). A liberação após estimulação com BK  $10^{-5}$  M foi menor do que a observada com BK  $10^{-6}$  M. Nas células estimuladas com Ang-(1-7) a resposta não foi diferente da observada no controle. A associação dos dois peptídeos não modificou a liberação de nitrito observada após estimulação só com BK ou só com Ang-(1-7) (Figuras: 2B e 2C).

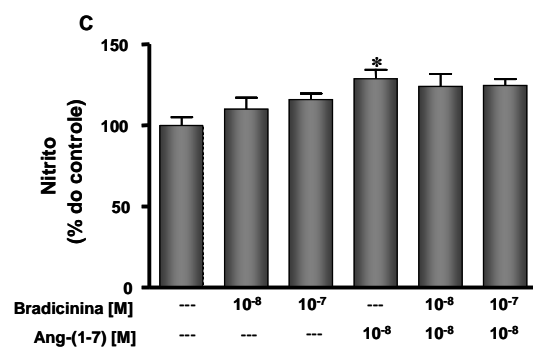
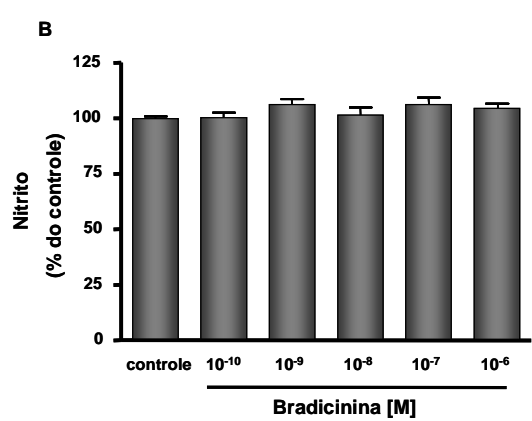
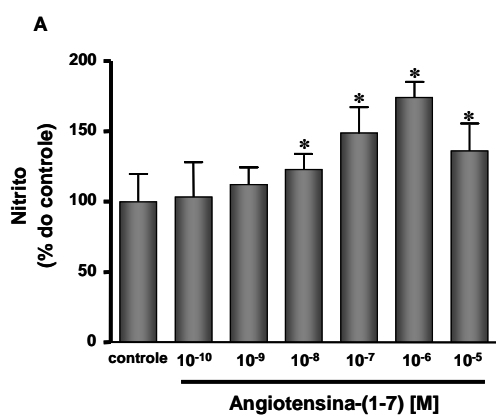
Nas células CHO-Mas a estimulação com Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M, por 30 minutos) provocou liberação de nitrito de forma dose dependente, mas

estatisticamente significativa apenas com as concentrações  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  (Figura 3A). A liberação após estimulação com Ang-(1-7)  $10^{-5}$  M foi menor do que a observada com Ang-(1-7)  $10^{-6}$  M. Já, quando estimuladas com BK ou com os peptídeos associados nenhum efeito, diferente do controle, foi observado (Figuras: 3B e 3C).

A incubação das células CHO não transfectadas com doses crescentes de BK, e Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M, durante 30 minutos) não provocou liberação de nitrito diferente da observada no controle. Resultados semelhantes foram obtidos com a associação dos dois peptídeos (Figuras: 4A, 4B e 4C).



**Fig. 2- Liberação de nitrito em células CHO-B2.** Células CHO-B2 foram estimuladas durante 30 min com bradicinina ( $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol/L) (A), Ang-(1-7) ( $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  mol/L) (B) e





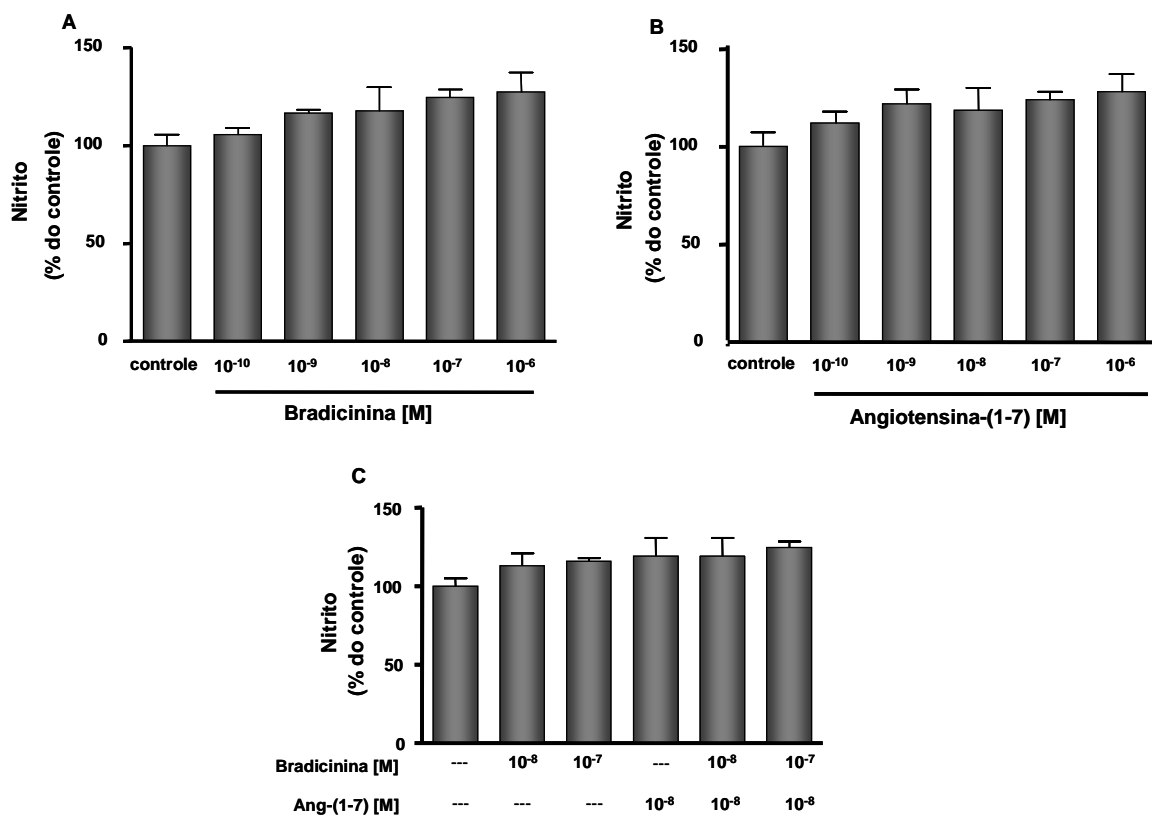
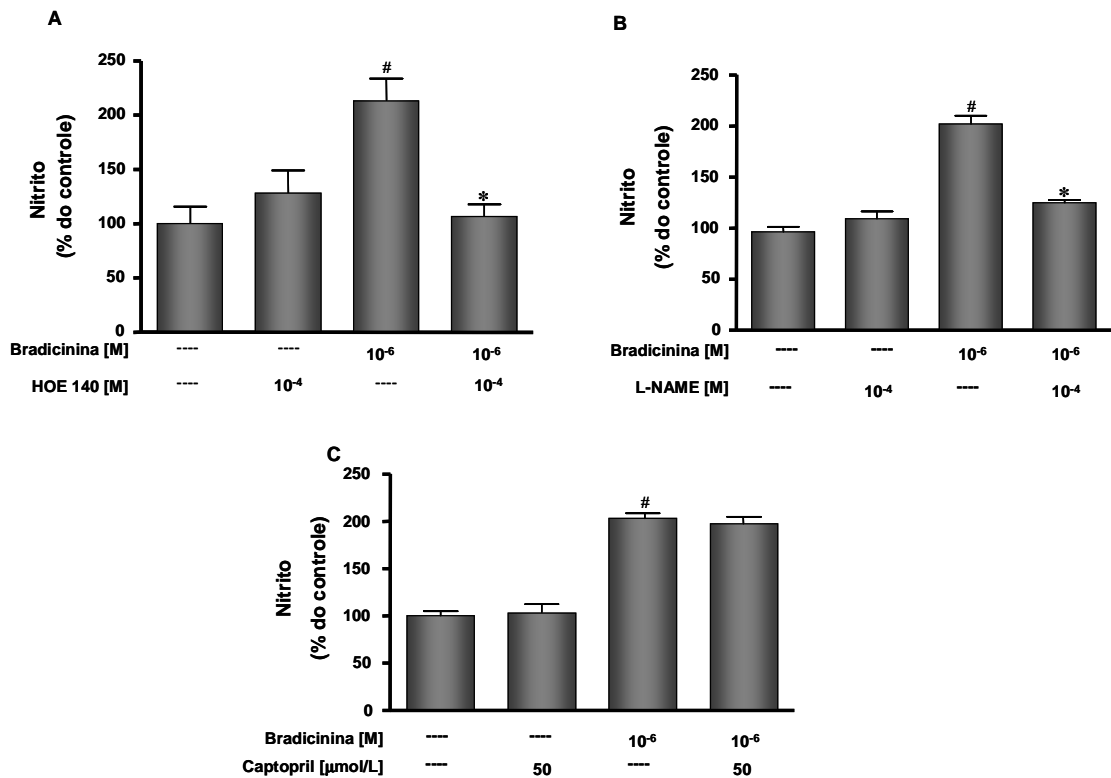


Fig. 4. Liberação de nitrito em células CHO. Células CHO foram tratadas com doses de 20

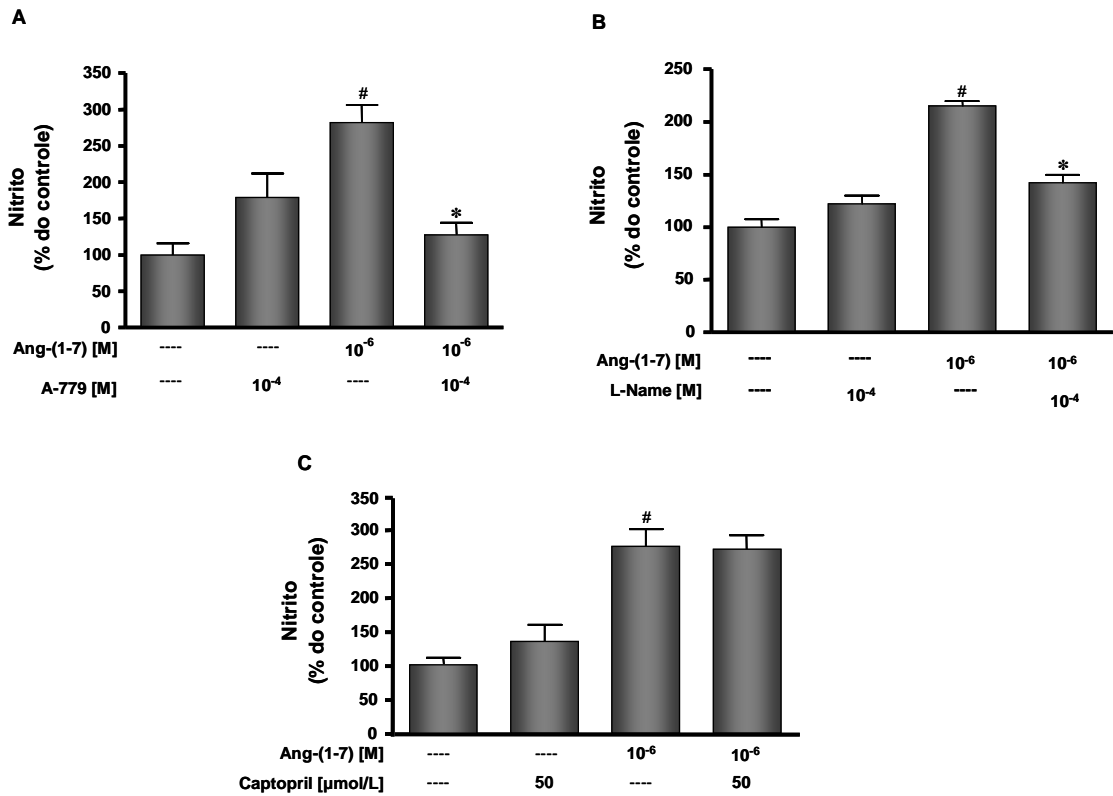
**5.3 Efeito da inibição dos receptores B2 da BK e Mas da Ang-(1-7), da sintase do óxido nítrico e da enzima conversora de angiotensina sobre a produção de nitrito após estimulação com BK e Ang-(1-7) em células CHO-B2 e CHO-Mas.** A participação dos receptores B2 na produção de nitrito pelas células transfectadas, CHO-B2, foi determinada pela pré-incubação com seu antagonista específico HOE 140 ( $10^{-4}$  M, 10 min). Como mostrado na figura 5A, o HOE 140 aboliu a produção de nitrito observada após a estimulação com BK  $10^{-6}$  M. A liberação de nitrito também foi abolida pela presença do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$  M, 10 min). (Figura 5B) e não foi modificada pela pré-incubação com o inibidor da enzima conversora captopril (50  $\mu$ mol/L, 10 min) (Figura 5C)

Nas células CHO-Mas a participação do receptor Mas foi avaliada pela pré-incubação com o antagonista da Ang-(1-7), A-779 ( $10^{-4}$  M, 10 min). A Figura 6A mostra que a presença do A-779 abole o efeito estimulatório da Ang-(1-7)  $10^{-6}$  M sobre a liberação de nitrito. Como observado em 6B a presença do inibidor da

sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$  M, 10 min) também aboliu o efeito da Ang-(1-7). A liberação de nitrito não foi modificada pela pré-incubação com o inibidor da enzima conversora captopril (50  $\mu$ mol/L, 10 min) (Figura 6C)



**Fig 5- Células CHO-B2.** Efeito da pré-incubação com o antagonista do receptor B2 HOE 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**A**), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (**B**) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (**C**), sobre a liberação de nitrito estimulada pela bradicinina ( $10^{-6}$  M). A concentração de nitrito foi mensurada no sobrenadante pelo método fluorimétrico do DAN. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. de 4 experimentos. \* $p < 0.05$  vs BK e <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs controle.

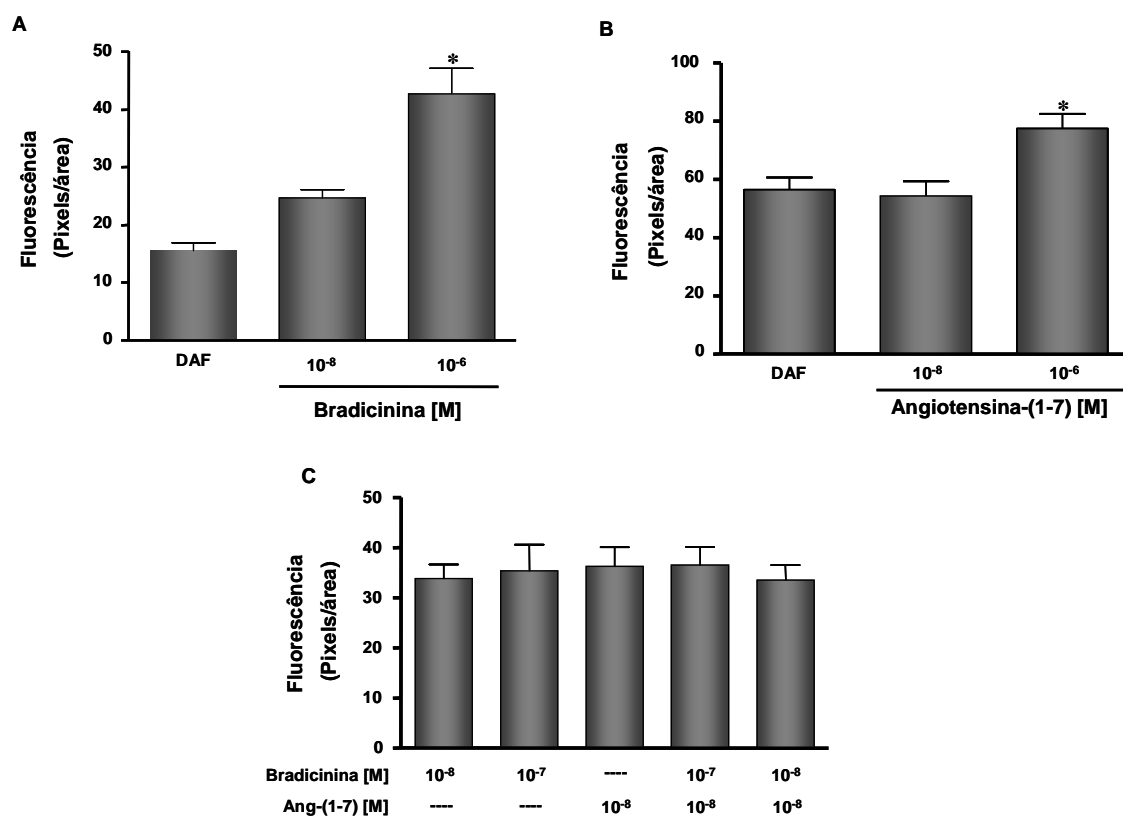


**Fig 6- Células CHO-Mas.** Efeito da pré-incubação com o antagonista do receptor Mas A-779 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (A), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (B) e com o inibidor da ECA, captopril ( $50\mu\text{mol/L}$ ) (C), sobre a liberação de nitrito estimulada pela Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  M). A concentração de nitrito foi mensurada no sobrenadante pelo método fluorimétrico do DAN. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. de 4 experimentos.  $^*p < 0.05$  vs Ang-(1-7) e  $^{\#}p < 0.05$  vs controle.

#### 5.4 Avaliação do efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a liberação de óxido nítrico em células CHO-B2 e CHO-Mas.

Com o objetivo de obter evidências diretas da produção de NO, pré-incubamos as células CHO-B2 e CHO-Mas com o indicador de fluorescência, específico para determinação de NO, DAF-FM diacetato.

A liberação significativa de NO pelas células CHO-B2 estimuladas com bradicinina ( $10^{-6}$  M, 30min) e CHO-Mas estimuladas com angiotensina-(1-7) ( $10^{-6}$  M, 30 min) foi confirmada pelos experimentos feitos, usando o indicador de fluorescência (Figuras 7A e 7B). Igualmente, a incubação das células CHO-B2 com bradicinina associada à angiotensina-(1-7) não provocou nenhuma mudança significativa na liberação de NO, quando avaliada usando a sonda fluorescente (Figura 7C).



**Fig. 7- Liberação de óxido nítrico em células CHO-B2** após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M) (A) ou com bradicinina ( $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  M) associada à Ang-(1-7) ( $10^{-8}$ .M) (C) e em **Células CHO-Mas** após 5 minutos de incubação com Ang-(1-7)( $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M) (B). A avaliação do NO produzido foi feita usando a sonda fluorescente DAF-FM diacetato. A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. de 4 experimentos. \* $p < 0.05$  vs DAF.

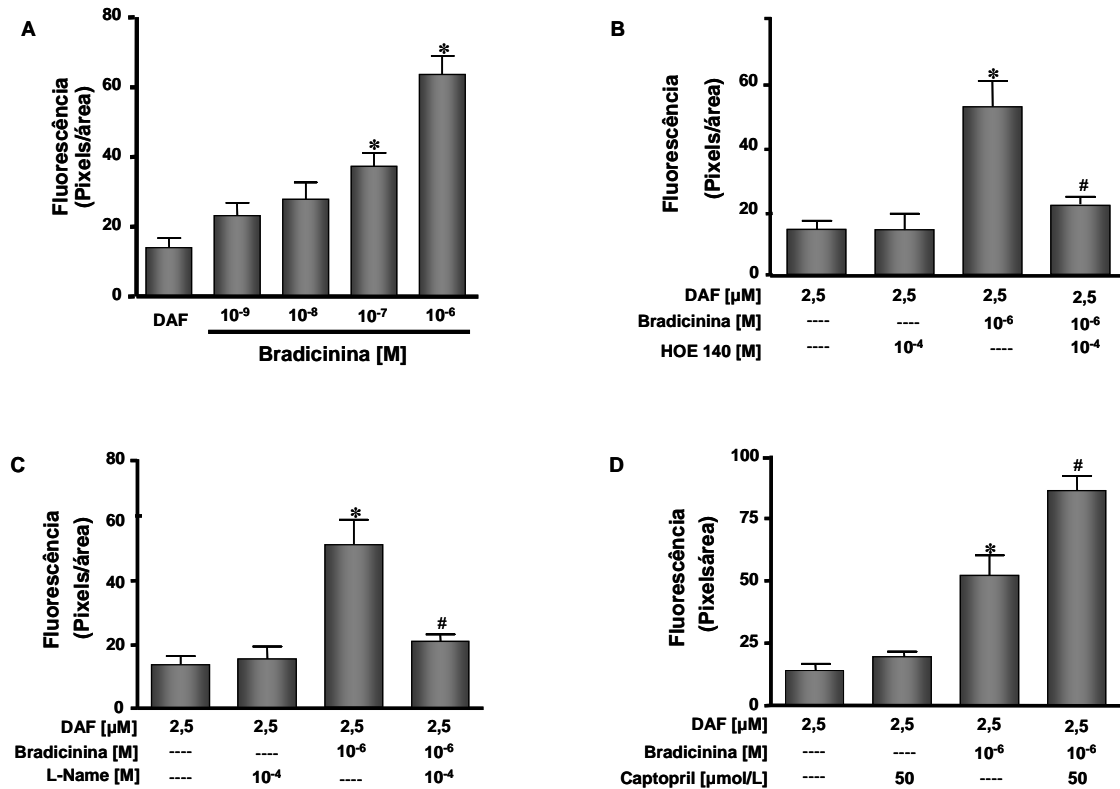
**5.5 Avaliação do efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a liberação de óxido nítrico (NO) em células endoteliais humanas de aorta torácica (HAEC).** Como observado na figura 8A a estimulação das células endoteliais com bradicinina provocou liberação significativa de NO de maneira dose-dependente. Este efeito foi abolido pela pré-incubação com o antagonista do receptor B2, HOE 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (8B) e com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (8C) e potencializado pelo pré-tratamento com o inibidor da enzima conversora, captopril ( $50\mu\text{mol/L}$ ) (8D).

Liberação de NO também foi observada nas células transfectadas com o receptor Mas, após estimulação com Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) (Figura 9A). Como mostrado na figura 9B o tratamento com o antagonista do receptor Mas, A779 atenuou significativamente o efeito estimulatório da Ang-(1-7)  $10^{-6}$  M sobre a liberação de NO. Este efeito foi abolido pela pré-incubação com o inibidor da sintase do óxido nítrico L-NAME ( $10^{-4}$  M, 10 min) (9C) e não foi modificado pela presença do captopril (9D).

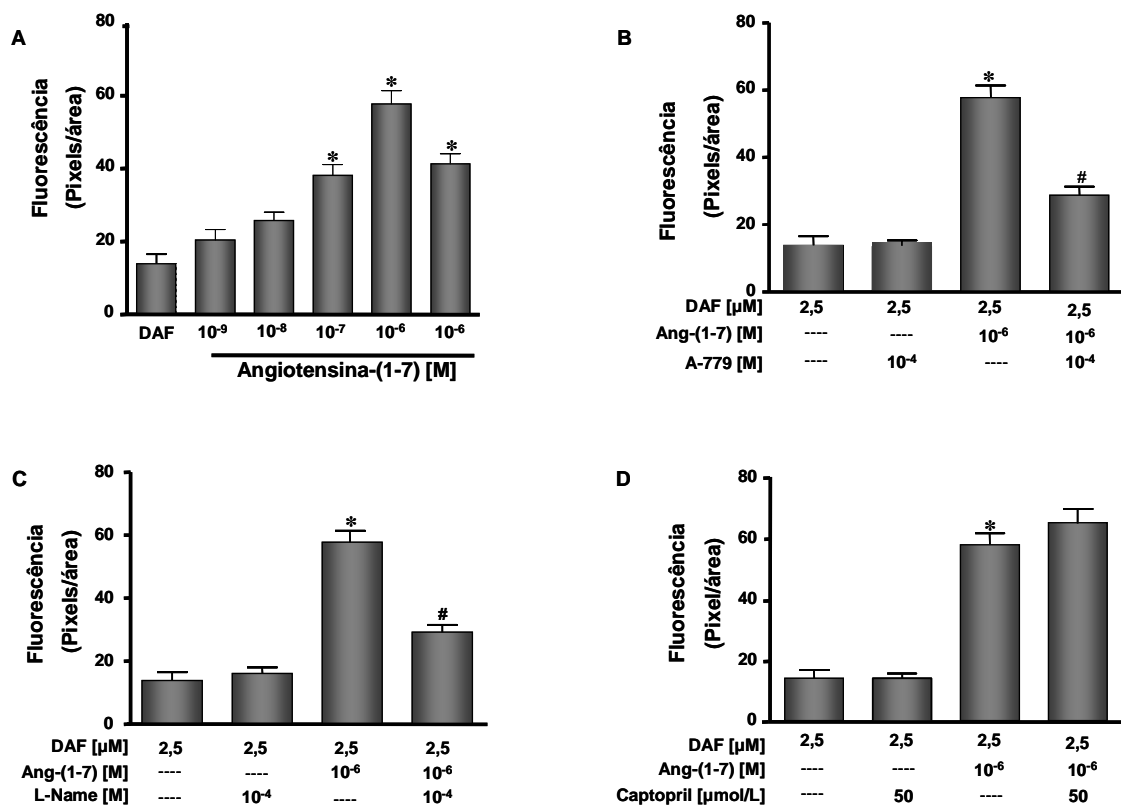
A estimulação das células endoteliais com bradicinina ( $10^{-7}$ M e  $10^{-8}$ M) associada à Ang-(1-7) ( $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M) aumentou significativamente a liberação de NO. Com todas as associações de bradicinina e Ang-(1-7), a fluorescência detectada foi maior que a observada após estimulação com os peptídeos isoladamente (Figuras 10 e 11). Este efeito foi abolido na presença dos antagonistas dos receptores B2, HOE 140 (Figura 30 A) e MAS, A-779 (Figura 30 B). A presença do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-Name, também bloqueou o aumento da liberação de NO induzido pela BK na presença de Ang-(1-7) (Figura 30 C). A



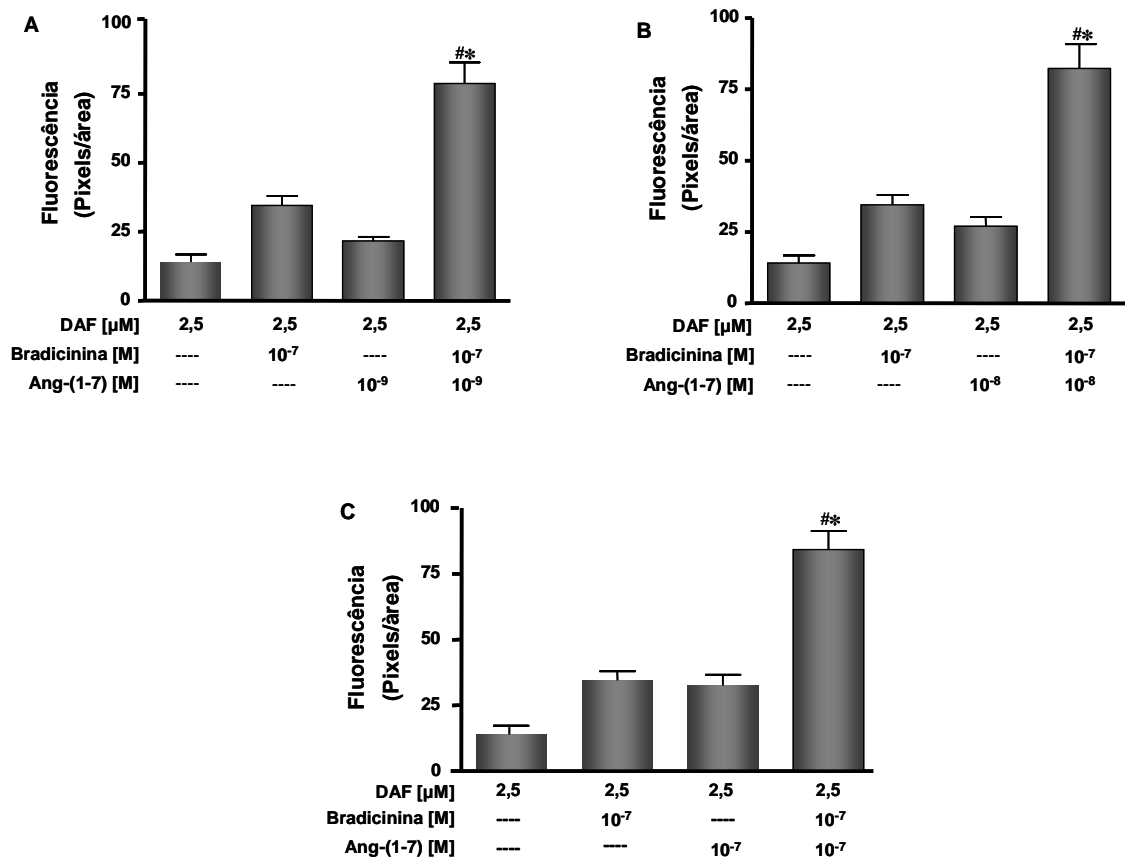
potenciação da BK pela Ang-(1-7) não foi modificada pela inibição da ECA com captopril (Figura 30 D).



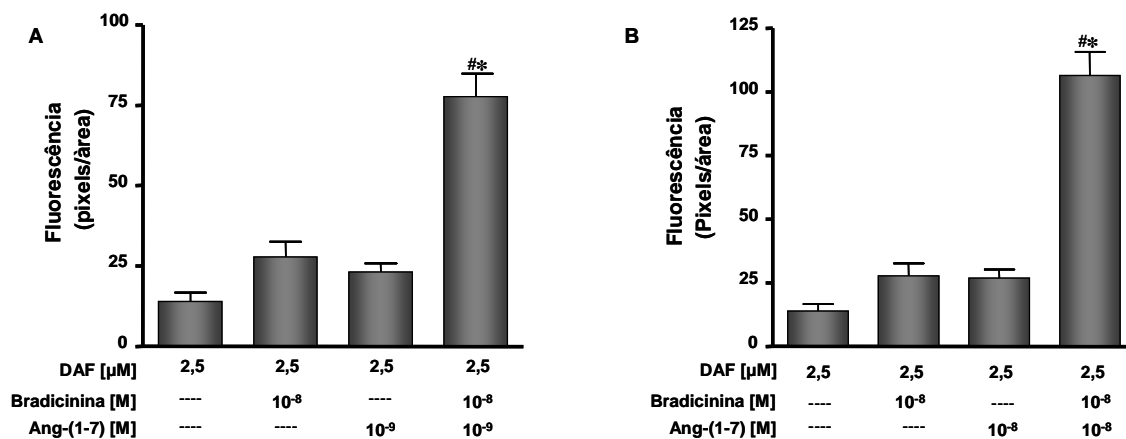
**Fig. 8- Liberação de óxido nítrico em células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs)** Efeito da incubação com bradicinina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) (A). Avaliação da pré-incubação com o antagonista do receptor B2 HOE 140 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (B), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (C) e com o inibidor da ECA, captopril ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) (D), sobre a liberação de óxido nítrico estimulada pela bradicinina ( $10^{-6}$  M). A avaliação do NO produzido foi feita usando a sonda fluorescente DAF-FM diacetato. A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. de 4 experimentos. \* $p < 0.05$  vs DAF e # $p < 0.05$  vs BK.



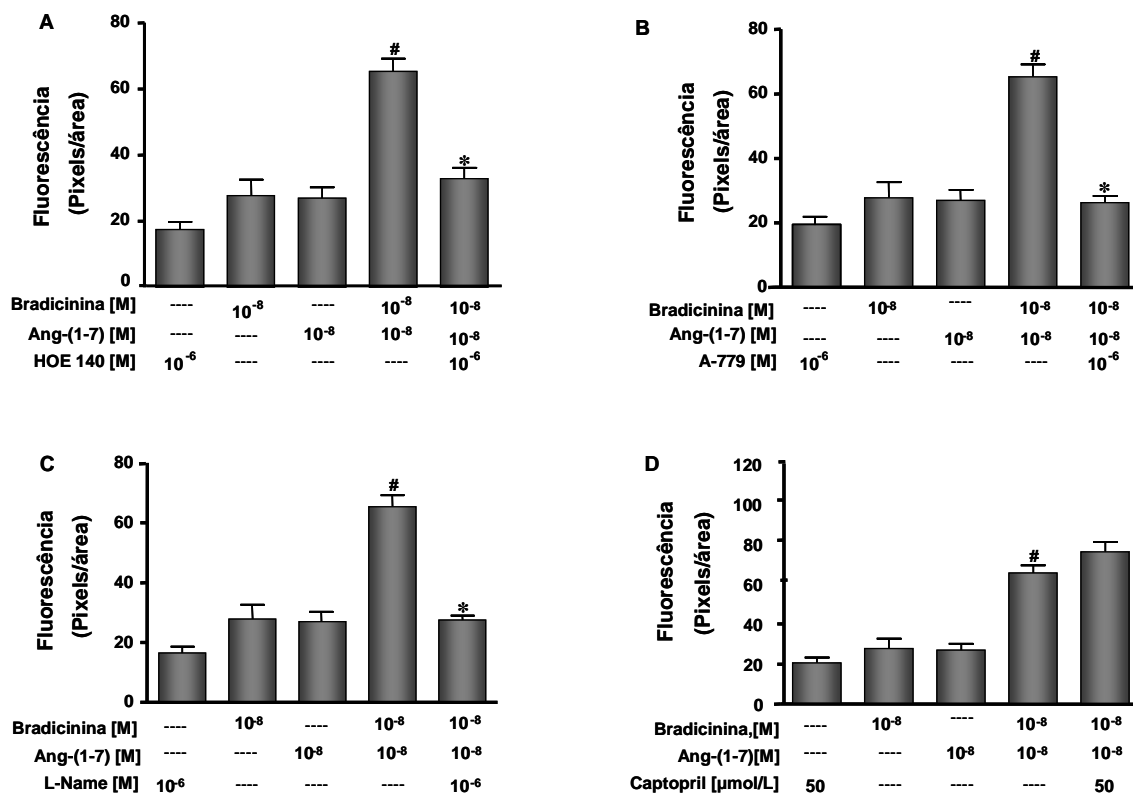
**Fig. 9- Liberação de óxido nítrico em células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs)** Efeito da incubação com Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) (A). Avaliação da pré-incubação com o antagonista do receptor Mas A-779 ( $10^{-4}$ M, 10 min) (B), com o inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME ( $10^{-4}$ M, 10 min) (C) e com o inibidor da ECA, captopril (50 $\mu$ mol/L) (D), sobre a liberação de óxido nítrico estimulada pela Ang-(1-7) ( $10^{-6}$  M). A avaliação do NO produzido foi feita usando a sonda fluorescente DAF-FM diacetato. A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. de 4 experimentos. \* $p < 0.05$  vs DAF e # $p < 0.05$  vs Ang-(1-7).



**Fig. 10- Células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs).** Liberação de NO após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-7}$  M) associada à Ang-(1-7)-(1-7) ( $10^{-9}$  M) (**A**), ( $10^{-8}$  M) (**B**) e ( $10^{-7}$  M) (**C**). A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos. \* $p < 0.05$  vs BK e # $p < 0.05$  vs Ang-(1-7)

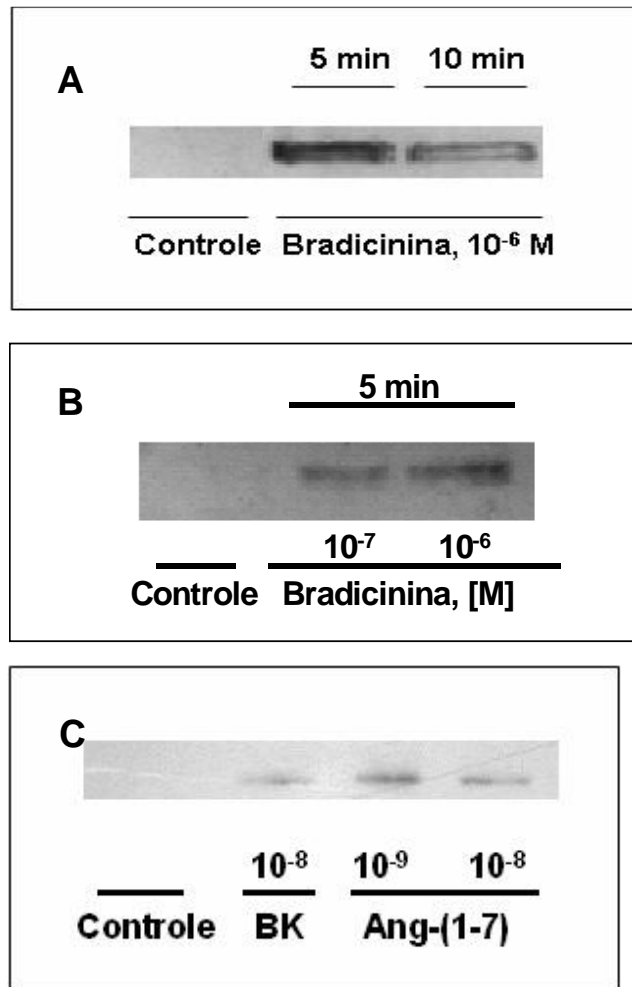


**Fig. 11- Células endoteliais de aorta torácica humana (HAECs).** Liberação de NO após 5 minutos de incubação com bradicinina ( $10^{-8}$  M) associada à Ang-(1-7)-(1-7) ( $10^{-9}$  M) (**A**) e ( $10^{-8}$  M) (**B**). A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos. \* $p < 0.05$  vs BK e # $p < 0.05$  vs Ang-(1-7)

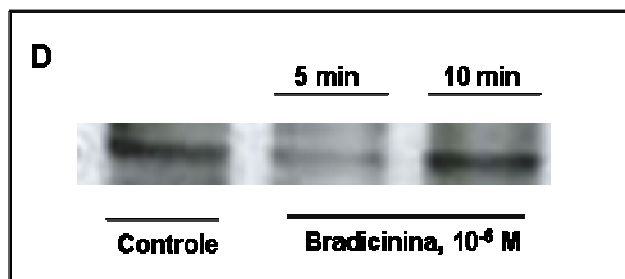


**Fig. 12- Células endoteliais de aorta torácica humana.** Efeito dos antagonistas dos receptores B2, HOE 140 (A) e MAS, A-779 (B) ( $10^{-6}$  M, 10 min de pré-incubação), do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-Name, ( $10^{-6}$  M, 10 min de pré-incubação) (C) e do inibidor da ECA, captopril, (50  $\mu$ mol/L, 10 min de pré-incubação) (D) sobre a potenciação da liberação de NO induzida pela BK ( $10^{-8}$  M) em presença de Ang-(1-7) ( $10^{-8}$  M). A avaliação do NO produzido foi feita usando DAF-FM diacetato. A liberação de NO foi quantificada como pixels/área de fluorescência observada por microscopia confocal. Valores expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos. \* $p < 0.05$  vs BK+Ang-(1-7) e <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs BK ou Ang-(1-7).

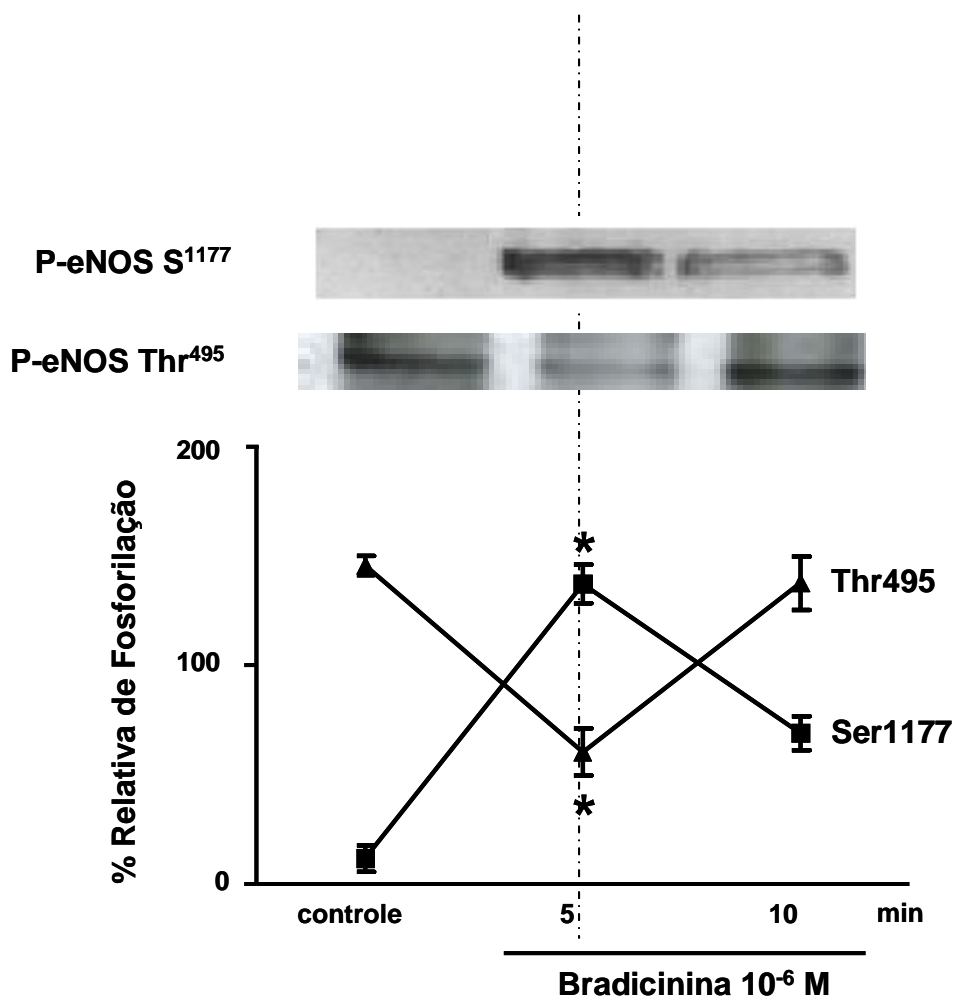
**5.6 Avaliação da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a fosforilação/desfosforilação da eNOS (HAEC).** O efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) na ativação da eNOS foi avaliado em dois dos sítios de fosforilação da enzima: na serina 1177 (sítio estimulatório) e na treonina 495 (sítio inibitório). A estimulação com bradicinina ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  M,) provocou fosforilação, dose e tempo dependente, do sítio estimulatório da eNOS (S1177) (Figura 13 **A, B e C**). Fosforilação significativa foi observada após 5 min de estimulação com BK  $10^{-6}$  M, sendo atenuada significativamente após dez minutos. Como demonstrado na Figura 13 **C**, a fosforilação do sitio estimulatório foi também observada após a estimulação com Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M). Como mostrado na Figura 14, no sítio inibitório da enzima, que está fosforilado na treonina 495 em condições basais, a estimulação com BK  $10^{-6}$  M provocou desfosforilação, sendo máxima após 5 minutos de incubação e retornando aos níveis basais após dez minutos. A Figura 15 mostra a fosforilação/desfosforilação coordenada da ser 1177/Thr 495 da eNOS diante da estimulação com BK. Nas células tratadas com BK  $10^{-8}$  M associada à Ang-(1-7)  $10^{-8}$  M a fosforilação da Ser 1177 foi significativamente maior que aquela observada após estimulação com os peptídeos isoladamente (Figura 16). De forma semelhante, a associação dos dois peptídeos provocou aumento significativo na desfosforilação da Thr 495 (Figura 17). A Figura 18 mostra a potenciação da fosforilação/desfosforilação simultânea da ser 1177/Thr 495 da eNOS diante da estimulação com BK associada à Ang-(1-7).



**Fig. 13-** Células endoteliais humanas. Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células mostrando a fosforilação do sítio estimulatório da eNOS (S1177) após estimulação com BK ( $10^{-6}$  M, 5 e 10 min) (A), BK ( $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M, 5 min) (B) e BK ( $10^{-8}$  M) e Ang-(1-7) ( $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M) (C).

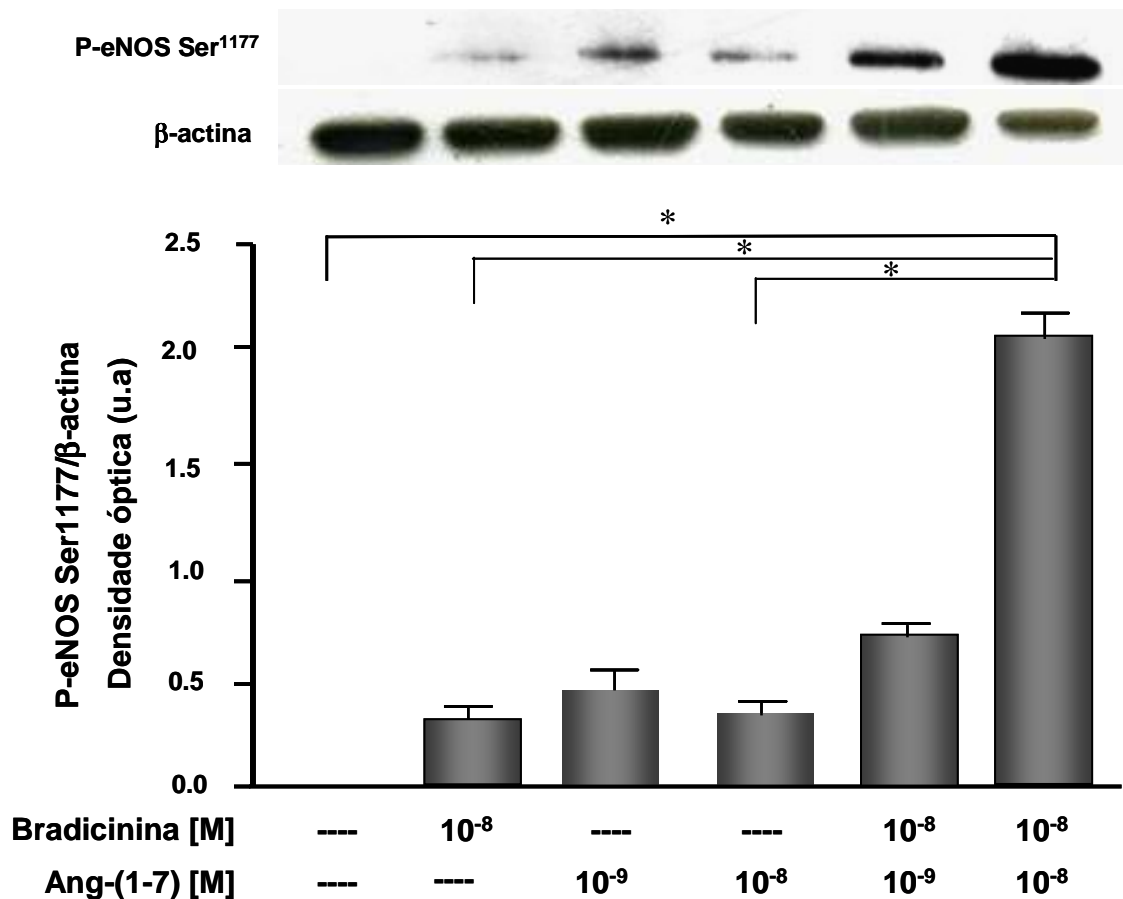


**Fig. 14-** Células endoteliais humanas. Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células mostrando a desfosforilação do sítio inibitório da eNOS (Thr 495) após estimulação com BK (10<sup>-6</sup> M, 5 e 10 min).

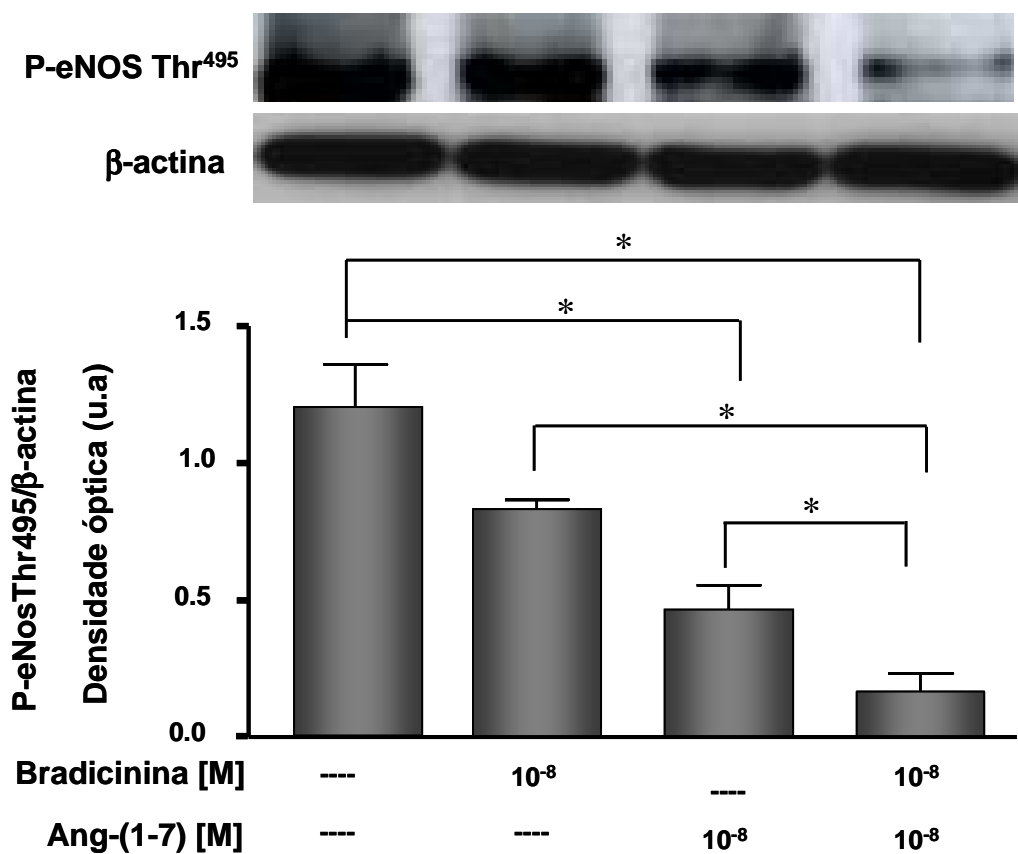


**Fig.15-** Efeito da bradicinina na fosforilação/desfosforilação simultânea do sítio estimulatório/inibitório da eNOS (S1177/Thr 495) nas células endoteliais humanas. Valores expressos como média ± EPM de 3 experimentos. \*p < 0.05 vs controle.

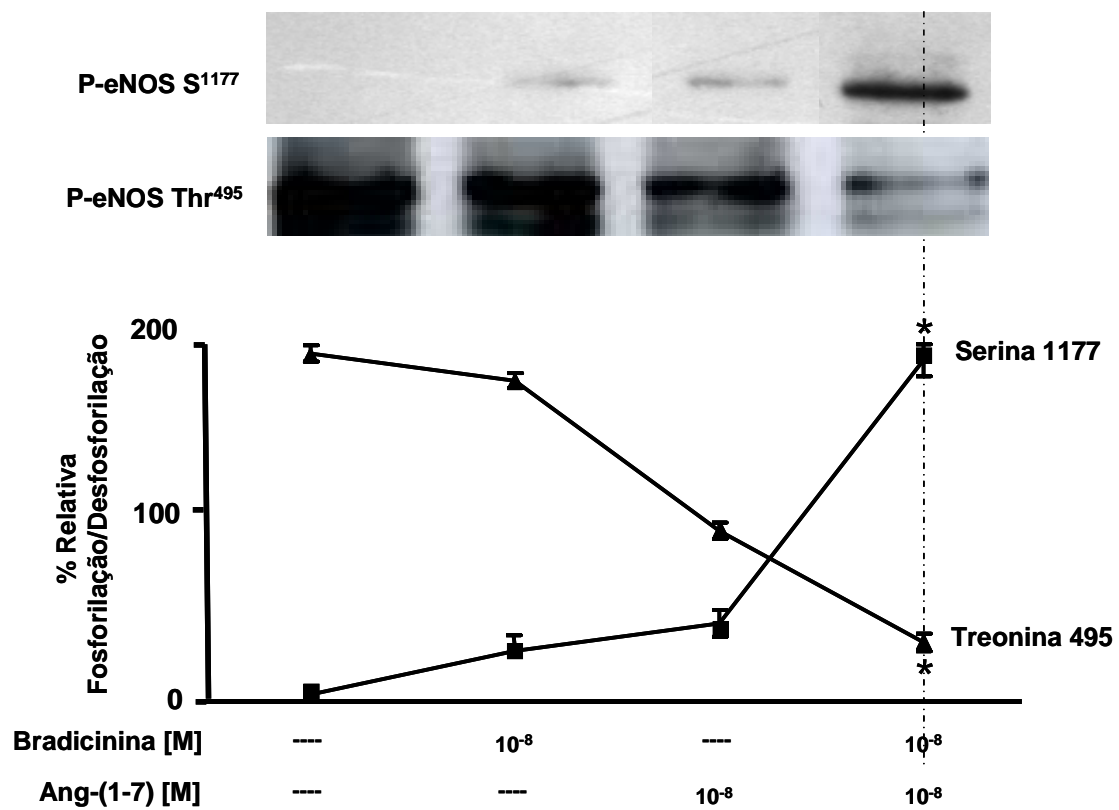




**Fig. 16-** Células endoteliais humanas. Efeito da estimulação com BK (10<sup>-8</sup> M), Ang-(1-7) (10<sup>-9</sup> e 10<sup>-8</sup> M) e BK associada à Ang-(1-7) na fosforilação do sítio estimulatório da eNOS (S1177). Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células. A BK e a Ang-(1-7) estimularam a fosforilação da S1177, este efeito foi potenciado significativamente pela associação da BK (10<sup>-8</sup> M) com Ang-(1-7) BK (10<sup>-8</sup> M). Valores expressos como média ± EPM de 3 experimentos. \*p < 0.05 vs controle.



**Fig. 17-** Células endoteliais humanas. Efeito da estimulação com BK ( $10^{-8}$  M), Ang-(1-7) ( $10^{-8}$  M) e BK associada à Ang-(1-7) na desfosforilação do sítio inibitório da eNOS (Thr 495). Exemplo de *western blotting* realizado no lisado de células. A BK e a Ang-(1-7) estimularam a desfosforilação da Thr 495, este efeito foi potenciado pela associação dos dois peptídeos. Valores expressos como média  $\pm$  EPM de 3 experimentos. \* $p < 0.05$  vs controle.



**Fig. 18-** Células endoteliais humanas. Potenciação da fosforilação/desfosforilação simultânea do sitio estimulatório/inibitório da eNOS (Ser1177/Thr 495) após estimulação com BK (10<sup>-8</sup> M) associada à Ang-(1-7) (10<sup>-8</sup> M). Valores expressos como média ± EPM de 3 experimentos. \*p < 0.05 vs controle.

## 6. DISCUSSÃO

---

O presente estudo, utilizando dois modelos celulares, um com células CHO transfectadas ou não com os receptores Mas para angiotensina-(1-7) e outro com células CHO-B2 para bradicinina e células endoteliais humanas, teve como objetivo geral caracterizar mecanismos moleculares envolvidos na potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7), mais especificamente, na liberação de NO.

A célula CHO é uma ferramenta importante em pesquisas devido à sua adaptabilidade a diferentes meios de cultura e à sua plasticidade no contexto de alterações genéticas (JAYAPAL *et al.*, 2007). Nos experimentos realizados com as células transfectadas, excluiu-se a participação de outros receptores dos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cinina, já que estes não são expressos constitutivamente por estas células. Por outro lado, a célula CHO expressa a eNOS como demonstrado por Cresswell *et al.* (2006) através de técnicas proteômicas (Eletroforese 2-D e LC/MS) e também por Sampaio *et al.* (2007) utilizando *Western Blotting*. Essas características tornam a célula CHO um modelo adequado para observação linear dos efeitos mediados pela interação peptídeo-receptor transfectado, na liberação de NO.

Numerosos trabalhos mostram a célula endotelial como importante local para a síntese, a ação e metabolismo dos peptídeos dos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas. O fato da remoção do endotélio abolir o relaxamento induzido pela Ang-(1-7) (Lemos, *et al.*, 2005; Lemos, *et al.*, 2002; Le tran & Foster, 1997; Brosnihan, *et al.*; 1996; Porsti *et al.*; 1994) e pela bradicinina, da célula endotelial expressar constitutivamente os receptores Mas para Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 2005)

e B2 para BK (Linz *et al.*, 1995; Linz *et al.*, 1999 ) e os dois peptídeos ativarem a eNOS, aumentando a liberação de NO (Pinheiro *et al.*, 2004; Heitsch *et al.*, 2001; Linz *et al.*, 1995), fazem da célula endotelial, por sua vez, um modelo biológico “excelente” para estudar a interação entre angiotensina-(1-7) e bradicinina e permite extrapolar os resultados para os efeitos dos peptídeos em vasos humanos.

Diferentes metodologias são empregadas para avaliar a liberação celular de NO. Neste estudo utilizamos, inicialmente, a determinação da concentração de nitrito no sobrenadante pelo método fluorimétrico do DAN, o qual reage com nitrito para formar o composto fluorescente 2,3-naftotriazol (Marzinzig, *et al.*, 1997).

Com o objetivo de visualizar o NO e avaliar sua distribuição espacial e temporal nas células vivas, num segundo momento, usamos a sonda fluorescente DAF-FM diacetato (diaminofluoresceína). Esta sonda, quando associada à técnica de microscopia confocal, permite detectar, quantificar e obter bioimagens do NO produzido com sensibilidade na ordem de nanomolares (LEPILLER *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 1998). Em todos os experimentos realizados com esta técnica, as células não foram fixadas, pois, segundo Lopez-Figueroa *et al.*, (2001), a fixação com glutaraldeído abole o sinal fluorescente do DAF, enquanto a fixação com paraformaldeído 4 ou 2% altera o padrão de distribuição da fluorescência intracelular, produzindo pontos fluorescentes no centro da célula. Como as células não eram fixadas, as análises foram realizadas imediatamente após a estimulação das células com os peptídeos em estudo.

Os principais resultados obtidos no presente trabalho foram: 1) a liberação de nitrito ou NO após estimulação com BK ou Ang-(1-7) depende da concentração dos peptídeos e expressão dos receptores B2 e Mas, respectivamente 2) a potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7) depende da co-expressão dos receptores B2 e Mas

na célula 3) Esta potencialização é bloqueada por HOE 140, A779 e L-name e não é afetada pelo iECA captopril e 4) Um dos mecanismos envolvidos na potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7) é o aumento da fosforilação/desfosforilação do sítio estimulatório/inibitório da eNOS (S1177/ Thr 495).

### **6.1- Avaliação do efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a produção de nitrito em células CHO, CHO-B2 e CHO-Mas.**

Numerosos estudos mostram a BK e a Ang-(1-7) desempenhando papel importante na manutenção do tônus vascular. A bradicinina age como potente vasodilatador, sendo esta ação mediada pela ativação do receptor B2 e, pelo menos em parte, aumento da síntese e liberação de NO (Erdös, 2002). Por outro lado, dados do nosso e de outros laboratórios mostram que a Ang-(1-7) age através do receptor acoplado a proteína G, Mas, liberando NO e provocando vasodilatação em diversos leitos vasculares (Li *et al.*, 1997; Tran *et al.*, 1997; Brosnihan *et al.*, 1996; Osei *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostram que a BK em concentrações específicas levou à liberação de nitrito somente nas células CHO transfectadas com o receptor B2 (CHO-B2). Este efeito é ausente nas células CHO transfectadas com receptor Mas (CHO-Mas) ou na célula CHO sem transfecção e foi abolido pelo pré-tratamento com HOE 140. Ressalta-se, que a liberação de nitrito diminuiu com doses elevadas do peptídeo ( $10^{-5}$  M), indicando uma possível dessensibilização dos receptores e talvez, a existência de uma concentração ideal capaz de ativar as vias de sinalização intracelular envolvidas na produção de NO. De forma semelhante, a Ang-(1-7) estimulou a liberação de nitrito apenas na célula CHO-Mas, não apresentando nenhum efeito nas células CHO-B2 ou CHO. A resposta da Ang-(1-7) nas células

CHO-Mas foi bloqueada pelo A-779, o qual não interfere com as respostas mediadas pelo receptor B2 (Santos *et al.*, 1994). O bloqueio pelo A-779 e a ausência de liberação de nitrito pelas células CHO-B2, em resposta à Ang-(1-7), constituem evidências contra a possibilidade dos efeitos da Ang-(1-7) serem mediados pelo receptor B2, como foi demonstrado em células endoteliais bovinas (Heitsch *et al.*, 2001). Estes resultados demonstram que a liberação de nitrito pelas células CHO ocorre após estimulação de receptores específicos de BK (B2) e de Ang-(1-7) (Mas) e confirmam a presença e funcionalidade dos receptores na membrana das células transfectadas. A participação do receptor Mas na liberação de NO mediada pela Ang-(1-7) foi verificada em estudos usando camundongos com deleção genética do receptor Mas (Mas-KO), nos quais o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) é abolido (Lemos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003). A estimulação das células CHO-B2 e CHO-Mas com BK associada à Ang-(1-7) não provocou liberação de nitrito diferente da observada quando as células foram estimuladas com os peptídeos isoladamente. Esse resultado sugere que cada peptídeo age no seu receptor e que certamente, seria necessária, no modelo, a co-expressão dos dois receptores, bem como a expressão da ECA, para ativação dos mecanismos intracelulares responsáveis pela potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7) (Minshall *et al.*, 1997, Marcic *et al.*, 1999).

Em nosso estudo, o pré-tratamento das células CHO-B2 e CHO-Mas com o inibidor da ECA, captopril, não modificou a liberação de nitrito estimulada pela BK ou Ang-(1-7). Este resultado era esperado já que as células CHO não expressam constitutivamente a ECA. Além disso, descarta a possibilidade de interação direta entre os inibidores da ECA e o receptor B2, confirmando os resultados de Minshall *et al.* (1997) e Marcic *et al.* (1999). Estes autores mostraram que o enalaprilato foi

incapaz de potenciar as ações da BK, em células CHO que expressam apenas o receptor B2.

O pré-tratamento com o inibidor da óxido nítrico sintase, L-Name, aboliu a liberação de nitrito estimulada pela BK em células CHO-B2, confirmando a contribuição expressiva do óxido nítrico no efeito vasodilatador da BK, já demonstrada em numerosas investigações com coração isolado de ratos (Linz *et al.*, 1993), micro-vasos e grandes artérias da circulação coronariana de cães (Busse *et al.*, 1993) e humanos (Kichuk *et al.*, 1996), arteríolas de ratos normotensos (Oliveira *et al.*, 1999) e espontaneamente hipertensos (Fernandes *et al.*, 2001). Da mesma forma, o L-Name aboliu a liberação de nitrito estimulada pela Ang-(1-7) em células CHO-Mas. Estas observações ratificam que os efeitos da Ang-(1-7) são mediados, pelo menos em parte, pela liberação endotelial de NO, corroborando com estudos em diversos modelos experimentais (Brosnihan *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 1997; Heistch *et al.*, 2001; .Pinheiro *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2005).

## **6.2- Avaliação do efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a liberação de óxido nítrico em células endoteliais de aorta torácica humanas (HAEC).**

A importância do endotélio para as ações da BK tem sido demonstrada em experimentos usando cultura de células endoteliais provenientes de vasos de diversos calibres e de diferentes espécies. Nestes estudos a estimulação com BK provoca ativação da eNOS, aumento da produção de GMPc e considerados índices da produção e liberação de NO (Venema, 2002).



Nossos resultados mostraram que as células endoteliais humanas quando estimuladas pela BK, liberam NO, de forma dose dependente, via receptor B2 e ativação da eNOS, já que o pré-tratamento com HOE 140 e L-Name aboliu este efeito. Em contraste ao observado nas células CHO-B2, onde não há expressão constitutiva da ECA, a pré-incubação com captopril aumentou significativamente a liberação de NO. Estes achados poderiam ser interpretados como sendo apenas, resultado da diminuição da hidrólise da BK, pela inibição da ECA. Entretanto, experimentos usando células transfectadas (Minshall *et al.*, 1997; Benzing *et al.*, 1999; Marcic e Erdös, 2000) e preparações de vasos intactos (Danser *et al.*, 2000; Tom *et al.*, 2001; Mombouli *et al.*, 2002) mostram que a potenciação da BK pelos inibidores da ECA é um efeito que vai além da inibição da hidrólise, já que os inibidores da ECA também potenciam as ações de análogos da BK resistentes a ECA (Erdös *et al.*, 1999). Os dados da literatura sugerem que os inibidores da ECA aumentam o número de receptores B2 na superfície celular prevenindo/revertendo a rápida dessensibilização que normalmente ocorre após exposição à BK. Estudos em cultura de células CHO mostram que a colocalização do receptor B2 e da ECA é o pré-requisito para a potenciação da BK e que a ECA humana e o receptor B2 estão suficientemente próximos na membrana celular (cerca de 10 nm). Essa organização espacial permitiria aos inibidores da ECA, induzir a formação de heterodímeros entre B2 e ECA podendo ser este um dos mecanismos envolvidos no aumento da atividade das cininas em nível celular (Chen *et al.*, 2006).

A estimulação das células endoteliais com Ang-(1-7) provocou liberação de NO de forma dose dependente. Confirmando os resultados obtidos nas células transfectadas com o Mas, nossos dados mostram que os pré-tratamentos das HAEC com A-779 e L-Name, inibem a liberação de NO, induzida pela estimulação com

Ang-(1-7). Como previamente demonstrado nos animais Mas-KO, o receptor Mas parece ser essencial para as ações vasculares da Ang-(1-7) (Lemos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003), as quais são mediadas, pelo menos em parte, pela liberação endotelial de NO como anteriormente mostrado por Heitsch *et al.*, (2001) e mais recentemente pelo trabalho de Sampaio *et al.*(2007). A pré-incubação com captopril não modificou a resposta das HAECs à Ang-(1-7). Como a ECA está predominantemente localizada na célula endotelial e metaboliza a Ang-(1-7) para Ang-(1-5), a inibição da ECA diminuiria essa hidrólise, aumentando a disponibilidade de Ang-(1-7) com conseqüente aumento do efeito do peptídeo. No entanto, nas nossas condições experimentais, isto não foi observado devido, talvez, ao curto período de incubação.

Nossos dados mostram que a estimulação das HAECs com BK associada à Ang-(1-7) provocou aumento da liberação de NO significativamente maior do que a observada após administração dos peptídeos isoladamente. Numerosos dados da literatura mostram que a Ang-(1-7) potencia as ações da BK, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e em diferentes espécies animais. Experimentos em ratos acordados (Paula *et al.*, 1995), ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR) (Lima *et al.*, 1997), artérias coronárias de cão (Brosnihan *et al.*, 1996), mesentério de ratos anestesiados (Oliveira *et al.*, 1999), artérias coronárias de porco e humanos (Tom *et al.*, 2001), arteríolas de SHR (Fernandes *et al.*, 2005) mostraram que a Ang-(1-7) potencializa a resposta vasodilatadora da BK. Da mesma forma, Deddish *et al.*, (1998) e Marcic *et al.*, (1999), usando células de ovário de hamster, mostraram que a Ang-(1-7) potencializa a liberação de ácido araquidônico e cálcio induzida pela BK. Como a Ang-(1-7) inibe o domínio C da ECA, primariamente envolvido no controle da pressão arterial, já que quebra a Ang I dando origem a um potente vasoconstritor,

Ang II, e inativa o peptídeo vasodilatador BK (Li *et al.*,1997; Deddish *et al.*,1998; Tom *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*,2004), poderíamos supor que a potencialização das ações da BK pela Ang-(1-7) seria devida à diminuição da hidrólise da BK e formação de Ang II. No entanto, já foi mostrado que a Ang-(1-7) potencializa a liberação de ácido araquidônico induzida pelo análogo da BK, HT-BK, resistente à hidrólise pela ECA (Deddish *et al.*, 1998), o que sugere que a inibição da enzima e o consequente aumento da biodisponibilidade da BK, não seja o mecanismo mais importante para a potencialização dos efeitos da BK pela Ang-(1-7). Além disso, foi sugerido que a Ang-(1-7) pode se ligar a ECA, facilitando as mudanças conformacionais do receptor B2 que diminuem sua internalização e facilitam seu acoplamento com as cascatas de sinalização intracelular (Tom *et al.*, 2003), levando a potenciação da BK independentemente da sua hidrólise. Entretanto, isto não é válido nas células endoteliais humanas, nas quais o bloqueio da ECA com captopril não modificou a atividade potencializadora da Ang-(1-7). Outro argumento contra a hipótese da potencialização da BK pela Ang-(1-7) ser dependente da inibição da ECA, foi conseguido com o bloqueio do receptor Mas pela pré-incubação com seu antagonista seletivo, A-779. Nestes experimentos o A-779 aboliu a potencialização da BK pela Ang-(1-7), indicando que a ligação do heptapeptídeo a seu receptor é condição essencial para a potencialização da BK. Resultados semelhantes foram reportados por Lima *et al.*, (1997), Oliveira *et al.*, (1999) e Fernandes *et al.*, (2001).

A potencialização da BK pela Ang-(1-7) não foi observada após pré-incubação das HAECs com HOE 140 e L-Name. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et al.*, (1999) e Fernandes *et al.*, (2001). Estes dados mostram que o aumento da atividade da BK é mediado pelo receptor B2 e ativação da NO sintase endotelial.

### **6.3- Avaliação do efeito da estimulação com BK, Ang-(1-7) e BK associada à Ang-(1-7) sobre a fosforilação/desfosforilação da eNOS em células endoteliais humanas.**

A enzima eNOS pode ser fosforilada em resíduos de serina, treonina e tirosina. Há numerosos sítios potenciais de fosforilação, mas sabe-se que a fosforilação da eNOS na Ser 1177 e Thr 495 modulam a atividade da enzima. Enquanto a fosforilação da Ser1177 implica na ativação, a fosforilação da Thr 495 decresce sua atividade (Fulton *et al.*, 2001; Brixius *et al.*, 2004). A fosforilação/desfosforilação coordenada pelos resíduos Ser 1177 e Thr 495 parece ser um evento crucial para a ativação da eNOS nas células endoteliais (Fleming *et al.*, 2001). Em condições basais, a eNOS está fosforilada na Thr 495 e muito fracamente fosforilada na Ser 1177. Mudanças rápidas no estado de fosforilação desses aminoácidos precedem o início da atividade enzimática da eNOS. Esse evento tem sido demonstrado diante de estímulo das células endoteliais com vários agonistas como bradicinina, histamina, estrogênio e iomicina (Harris *et al.*, 2001; Bucci *et al.*, 2002; Thors *et al.*, 2004). Recentemente, trabalho realizado em nosso laboratório (Sampaio *et al.*, 2007) mostrou que a Ang-(1-7) também provoca a fosforilação/desfosforilação coordenada pelos resíduos Ser 1177/Thr 495 aumentando a atividade da eNOS e a liberação de NO, em células CHO transfectadas com o receptor Mas e em células endoteliais humanas. Este efeito foi abolido pelo A-779 o que reforça a participação do receptor Mas nos efeitos induzidos pela Ang-(1-7).

Em nosso estudo, a estimulação das células endoteliais humanas com BK provocou fosforilação transiente da eNOS na Ser 1177, coordenada com a desfosforilação transiente da Thr 495. Em ambos os casos, efeito significativo foi

observado após 5 min de estimulação. Nossos resultados estão de acordo com as observações de Fleming *et al.*, (2001). Usando células endoteliais de aorta de porcos e veia umbilical humana, estes autores mostraram que embora a fosforilação na Ser 1177 aumente a atividade da eNOS em baixas concentrações de cálcio, a associação do complexo CaM - eNOS e o início da produção de NO são regulados pela desfosforilação cálcio-dependente da Thr 495. Além disso, Harris *et al.* (2001) observaram que a estimulação de células endoteliais de aorta bovina com BK provocou liberação transiente de NO com perfil da curva de tempo similar ao observado para a fosforilação da Ser 1179 e a desfosforilação da Thr 495. No entanto, contrapondo-se aos dados anteriores, Bae *et al.* (2003), usando células endoteliais de aorta bovina, observaram que o estado de fosforilação da Thr 497 permaneceu inalterado após estimulação com BK. A razão para esta diferença pode estar na passagem (5<sup>a</sup>-10<sup>a</sup>) das células usadas neste estudo. Tem sido observado que as células endoteliais além da 5<sup>a</sup> passagem perdem a capacidade de ativar algumas cascatas de sinalização, inclusive as iniciadas pela estimulação com BK (Harris *et al.*, 2001).

O tratamento das células endoteliais com Ang-(1-7) provocou fosforilação da Ser 1177 e desfosforilação da Thr 495, resultados semelhantes aos obtidos por Sampaio *et al.*, (2007) em células endoteliais humanas e por Dias-Peixoto *et al.* (2008) em cardiomiócitos. Os mecanismos intracelulares envolvidos nos efeitos da Ang-(1-7) são pouco conhecidos. Dados da literatura indicam que a Ang-(1-7) não altera a concentração de cálcio intracelular em células endoteliais (Heistch *et al.*, 2001). Nos estudos de Sampaio *et al.* (2007) e Dias-Peixoto *et al.* (2008), os efeitos da Ang-(1-7) sobre o estado de fosforilação dos resíduos da eNOS e o aumento da produção de NO foram bloqueados pelos inibidores da PI3K sugerindo o

envolvimento da via da PI3K/Akt, que ativa eNOS independentemente de cálcio (Fulton *et al.*, 2001).

A estimulação das células endoteliais com Ang-(1-7) associada à BK aumentou significativamente a fosforilação/desfosforilação dos resíduos serina e treonina da eNOS, sugerindo ser esta modulação um dos mecanismos moleculares envolvidos na potenciação dos efeitos da BK pela Ang-(1-7). Além disso, já foi demonstrado que os receptores de cininas ativam várias cascatas de segundos mensageiros, dependendo do tipo celular e da via de ativação das proteínas G. Em célula endotelial, o mecanismo de ação clássico das cininas envolve a ativação da eNOS por vias dependentes de cálcio e da cálcio-calmodulina KII (Moreau *et al.*, 2005). No entanto, vários estudos mostraram que a fosforilação da eNOS estimulada pela bradicinina é parcialmente dependente da via PI3K/Akt (Harris *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2003), a mesma via ativada pela Ang-(1-7) como demonstrado por Sampaio *et al.* (2007). Deste modo, é provável que o aumento da atividade da BK pela Ang-(1-7) resulte da ativação sinérgica de vias intracelulares comuns aos dois peptídeos, como a via PI3K/Akt.

Embora nossos experimentos confirmem a ligação entre Ang-(1-7) e BK, na ativação da eNOS e produção de NO, muitos dos mecanismos envolvidos nesta cascata de eventos precisam ser esclarecidos já que, a ligação entre os dois peptídeos pode envolver a ECA, ligação aos receptores Mas e B2 e formação de heterodímeros com ECA e outros receptores do SRA.

## 7. CONCLUSÃO

---

---

- ✓ As células transfectadas com o receptor B2 liberam nitrito apenas após estimulação com BK. Nenhum efeito foi observado após a estimulação com Ang-(1-7) ou Ang-(1-7) associada à BK. Este efeito foi abolido pelo pré-tratamento com o HOE 140 e com L-Name e potencializado pelo inibidor da ECA, captopril.
- ✓ A Ang-(1-7) provoca liberação de nitrito apenas nas células transfectadas com o receptor Mas. Nenhum efeito é observado após a estimulação com BK ou BK associada à Ang-(1-7). Este efeito é abolido pelo pré-tratamento com o A-779 e com L-Name e não é influenciado pelo inibidor da ECA (captopril) ou pelo HOE 140.
- ✓ Nas células endoteliais humanas, a estimulação com BK e Ang-(1-7) provoca liberação NO. Este efeito é potencializado pela associação dos dois peptídeos.
- ✓ Nas células endoteliais humanas, a bradicinina e Ang-(1-7) estimulam a fosforilação/desfosforilação coordenada dos resíduos Ser 1177/Thr 495. Este efeito é potencializado pela estimulação com BK associada a Ang-(1-7).

Em resumo, nossos resultados mostram que, em células endoteliais de aorta torácica humanas (HAEC), a associação de Ang-(1-7) e BK aumenta significativamente a liberação de NO. Este feito é mediado pelos receptores Mas e B2, independe da inibição da ECA e envolve a fosforilação/desfosforilação do sítio excitatório/inibitório da eNOS, aumentando a atividade da enzima e portanto, a liberação de NO.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABBAS, A.; GORELIK, G.; CARBINI, L.A. Angiotensin (1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension*, **30** (part 1): 217-221, 1997.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, **357**:593 – 615, 2001.

ALEXANDER, R.W.; BROCK, T.A.; GIMBRONE-JR, M.A.; RITTENHOUSE, S.E. Angiotensin increases inositol triphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension*, **7**: 447 – 451, 1985.

ALMEIDA, A.P.; FRABREGAS, B.C.; MADUREIRA, M.M.; SANTOS, R.J.S.; CAMPGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**(6): 709-713, 2000.

ANGUS, J.A.; & COCKS, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacology & Therapeutics*, **41**(1-2): 303 – 352, 1989.

ARAKAWA, K. Serine protease angiotensin II systems. *J. Hypertens*, suppl. S3-S7, 1996.

ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D.; BLACKMORE, P.F.; EXTON, J.H. Studies of the interaction between glucagons and alpha-adrenergic agonists in the control of hepatic glucose output. *J Biol Chem*, vol. **257**: 3759 – 3765, 1982.

AMBHUHL, P.; FELIX, D.; KHOSLA, M.C. [7-D-ALA]-angiotensin (1-7): selective antagonism of angiotensin (1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brian Res Bull*, **35**: 289-291: 1994.

BAE, S.W.; KIM, H.S.; CHA, Y.N.; PARK, Y.S.; JO, S.A.; JO, I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A



signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **306**: 981-987, 2003.

BARBE J, Marceau F, Theriault B, Drouin JN, and Regoli D. Cardiovascular actions of kinins in the rabbit. *Can J Physiol Pharmacol*, 57:78-91, 1979.

BARNES KL, Knowles WD, and Ferrario CM. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) excite neurons in the canine medulla in vitro. *Brain Res Bull*, 24:275-280, 1990.

BENZING, T.; FLEMING, I.; BLAUKAT, A.; MÜLLER-ESTERL, W.; BUSSE, R. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation*, **99**: 2034-2040, 1999..

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Biorregulation of kinins, kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, **44**:1-80, 1992.

BLANKLEY CJ, HODGES JC, KLUTCHKO SR AND HIMMELSBACH RJ ET ALL. *Synthesis and structure – activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the At<sub>2</sub> subtype*. *J. Med. Chem.*, **34**: 3248 – 3260, 1991.

BLAUKAT, A.; BARAC, A.; CROSS, M.J.; OFFERMANS, S.; DIKIC, I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G $\alpha_q$  and G $\alpha_i$  signals. *Mol Cell Biol*, **20**: 6837-6848, 2000.

BLAUKAT, A. Structure and signaling pathways of kinin receptors. *Andrologia*, **35**: 17-23, 2003.

BLOCK, C.H.; SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*, **9**:1395-1401, 1988.

BOMTEMPO, C.A.S.; SANTOS, G.F.P.; SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Interaction of bradykinin and angiotensin-(1-7) in the central

modulation of the baroreflex control of heart rate. *J Hypertension*, 16: 1797-1804, 1998.

BONVENTRE, J.B. Phospholipase A2 and signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**(2): 128 – 150, 1992.

BOTTARI SP, Gasparo M, Stekelings UM, Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and physiological implications. *Front. Neuroendocrinol.*, 14(2): 123-171, 1993.

BREDT, D.S.& SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **87**(2): 682 – 685, 1990.

BRITO RR, Santos RAS, Fagundes-Moura CR, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*, 30 (part 2):549-556, 1997.

BRIXIUS, K.; BLOCH, W.; POTT, C.; NAPP, A.; KRAHWINKEL, A.; ZISKOVEN, C.; KORILLER, M.; MEHLHORN, U.; HESCHELER, J.; FLEISCHMENN, B.; SCHWINGER, R.H. Mechanisms of  $\beta$ 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br. J. Pharmacol*, **143**(8): 1014-1022, 2004.

BROSNIHAN, K.B.; SANTOS, R.A.S.; BLOCK, C.H.; SCHIAVONE, M.T.; WELCHES, W.R.; CHAPPELL, M.C.; KHOSLA, M.C; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Biotransformation of angiotensins in the central nervous system, *Therapeutic Research*, **9**:48-59, 1988.

BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Angiotensin (1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension*, **27**: 523-528, 1996.

BUMPUS, F.M.; CATT, K.J.; CHIU, A.T.; DEGASPARO, M.; GOODFRIEND, T.; HUSSAIN, A.; PEACH, M.J.; TAYLOR, D.G.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Nomenclature for angiotensin receptors, *Hypertension*, **17**: 720-723, 1991.

BUMPUS, F.M; KHOSLA, M.C. Inhibition of the pressor and aldosterone-releasing effects of angiotensin II. *Clin Sci Mol Med*, **48**: 15-18, 1975.

BUSSE, R.; FLEMING, I.; HECKER, M. Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy. *J.Cardiovas Pharmacol*, **22**(5):S31-S36, 1993.

BUSSE, R. & FLEMING, I. Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes*, **45** suppl 1: S8 – S13, 1996.

BUCCII, M.; ROVIEZZO, F.; CICALA, C.; PINTO, A.; CIRINO, G. 17-beta-oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and Akt/PKB dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol*, **135**(7):1695-1700, 2002.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A.M. Bradykinin, blood and other tissues of the rat. *Hypertension*, **21**:155-165, 1993.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; DIZ, D.I.; SANTOS, R.A.S.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7) microinjected into the dorsal medial medulla. *Am J Physiol*, **257**: H324-H329, 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; DIZ, D.I.; FERRARIO, CM. Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus. *Hypertension*, **15** (Suppl I):I34-I39,1990.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; HERINGER, S.B.; BATISTA, E.N.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*, **267**:R89-R94, 1992.

CARRETERO, A.O.; SCICLI, A.G. Kinins, paracrine hormones in the regulation of blood flow, renal function and blood pressure. In: LARAGH, J.B.; BRENNER, B.M.;

CARRETERO AO, Scicli AG. Local hormonal factors (intracrine, autocrine and paracrine ) in hypertension. *Hypertension*, **18** ( Suppl. I ): I-58-I-69, 1991.

CARRETERO, A.O.; CARBINI, L.A.; SCICLI, A.G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and the mouse gene family. *J Hipertens*, **11**:693-697, 1993.

CARRETERO, A.O.; CARBINI, L.A. SCICLI, A.G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and the mouse gene family. *J Hipertens*, **11**: 693-697, 1993.

CARVALHO, M.H.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES R.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*, **8**: 76 – 88, 2001.

CASTRO, C.H.; SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A.P. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the mouse heart. *Hypertension*, **46**[part 2]:937 - 942, 2005.

CASTRO, C.H.; SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A.P. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci*, **80**:264 -268, 2006.

CHAPPELL, M.C.; TALLANT, E.A.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cell line. *Peptides*,**11**:375-380, 1989.

CHAPPELL, M.C; BROSNIHAN, K.B; DIZ, D.I; FERRARIO, C.M. Identification of angiotensin-( 1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem*, **264**:16518, 1990.

CHAPPELL, M.C.; PIRRO, N.T.; SYKES, A.; FERRARIO, C.M. Metabolism of angiotensin (1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, **31** (part 2): 362-367, 1998.

CHECLER, F.; AMAR, F.; KITABGI, P.; VINCENT, J. Metabolism of neurotensin by neural (neuroblastoma NIE 115) and extraneural (HT29) cell lines. *Peptides*, **7**: 1071 – 1077, 1986.

CHEN, Z.; DEDDISH, P.A.; MINSHALL, R.D.; BECKER, R.P.; ERDÖS, E.G.; TAN, F. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. *Faseb J.*, **20**(13): 2261 – 2270, 2006.

CHERRY, P.D.; FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. A.S.A.*, **79**(6):2106-2110, 1982

CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; ARDECKY, R.J.; CARINI, D.J.; DUNCIA, J.V.; PEASE, L.J.; WONG, P.C.; WEXLER, R.R.; JOHNSON, S.L.; TIMMERMANS, P.B. Identification of angiotensin II receptors subtypes. *Biochem. Res. Commun.*, **165**:169 – 203, 1986.

CHU, K.Y.; LAU, T.; CARLSSON, P.O.; LEUNG, P.S. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*, vol. **55**: 264 – 274, 2006.

CHUNG, O.; KUHL, H.; STOLL, M.; UNGER, T.; Physiological and Pharmacological implications of AT<sub>1</sub> versus AT<sub>2</sub> receptors. *Kidney Int*, **54** (Suppl. 67):S95-S99, 1998.

COOK, V.I.; GROVE, K.L.; MCMENAMIN, K.M.; CARTER, M.R.; HARDING, J.W.; SPETH, R.C. The At<sub>2</sub> angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Res.* **560**(1-2): 334 – 336, 1991

CSIKOS, T.; CHUN, O.; UNGER, T. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the ET<sub>2</sub> receptor. *J Hum Hypertens*, **12**(5):311-318, 1998.

CULMAN, J.; BAULMANN, J.; BLUME, A.; UNGER, T. the rennin-angiotensin system in the brain: an update. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2**:96 – 102, 2001.

DANSER, A.H.J.; TOM, B.; DE VRIES, R.; SAXENA, P.R. L-Name resistant bradykinin-induced relaxation in porcine coronary arteries is NO-dependent: effect of ACE inhibition. *Br. J. Pharmacol.*, **131**: 195-202, 2000.

DECARIE, A.; ADAM, A.; COUTURE, R.; Effects of captopril and icatiban on bradykinin (BK) and des[Arg9]BK in carrageenan-induced edema. *Peptides.*, **17**: 1009 – 1015, 1996.

DEDDISH, P.A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H.L.; WANG, H.Z.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Angiotensin (1-7) and Keto-ACE. *Hypertension*, **31**: 912-917, 1998.

DESCHEPPER, C.F.; BOUHNİK, J.; GANONG, W.F. Colocalization of angiotensin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res.*, **355**: 195 – 202, 1986.

DIAZ-PEIXOTO, M.F.; SANTOS, R.A.S.; GOMES, E.R.M.; ALVES, M.N.M.; ALMEIDA, P.W.M.; GRECO, L.; ROSA, M.; FAULER, B.; BADER, M.; ALENINA, N.; GUATIMOSIM, S. Molecular mechanisms involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*, **52** :542 – 548, 2008.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**(6736): 601 – 605, 1999.

DIZ, D.I.; PIRRO, N.A.T.; Differential actions of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on transmitter release. *Hypertension*, (Suppl. II): II41-II48, 1992.

DONOGUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GOBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREIBART, R.E.; ACTON, S. (2000). A novel angiotensin-converted enzyme-related carboxypeptidase (ECA2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *cir. Res.* Vol. **87**: E1 – E9. 2000.

DOUGLAS, J.C. Angiotensin receptor subtypes of kidney cortex. *Am. J. Physiol.* **253**: F1-F7, 1987.

DRAY, A.; PATEL, I.A.; PERKINS, M.N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal spinal cord-tail preparation in vitro. *Br. J. Pharmacol*, **107**:1129 – 1134, 1992.

DRAY, A. A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**:704 – 712, 1997.

DUCHENE, J.; CHAUHAN, S.D.; LOPEZ, F.; PECHER, C.; ESTEVE, J-P.; GIROLAMI, J-P.; BASCANDSJ-L.; SCHANSTRA, J.P. Direct protein-protein interaction between PLC $\gamma$  1 and the bradykinin B2 receptor-importance of growth conditions. *Biochemical. And Biophysical Research Communications*, **326**:894 – 900, 2005.

DUNCIA JV, Carini AT, Johnson AL, Price WA, Wong PC, Wexler RR, Timmersmans PBMWM. The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin receptor antagonist. *Med Res Med*, 12:149-191, 1992.

DZAU, V.J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*, **77** (suppl 10 ): S11-S16, 1986. ,

ERDOS, E.G. & SKIEDGEL, R.A. Renal metabolism of angiotensin I and II. *Kidney Int.*, **38**: S24-S27, 1976.

ERDÖS, E.G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension*, 16:363-370, 1990.

ERDÖS, E.G.; DEDDISH, P.A.; MARCIC, B.M. Potentiation of Bradykinin Actions by ACE inhibitors. *Tem* **10**(6): 1999.

ERDÖS, E.G. Kinins, the long march—A personal view. *Cardiovascular Research*, **54**:485 – 491, 2002.

ERDOS, E.G.; JACKMEN, H.L.; BROVKOVYCH, V.; TAN, F.; AND DEDDISH, P.A. Products of Angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J. Mol. Cell Cardiol*, **34**: 1569-1576, 2002.

FARIA-SILVA, R.; DUARTE, F.V.; SANTOS, R.A. Short-term angiotensin-(1-7) receptor MAS stimulations improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension*, **46**(4): 948 – 952, 2005.

FARMER, S.G.; BURH, R.; MEEKER, A.S.; WILKINS, D.E. Evidence for a pulmonary B3 bradykinin receptor. *Mol pharmacol*, **36**:1-8, 1989.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P.M.; Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, **93**: 515 – 524, 1988.

FELIX, D.; KHOSLA, MC.; BARNES, KL.; IMBODEN, H.; MONTANI, B.; FERRARIO, CM. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). *Hypertension*, **17**(6pt2): 1111 – 1114, 1991.

FERRARIO, C.M.; BARNES, K.L.; BLOK, C.H.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I.; KHOSLA, M.C.; SANTOS R.A.S. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*, **15**:113-119, 1990.

FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I.; JAISWAL, N.; KHOSLA, M.C.; MILSTED, A.; TALLANT, E.A. Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* **18**, Suppl. III: III-126-III-133, 1991.

FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C.; TALLANT, E.A.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I. Counterregulatory actions of angiotensin(1-7). *Hypertension*, **30** ( part 2 ): 535-541, 1997.

FERRARIO, C.M.; IYER, S.N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept*, **78**:13-18, 1998.

FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C. Novel angiotensin peptides. *Cell. Mol. Life Sciences*, **61**:2720 - 2727, 2004.



FERNANDES, L.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; TOSTES, R.C.A.; SANTOS, R.A.S.; CARVALHO, M.H.C. Potentiation of bradykinin by angiotensin (1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*, **37**: 703-709, 2001.

FERNANDES, L.; FORTES, Z.B.; CASSARINI, D.E; NIGRO, D.; TOSTES, R.C.A.; SANTOS, R.A.S.; CARVALHO, M.H.C. Role of PGI<sub>2</sub> and ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin (1-7) in resistance vessels of SHR. *Regulatory Peptides*, **127**: 183-189, 2005.

FERNANDEZ, J.H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A.C.M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genetics and Molecular Research*, **3**(4): 554-563, 2004.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*, **38**:499 – 507,2005.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S.; ALMEIDA, A.P. Angiotensin (1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, **38**: 665-668, 1997.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiological Reviews*, **78**(3): 583 – 686, 1998.

FLEMING, I. & BUSSE, R. Tyrosine phosphorylation and bradykinin-induced signaling in endothelial cells. *Am. J. Cardiol*, **80**(3A): 102A – 109A, 1997

FLEMING, I.; BAURSACHS, J.; SCHAFER, A.; SCHOLZ, D.; ALDERSHILE, J.; BUSSE, R. Isometric contraction induces de Ca<sup>2+</sup> - 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.; FISSALTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B.E.; BUSSE, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. **88** (11): E68 – 75 ,2001.

FLEMING,I. Cytochrome P450 2C is a EDHF synthase in coronary arteries. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **10**: 166 – 170, 2002a

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

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, W.R.; POLLACK, J.S. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *European Heart Journal*, **14**(Suppl I): 10 – 15,1993.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLACK, J.S; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**(6 Pt 2):1121–1131,1994.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C.; Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**(6736):597-601, 1999.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V.. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376 1980.

FURCHGOTT, R.F.The Discovery of Endothelium-Dependent Relaxation. *Circulation*, **87**: v-3 – v8, 1993.

GALLINAT, S.; BUSCHE, S.; RAIZADA, M.K.; SUMNERS, 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.; HENNHOFER, C. Genetic control of rennin in the tissues of different strains of mice. *Naunyn schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **332**: R59, 1986.

GARCIA-CARDEÑA, G.; FAN, R.; SHAH, V.; SORRENTINO, R.; CIRINO, G.; PAPAPETROPOULOS, A. *ET AL.*, Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hs90. *Nature*, **392**: 821 – 824, 1998.

GRIFFITH, T.M.; EDWARDS, D.H.; NEWBY, A.C.; LEWIS, M.J.; HENDERSON, A.H. Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovascular Research*, **20**(1): 7 – 12, 1986.

GRYGLEWSKI, R.J.; BOTTING, R.M.; VANE, J.R. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*, **12**: 530 – 548, 1988.

HALL, J.E. The rennin angiotensin system: Renal actions and blood pressure regulation. *Comprehensive Therapy*, **17**(5): 8 – 17, 1991.

HARRIS, M.B.; JU, H.; VENEMA, V.J.; BLACKSTONE, M.; VENEMA, R.C. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *General Pharmacology*, **35**: 165 – 170, 2001.

HECKER, M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor - fact or fiction. *News in Physiological Sciences*, **15**: 1 – 5, 2000.

HARRIS, M.B.; JU, H.; VENEMA, V.J.; LIANG, H.; ZOU, R.; MICHELL, B.J.; CHEN, Z-P.; KEMP, B.E.; VENEMA, R.C. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (19): 16587 – 16591, 2001.

HEITSCH, H.; BROVKOVYCH, S.; MALINSKI, T.; WIENER, G. Angiotensin (1-7) stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*, **37**: 72-76, 2001.

HELLER, R.; POLACT, T.; GRÄBNER, R.; TILL, U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*, **144**(1):49 – 57, 1999.

HEVEL, J.M.; WHITE, K.A.; MARLETTA, M.A. purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **222**(34): 22798 – 22791, 1991.

HOMG, J.; VENEMA, V.; LIANG, H.; HARRIS, B.; ZOU, R.; VENEMA, R. Bradykinin activates the janus-activated kinase/signal transducers and activator of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cell: localization of JAK/STAT signaling proteins in plasmalemmal caveolae. *Bioche*, vol **351**: 257-264, 2000.

HUNYADY L, Balla T, Catt, KJ. The ligand binding site of the angiotensin AT<sub>1</sub> receptor. *Trends Physiol. Sci.*, 17:135-140, 1996.

IGNARRO, L.J.;BYRNS, R.E.;WOOD, K.S. 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.

INAGAMI T, IWAI N, SASAKI K, YAMAMO Y, BARDHAN S, CHAKI S, GUO DF, FURUTA H. Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptor. *J. Hypertens.*, **10**:713-716, 1992.

JAISWAL, N.; TALLAN, E.A.; DIZ, D.I.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes *Hypertension*, **17** : 1115-1120, 1991.

JAYAPAL, K.P.; WLASCHIN, K.F.; HU, WEI-SHOU. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells – 20 years and Counting. CHO Consortium.*SBE Special Section*, 2007.

JU, H.; VENEMA, V.; MARRERO, M.; VENEMA, R. Inhibitory interaction of bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 24025-24029, 1998.

KAKAR, S.S.; SELLERS, J.C.; DEVOR, D.C.; MUSGROVE, L.C.; NEIL, J.D. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **185**: 109 – 1096, 1992.

KHOSLA, M.C.; SMEBY, R.R.; BUMPUS, F.M. Structure activity relationship in angiotensin analogs, in Page IH, Bumpus FM (Eds): *Angiotensin. Berlin, Springer-Verlag*, **126**-161, 1974.

KIUCHUK, M.R.; SEYEDI, N.; ZHANG, X. Regulation of nitric oxide production in human coronary microvessels and the contribution of local kinin formation. *Circulation*, **94**:44-51, 1996.

KOHARA, K.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7): A member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension*, **17**: 131-138, 1991.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, **70**: 2446 – 2453, 1998.

KOŁODZIEJSKI, P.J.; RASHID, M.B.; EIŠSA, N.T. Intracellular formation of “indisruptable” dimers of inducible nitric oxide synthase. *PANS*, **100**(24): 14263 – 14268, 2003.

KUMAGAI, H.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M.; FOUAD-TARAZI, F.M. Biological activities of angiotensin-(1-7) heptapeptide in the hamster heart. *Hypertension*, **15**: 29, 1990.

KONE, B.C. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand*, **168**: 27-31, 2000

KUBES,P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N.. Nitric oxide: and endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88(11)**: 4651 – 4655, 1991.

KUCHAREWICZ, R.; PAWLAK, T.; MATYS, E.; CHABIELSKA, W. Angiotensin (1-7): an active member of the rennin-angiotensin system. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **53**: 533-540, 2002.

LAWRENCE, A.C.; EVIN, G.; KLADIS, A.; CAMPBELL, D.J. An alternative strategy for the radioimmunoassay of angiotensin peptides using amino-terminal-directed antisera: measurement of eight angiotensin peptides in human plasma. *J Hypertension*, **8**: 715, 1990.

LEEB-LUNDBERG, L.M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, **57**: 27 – 77, 2005.

LEMOS, V.S.; SILVA, D.M.R.; WALTHER, T.; ET AL. The endothelium- dependent vasodilator effect of Ang-(1-7) is abolished in the aorta of Mas Knockout mice. *Hypertension*, 2002.

LEMOS, V.S.; SILVA, D.M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *Br J Pharmacol*, **135**: 1743 – 1748, 2002.

LEMOS, V.S.; SILVA, D.M.R.; WALTER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R.A.S. The Endothelium-Dependent Vasodilator effect of the Nonpeptide Ang (1-7) Mimic AVE 0991 is abolished in the Aorta of Mas-Knockout Mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, **46**: 274 – 278, 2005.

LEPILLER, S.; LAURENS, V.; BOUCHOT, A.; HERBOMEL, P.; SOLARY, E.; CHLUBA, J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic Biol Med.* **43 (4)**:619 – 627,2007.

LE TRAN & FOSTER, C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J cardiovasc pharmacol*, **30**: 676 – 678,1997.

LI, J.; CULMAN, J.; HORTNAGL, H. *et al.*. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB*,. **19**: 617 - 619, 2005.

LI, P.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Angiotensin (1-7) augments bradykinin-induced vasidilation by comprting with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*,. **29**: 394-400, 1997.

LIMA, C.V.; PAULA, R.D.; RESENDE, F.L.; KHOSLA, M.C. SANTOS, R.A.S. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin (1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, **30** (part 2): 542-548, 1997.

LINZ W, WIEMER And Schölkens BA. Bradykinin prevents left ventricular hypertrophy in rats. *J Hypertens*, **11**(Suppl 5):S96-S97, 1993.

LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHÖLKENS, B.A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angitensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*, **47**:25 - 49, 1995.

LINZ, W.; WOHLFART, P.; BERNWARD, A.; SCHÖLKENS, B.A. MALINSKI, T. WIENER, G. Interactions ACE, kininis and NO. *Cardiovas Res*, **43**:549-61, 1999.

LONG, C.J.; STONE, T.W. The release of endothelium-dependet relaxant factor is calcium dependent. *Blood Vessels*, **22**: 205-208, 1985.

LOOT, A.E.; ROKS, A.J.; HENNING, R.H.; *et al.* Angiotensin (1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, **105**: 1548-1550, 2002.

LOPEZ-FIGUEROA, M.O.; CAAMANO,C.; MARIN, R.; GUERRA, B.; ALONSO, R.; MORANO, M.I.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1540**. 253 – 264, 2001.

LÜCKHOFF, A.; BUSSE, R.; WINTER, I.; BASSENGE, E. Characterization of vascular relaxant factor released from cultured endothelial cells. *Hypertension*, **9**(3):295-303, 1987.

LÜSCHER, T.F.; BARTON, M. Biology of Endothelium. *Clin. Cardiology*. **20**(11): II-3 - II-10,1997.

MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV,D.R. The B1 receptor for kinins. *Pharmacol Rev.* **50**: 350 – 386,1998.

MARCIC, B.; DEDDISH, P.A.; JACKMAN, H.L.; ERDOS, E.G.. Enhancement of Bradykinin and Resensitization of its B<sub>2</sub> Receptor. *Hypertension*, **33**: 835-843, 1999.

MARCIC, B.M.; ERDÖS, E.G. Protein kinase C and phosphatase inhibitors block the ability of angiotensin I-converting enzyme inhibitors to resensitize the receptor to bradykinin without altering the primary effects of bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**: 605-612, 2000.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. **268**: 12131 – 12234, 1993.

MARLETA, M.A. Nitic oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 12231 – 12234,1993.

MARRERO, M.B.; VENEMA, V.J.; JU, H.; HE, H.; LIANG, H.; CALDWELL, R.B.; VENEMA, R.C. Endothelial nitric oxide synthase interaction with G protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, **343**: 335 – 340, 1999.



MARZINZIG, M.; NUSSLER, A.K.; STADLER, J.; MARZINZIG, E.; BARTHLEN, W.; NUSSLER, N.C.; BEGER, H.G.; MORRIS, S.M.; BRUCKNER, U.B. Analytical Methods. *Biology and Chemistry*, **1**: 177 – 189, 1997.

MCCARTHY, D.A.; POTTER, D.E.; NICOLAIDES, E.D. Na in vivo stimulation of the potencies and half-lives of synthetic bradykinin and kallidin. *J Pharmacol Exp Ther*, **148**:117-122, 1965.

MINSHALL, R.D.; TAN, F.; NAKAMURA, F.; RABITO, S.F.; BECKER, R.P.; MARCIC, B.; ERDÖS, E.G. Potentiation the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B<sub>2</sub> receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells. *Circ Res*, **81**:848-856, 1997.

MITCHELL, B.J.; GRIFFITHS, J.E.; MITCHELHILL, K.I.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; TIGANIS, T.; BOZINOVSKI, S.; DE MONTELLANO, P.R.; KEMP, B.E.; PEARSO, R.B. Akt tht kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology*, **9**(15): 845 – 848, 1999.

MOMBOULI, J.V.; BALLARD, K.D.; VANHOUTTE, P.M. Kininase-independent potentiation of endothelium dependent relaxations to kinins by converting enzyme inhibitor perindoprilat. *Acta Pharmacol. Sin.*, **23**: 203-207, 2002.

MONCADA, S.; HERMANN, A.G.; HIGGS, E.A.; VENE, J.R.. Differential formation of prostacyclin (PGX or PG<sub>12</sub>) by layoff the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*, **11**:323 – 344, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, M.J.; HIGGS, E.A.; Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **43**(2):109 – 120, 1991.

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J Pharmacol Sci*, **99**: 6 – 38, 2005.

MUBARACK, N. Muthalif; IBRAHIM, F. Benter; MOHAMMAD, R. Uddin; JASON, L. Harper; KAFAIT, U. Malik. Signal transduction mechanism involved in Angiotensin (1-7) stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *JPET*, 284: 388-398, 1998.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCH, I.M.; SASAMURA, H.; PRATT, R.E.; DZAU, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol.Chem.* **268**: 24539-24542, 1993.

NAHAMIAS, M.; STROSBURG, A.D. The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor: searching for signal-transduction pathway and physiological function. *Trends Physiol.Sci.*, **16**: 223-225, 1995.

OLIVEIRA, M.; CARVALHO, M.H.; NIGRO, D.; PASSAGLIA, R.; FORTES, Z. Elevated glucose blocks angiotensin (1-7) and bradykinin interaction: the role of cyclooxygenase products. *Peptides*, 24: 449-454, 2003.

OLIVEIRA, M.A.; FORTES, Z.B.; SANTOS, R.; KOSLA, M.; CARVALHO, M.A. Synergistic effect of angiotensin (1-7) on bradykinin arteriolar dilatation in vivo. *Peptides*, 20: 1195-1201, 1999.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T.G. Soluble metalloendopeptidase from rat brain: Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur L Biochem*, **135**:81-88, 1983.

OSEI, S.Y.; AHIMA, R.S.; MINKES, R.K.; WEAVER, J.P.; KHOSLA, M.C.; KADOQITZ, P.J. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol*, 234:35-42, 1993.

OZA, N.B.; SCHWARTZ, J.H.; GOUD, M.D.; LEVINSKI, N.G. Rta aortic smooth muscle cells in culture express kallikrein, kininogen and bradykinase activity. *J. Clin. Invest.*, **85**: 597-600, 1990.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**(6122): 524 – 526, 1987.

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

PALS, D.T.; MASCUCCI, F.D.; DENNING, G.S.; SIPOS, F.; FESSLER, D.C. Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. *Circ. Res.*, **29**: 673 – 681, 1971.

PAULA, R.D.; LIMA, C.V.; BRITTO R.R.; CAMPOGNOLE SANTOS, M.J.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Potentiation of hypotensive effect of bradykinin by Angiotensin (1-7) related peptides. *Peptides*, vol. **20**: 493-500, 1995.

PAULA, R.D.; LIMA, C.V.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, **26**[part 2]: 1154-1159, 1995.

PEACH, M.J.; CHIU, A.T. Stimulation and inhibition of aldosterone biosynthesis in vitro by angiotensin II and analogs. *Cir. Res*, **1**(suppl 1): 34 – 35, 1974.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPESTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.; WALTER, T. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 8140 – 8145, 2000.

PHEILSCHIFTER, J.; BAUER, C. Pertussis toxin abolishes angiotensin II induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin synthesis in rat renal mesangial cells. *Biochem. J.*, **236**: 289 – 294, 1986.

PINHEIRO, S.V.; SIMÕES E SILVA, A.C.; SAMPAIO, W.O.; PAULA, R.D.; MENDES, E.P.; BOMTEMPO, E.D.; PESQUERO, J.B.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; BLEICH, M.; SANTOS, R.A.S. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, **44**(4): 490 - 496, 2004.

PORSTI, I.; BARA, A.T.; BUSSE, R.; HECKER, M. Release of oxide nitric by Angiotensin (1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel Angiotensin receptor. *Br. J. Pharmacol*, **111**: 652-654, 1994.

PRADO, G.N.; TAYLOR, L.; ZHOU, X.; RICUPERO, D.; MIERKE, D.F.; POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J. Cell Physiol.*, **193**(3): 275 – 286, 2002.

RAJENDRAN, S.; CHIRKOV, Y.Y.; CAMPELL, D.J.; Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **46**(4):459 – 453, 2005.

RAIA, J.J.; BARONE, J.A.; BYERLY, W.G.; LACY, C.R. Angiotensin converting enzyme inhibitors: a comparative review. *Ann. Pharmacol.*, **24**: 506 – 525, 1990.

RAN, J.; HIRANO, T.; FUKUI, T. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptors in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance, *Metabolism*, vol. **55**: 478 – 488, 2006.

RAMRACHEYA, R.D.; MULLER, D.S.; WU, Y. Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia*, vol. **49**: 321 – 331. 2006.

REGOLI, D. & Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, **32**:1-46, 1980.

REGOLI, D.; RHALEB, N.E.; DRAPEAU, G.; DION, S. Kinin receptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol*, **15**:S30-S38, 1990.

REGOLI, D.; GOBEIL, F.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D.; SEOANE, P.R.; SALVINO, J.M.; SAWUTZ, D.G. Bradykinin receptor types and B<sub>2</sub> subtypes. *Life Sciences*, **55**(10):735-749, 1994.

REN, Y.; GARVIN, J.L.; CARRETERO, O.A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. **39**(6): 1261 – 1262, 2002

ROCHA e SILVA M. Kinin Hormones With: special reference to Bradykinin and related kinins: *American Lecture Series*, 1970.

ROKS, A.J.; VAN GEEL, P.P.; PINTO, Y.M.; BUIKEMA, H.; HENNINQ, R.H.; DE ZEEUW, D.; VAN GILST, W.H. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*, **32**(2): 296 – 301, 1999.

RUBANYI, G.M.; VANHOUTE, P.M. Oxygen-derived free radical, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*, **2**(4): 1-14, 1986.

RUBANYI, G.M.; VANHOUTE, P.M. Nature of endothelium derived relaxing factor are there two relaxing mediators? *Circulation Research*, **61**: 1161-1167, 1987.

RUBANYI, MCKINNEY, M.; G.M.; VANHOUTE, P.M. 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 G.M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; vol. **22**(4): 1-14,1993.

SAMPAIO, W.O.; SANTOS, R.A.S.; FARIA-SILVA, R.; MATA MACHADO, L.T.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, **49**: 185 – 192, 2007.

SANTOS, R.A.S; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.L; CHERNICKY, C.L; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in dog brainstem. *Hypertension*, **11**:155-157, 1988.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; JACOBSEN, D.W. *et al.* Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*, **19**(2suppl):II56 – II61, 1992.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BARACHO, N.C.V.; FONTES, M.A.P.; SILVA, L.C.S.; NEVES, L.A.A.; OLIVEIRA, D.R.; CALIGIORNE, S.M.; RODRIGUES, A.R.V.; GROSPEN, J.R.C.; CARVALHO, W.S.; SIMÕES E SILVA, A.C.; KHOSLA, M.C. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptor. *Brain Res Bull*, **35**(4): 298-298, 1994.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ANDRADE, S.P. Angiotensin (1-7): an update. *Regulatory Peptides*, **91**: 45-62, 2000.

SANTOS, R.A.S.; PASSAGLIO, K.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; SILVA, A.C. Interactions between angiotensin (1-7), kinins and angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension*, **38**: 660-664, 2001.

SANTOS, R.A.S.; SIMÕES, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.R.; MACHADO, R.P.; BUHR, I.; WALTHER, S.; PINHEIRO, S.V.B.; LOPES, M.; BADER, M.; MENDES, E.P.; LEMOS, V.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SCHULTHEISS, H.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad USA*, **14**: 8258-8263, 2003.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.; SAMPAIO, W.O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for a new cardiovascular drugs. *Exper Opin Investig Drugs*, **14**:1019-1031, 2005

SANTOS, R.A.S.; CASTRO, C.H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S.V.; ALMEIDA, A.P.; PAULA, R.D.; CRUZ, J.S.; RAMOS, A.S.; ROSA, K.T.; IRIGOGEM, M.C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G.T.; FERREIRA, A.J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor Mas knockout mice. *Hypertension*, **47**: 996 - 1002, 2006

SANTOS, R.A.S. & FERREIRA, A.J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **16**:122 – 128, 2007.

SASAKI, S.; HIGASHI, Y.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G.; OSHIMAT, T. Angiotensin (1-7) induces endothelium independent vasodilation in normotensive control subjects and essential hypertensive patients. *Circulation*, 100 (Suppl S): 174 (Abstract).

SASAKI, K.; YMANO, Y.; BARDHAN, S.; IWAI, N.; MURRAY, J.J.; HASEGAWA, M.; MATSUDA, Y.; INAGAMI, T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*, **351**: 230 – 232, 1991.

SCHIAVONE, M.T.; SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; KHOSLA, M.C. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7)-heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci*, **85**:4095-4098, 1988.

SCHMAIER, A. The Kallikrein-kinin and the rennin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol*, **285**: R1 – R13, 2003.

SU, B.; MARTIN, M.M.; ELTON, T.S. Human AT<sub>1</sub> receptor gene regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **396**: 11 – 21, 1996

SIRAGY, H.M. The role of the AT<sub>2</sub> receptor in hypertension. *Am. J. Hypertens.***13**:5 pt2): 62S – 67S, 2000.

STEPHENSON, S.I.; KENNY, A.J.; Metabolism of neuropeptides. *Biochem J*, **241**:237-247, 1987.

SWASON, G. N.; HANESWORTH, J.M.; SARDINIA, M.F.; COLEMAN, J.K.M.; WRIGHT, J.W.; HALL, K.L.; MILLER- WING, A.V.; STOBBS, J.W.; COOK, V.I.; HARDING, E.C.; HARDING, J.W. Discovery of a distinct binding site of angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul. Pept.* **40**: 409 – 419, 1992.

TALLANT, E.A.; JAISWAL, N.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Human astrocytes contain two distinct angiotensin receptor subtypes. *Hypertension*, **18**(1): 32 – 39, 1991.

TALLANT, E.A.; LU, X.; WEISS, R.B.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M. Bovine aortic endothelial cells contain an Angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension*, **29**: 388-393, 1997.

THAISRIVONGS S. Orally active renin inhibitors. In: Current drugs current patents Middlesex house, London UK, 1992, pp B35-B39..

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINE, D.J.; LEE, R.J.; WEXLER, R.R.; SAYE, J.A.M.; SMITH, D.R. Angiotensin II Receptors and Angiotensin II Receptors Antagonists. *Pharmacol. Ver.*, **45** (2): 205-251, 1993.

TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M., *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, vol. **275**, n.43, Oct 27: 33238 – 33243, 2000.

THORS, B.; HALLDORSSON, H.; THORGEIRSSON, G. Thrombin and histamine stimulate nitric oxide synthase phosphorylation at Ser 1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett*, **573**(1-3):175-180,2004.

TRACHTE, G.J.; MEIXNER, K.; FERRARIO, C.M.; KHOSLA, M.C.; Prostaglandin production in response to angiotensin-(1-7) in rabbit isolated vasdeferent. *Prostaglandin*, **39**:385, 1990.

TRAN, Y.; FORSTER, C. Angiotensin (1-7) and the rat aorta: modulation by endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*, **30**: 676-682, 1997.

TOM, B.; DENDORFER, A.; DANSER, A.H.J. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**: 792-801, 2003.

TOM, B.; DE VRIES, R.; SAXENA, P.R.; DANSER, A.H.J. Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors correlates with ACE-C and N-domain blockade. *Hypertension*, **38**: 95-99, 2001.



TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Ang II-stimulated generation of reactive species in human vascular smooth muscle cells is mediated via PLD-dependent pathways. *Hypertension*, **34**(2): 976 – 982, 1999.

THORS, B.; HALLDORSSON, H.; THORGEIRSSON, G. Thrombin and histamine stimulate nitric oxide synthase phosphorylation at Ser 1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett*, **573**(1-3):175-180, 2004.

TSCHOPE, C.; HERING-WALTHER, S.; KOCH, M.; SPILLMANN, F.; WANDORIF, M.; LEITNER, E. *et al.* Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction. *Br J Pharmacol*, **129**: 1537 – 1538, 2000.

UNGER, T.; CHUNG, O.; CSIKOS, T.; CULMAN, J.; GALLINAT, S.; GOHLKE, P.; HÖHLE, S.; MEFFERT, S.; STOLL, M.; STROTH, U.; ZHU, Y.Z.-.Angiotensin receptors. *J Hypertens*, **14** (Suppl):S95-S103, 1996.

VAVREK, R. & STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides*, **6**:161-164, 1985.

VENEMA, R.C. Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *International Immunopharmacology*, **2**:1755– 1762, 2002

VICKERS, C.; HALES, *et al.* (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, vol. **277**: 14838 – 14843.

WELCHES, W.R.; SANTOS, R.A.S.; CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; GREENA, L.J; FERRARIO, C.M. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens*, **9**:631-638, 1991.

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.; SCHÖLKENS, B.A.; BECKER, R.H.; BUSSE, R. Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension*, **18**(4); 558 – 563, 1991.

WRIGHT, J.W.; Harding, J.W.; Brain angiotensin receptor subtypes AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> and their functions. *Regul. Pept.* 59: 269 – 295, 1995.

WONG PC, Hart SD, Zaspel A, Chiu AT, Smith RD and Timmersmans PBMWM. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: Dup 753 ( All-1) and PD 123177 ( All-2). *Pharmacol. Exp. Ther.*, 255: 584 – 592, 1990.

XU, P.; COSTA-GONÇALVES, A.C.; TODIRAS, M.; RABELO L.A.; SAMPAIO, W.O.; MOURA, M.M.; SANTOS, S.S.; LUFT, F,C,; BADER, M.; GROSS, V.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.S. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure im Mas gene-deleted mice. *Hypertensão*, **51**:574 – 580, 2008.

YAMAMOTO, K.; CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, B.; FERRERIO, M.C. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (ec 3.4.24.11) in spontaneously hipertensive rats. *Hypertension*, **19**:692-696, 1992.

ZANCHETTI, A. Fisiologia do sistema renina angiotensina. IN: O sistema renina angiotensina. Robertson J.I.S. Editor, cap 3: pp 3.1 – 3.42, 1985.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)