

Mariana de Braga Lima Carvalho

Evidência de Potenciação da Bradicinina pelo
Agonista Não Peptídico de Angiotensina-(1-7), AVE
0991, Mediada pelo Receptor Mas, em Ratos
Normotensos

Dissertação de Mestrado

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Mariana de Braga Lima Carvalho

Evidência de Potenciação da Bradicinina pelo
Agonista Não Peptídico de Angiotensina-(1-7), AVE
0991, Mediada pelo Receptor Mas, em Ratos
Normotensos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Fisiologia e Farmacologia,
Departamento de Fisiologia e Biofísica,
Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole-Santos

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA: Profa. Heloisa Starling

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Pró-Reitor: Prof. Jaime Ramirez

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Diretora: Profa. Maria Cristina Lima de Castro

Vice-Diretor: Prof. Sérgio Costa Oliveira

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Chefe do Departamento: Profa. Maria Carolina Doretto

Sub-Chefe: Prof. Miguel José Lopes

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Coordenadora: Prof^a. Maria José Campagnole-Santos

Sub-Coordenador: Prof. Frederic Jean Georges Frezard

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Hipertensão,
Departamento de Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais.
Auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES,
PRONEX – CNPq.

“Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo.”

Clarice Lispector

“Alguns homens vêem as coisas como são e dizem ‘Por quê’. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’.”

Bernard Shaw

Dedico este trabalho a todos que fizeram parte desta história.

A Deus, proteção da minha vida, força, luz e esperança sempre.

Agradeço ao Professor Robson pelo entusiasmo e dedicação contagiantes.
Obrigada pela amizade e por me introduzir ao fascinante campo da fisiologia.

À Professora Maria José por estimular meu interesse pela pesquisa e pela disponibilidade para ensinar sempre.

Ao meu pai, que com sua brilhante carreira, com sua devoção à medicina e ao conhecimento científico me incitou à busca do mais, do esforço constante e trabalho criativo.

À minha mãe por me ensinar que se algo parece impossível, isso não me impede de querê-lo.

Ao Felipe:

“Mas há a vida que é para ser intensamente vivida, há o amor. Que tem que ser vivido até a última gota. Sem nenhum medo. Não mata.” *Clarice Lispector.*

Felipe, nosso amor floresce porque floresce. É o simples transbordar de nossa verdade. Agradeço-lhe cada momento e cada sorriso.

À Elenice, Tarcísio e Guilherme, meu segundo lar, pela acolhida e solidariedade.

Aos meus irmãos, em especial ao pequeno Leonardo, amor que ultrapassa distâncias.

À família Carvalho, meus anjos, pela união nos caminhos da medicina, em especial à Renata e ao Rodrigo pelo amparo e amizade.

À família Braga pela compreensão nos momentos de ausência

Às minha irmã companheira: Aline.

Aos queridos amigos da UFMG, medicina e fisiologia...

Obrigada a todos do laboratório, especialmente, à Professora Leonor, Raphael, Fernanda, Beatrix e Renata, companheiros de projeto. Agradeço também ao José Roberto, Marilene e Soninha por todo o apoio. Sem vocês nada seria possível.

Agradecimentos.....	IV
Índice.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Lista de ilustrações.....	XI
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
Introdução.....	1
Objetivos.....	19
Materiais e Métodos.....	21
Resultados.....	30
Discussão.....	41
Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	48
Anexos.....	61

- A-779 – d-Ala-angiotensina-(1-7)
- AMPC – monofosfato de adenosina cíclico
- ACh – acetilcolina
- ADH – vasopressina ou hormônio antidiurético
- Ang I ou Ang-(1-10) – angiotensina I
- Ang II ou Ang-(1-8) – angiotensina II
- Ang III – angiotensina III, angiotensina-(2-8)
- Ang IV – angiotensina IV, angiotensina-(3-8)
- Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)
- Ang-(1-9) – angiotensina-(1-9)
- Ang-(3-7) – angiotensina-(3-7)
- Ang-(4-7) – angotensina-(4-7)
- AOG – angiotensinogênio
- AT₁ – receptores angiotensinérgicos do subtipo 1
- AT₂ – receptores angiotensinérgicos do subtipo 2
- AVE 0991 – análogo não peptídico da Ang-(1-7)
- BK – bradicinina
- BSA – albumina sérica bovina
- Ca⁺⁺ – cálcio
- CGP 42112 – agonista do receptor AT₂
- DAF-FM - diacetato 4-amino-5 metilamino-2'7'-difluoresceína
- ECA – enzima conversora de angiotensina I
- ECA2 – enzima conversora de angiotensina II
- EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

FBS - soro fetal bovino

FC – frequência cardíaca

HBS – “Hanks’balanced salt”

i.v – intravenoso

i.a – intra-arterial

GMP – monofosfato de guanosina

GMPc – monofosfato de guanosina cíclico

HOE 140 – antagonista do receptor B₂ de bradicinina

HPLC - cromatografia líquida de alta performance

iECA – inibidores de enzima conversora de angiotensina I

L-NAME – N^ω – Nitro L-Arginina Metil Éster

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

Mas - receptor para Ang-(1-7)

NEP – endopeptidase neutra

NO – óxido nítrico

NOS – sintase de óxido nítrico

NP – nitroprussiato de sódio

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PCP – prolil carboxipeptidase

PD 123319 – antagonista de receptor AT₂ de Ang II

PEP – prolil-endopeptidase

PG - prostaglandina

PGE₂ – prostaglandina E₂

PGI₂ – prostaciclina

RECs – células endoteliais de coelho

SHR – ratos espontaneamente hipertensos

SRA – sistema renina-angiotensina

Figura 1: Ilustração simplificada das vias de formação de Ang-(1-7).

Figura 2: Ações do AVE 0991.

Figura 3: Síntese e metabolismo de angiotensinas e bradicinina.

Figura 4: Esquema dos Protocolos Experimentais com doses crescentes de bradicinina (BK) intra-arterial (i.a) e intravenosa (i.v).

Figura 5: Esquema dos Protocolos Experimentais com doses crescentes de Angiotensina I (Ang I) e Angiotensina II (Ang II).

Figura 6: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de: (A) AVE 0991 (46 pmol/ min; n=8); (B) AVE 0991 (230 pmol/ min; n=7); (C) AVE 0991 (460 pmol/ min; n=8); e (D) salina isotônica (6 µL/ min, n=6). Valores expressos como média ± erro padrão da média. *P<0.05, Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, 30 minutos de infusão comparado com o período antes da infusão.

Figura 7: Efeito hipotensor de doses crescentes de bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de salina isotônica (6 µL/ min) em animais previamente tratados com L-NAME (30mg/Kg, n=5). (A) Valores expressos como média ± EPM e (B) valores expressos como queda na pressão arterial basal em porcentagem.

Figura 8: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão de (A) AVE 0991 (230 pmol/min) associado a A-779 (180 pmol/min; n=5) ou (B) AVE 0991 (230 pmol/min) em animais previamente tratados com L-NAME (30 mg/Kg, n=7). Valores expressos como média \pm EPM.

Figura 9: Efeito pressor de doses crescentes de Ang I (A, n=6) e Ang II (B, n=6) endovenosas em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão endovenosa de AVE 0991 (230 pmol/min). Valores expressos como média \pm EPM.

Figura 10: Efeito pressor de doses crescentes de Ang I endovenosa em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão endovenosa de: (A) AVE 0991 (460 pmol/min; n=6) e (B) salina isotônica (6 μ L/min; n=7). Efeito pressor de doses crescentes de Ang II endovenosa em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão de: (C) AVE 0991 (460 pmol/min, n=6) e (D) salina isotônica (6 μ L/min, n=7 para Ang I e n=8 para Ang II). Valores expressos como média \pm EPM.

Figura 11: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina endovenosa (A, n=8) ou intra-arterial (B, n=7) em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de AVE 0991 (230 pmol/min). Valores expressos como média \pm EPM. *P<0.05, Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, 30 minutos de infusão, comparado com o período antes da infusão.

Figura 12: Produção de NO por células endoteliais de coelho em resposta a: (A) Sonda de NO DAF-FM; (B) BK (10^{-7} mol/L); (C) AVE 0991 (10^{-8} mol/L); ou (D) AVE 0991 (10^{-8} mol/L) em combinação com BK (10^{-7} mol/L). Imagens fluorescentes foram obtidas através de microscópio confocal Zeiss 510 meta laser equipado com lente objetiva de óleo de imersão (63x). * $P < 0.01$ vs BK 10^{-7} mol/L; # $P < 0.01$ vs AVE 0991, 10^{-8} mol/L. Valores expressos como porcentagem de liberação de NO em relação às células controle.

Tabela 1: Efeito da infusão de AVE 0991 sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em Ratos Wistar Não Anestesiados

EVIDÊNCIA DE POTENCIAÇÃO MAS-MEDIADA DA BRADICININA PELO AGONISTA NÃO PEPTÍDICO DE ANGIOTENSINA-(1-7) AVE 0991 EM RATOS NORMOTENSOS.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do análogo não peptídico de angiotensina-(1-7), AVE 0991, sobre a ação hipotensora da bradicinina (BK). Doses crescentes de BK foram administradas via intra-arterial ou endovenosa antes e 30 minutos após o início da infusão de AVE 0991, cujo efeito na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) plasmática foi testado, utilizando Hip-His-Leu como substrato. A interação de AVE 0991 com ECA *in vivo* foi testada através da determinação do seu efeito sobre a ação pressora da Ang I ou Ang II. AVE 0991 produziu potenciação significativa e similar da bradicinina intra-arterial ou endovenosa. AVE 0991 não inibiu atividade da ECA *in vitro* nem o efeito pressor da Ang I *in vivo*. A administração de N^ω – nitro L-arginina metil éster (L-NAME) ou D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A-779) aboliu o efeito de potenciação de BK pelo AVE 0991. Em uma análise mais refinada, a atividade potenciadora de BK por AVE 0991 foi examinada, avaliando seu efeito na produção de NO em células endoteliais isoladas de coelho. A liberação de NO foi medida, utilizando o diacetato de 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína. Observou-se um efeito sinérgico de AVE 0991 e BK na liberação de NO. Esses resultados sugerem que AVE 0991 potencia a BK através de um mecanismo mediado por receptor *Mas*, independente de ECA e dependente de NO. Esse efeito pode contribuir para a melhora da função endotelial por AVE 0991 *in vivo*.

Palavras chave: Bradicininina, angiotensina-(1-7), AVE 0991, óxido nítrico, função endotelial.

EVIDENCE FOR MAS-MEDIATED BRADYKININ POTENTIATION BY THE ANGIOTENSIN-(1-7) NONPEPTIDE MIMIC AVE 0991 IN NORMOTENSIVE RATS.

We have evaluated the effect of the nonpeptide mimic of angiotensin (Ang)-(1-7), AVE 0991, on the hypotensive effect of bradykinin (BK). Increasing doses of intra-arterial or intravenous BK were administered before and 30 minutes after the beginning of AVE 0991 infusion. The effect of AVE 0991 on plasma Ang I-converting enzyme (ACE) activity was tested using Hip-His-Leu as the substrate. The interaction of AVE 0991 with ACE *in vivo* was tested by determining its effect on the pressor action of Ang I or Ang II. AVE 0991 produced a significant and similar potentiation of intra-arterial or intravenous bradykinin. AVE 0991 did not inhibit plasma ACE activity *in vitro* or the pressor effect of Ang I *in vivo*. N^ω-nitro-L-arginine methyl ester or D-Ala⁷-Ang-(1-7) administration abolished the BK potentiating effect of AVE 0991. We further examined the BK-potentiating effect of AVE 0991, evaluating its effect on NO production in rabbit endothelial cells. The NO release was measured using the 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate. A synergistic effect of AVE 0991 and BK on NO release was observed. These results suggest that AVE 0991 potentiates BK through an ACE-independent, NO-dependent receptor Mas-mediated mechanism. This effect may contribute to the improvement of endothelial function by AVE 0991 *in vivo*.

Key Words: Bradykinin, angiotensin (1-7), AVE 0991, nitric oxide; endothelial function.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Sistema Renina-Angiotensina.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado o principal regulador fisiológico da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrolítico. Esse sistema é considerado um sistema endócrino, parácrino e autócrino modulador de funções em diversos tecidos (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000). As ações do SRA sobre as funções cardiovasculares e renais envolvem múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular diversos (Kim e Iwao, 2000; Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000).

Nas duas últimas décadas, a visão clássica do SRA foi submetida a importantes mudanças conceituais. Esse sistema não é mais visto como um sistema composto de apenas um hormônio efetor (Santos, Ferreira *et al.*, 2005). A angiotensina II (Ang II) é o principal componente do sistema renina-angiotensina (SRA). Usualmente esse octapeptídeo é formado através de duas etapas seqüenciais de proteólise limitada. Inicialmente ocorre clivagem do angiotensinogênio pela renina em angiotensina I (Ang I), que é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (Lentz, Skeggs *et al.*, 1956). Atualmente se aceita que Ang II pode ser formada a partir do angiotensinogênio ou Ang I através de vias independentes de renina/ECA, e que Ang I e Ang II podem ser convertidas em peptídeos angiotensinérgicos menores biologicamente ativos, incluindo Ang III, Ang IV e Ang-(1-7), resultando dessa maneira em múltiplos mediadores das ações biológicas do SRA (Santos, Ferreira *et al.*, 2005; Santos, Ferreira *et al.*, 2008),

Foram identificados, através de técnicas de biologia molecular e bioquímica, componentes do SRA em vários tecidos levando ao conceito de SRA tissulares ou mais apropriadamente, de sistemas locais produtores de angiotensina (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000).

1.2 Angiotensina - (1-7).

O estudo da Ang-(1-7) teve início com a observação ocasional de que adição de Ang I a homogenatos de tronco encefálico de cães resultava em

aparecimento de um pico em cromatograma de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que correspondia ao peptídeo Ang-(1-7). Além disso, quando o metabolismo de Ang I era medido em presença de inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA), a geração de Ang II era abolida, enquanto a geração de Ang-(1-7) não era afetada (Santos, Brosnihan *et al.*, 1988). Dessa forma, Santos e colaboradores aventaram a possibilidade de que Ang-(1-7) possuiria efeitos centrais ou periféricos seletivos. Contudo, essa hipótese contrariava o conceito, prevalente na época, de que peptídeos angiotensinérgicos, que não possuísem fenilalanina na oitava posição, seriam biologicamente inativos. Diante dessas controvérsias, Schiavone e colaboradores avaliaram o efeito biológico da Ang-(1-7) em explante de hipotálamo-neurohipofisário de ratos. Esses experimentos demonstraram que a Ang-(1-7) produzia secreção de vasopressina em explante neurohipofisário de forma equipotente à Ang II (Schiavone, Santos *et al.*, 1988).

Apesar das primeiras ações descritas para Ang-(1-7) indicarem que esse peptídeo mimetizava as ações da Ang II, incluindo liberação de prostanóides e vasopressina, posteriormente foi demonstrado que Ang-(1-7) era desprovida de efeito pressor e dipsinogênico após a administração periférica ou intra-cérebro-ventricular, para revisão ver (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000). Atualmente é considerado que esse heptapeptídeo exerce um papel predominantemente contra-regulador das ações da Ang II dentro do SRA (Ferrario, Chappell *et al.*, 1997; Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000; Santos, Ferreira *et al.*, 2005; Simoes E Silva, Pinheiro *et al.*, 2006; Santos, Ferreira *et al.*, 2008).

1.2.1. Síntese e catabolismo.

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo biologicamente ativo e seletivo do SRA, podendo ser formado independentemente da ação da ECA. A via independente da ECA corresponde à clivagem da ligação Pro⁷-Phe⁸ da Ang I pelas enzimas PEP e endopeptidase neutra 24.11 (NEP) (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000). A Ang-(1-7) é formada diretamente da Ang II pela ação da prolilendopeptidase (PEP) ou carboxipeptidases como a prolilcarboxipeptidase (PCP) (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Tipnis, Hooper *et al.*, 2000;

Vickers, Hales *et al.*, 2002). A ECA2 também cliva menos eficientemente Ang I em Ang-(1-9) (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Vickers, Hales *et al.*, 2002) podendo originar subsequentemente Ang-(1-7) através de hidrólise pela ECA ou neprilisina (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Ferreira e Santos, 2005; Santos, Ferreira *et al.*, 2005; Simoes E Silva, Pinheiro *et al.*, 2006). Uma vez formada, Ang-(1-7) é rapidamente hidrolisada especialmente pela ECA (Chappell, Pirro *et al.*, 1998; Deddish, Marcic *et al.*, 1998). Ang-(1-7) também pode ser hidrolisada por aminopeptidases, gerando Ang-(2-7) e Ang-(3-7) (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000). Assim, o nível circulante de Ang-(1-7) que é similar ao nível de Ang II, aumenta 5 a 25 vezes em presença de inibição da ECA (Lawrence, Evin *et al.*, 1990; Kohara, Brosnihan *et al.*, 1993; Ferrario, Martell *et al.*, 1998; Campbell, 2003) provavelmente devido a aumento da concentração de Ang I e diminuição da degradação de Ang-(1-7). Simões e Silva *et al.* reportaram que em crianças hipertensas com doença renal crônica o tratamento com iECA aumentou 1,4 vezes a concentração plasmática de Ang-(1-7) e diminuiu 2,4 vezes a Ang II (Simoes E Silva, Pinheiro *et al.*, 2006). Deddish e colaboradores demonstraram que Ang-(1-7) é substrato do centro ativo N-terminal da ECA, enquanto inibe predominantemente o centro ativo C-terminal da ECA (Deddish, Marcic *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que Ang-(1-7) inibe ECA canina purificada (Li, Chappell *et al.*, 1997). A observação de que níveis de Ang-(1-7) podem aumentar após administração crônica de bloqueadores do receptor subtipo AT₁ (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000; Simoes E Silva, Diniz *et al.*, 2006; Santos, Ferreira *et al.*, 2008) levanta a possibilidade de que Ang-(1-7) contribua para os efeitos farmacológicos dos inibidores de ECA e antagonistas AT₁. Reforçando essa hipótese, Iyer e colaboradores demonstraram que anticorpo monoclonal contra Ang-(1-7), assim como inibidores da NEP aumentam a pressão sanguínea, durante o bloqueio do SRA em SHR (Iyer, Chappell *et al.*, 1998; Iyer, Ferrario *et al.*, 1998).

1.2.2. ECA2 e Ang-(1-7)

ECA2 é uma zinco-metaloprotease recentemente descrita que apresenta um único domínio catalítico que é aproximadamente 40% idêntico ao observado na ECA (Tipnis, Hooper *et al.*, 2000). Uma importante diferença

observada entre essas duas enzimas é que ECA2 não pode ser bloqueada pelos clássicos inibidores da ECA (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Tipnis, Hooper *et al.*, 2000). ECA2 inicialmente foi descrita como sendo predominantemente expressa no endotélio de coração, rim e testículos (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000). Harmer e colaboradores realizaram um perfil da expressão de RNAm da ECA2 humana e confirmaram que essa enzima é altamente expressa nesses locais, todavia ECA2 também é altamente expressa no sistema gastrointestinal, incluindo íleo, duodeno, jejuno, ceco e cólon (Harmer, Gilbert *et al.*, 2002). Recentemente foi reconhecido que a distribuição da ECA2 no organismo é mais ubíqua do que previamente esperado. Entretanto, o padrão de expressão de ECA2 se mostrou menos difuso e marcadamente diferente do da ECA em roedores (Kostenis, Milligan *et al.*, 2005). ECA2 aparentemente exerce importante papel sobre a função cardíaca, através da regulação endógena do SRA, no qual contrabalança as ações da ECA (Crackower, Sarao *et al.*, 2002). Ishiyama e colaboradores demonstraram que RNAm da ECA2 aumenta em miocárdio viável após infarto em ratos com bloqueio de receptores AT₁, correlacionando-se com a elevação da concentração plasmática da Ang-(1-7) (Ishiyama, Gallagher *et al.*, 2004). Esses dados reforçam a possível participação desse peptídeo nos efeitos cardiovasculares produzidos por terapia com antagonista AT₁. Em síntese, ECA2 provavelmente exerce papel central na fisiopatologia do SRA, pois pode degradar Ang II, um peptídeo vasoconstritor e produzir Ang-(1-7), um peptídeo vasodilatador (Ferrario, 2006).

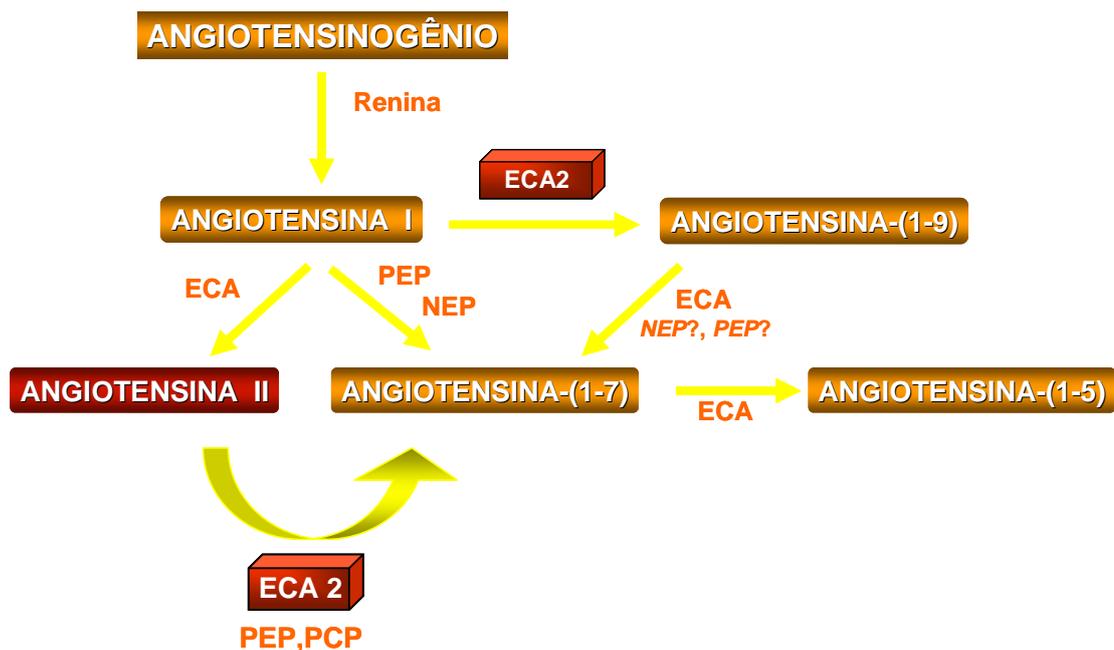


Figura 1. Ilustração simplificada das vias de formação de Ang-(1-7).

1.2.3. Angiotensina-(1-7) e receptor Mas

A seletividade da Ang-(1-7) é atribuída à ausência do aminoácido fenilalanina na posição C-terminal (Khosla, Hall *et al.*, 1974; Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000). Esse heptapeptídeo possui afinidade muito baixa para receptores AT_1 (ao menos 150 vezes menor que Ang II) e afinidade ainda menor para receptores AT_2 (cerca de 1000 vezes menor que Ang II) tornando difícil atribuir algumas de suas ações à ligação com esses subtipos de receptores angiotensinérgicos (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000).

Estudos, utilizando o antagonista seletivo de angiotensina-(1-7), [D-Ala⁷]-Ang-(1-7) (A-779), forneceram evidências da existência de um receptor de Ang-(1-7) distinto dos receptores clássicos de Ang II, AT_1 e AT_2 (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 1994; Santos, Simoes E Silva *et al.*, 1996). A-779 é uma forma modificada da Ang-(1-7) na qual a prolina na sétima posição é substituída por D-Ala. A-779 bloqueia seletivamente as respostas a Ang-(1-7), é um fraco competidor do receptor AT_1 ou AT_2 , não bloqueia as respostas hipertensora e vasoconstritora da Ang II (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 1994).

Mais recentemente, Santos e colaboradores identificaram o receptor órfão Mas como sítio de ligação funcional para Ang-(1-7) (Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003). Deleção genética do receptor acoplado à proteína G codificado pelo Mas protooncogene aboliu a ligação de Ang-(1-7) em rim de camundongos, a ação antidiurética de Ang-(1-7) após uma sobrecarga hídrica aguda e a resposta vasodilatadora induzida por Ang-(1-7) em aorta (Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003). Nesse trabalho foi demonstrado que Ang-(1-7) se liga a células transfectadas com o gene para o receptor Mas, nas quais induz liberação de ácido araquidônico. A partir dessa descoberta foi demonstrado que a redução do crescimento em cardiomiócitos dependente de Ang-(1-7) é mediada pelo receptor Mas (Tallant, Ferrario *et al.*, 2005).

A recente caracterização do receptor Mas órfão, acoplado à proteína G como receptor de Ang-(1-7), envolvido na maior parte de suas ações biológicas (Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003) e da enzima homóloga à enzima conversora de angiotensina (ECA), a ECA 2, como a principal formadora de Ang-(1-7) (Donoghue, Hsieh *et al.*, 2000; Tipnis, Hooper *et al.*, 2000), proporcionou maior suporte para o conceito de que a Ang-(1-7) é um componente biologicamente ativo do SRA. Além disso, existe evidência crescente do papel da Ang-(1-7) como um peptídeo contra-regulador através da oposição aos efeitos cardiovasculares da Ang II, especialmente vasoconstrição e proliferação, para revisão ver (Santos, Ferreira *et al.*, 2005; Ferrario, 2006). Dessa forma está clara a existência de um eixo do SRA formado por ECA2-Ang-(1-7)-Mas que geralmente se opõe aos efeitos elicitados pelo eixo clássico ECA-Ang II-AT₁ possuindo um papel contra-regulatório nesse sistema (Santos, Ferreira *et al.*, 2005).

1.2.4. Ações da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular

Estudos *in vivo*, que demonstraram os efeitos da Ang-(1-7) no controle central do barorreflexo (Campagnole-Santos, Heringer *et al.*, 1992) e circulação sistêmica (Benter, Diz *et al.*, 1993), forneceram evidências preliminares de que a Ang-(1-7) exerceria ações opostas e antagônicas à Ang-II.

1.2.4.1. Ações nos vasos sanguíneos

Células endoteliais são um dos sítios onde a Ang-(1-7) exerce seus efeitos (Brosnihan, Li *et al.*, 1996; Le Tran e Forster, 1997; Lemos, Cortes *et al.*, 2002). De acordo com essa evidência foi reportado que as células endoteliais representam importante local de formação (Campagnole-Santos, Heringer *et al.*, 1992) e metabolismo da Ang-(1-7) (Chappell, Pirro *et al.*, 1998).

As ações da Ang-(1-7) são compostas de ativação de mecanismos de vasodilatação periférica e efeitos antitróficos mediados por inibição de síntese de proteínas. Foi demonstrado que Ang-(1-7) produz relaxamento em vários leitos vasculares incluindo anéis aórticos de ratos Sprague-Dawley (Le Tran e Forster, 1997) e de ratos transgênicos mRen-2 (Almeida, Cortes *et al.*, 2002), artérias coronarianas de cães (Brosnihan, Li *et al.*, 1996) e porcos (Porsti, Bara *et al.*, 1994; Gorelik, Carbini *et al.*, 1998), artéria cerebral média de cão (Feterik, Smith *et al.*, 2000), artéria pial de porcos (Meng e Busija, 1993), vasos sistêmicos de felinos (Osei, Ahima *et al.*, 1993), arteríola aferente renal de coelho (Ren, Garvin *et al.*, 2002), e microvasos mesentéricos de ratos normotensos (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001) e hipertensos (Oliveira, Fortes *et al.*, 1999). Em ratos anestesiados, Ang-(1-7) induz vasodilatação em vários territórios vasculares e aumento do volume sistólico e do débito cardíaco (Sampaio, Nascimento *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstraram que Ang-(1-7) potencia vasodilatação eletro-estimulada em corpos cavernosos de ratos via facilitação de liberação de NO (Da Costa Goncalves, Leite *et al.*, 2007). Em vasos humanos, foram descritos resultados contraditórios, enquanto Sasaki e colaboradores demonstraram vasodilatação em antebraço de humanos (Sasaki, Higashi *et al.*, 2001), Davie e Mc Murray (Davie e McMurray, 1999) não observaram efeito da Ang-(1-7) nesse mesmo território em pacientes tratados com iECA.

Vários estudos demonstraram que as ações da Ang-(1-7) parecem envolver produção aumentada de prostanóides vasodilatadores (Jaiswal, Diz *et al.*, 1992; Jaiswal, Jaiswal *et al.*, 1993; Brosnihan, Li *et al.*, 1996), óxido nítrico (Osei, Ahima *et al.*, 1993; Seyedi, Xu *et al.*, 1995; Li, Chappell *et al.*, 1997; Heitsch, Brovkovich *et al.*, 2001) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001). De acordo com efeito vasodilatador, infusão

crônica de Ang-(1-7) reduziu a pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Benter, Diz *et al.*, 1993).

Uma importante ação cardiovascular da BK está relacionada a sua atividade potenciadora de BK que contribui para os efeitos dos iECA (Paula, Lima *et al.*, 1995); Santos, Passaglio *et al.*, 2001). Cross-talk entre sistemas prostaglandinas-BK-NO e Ang-(1-7) sugere que uma interação multifacetada entre eles é importante para um arranjo amplo das funções fisiológicas do organismo (Ferrario, 2006). Nesse contexto, estudos em humanos e animais mostraram que as ações antihipertensivas de iECA correlacionam-se a aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Ferrario, Martell *et al.*, 1998; Campbell, 2003; Simoes E Silva, Diniz *et al.*, 2006).

Ressalta-se ainda que, em relação ao crescimento de células do músculo liso vascular, Ang II e Ang (1-7) mostram efeitos opostos. Assim, Ang-(1-7) foi descrita como peptídeo antiproliferativo pela primeira vez por Freeman e colaboradores (Freeman, Chisolm *et al.*, 1996). Os autores aventaram a participação do heptapeptídeo nos efeitos antiproliferativos das prostaglandinas, uma vez que Ang-(1-7) libera PGI₂ e PGE₂ de células de músculo liso vascular (Tallant, Diz *et al.*, 1999). Nesse estudo, foi utilizada medida de incorporação de timidina triciada em células de músculo liso vascular aórtico de rato em presença ou ausência de vários mitógenos. A quantidade de incorporação de timidina foi aumentada com tratamento com soro fetal bovino (FBS), fator derivado de plaquetas ou Ang II. Na presença de Ang-(1-7) a incorporação de timidina em resposta a FBS, fator derivado de plaquetas e Ang II foi significativamente atenuada de maneira dose-dependente. Em presença de Ang II, a incorporação de timidina triciada aumentou significativamente. Efeito esse inibido por antagonista de receptor AT₁, mas não alterado por antagonista de receptor AT₂. Atenuação da incorporação de timidina estimulada por soro não se alterou por antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂. No entanto, [Sar¹,Ile⁸]Ang II e [Sar¹, Thr⁸]Ang II foram antagonistas efetivos dessa resposta, indicando que a inibição de crescimento por Ang-(1-7) é resultado de ativação de receptor de angiotensina. Além disso, a infusão crônica de Ang-(1-7) reduz a formação neoíntima, quando em concentrações duas vezes maior que o controle, sem alterar a pressão arterial (Strawn, Ferrario *et al.*, 1999). Esses dados em conjunto

sugerem que um balanço entre as concentrações teciduais de Ang II e Ang-(1-7) é crítico para a manutenção, em longo prazo da estrutura vascular. Assim, o SRA possui um mecanismo envolvido no controle intrínseco das ações estimulantes da Ang II na regulação aguda e crônica da pressão arterial e do crescimento vascular.

Recentemente foi demonstrado que Ang-(1-7) inibe crescimento vascular através de eventos intracelulares mediados por prostaglandinas que incluem produção de AMPc e redução da atividade ERK $\frac{1}{2}$ estimulada por Ang II (Tallant e Clark, 2003; Ferreira e Santos, 2005). Pelo fato dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) estarem aumentados em animais e pacientes tratados com iECA, acredita-se que a Ang-(1-7) participe dos efeitos antiproliferativos em vasos sanguíneos (Tallant, Diz *et al.*, 1999). Além disso, Ang-(1-7) inibe o crescimento de miócitos cardíacos (Tallant, Ferrario *et al.*, 2005), apresenta efeito anti-trombótico (Kucharewicz, Pawlak *et al.*, 2002; Fraga-Silva, Pinheiro *et al.*, 2008) e anti-angiogênico (Machado, Santos *et al.*, 2001).

Diante do evidente contraste entre os pronunciados efeitos da Ang-(1-7) e sua ação pouco relevante na pressão arterial (Benter, Diz *et al.*, 1993; Braga, Da Silva Lemos *et al.*, 2002). Sampaio e colaboradores (Sampaio, Nascimento *et al.*, 2003) avaliaram, através do uso de microesferas fluorescentes, o papel da Ang-(1-7) na regulação hemodinâmica sistêmica e regional em ratos anestesiados. Foi demonstrado que a infusão de baixas doses de Ang-(1-7) aumentava significativamente o fluxo sanguíneo em rim, mesentério, cérebro e pele. Além disso, a Ang-(1-7) produziu aumento de 30% do débito cardíaco (DC) e diminuição de aproximadamente 26% na resistência vascular periférica total (RVPT). O fluxo sanguíneo esplênico, em músculos, pulmões e adrenais, bem como a pressão arterial sistêmica e a frequência cardíaca não foram alterados com a dose de Ang-(1-7) utilizada (330 fmol/ Kg/ min, ex, ~0.3 ng/ K/ min). A-779 bloqueou a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) em leito vascular renal, mesentérico e cutâneo. Por outro lado os efeitos da Ang-(1-7) sobre o fluxo sanguíneo cerebral, o DC, o volume sistólico e a RVPT não foram totalmente bloqueados pelo A-779. Assim Ang-(1-7) possui importante papel no controle da distribuição do fluxo sanguíneo. A modulação do tônus vascular por

esse peptídeo é complexa e provavelmente dependente do leito vascular investigado (Santos, Ferreira *et al.*, 2008).

1.2.4.2. Ações no coração.

Santos e colaboradores reportaram pela primeira vez a presença e geração local de Ang-(1-7) no miocárdio de cães (Santos, Brum *et al.*, 1990).

Estudos recentes sugeriram que esse heptapeptídeo exerce ação cardioprotetora (Ferreira, Santos *et al.*, 2001; Loot, Roks *et al.*, 2002). Em coração isolado, a Ang-(1-7) produziu uma redução significativa das arritmias de reperfusão e da disfunção sistólica cardíaca e esse efeito foi bloqueado por A-779 (Ferreira, Santos *et al.*, 2001). Loot e colaboradores demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) restaura contratilidade cardíaca, preserva a perfusão coronariana e melhora a função endotelial em modelo de insuficiência cardíaca em ratos pós infarto do miocárdio (Loot, Roks *et al.*, 2002). Os mecanismos envolvidos nessas ações incluem, ao menos em parte, liberação de prostanóides, NO, e BK (Ferreira e Santos, 2005). A possibilidade de influência direta da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca foi reforçada pela observação de que camundongos com deleção do gene para ECA2, enzima que forma Ang-(1-7) a partir de Ang II, apresentavam disfunção cardíaca grave (Crackower, Sarao *et al.*, 2002). O coração foi o primeiro órgão onde se avaliou a interação da ECA2 e Ang-(1-7), pois miócitos expressavam componentes do sistema (Averill, Ishiyama *et al.*, 2003). O gene da ECA2 é abundante em coração de rato (Kostenis, Milligan *et al.*, 2005). Paralelamente o heptapeptídeo revertia lesão de arritmia de reperfusão em corações isolados de ratos (Ferreira, Santos *et al.*, 2001; Santos, Ferreira *et al.*, 2004). Além disso, a expressão de ECA2 cardíaca é aumentada através de tratamento com antagonistas de receptores AT₁ em ratos pós-infarto (Ishiyama, Gallagher *et al.*, 2004) e em ventrículos de pacientes com insuficiência cardíaca (Zisman, Keller *et al.*, 2003; Goulter, Goddard *et al.*, 2004). Utilizando ratos transgênicos, TGR(A1-7)3292, que expressam proteína de fusão produtora de Ang-(1-7), Santos e colaboradores, em 2004, demonstraram que Ang-(1-7) melhora performance cardíaca do coração normal e pós isquêmico, além de reduzir incidência de fibrose no modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (Santos, Ferreira *et al.*, 2004). Mais recentemente foi evidenciada disfunção cardíaca *in*

vitro e *in vivo* em camundongos com deleção para o gene do receptor *Mas* (Santos, Castro et al., 2006). As alterações cardíacas podem ser parcialmente explicadas por um perfil de distribuição de colágeno pró-fibrótico em camundongos geneticamente modificados. Dessa forma, o eixo A-(1-7)/ ECA2 exerce importante função local no controle cardíaco (Ferrario, 2006).

1.3 AVE 0991.

Recentemente, Wiemer e colaboradores identificaram e descreveram um composto não peptídico ativo por via oral, AVE 0991, que mostrou evocar efeitos similares ao da Ang-(1-7) (Wiemer, Dobrucki *et al.*, 2002).

AVE 0991 é um derivado imidazólico substituído, tem um peso molecular de 580.73 e é solúvel em substâncias aquosas alcalinas ou solventes orgânicos (Santos, Castro *et al.*, 2006).

Em células endoteliais aórticas bovinas, AVE 0991 liberou NO e em menor extensão superóxido (Wiemer, Dobrucki *et al.*, 2002). Esse efeito foi totalmente bloqueado pelo inibidor da NO sintase (L-NMMA), pelo antagonista de receptor B₂ de BK (HOE 140) e também parcialmente bloqueado pelo antagonista do receptor *Mas* da Ang-(1-7) (A-779). AVE e Ang-(1-7) não marcada competiram com alta afinidade pela ligação de ¹²⁵I-Ang-(1-7) em membranas de células endoteliais aórticas bovinas. Esses dados sugeriram que esse composto mimetiza os efeitos da Ang-(1-7) no endotélio provavelmente através de uma ativação da NO sintase endotelial e pela interação com cininas (Wiemer, Dobrucki *et al.*, 2002).

Posteriormente foi demonstrado que AVE desloca a ligação de ¹²⁵I-Ang-(1-7) em fatias de rim de camudongos e a ligação de ¹²⁵I-Ang-(1-7) e/ou da Rodamina-Ang-(1-7) em células ovarianas de hamster transfectadas com gene para o receptor *Mas* (CHO-*Mas*). Nesse estudo, AVE 0991 induziu liberação de NO em células CHO-*Mas* que foi abolida por A-779, mas não pelos antagonistas AT₁ (CV11974) ou AT₂ (PD123319) (Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004).

AVE e Ang-(1-7) induziram efeito vasodilatador equipotente em anéis aórticos de camundongos. Esse efeito foi abolido em camundongos com deleção do gene do receptor *Mas* e em camundongos selvagens com endotélio

desnudado. A vasodilatação foi farmacologicamente abolida por antagonistas de Ang-(1-7) [A-779 e D-Pro7-Ang-(1-7)] e pela inibição da produção de NO (Lemos, Silva *et al.*, 2005). Em conjunto esses trabalhos evidenciam que AVE 0991 age como agonista de receptor Mas (Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004; Lemos, Silva *et al.*, 2005). De acordo com a atividade liberadora de NO da Ang-(1-7) e de AVE 0991 (Porsti, Bara *et al.*, 1994; Brosnihan, Li *et al.*, 1996; Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004; Lemos, Silva *et al.*, 2005; Botelho-Santos, Sampaio *et al.*, 2007), nosso laboratório demonstrou recentemente que infusão aguda de Ang-(1-7) ou AVE 0991 potencia a vasodilatação produzida pela injeção intra-arterial de acetilcolina (ACh) sugerindo melhora da função endotelial (Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005). Esse efeito foi bloqueado pelo do inibidor de NO sintase ou por meio do antagonista do receptor Mas (A-779). Adicionalmente, foi demonstrado que AVE possui efeitos protetores qualitativamente comparáveis aos da Ang-(1-7) em ratos SHR tratados com L-NAME. O heptapeptídeo e seu agonista não peptídico AVE 0991 preveniram lesão em órgãos alvo, tais como coração, rim e vasos mesentéricos (Benter, Diz *et al.*, 1993).

Agonistas do receptor de Ang-(1-7) estão sendo considerados como possíveis alvos para a síntese de drogas cardiovasculares para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca, aterosclerose e várias outras doenças envolvidas na disfunção endotelial (Santos, Ferreira *et al.*, 2005). Dessa forma AVE 0991 consiste em uma poderosa ferramenta para estudos de novas possibilidades terapêuticas no das doenças cardiovasculares.

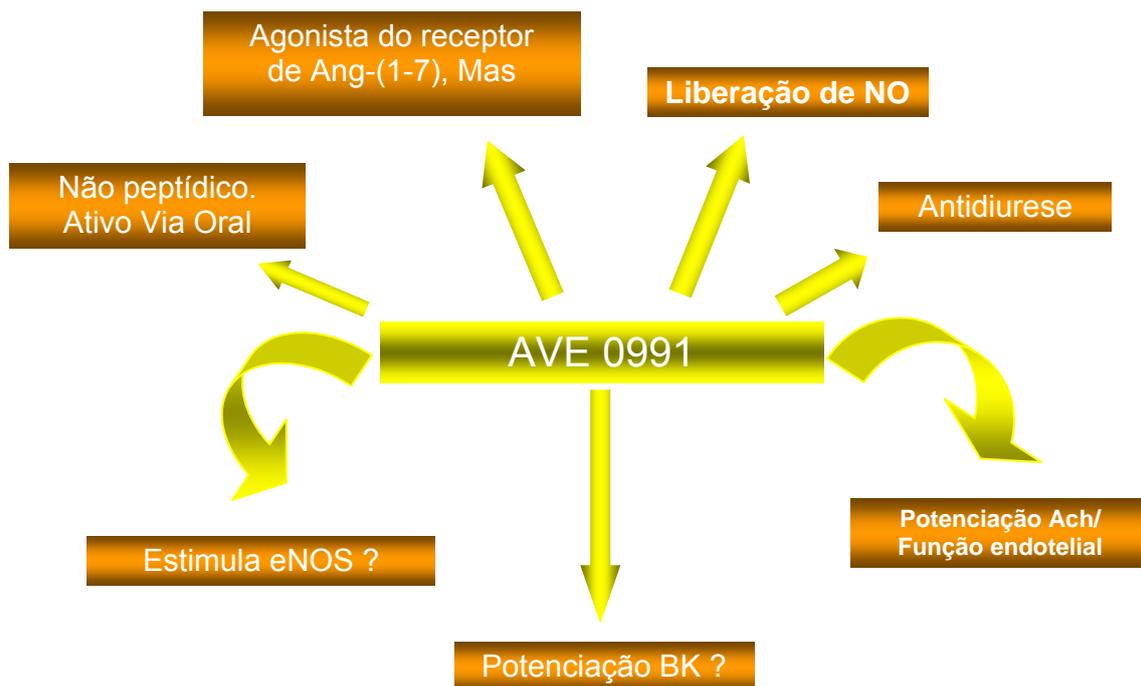


Figura 2. Ações do AVE 0991.

1.4 Interação entre angiotensina-(1-7) e a bradicinina.

O principal ponto de cruzamento entre o sistema renina-angiotensina e o sistema caliceína-cinina é a ECA (ou cininase II) que é também eficiente para o metabolismo de cininas (Erdos, 1975). A ECA é uma dipeptidil-carboxipeptidase, que pode tanto degradar BK quanto gerar angiotensina II.

A bradicinina é um nonapeptídeo endógeno que promove vasodilatação dependente de fatores endoteliais tais como NO, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e das prostaglandinas (Linz, Wiemer *et al.*, 1995; Linz, Wohlfart *et al.*, 1999). BK é gerada diretamente do cininogênio pela caliceína ou via calidina (Figura 3). *In vivo* BK é rapidamente degradada (meia vida menor que 0.5 minutos) por cininases, sobretudo as metalopeptidases ECA e NEP, aminopeptidase P e carboxipeptidases M e N (Tom, Dendorfer *et al.*, 2003). As cininas são sintetizadas não só na circulação, como também localmente nos tecidos e provavelmente agem principalmente como fatores hormonais locais, através de mecanismos autócrinos e parácrinos (Linz, Wiemer *et al.*, 1995). BK exerce suas ações através de ligação a receptores B₁

e B₂, ambos acoplados a proteína G. Receptores B₂ são expressos constitutivamente em variedade de células incluindo células endoteliais, células de músculo liso vascular e cardiomiócitos. Receptores B₁ são fracamente detectáveis em condições fisiológicas, mas fortemente expressos em estados patológicos como lesão tecidual e estress (Linz, Wiemer *et al.*, 1995; Tom, Dendorfer *et al.*, 2003). Ativação de receptor B₂ endotelial leva à formação de NO, prostaciclina (PGI₂) e fator ativador de plaquetas, exercendo efeitos protetores através da ativação dessas vias de transdução de sinal que geram segundos-mensageiros como monofosfato de guanosina cíclico (GMP) e monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) (Linz, Wiemer *et al.*, 1995). Os receptores B₂ medeiam efeitos contráteis e inotrópicos no músculo liso vascular e em cardiomiócitos, respectivamente. Adicionalmente, ativação de receptor B₂ tem sido associada a efeitos anti-hipertróficos e/ou antiproliferativos em cardiomiócitos e fibroblastos. Os receptores B₁, uma vez induzidos por mediadores inflamatórios e lesão tecidual, assumem algumas das propriedades hemodinâmicas dos receptores B₂, como a vasodilatação. É importante notar que BK e calidina apresentam menor afinidade para receptores B₁ do que para receptores B₂, sendo que seus metabólitos, Des-Arg⁹-BK e Des-Arg¹⁰-calidina, devem atuar como agonistas do receptor B1 (Tom, Dendorfer *et al.*, 2003).

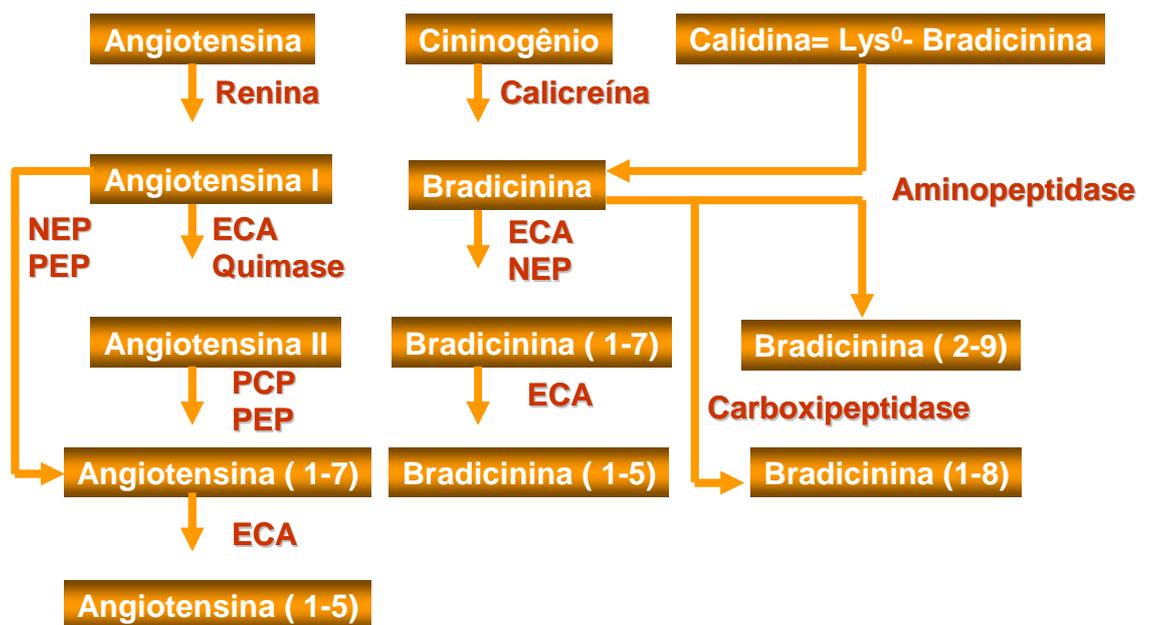


Figura 3. Síntese e metabolismo de angiotensinas e bradicinina.

Ang-(1-7) aumenta os efeitos da BK em uma variedade de modelos (Santos, Passaglio *et al.*, 2001) incluindo ratos normotensos e hipertensos em modelo de animais intactos (Paula, Lima *et al.*, 1995; Lima, Paula *et al.*, 1997), ou *in situ* em microvasos mesentéricos (Oliveira, Fortes *et al.*, 1999; Fernandes, Fortes *et al.*, 2001), em vasos coronarianos de cães (Brosnihan, Li *et al.*, 1996; Li, Chappell *et al.*, 1997), de porco (Gorelik, Carbini *et al.*, 1998; Tom, De Vries *et al.*, 2001) e de ratos (Almeida, Frabregas *et al.*, 2000). Vale ressaltar que, venoconstrição produzida por BK em endotélio desnudado de veia femoral em coelhos também foi potenciada por BK, indicando que a atividade potenciadora de BK da Ang-(1-7) não é um fenômeno exclusivamente endotélio-dependente (Hecker, Blaukat *et al.*, 1997). Também foi descrita a atividade potenciadora da Ang-(1-7) em outras preparações, como na liberação de ácido araquidônico induzida por BK em células ovarianas de hamster (CHO) co-transfectadas com cDNA humano para receptor B₂ de BK e ECA (Deddish, Marcic *et al.*, 1998). Além disso, a interação da Ang-(1-7) com BK foi demonstrada na modulação central do barorreflexo (Bomtempo, Santos *et al.*, 1998). Assim como foi documentado para vasodilatação produzida pela Ang-(1-7), a atividade potenciadora de BK pela Ang-(1-7) é controversa em humanos. Ueda *et al.* reportaram potenciação da BK em antebraço humano (Ueda, Masumori-Maemoto *et al.*, 2001), enquanto Wilsdorf *et al.* não conseguiram demonstrar nenhum efeito em doses suprafisiológicas (Wilsdorf, Gainer *et al.*, 2001).

O mecanismo da atividade potenciadora de BK da Ang-(1-7) é complexo. Ang-(1-7) não ativa diretamente o receptor B₂ de BK, mas sim amplifica os efeitos da BK via interação não hidrolítica com ECA (Deddish, Marcic *et al.*, 1998; Erdos, Jackman *et al.*, 2002), inibição da ECA (Li, Chappell *et al.*, 1997; Chappell, Pirro *et al.*, 1998; Tom, Dendorfer *et al.*, 2003) e através de liberação de prostaglandinas (Paula, Lima *et al.*, 1995; Oliveira, Fortes *et al.*, 1999; Almeida, Frabregas *et al.*, 2000; Fernandes, Fortes *et al.*, 2001), NO (Li, Chappell *et al.*, 1997; Oliveira, Fortes *et al.*, 1999; Almeida, Frabregas *et al.*, 2000; Heitsch, Brovkovich *et al.*, 2001) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001). É importante ressaltar que a inibição da ECA não é o principal mecanismo de ação potenciadora de BK em ratos

Wistar normotensos (Paula, Lima *et al.*, 1995; Lima, Paula *et al.*, 1997) e em leito mesentérico de ratos normotensos *in situ* (Oliveira, Fortes *et al.*, 1999), pois nesses estudos a inibição da ECA facilitou o efeito potenciador de BK pela Ang-(1-7). Além disso, em microvasculatura de leito mesentérico de ratos espontaneamente hipertensos, inibidor de ECA não impediu atividade potenciadora de BK pela Ang-(1-7), novamente apontando contra a hipótese do envolvimento da inibição da ECA nesse efeito (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001). Em contraste, em vasos coronarianos isolados de cães, lisinopril aboliu a atividade potenciadora de BK pela Ang-(1-7) (Li, Chappell *et al.*, 1997). Acredita-se que a Ang-(1-7) aumente o efeito hipotensor de BK preferencialmente através da modulação de um possível *crosstalk* entre receptores ou cascatas de sinalização/fosforilação intracelular do que via prevenção da degradação da BK pela ECA (Deddish, Marcic *et al.*, 1998; Marcic, Deddish *et al.*, 1999; Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000; Erdos, Jackman *et al.*, 2002; Santos, Ferreira *et al.*, 2005). Erdos e colaboradores demonstraram que Ang-(1-7) aumenta a afinidade do receptor B₂ por BK ou seus análogos resistentes a ECA de forma similar em células que expressam ECA e receptor B₂ (Deddish, Marcic *et al.*, 1998; Marcic, Deddish *et al.*, 1999). De acordo com o conceito de *crosstalk*, ocorreria modificação alostérica da estrutura do receptor B₂, potenciando a atividade dos ligantes, além de ressensibilizar o receptor, após o mesmo ser dessensibilizado por um agonista (Erdos, Jackman *et al.*, 2002). A atividade de potenciação de BK, ao menos em ratos espontaneamente hipertensos e Wistar, parece ser um evento mediado por receptor Mas, uma vez que é bloqueado em presença de A-779 (Lima, Paula *et al.*, 1997; Oliveira, Fortes *et al.*, 1999; Fernandes, Fortes *et al.*, 2001), o antagonista seletivo para o receptor Mas de Ang-(1-7) (Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003). No entanto, em ratos Sprague-Dawley outros mecanismos estão aparentemente envolvidos (Lemos, Cortes *et al.*, 2002; Greco, Master *et al.*, 2006; Silva, Vianna *et al.*, 2007). Dessa forma, a contribuição relativa de cada um desses mecanismos, varia dependendo do leito vascular, da espécie estudada e provavelmente do diâmetro dos vasos avaliados. Também é importante citar a ausência de potenciação da BK observada com altas doses de Ang-(1-7) (Oliveira, Fortes *et al.*, 1999; Fernandes, Fortes *et al.*, 2001). Uma curva dose-resposta para Ang-(1-7) em forma de sino, cujo mecanismo ainda

desconhecido, também foi descrito em outras preparações (Muthalif, Benter *et al.*, 1998; Almeida, Frabregas *et al.*, 2000). Outro mecanismo de interação entre Ang-(1-7) e BK, documentada em vasos sanguíneos, é a mediação das ações vasculares da Ang-(1-7) por cininas (Brosnihan, Li *et al.*, 1996; Abbas, Gorelik *et al.*, 1997; Li, Chappell *et al.*, 1997; Bomtempo, Santos *et al.*, 1998; Gorelik, Carbini *et al.*, 1998; Feterik, Smith *et al.*, 2000). Nesses estudos, a contribuição das cininas para ação da Ang-(1-7) foi avaliada através da utilização do antagonista de receptor B₂ de BK, HOE 140. Assim, essa abordagem não exclui a possibilidade da potenciação de cininas endógenas por Ang-(1-7) ou por mecanismo de *crosstalk* dependente de receptores B₂ de BK desocupados. Adicionalmente, a observação recente de que o antagonista do receptor *Mas* de Ang-(1-7), A-779, reverte a potenciação da BK por enalapril ou enalaprilato em microvasos mesentéricos (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001) ou atenua a potenciação da resposta hipotensora da BK em ratos tratados com captopril (Maia, Ramos *et al.*, 2004), indica que mecanismos relacionados à Ang-(1-7) estejam envolvidos de maneira importante nos efeitos cardiovasculares dos inibidores de ECA (Linz, Wohlfart *et al.*, 1999).

Considerando que outros peptídeos angiotensinérgicos, produzidos pela hidrólise enzimática da Ang-(1-7), podem potencializar BK (Paula, Lima *et al.*, 1999), seria importante determinar o efeito do agonista não peptídico, AVE 0991, no efeito da BK e se essa atividade potenciadora pode ser bloqueada pelo antagonista do receptor *Mas* da Ang-(1-7), A779.

Nesse estudo, foram abordados esses aspectos através da determinação do efeito do AVE 0991 no efeito hipotensor da BK e através da avaliação do papel do receptor *Mas* e do NO.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do AVE 0991, análogo sintético não peptídico de Angiotensina-(1-7), sobre a ação vasodilatadora da Bradicinina (BK) em ratos Wistar normotensos.

2.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar o papel do NO na interação entre o AVE 0991 e BK *in vivo* e *in vitro*.
- B) Avaliar a participação do receptor Mas na interação entre AVE 0991 e BK.
- C) Avaliar o efeito do AVE 0991 sobre a atividade da ECA *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 MATERIAIS.

3.1.1 Animais.

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 230-330g, mantidos sob dieta normal e com livre acesso à água, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG. O protocolo foi aprovado pelo CETEA, registro 040/05.

3.1.2 Drogas.

Ang I, Ang II, BK, L-NAME, A-779 e AVE 0991 foram dissolvidos em salina isotônica (NaCL 0.9%), imediatamente antes do uso. Ang I, Ang II e A-779 foram fornecidos pela Bachem. BK e L-NAME foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. AVE 0991 foi fornecido pela Aventis Pharma.

3.1.2 Sistema de Aquisição de Dados.

Os parâmetros avaliados nos protocolos experimentais *in vivo*, pressão arterial e frequência cardíaca, foram monitorados por um transdutor conectado ao animal e a um computador através de um sistema de aquisição de dados. (MP-150, BIOPAC Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA)

3.1.3 Células endoteliais da aorta de coelho (RECs).

As células REC foram cedidas pela professora Dra. Helena Bonciani Nader da Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica.

3.1.4 Material de cultura celular.

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DEMEM/F12, Gibco, Invitrogen Corporation).
- *Hanks'balanced salts* (HBSS, Sigma Aldrich, Inc., USA).
- Solução Tripsina/EDTA 250 mg% (Cultilab Mat. Cult. Cel LTDA, Brasil).
- Soro fetal bovino i(FBS, Cultilab Mat. Cult. Cel LTDA, Brasil).

- Penicilina/ estreptomicina/ anfotericina B (Cultilab Mat. Cult. Cel LTDA, Brasil).

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 Protocolos Experimentais *in vivo*.

a) Procedimentos Cirúrgicos.e Parâmetros Avaliados

Vinte e quatro a quarenta e oito horas antes dos experimentos, sob anestesia por tribromoetanol 2,5 % (1mL/ 100g peso corporal) intraperitoneal, catéteres de polietileno (PE-10 fundido a PE-50) foram introduzidos na aorta descendente, através da artéria carótida esquerda, para a injeção intra-arterial de drogas. A correta posição do cateter era verificada em análise *post-mortem*. Outros cateteres foram implantados na aorta abdominal (via artéria femoral esquerda), para a medida de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), na veia femoral, para injeções e infusões intravenosas das drogas sob estudo. Após recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a água e ração, até o início do procedimento experimental. Tempo de infusão de drogas (60-90 min) de acordo com o protocolo experimental. A infusão foi na taxa de 6 μ L/min em bomba pré calibrada.

Os parâmetros avaliados foram a pressão arterial e a frequência cardíaca que foram monitoradas por um transdutor conectado ao animal e a um computador através de um sistema de aquisição de dados. A pressão arterial média e frequência cardíaca foram calculadas a partir da pressão pulsátil com o software AcqKnowledge. Ambos os parâmetros foram continuamente monitorados. Os experimentos foram realizados em ratos acordados.

b) Protocolos Experimentais *in vivo*.

b.1) Protocolo 1: Efeito de AVE 0991 sobre a ação hipotensora da bradicinina intra-arterial em ratos Wistar.

Injeções intra-arteriais de BK (6.2, 12.5, 25.0 e 50 ng) foram feitas antes e 30 minutos após o início da infusão de AVE0991 (46 pmol/ min/ 60min, n=8; 230 pmol/ min/ 60min, n=7; 460 pmol/ min/ 60 min, n=8) ou veículo (6 µL/ min/ 60 min; n=6). Fizeram-se injeções com intervalos de no mínimo 3 minutos. Após a primeira série de injeções de BK, o cateter foi lavado com salina isotônica. As doses das drogas e o momento para determinação dos seus efeitos fundamentaram-se em experimentos prévios. Um desenho experimental é mostrado a seguir (Figura 4).

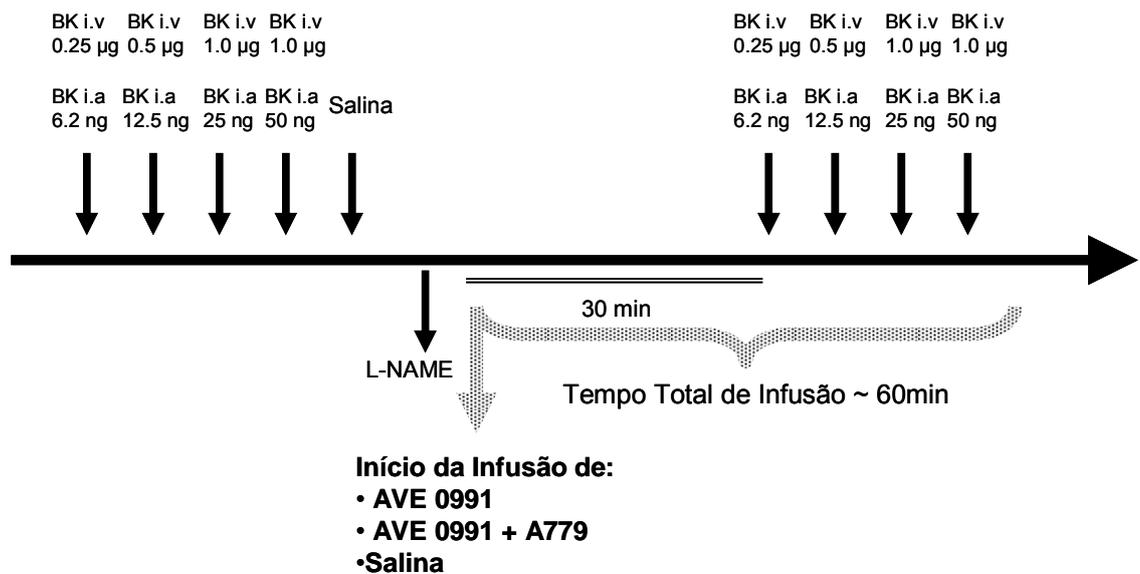


Figura 4. Esquema dos Protocolos Experimentais com doses crescentes de bradicinina (BK) intra-arterial (i.a) e intravenosa (i.v).

b.2) Protocolo 2: Efeito de AVE sobre a ação hipotensora da bradicinina em ratos Wistar tratados previamente com L-NAME.

Após a primeira série de injeções de BK (6.2, 12.5, 25.0 e 50.0 ng) e logo antes do início da infusão de AVE 0991 (230 pmol/ min/ 60 min; n=7) ou

salina (6 $\mu\text{L}/\text{min}/ 60 \text{ min}$; $n=5$), os animais foram tratados com L-NAME (30 mg/ Kg, e.v).

b.3) Protocolo 3: Efeito do A-779 na atividade potenciadora de BK do AVE 0991 em ratos Wistar.

Injeções intra-arteriais de BK (6.2, 12.5, 25.0 e 50 ng) foram feitas antes e 30 minutos após o início da infusão de AVE 0991 (230 pmol/ min/ 60 min) associado a A-779 (180 pmol/ min/ 60 min; $n=5$).

b.4) Protocolo 4: Efeito de AVE sobre atividade da Enzima Conversora de Angiotensina em ratos Wistar.

O efeito de AVE 0991 sobre a ECA foi testado *in vivo* através dos seguintes procedimentos:

1. Injeções endovenosas de Ang I (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 ng) ou Ang II (1.2, 2.5, 5.0, 10.0 ng) foram feitas antes e 30 minutos após o início da infusão de: AVE 0991 (230 pmol/ min/ 60 min, $n=6$; 460 pmol/ min/ 60min, $n=6$) ou veículo (6 $\mu\text{L}/ \text{min}/ 60 \text{ min}$, $n=7$ para Ang I e $n=8$ para Ang II). O desenho experimental utilizado é mostrado a seguir (Figura 5).

2. Injeções endovenosas de BK (0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 μg) foram feitas antes e 30 minutos após o início da infusão de AVE 0991 (230 pmol/ min/ 60 min, $n=8$).

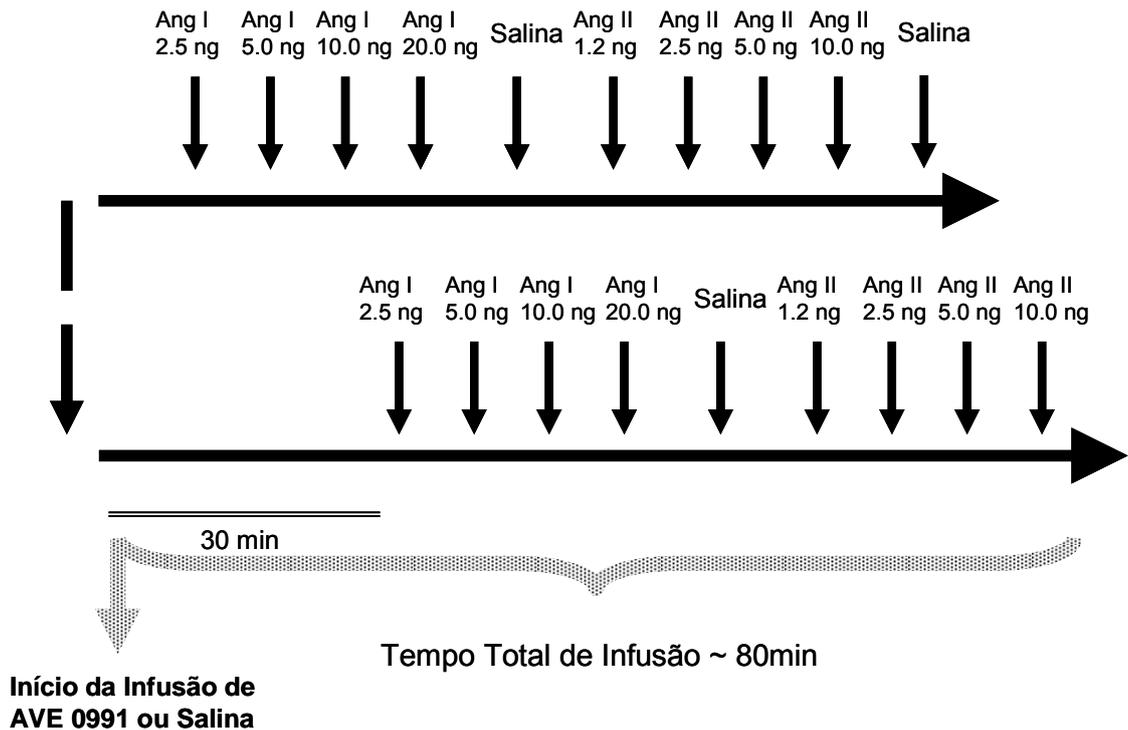


Figura 5. Esquema dos Protocolos Experimentais com doses crescentes de Angiotensina I (Ang I) e Angiotensina II (Ang II).

3.2.2 Procedimentos Experimentais *in vitro*.

a) Cultura de células endoteliais aórticas de coelho (RECs).

a.1) *Preparo das soluções.*

a.1.1) Solução de HBS: solução utilizada para a lavagem das células com o objetivo de retirar o FBS. Esta solução foi preparada conforme o protocolo da empresa de origem (SIGMA). Após o preparo, a solução foi filtrada em filtro Millipore estéril de 0,22 µm em capela de fluxo laminar e estocada em frascos estéreis, em geladeira a 4° C.

a.1.2) Meio Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes F-12 (Ham) (1:1) (D-MEM/F-12): meio de cultura para células. Esta solução foi preparada conforme o protocolo da empresa de origem (GIBCO). Após o preparo, a solução foi filtrada em filtro Millipore estéril de 0,22 µm em capela de fluxo laminar e estocada em frascos estéreis, em geladeira à 20° C. Uma solução de 10000 UI/mL de penicilina, 20 mg/mL de estreptomicina e

2mg/mL de anfotericina B (Adicionamos para obter 1% final) e FBS 10% foi acrescentada ao meio de cultura.

b) Cultura de células REC.

As células REC foram cultivadas em meio D-MEM/F-12, suplementado com soro fetal bovino 10% e solução de penicilina/estreptomicina/ anfotericina B 1%. As células foram descongeladas antes do experimento e utilizadas entre a quarta e nona passagem. As células foram mantidas em estufa com injeção de CO₂ 5% e temperatura de 37° C.

c) Medida de NO intracelular.

Em experimentos, usando fluorescência, células confluentes entre a quarta e nona passagem foram colocadas em placas de 6 poços. As células REC foram ressuspensas com 0,25% de tripsina, contadas e semeadas (100.000 a 145.000 cels/poço), cerca de 48 a 72 horas antes, em placas de cultura de 6 poços. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, células REC foram pré incubadas com solução salina de Krebs-Ringer-Hepes (KRH), contendo 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato; Molecular Probes) por 20 minutos, como descrito previamente por Kojima et al (Kojima, Nakatsubo *et al.*, 1998). Depois de lavadas com KRH, as células foram incubadas com AVE 0991 10⁻⁸ mol/L; BK 10⁻⁷ mol/L; ou AVE 0991 combinado com BK, por 15 minutos a 37°C em estufa umidificada em uma atmosfera com 5% CO₂. Células controle foram incubadas no mesmo meio sem nenhuma droga. Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com KRH e cobertas com Hydromount. Imagens da fluorescência foram obtidas através do microscópio confocal Zeiss 510 meta laser, equipado com lente objetiva de óleo de imersão (x63).

3.2.3 Protocolos Experimentais *in vitro*.

a) Avaliação do Efeito de AVE sobre atividade da Enzima Conversora de Angiotensina *in vitro*.

Para avaliar o efeito de AVE 0991 na atividade da ECA, diferentes concentrações desse composto (10⁻⁵ a 10⁻⁹) foram testadas, usando Hip-His-

Leu como substrato e uma amostra de plasma de rato como fonte de enzima. Quantificou-se por ensaio fluorimétrico o produto His-Leu liberado do substrato, como descrito por Santos e colaboradores (Santos, Krieger *et al.*, 1985).

a.1) Determinação da atividade da ECA.

Inicialmente, obtiveram-se amostras de 0,3 mL de sangue em seringas previamente heparinizadas (1000U/mL). A seguir, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm) durante 20 minutos, em temperatura de 4° C. As amostras de plasma corresponderam a um “pool” extraído do sangue de ratos como fonte de enzima. O plasma foi obtido de ratos que não foram utilizados nos experimentos in vivo.

Através do método fluorimétrico, mensurou-se a atividade da ECA, usando Hip-His-Leu como substrato. As etapas do ensaio consistiram em:

- Incubação de alíquotas em duplicata de um “pool” de plasma de rato, com 500 µL de 1mM do substrato Hip-His-Leu, em um tampão de sódio-borato (pH 8,3), contendo 0,9 M de NaCl, durante 15 minutos, a 37° C.
- A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de NaOH 0,34 M; foram adicionados 100 µL de ortoftaldeído (20mg/mL em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente, 200 µL de HCl 3 N.
- Centrifugação a 800 x g durante 5 minutos. A seguir, a solução fluorescente sobrenadante (365 nm de excitação e 495 nm de emissão) foi mensurada contra água.
- Os brancos corresponderam à repetição das etapas, porém, com inversão da ordem de adição do plasma de rato e NaOH.
- Uma curva padrão de 0,5 a 20 nmol de His-Leu por tubo foi usada para o ensaio.
- A solução de AVE 0991 foi misturada à solução de substrato imediatamente antes da adição de plasma de rato.

3.2.4 Análise estatística.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Comparações foram feitas pelo teste t pareado de Student ou análise de variância (Two-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni, quando apropriado (através do software GraphPad Prism). Para os experimentos *in vitro*, os resultados foram analisados, utilizando One-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O critério para significância estatística foi $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1 Efeito da infusão de AVE 0991 em ratos Wistar normotensos.

A Figura 6 mostra o efeito de diferentes doses de AVE 0991 na ação hipotensora da BK. A infusão de AVE 0991 na dose de 46 pmol/min/60min aumentou significativamente a hipotensão produzida pela BK em ratos Wistar normotensos (figura 6A), apesar de não ter sido observada diferença com a maior dose de BK (50ng i.a). Observou-se uma potenciação mais consistente com dose 5 vezes maior de AVE 0991 (25ng: -23 ± 2 mmHg versus -18 ± 2 mmHg antes; e 50 ng: -30 ± 2 mmHg versus -24 ± 2 mmHg antes; $P<0.05$; Figura 6B). Um resultado similar foi observado com a dose de 460 pmol/ min/ 60 min de AVE 0991 (Figura 6C). Salina isotônica não alterou o efeito hpotensor da BK (Figura 6D). Infusão de AVE 0991 não alterou os valores basais de pressão arterial média ou frequência cardíaca (Tabela 1). É importante ressaltar que os valores de pressão arterial média estão ligeiramente acima do normal, uma vez que a artéria carótida esquerda foi ocluída para as injeções de BK.

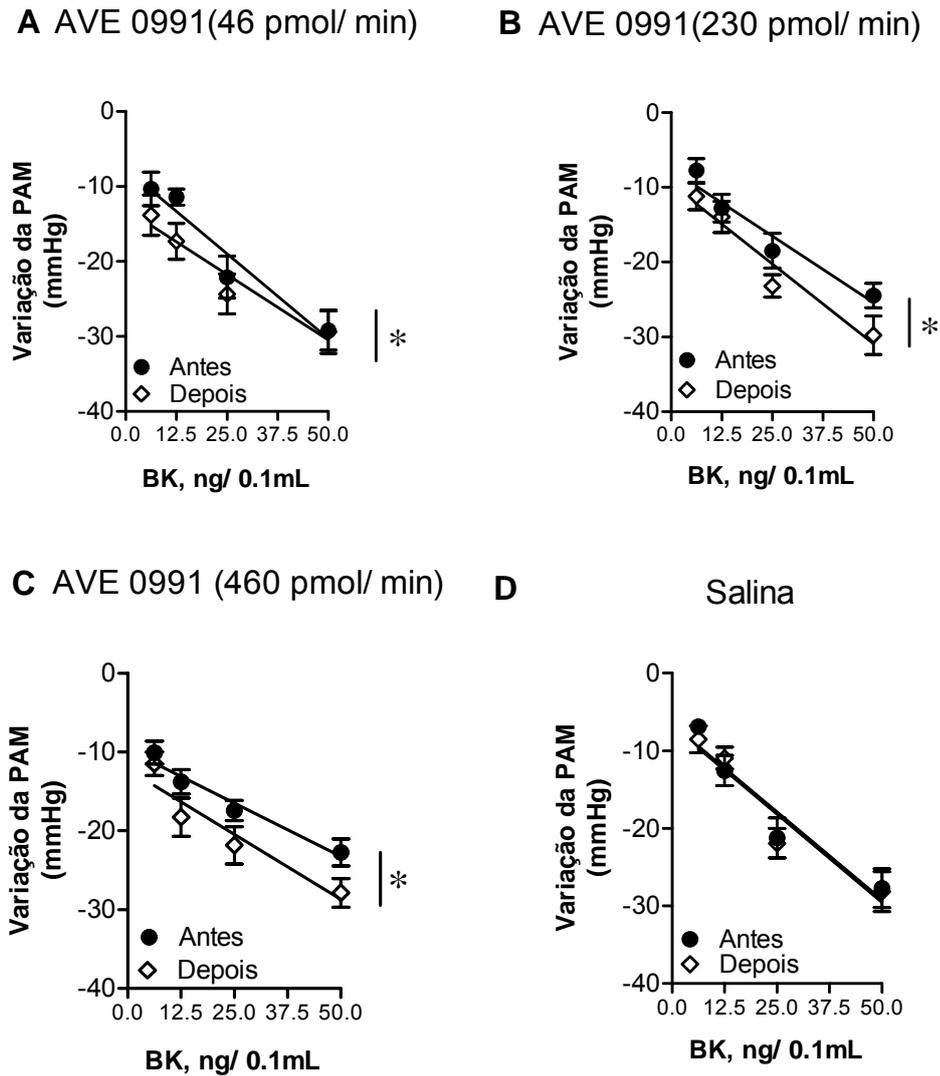


Figura 6: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de: (A) AVE 0991 (46 pmol/ min; n=8); (B) AVE 0991 (230 pmol/ min; n=7); (C) AVE 0991 (460 pmol/ min; n=8); e (D) salina isotônica (6 μ L/ min, n=6). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. *P<0.05, Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, 30 minutos de infusão comparado com o período antes da infusão.

Tabela 1. Efeito da infusão de AVE 0991 sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em Ratos Wistar Não Anestesiados.

	PAM (mmHg)		FC (bpm)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Controle	131 ± 7	129 ± 6	413 ± 35	386 ± 30
AVE 0991 (46 pmol)	131 ± 3	129 ± 5	356 ± 16	369 ± 11
AVE 0991 (230 pmol)	137 ± 1	129 ± 4	393 ± 10	355 ± 15
AVE 0991 (460 pmol)	128 ± 5	131 ± 4	410 ± 22	398 ± 14

Valores expressos como média ± EPM. $p > 0,05$ para todas as comparações.

4.2 Avaliação da potenciação do efeito hipotensor da BK por AVE 0991. Bloqueio do receptor Mas de Ang-(1-7) e do NO.

Para avaliar se a atividade potenciadora de BK por AVE 0991 foi uma resposta mediada por receptor de Ang-(1-7), determinou-se o efeito de AVE 0991 em associação ao antagonista do receptor Mas. Infusão de A-779 associado a AVE 0991 aboliu a atividade potenciadora de BK desse agonista de receptor de Ang-(1-7) (Figura 8A).

Tratamento com L-NAME (30 mg/Kg e.v) antes de infusão de salina isotônica não aboliu o efeito hipotensor de BK em ratos normotensos (Figura 7). No entanto, a potenciação da hipotensão BK-evocada por AVE 0991 foi completamente abolida em ratos tratados previamente com L-NAME (Figura 8B). O valor basal de PAM foi significativamente aumentado, após injeção de L-NAME (152±7 mmHg aos 30 min versus 118±5 mmHg, no grupo tratado com AVE 0991; $P < 0.05$ e 157±4 aos 30 min versus 125±8 mmHg, no grupo controle;

P<0.05). Dessa forma, apesar das mudanças nos valores absolutos da PAM produzidos pela BK, após o tratamento com L-NAME no grupo-controle, terem sido maiores que os observados em condições basais, as mudanças percentuais na pressão arterial não foram diferentes.

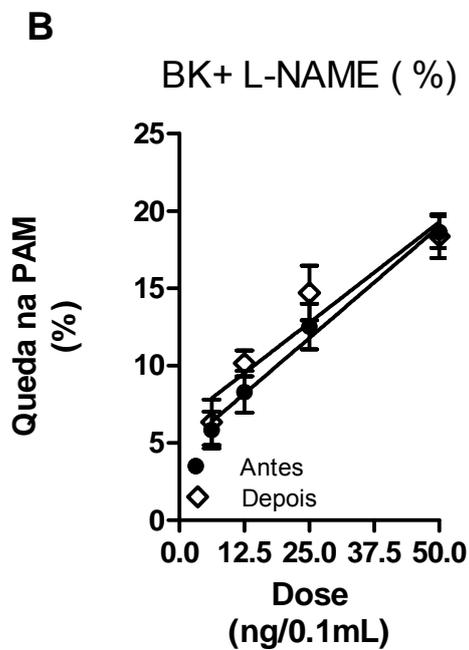
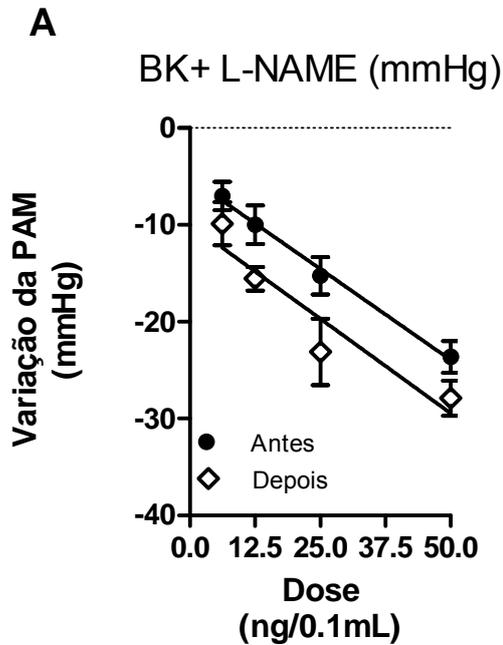


Figura 7: Efeito hipotensor de doses crescentes de bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de salina isotônica (6 $\mu\text{L}/\text{min}$) em animais previamente tratados com L-NAME (30mg/Kg, n=5). (A) Valores expressos como média \pm EPM e (B) valores expressos como queda na pressão arterial basal em porcentagem.

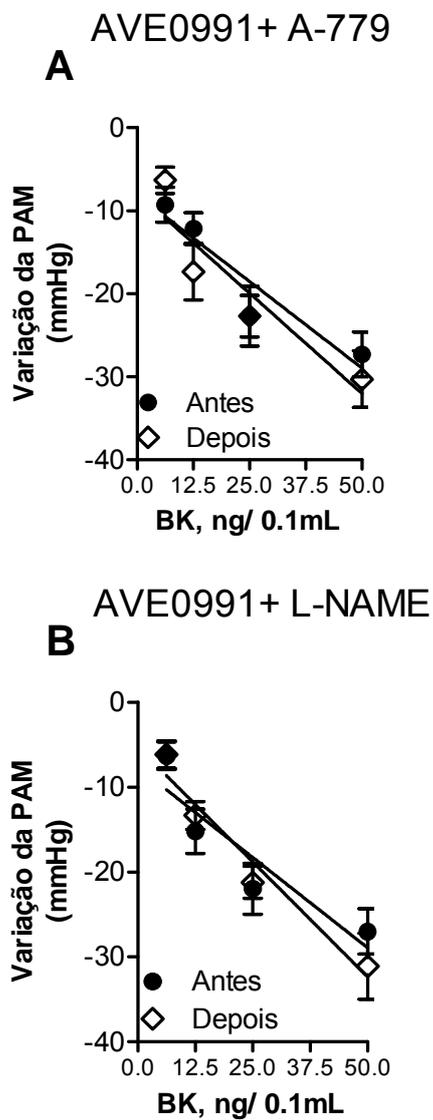


Figura 8: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina intra-arterial em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão de (A) AVE 0991 (230 pmol/min) associado a A-779 (180 pmol/min; n=5) ou (B) AVE 0991 (230 pmol/min) em animais previamente tratados com L-NAME (30 mg/Kg, n=7). Valores expressos como média \pm EPM.

4.3 Avaliação do efeito do AVE 0991 na atividade da ECA *in vivo*.

Infusão de AVE 0991 na dose de 230 pmol/ min/ 60 min não alterou o efeito pressor de Ang I em nenhum momento (Figura 9A). Observou-se um resultado similar com aumento de 2 vezes da dose de AVE 0991 (460 pmol/min; 2.5 ng: 6 ± 1 mmHg versus 9 ± 2 mmHg antes; e 20ng: 33 ± 5 mmHg versus 27 ± 4 mmHg antes; Figura 10A). Salina isotônica não alterou o efeito pressor da Ang I (Figura 10B). Da mesma forma, infusão de AVE 0991 na dose de 230 pmol/ min/ 60 min não alterou o efeito pressor de Ang II endovenosa (Figura 9B). Uma maior dose de AVE 0991 (460 pmol/ min) também não alterou o aumento da pressão arterial induzida por Ang II (1.25 ng: 10 ± 2 mmHg versus 11 ± 1 mmHg antes; e 10.0 ng: 31 ± 5 mmHg versus 31 ± 4 mmHg antes; Figura 10C). Infusão de veículo não alterou o efeito pressor de Ang II em nenhum momento (Figura 10D).

Infundiu-se também AVE 0991 na dose de 230 pmol/ min, via endovenosa, em animais, que receberam injeções *in bolus* e.v de BK (0.25 μ g: -9 ± 1 mmHg antes, -14 ± 2 mmHg depois; 0.5 μ g: -12 ± 1 mmHg antes, -19 ± 2 mmHg depois; 1.0 μ g: -17 ± 2 mmHg antes, -21 ± 2 mmHg depois; 2.0 μ g: -22 ± 2 mmHg antes, -25 ± 1 mmHg depois; Figura 11B). A potenciação da BK, observada nessa condição, contrasta com o que seria esperado, se AVE 0991 estivesse inibindo a ECA. Na realidade, a potenciação observada foi até mesmo menor que a observada em animais que receberam BK via intra-arterial.

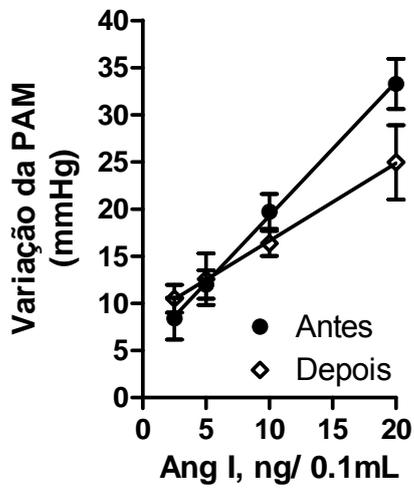
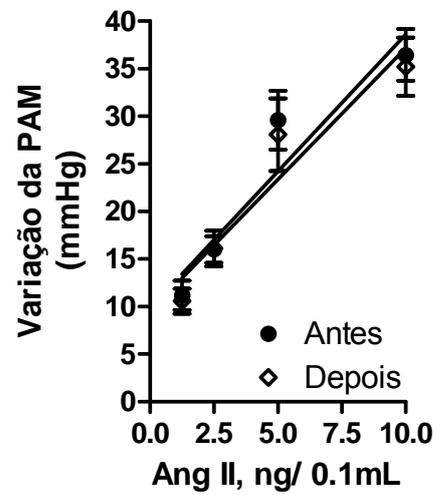
A AVE 0991 (230 pmol/ min)**B** AVE 0991 (230 pmol/ min)

Figura 9: Efeito pressor de doses crescentes de Ang I (A, n=6) e Ang II (B, n=6) endovenosas em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão endovenosa de AVE 0991 (230 pmol/ min). Valores expressos como média \pm EPM.

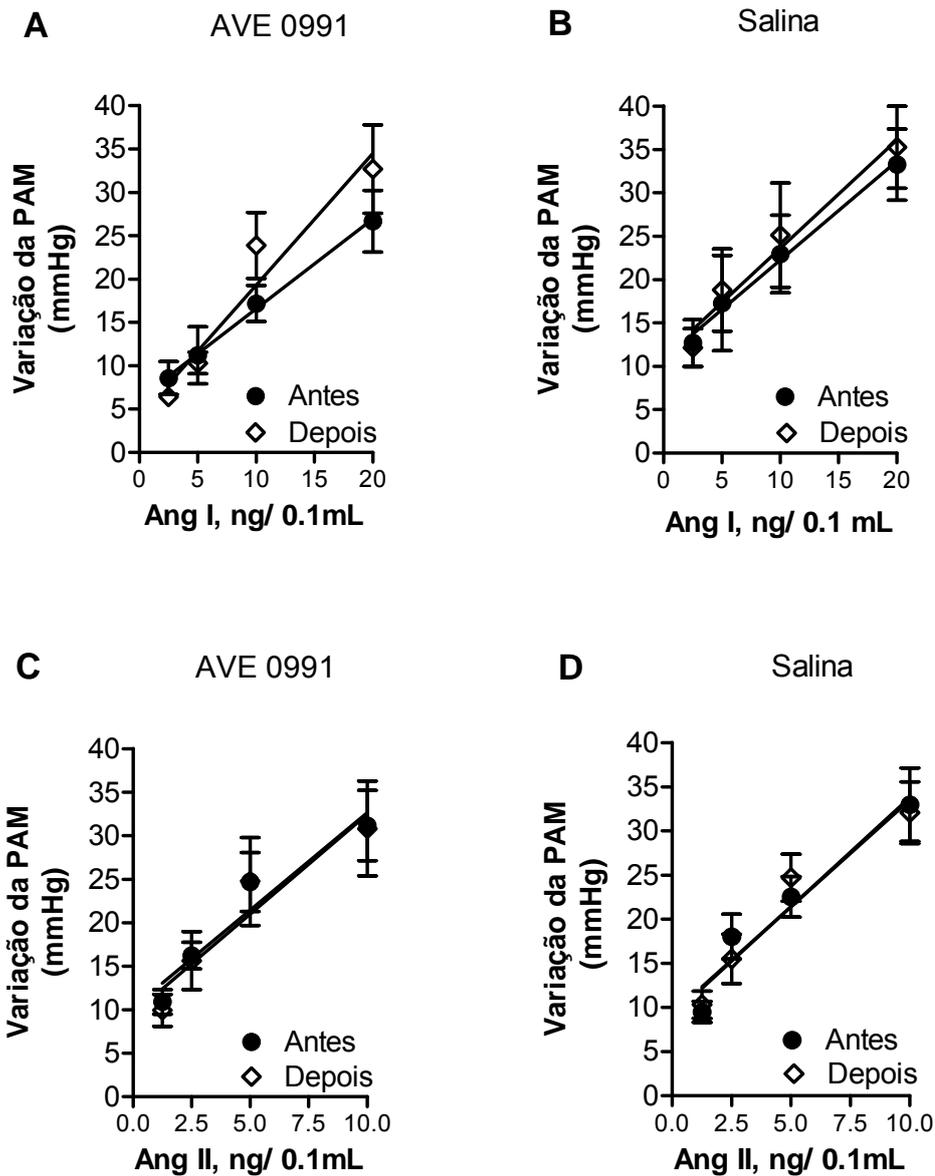


Figura 10: Efeito pressor de doses crescentes de Ang I endovenosa em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão endovenosa de: (A) AVE 0991 (460 pmol/ min; n=6) e (B) salina isotônica (6 μ L/ min; n=7). Efeito pressor de doses crescentes de Ang II endovenosa em ratos Wistar acordados, antes e após 30 minutos de infusão de: (C) AVE 0991 (460pmol/ min, n=6) e (D) salina isotônica (6 μ L/ min, n=7 para Ang I e n=8 para Ang II). Valores expressos como média \pm EPM.

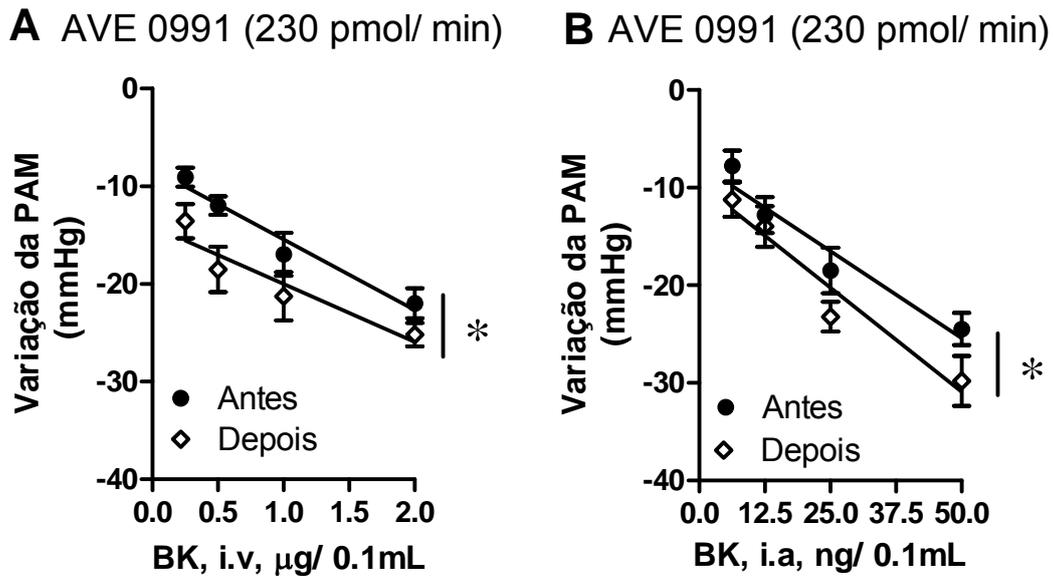


Figura 11: Efeito hipotensor de doses crescentes da bradicinina endovenosa (A, n=8) ou intra-arterial (B, n=7) em ratos Wistar, antes e 30 minutos após a infusão endovenosa de AVE 0991 (230 pmol/ min). Valores expressos como média \pm EPM. *P<0.05, Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, 30 minutos de infusão, comparado com o período antes da infusão.

4.4 Avaliação do efeito do AVE 0991 na atividade da ECA *in vitro*.

Usando um ensaio fluorimétrico para determinar a atividade da ECA (Santos, Krieger *et al.*, 1985), foi observado que AVE 0991 não inibiu a conversão do Hip-His-Leu em seu metabólito His-Leu em presença de ECA nas concentrações $\leq 10 \mu\text{mol/L}$.

4.5 Efeito do AVE 0991 na liberação de NO induzida por BK em RECs.

A figura 12 mostra as medidas de NO, utilizando 4-amino-5-metil amino-2'-7'-difluorofluoresceína diacetato, expressas em porcentagem de produção de NO em relação às células controle. A fluorescência nas células aumentou de forma concentração-dependente de NO. Em presença de BK (10^{-7} mol/L), foi observado um pequeno aumento na liberação de NO (Figura 12B). A

liberação de NO pelas RECs foi 4 vezes maior em presença de AVE 0991 (10^{-8} mol/L; $P < 0.01$; Figura 12C), enquanto a combinação de AVE 0991 (10^{-8} mol/L) e BK (10^{-7} mol/L) produziu um aumento de 9 vezes na liberação de NO pelas RECs ($P < 0.001$; Figura 12D).

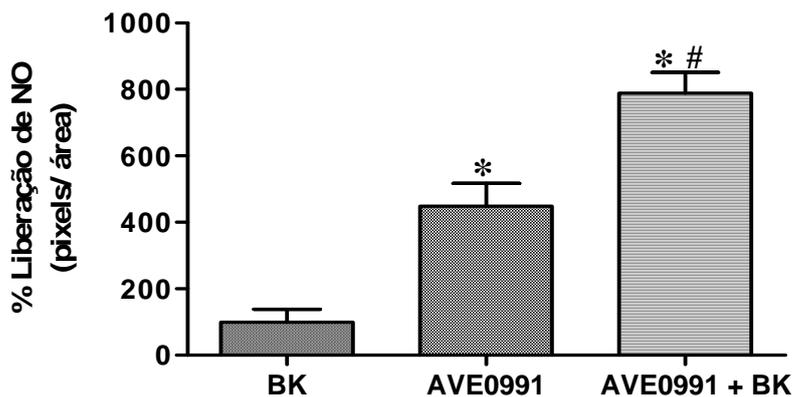
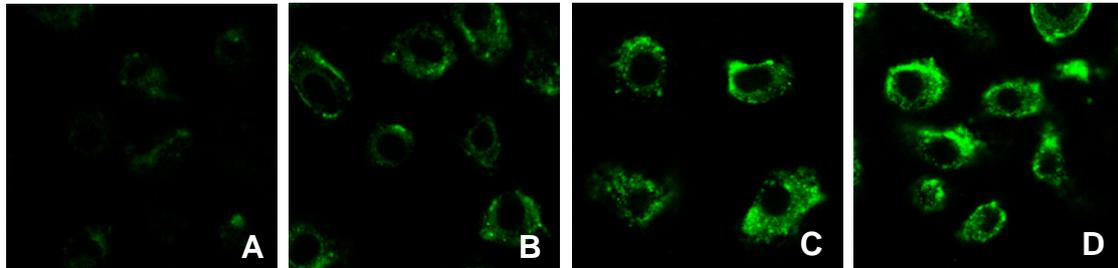


Figura 12: Produção de NO por células endoteliais de coelho em resposta a: (A) Sonda de NO DAF-FM; (B) BK (10^{-7} mol/L); (C) AVE 0991 (10^{-8} mol/L); ou (D) AVE 0991 (10^{-8} mol/L) em combinação com BK (10^{-7} mol/L). Imagens fluorescentes foram obtidas através de microscópio confocal Zeiss 510 meta laser equipado com lente objetiva de óleo de imersão (63x). * $P < 0.01$ vs BK 10^{-7} mol/L; # $P < 0.01$ vs AVE 0991, 10^{-8} mol/L. Valores expressos como porcentagem de liberação de NO em relação às células controle.

DISCUSSÃO

Discussão

O principal resultado demonstrado nesse estudo revela que infusão aguda de AVE 0991 aumentou significativamente o efeito hipotensor de BK, administrada via intra-arterial em ratos normotensos. Adicionalmente, a potenciação da hipotensão induzida por BK pelo AVE 0991 foi completamente abolida pelo tratamento prévio com injeção de L-NAME ou infusão de A-779. Estudos *in vitro* com células endoteliais de coelho dão suporte à evidência obtida com L-NAME de que esse efeito envolve liberação de NO. Esses resultados estão de acordo com observações prévias em ratos Wistar normotensos que demonstraram o efeito da administração de Ang-(1-7) *in bolus* ou por infusão potenciando a hipotensão produzida por BK (Paula, Lima *et al.*, 1995; Lima, Paula *et al.*, 1997).

As células endoteliais são um dos sítios onde Ang-(1-7) ou seus análogos exercem seus efeitos, como foi evidenciado por ausência de relaxamento induzido por AVE 0991 ou Ang-(1-7) em vasos com endotélio desnudado de cães (Brosnihan, Li *et al.*, 1996), ratos (Le Tran e Forster, 1997; Almeida, Cortes *et al.*, 2002), porcos (Porsti, Bara *et al.*, 1994) e camundongos (Lemos, Silva *et al.*, 2005). De acordo com essa evidência, o receptor Mas é expresso em células endoteliais (Santos, Ferreira *et al.*, 2005), que também parecem ser o sítio primário para os efeitos cardiovasculares da BK (Nolly, Carretero *et al.*, 1993). A vasodilatação produzida por Ang-(1-7) e AVE 0991 em anéis de aorta de camundongos é bloqueada por A-779 (Lemos, Silva *et al.*, 2005) e ausente em vasos retirados de camundongos com deleção genética do gene *Mas* (Santos, Simoes E Silva *et al.*, 2003; Lemos, Silva *et al.*, 2005).

Foi descrito que AVE 0991 *in vitro* é mais potente em produzir liberação de NO que Ang-(1-7) (Wiemer, Dobrucki *et al.*, 2002). No presente estudo, a dose de AVE 0991 necessária para produção de efeito similar ao descrito para potenciação de BK por Ang-(1-7) (Lima, Paula *et al.*, 1997) foi ~750 a ~1500 vezes maior. Esses resultados contrastantes, que também foram obtidos para potenciação de acetilcolina (Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005), podem estar relacionados ao fato das ações vasculares da Ang-(1-7) poderem ser mediadas por múltiplos mecanismos. Adicionalmente à ligação ao receptor Mas, Ang-(1-

7) pode gerar outros fragmentos com atividade potenciadora de BK (Paula, Lima *et al.*, 1999) e pode se ligar à ECA (Deddish, Marcic *et al.*, 1998; Ferreira e Santos, 2005). Além disso, a extensão da ligação de AVE 0991 a proteínas plasmáticas, que poderia influenciar na sua biodisponibilidade e distribuição, não está disponível na literatura, tornando difícil uma comparação farmacocinética e farmacodinâmica mais precisa desse composto com Ang-(1-7).

Ressalta-se que AVE 0991 não possui efeito na pressão arterial de ratos acordados, no entanto, ao menos em ratos anestesiados, Ang-(1-7) aumenta o débito cardíaco e produz vasodilatação significativa em vários territórios vasculares, diminuindo a resistência periférica total. Essas mudanças foram observadas após aumento agudo ou crônico dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Sampaio, Nascimento *et al.*, 2003; Botelho-Santos, Sampaio *et al.*, 2007). As mudanças em sentidos opostos no débito cardíaco e resistência periférica total poderiam explicar a ausência de importantes alterações na pressão arterial, após administração de Ang-(1-7). Apesar de estudos similares não terem sido realizados com AVE 0991, a hipótese é que mudanças similares, no débito cardíaco e resistência periférica total, possam ocorrer em resposta a esse composto.

No presente estudo, verificou-se que AVE 0991 em concentrações ≤ 10 $\mu\text{mol/L}$ não possui efeito detectável na atividade da ECA em rato, conforme avaliação da hidrólise do Hip-His-Leu. Resultados similares foram obtidos com ECA plasmática humana (M.B.L., R.D.P., e R.A.S.S, dado não publicado). Também se observou, *in vivo*, que infusão endovenosa de AVE 0991 não alterou a ação pressora de Ang I, nem produziu nenhuma mudança significativa no efeito pressor da Ang II. Mais importante, devido ao fato da ECA contribuir para a inativação pulmonar da BK, a potenciação de BK administrada endovenosamente por inibição da ECA é muito mais evidente que a observada com administração intra-arterial desse nonapeptídeo (Stanziola, Greene *et al.*, 1999). Esse não foi o caso com AVE 0991. Na realidade, a potenciação do efeito da BK endovenosa pelo AVE 0991 foi até mesmo menor que a observada em relação à via intra-arterial. Em conjunto, os achados indicam que mecanismos endoteliais não enzimáticos estariam envolvidos primariamente na potenciação de BK por AVE 0991. De fato, a potenciação de BK por AVE 0991

pode ser considerada evidência adicional de que AVE 0991 melhora a função endotelial em ratos (Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005).

Tratamento com L-NAME aboliu a potenciação do efeito hipotensor da BK pelo AVE 0991, sugerindo que a potenciação da BK está envolvida com facilitação de liberação de NO pelo endotélio. De acordo com isso, percebeu-se que AVE 0991 potencia a liberação de NO induzida por BK em RECs. No entanto, os resultados não descartam o envolvimento de derivados do ácido araquidônico (Fernandes, Fortes *et al.*, 2001) ou do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000; Herrmann e Lerman, 2001; Ferreira e Santos, 2005; Santos, Ferreira *et al.*, 2005) nesse efeito.

A atividade de potenciação de BK por AVE 0991 foi completamente abolida pelo antagonista de receptor Mas, A-779. Esse efeito não pode ser atribuído à influência do A-779 *per se*. Em estudos prévios de nosso laboratório não detectaram mudanças consistentes na hipotensão evocada por BK, quando A-779 era infundido isoladamente (Lima, Paula *et al.*, 1997). Foi demonstrado pelo nosso e outros laboratórios que A-779 antagoniza os efeitos da Ang-(1-7) e de AVE 0991 em várias preparações (Santos, Campagnole-Santos *et al.*, 2000), incluindo o efeito de AVE 0991 em células ovarianas de hamsters chineses transfectadas com gene *Mas* (CHO-*Mas*) (Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004), rim de camundongos (Pinheiro, Simoes E Silva *et al.*, 2004), aorta de camundongos (Lemos, Silva *et al.*, 2005), e a potenciação da vasodilatação da acetilcolina *in vivo* (Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005), indicando que ao menos alguns dos efeitos de AVE 0991 são mediados pelo receptor Mas. Em resumo, no presente estudo, obteve-se evidência de que AVE 0991 potencia BK, através de mecanismo mediado pelo receptor Mas, envolvendo facilitação de liberação de NO.

Os resultados do presente estudo demonstram que o análogo não peptídico de Ang-(1-7), AVE 0991, induz potenciação da BK sem alterar o efeito pressor da Ang I ou Ang II. Essa observação está de acordo com ausência de efeito visível de AVE 0991 na atividade da ECA *in vitro*. A evidência obtida com L-NAME e A-779 *in vivo* e em células endoteliais *in vitro* indicam o envolvimento de mecanismo mediado por receptor Mas, envolvendo facilitação de liberação de NO na potenciação da BK por AVE 0991. Além

disso, esse dado, que está de acordo com observações prévias (Faria-Silva, Duarte *et al.*, 2005), sugere a utilização de AVE 0991 para melhorar a função endotelial *in vivo*.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que:

- A infusão aguda de AVE 0991 aumenta significativamente o efeito hipotensor da BK em ratos normotensos.
- A potenciação do efeito hipotensor de BK foi completamente abolida por L-NAME e A-779.
- O AVE 0991 não atua através da inibição da ECA *in vivo* e *in vitro*.
- O efeito do AVE 0991 sobre a BK envolve liberação de NO.

Em conjunto esses resultados sugerem que AVE 0991 potencia bradicinina, através de um mecanismo endotelial não enzimático, mediado pelo receptor Mas que envolve facilitação de liberação de NO. Além disso, esses dados sugerem utilização de AVE 0991 para melhoria da função endotelial *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A., G. Gorelik, *et al.* Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. Hypertension, v.30, n.2 Pt 1, Aug, p.217-21. 1997.

Almeida, A. P., S. F. Cortes, *et al.* Increase on the coronary flow induced by dioclein in isolated rat heart. Life Sci, v.70, n.10, Jan 25, p.1121-8. 2002.

Almeida, A. P., B. C. Frabregas, *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. Braz J Med Biol Res, v.33, n.6, Jun, p.709-13. 2000.

Averill, D. B., Y. Ishiyama, *et al.* Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. Circulation, v.108, n.17, Oct 28, p.2141-6. 2003.

Benter, I. F., D. I. Diz, *et al.* Cardiovascular actions of angiotensin(1-7). Peptides, v.14, n.4, Jul-Aug, p.679-84. 1993.

Bomtempo, C. A., G. F. Santos, *et al.* Interaction of bradykinin and angiotensin-(1-7) in the central modulation of the baroreflex control of the heart rate. J Hypertens, v.16, n.12 Pt 1, Dec, p.1797-804. 1998.

Botelho-Santos, G. A., W. O. Sampaio, *et al.* Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.292, n.5, May, p.H2485-90. 2007.

Braga, A. N., M. Da Silva Lemos, *et al.* Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.282, n.6, Jun, p.R1663-71. 2002.

Brosnihan, K. B., P. Li, *et al.* Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. Hypertension, v.27, n.3 Pt 2, Mar, p.523-8. 1996.

Campagnole-Santos, M. J., S. B. Heringer, *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. Am J Physiol, v.263, n.1 Pt 2, Jul, p.R89-94. 1992.

Campbell, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.6, Jun, p.784-91. 2003.

Chappell, M. C., N. T. Pirro, *et al.* Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. Hypertension, v.31, n.1 Pt 2, Jan, p.362-7. 1998.

Crackower, M. A., R. Sarao, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature, v.417, n.6891, Jun 20, p.822-8. 2002.

Da Costa Goncalves, A. C., R. Leite, *et al.* Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.4, Oct, p.H2588-96. 2007.

Davie, A. P. e J. J. McMurray. Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. Hypertension, v.34, n.3, Sep, p.457-60. 1999.

Deddish, P. A., B. Marcic, *et al.* N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. Hypertension, v.31, n.4, Apr, p.912-7. 1998.

Donoghue, M., F. Hsieh, *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res, v.87, n.5, Sep 1, p.E1-9. 2000.

Erdos, E. G. Angiotensin I converting enzyme. Circ Res, v.36, n.2, Feb, p.247-55. 1975.

Erdos, E. G., H. L. Jackman, *et al.* Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. J Mol Cell Cardiol, v.34, n.12, Dec, p.1569-76. 2002.

Faria-Silva, R., F. V. Duarte, *et al.* Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. Hypertension, v.46, n.4, Oct, p.948-52. 2005.

Fernandes, L., Z. B. Fortes, *et al.* Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. Hypertension, v.37, n.2 Part 2, Feb, p.703-9. 2001.

Ferrario, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. Hypertension, v.47, n.3, Mar, p.515-21. 2006.

Ferrario, C. M., M. C. Chappell, *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). Hypertension, v.30, n.3 Pt 2, Sep, p.535-41. 1997.

Ferrario, C. M., N. Martell, *et al.* Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. Am J Hypertens, v.11, n.2, Feb, p.137-46. 1998.

Ferreira, A. J. e R. A. Santos. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). Braz J Med Biol Res, v.38, n.4, Apr, p.499-507. 2005.

Ferreira, A. J., R. A. Santos, *et al.* Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, Sep, p.665-8. 2001.

Feterik, K., L. Smith, *et al.* Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. Brain Res, v.873, n.1, Aug 4, p.75-82. 2000.

Fraga-Silva, R. A., S. V. Pinheiro, *et al.* The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. Mol Med, v.14, n.1-2, Jan-Feb, p.28-35. 2008.

Freeman, E. J., G. M. Chisolm, *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. Hypertension, v.28, n.1, Jul, p.104-8. 1996.

Gorelik, G., L. A. Carhini, *et al.* Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. J Pharmacol Exp Ther, v.286, n.1, Jul, p.403-10. 1998.

Goulter, A. B., M. J. Goddard, *et al.* ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. BMC Med, v.2, May 19, p.19. 2004.

Greco, A. J., R. G. Master, *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates responses to bradykinin but does not change responses to angiotensin I. Can J Physiol Pharmacol, v.84, n.11, Nov, p.1163-75. 2006.

Harmer, D., M. Gilbert, *et al.* Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. FEBS Lett, v.532, n.1-2, Dec 4, p.107-10. 2002.

Hecker, M., A. Blaukat, *et al.* ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced vasoconstriction. Br J Pharmacol, v.121, n.7, Aug, p.1475-81. 1997.

Heitsch, H., S. Brovkovich, *et al.* Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. Hypertension, v.37, n.1, Jan, p.72-76. 2001.

Herrmann, J. e A. Lerman. The endothelium: dysfunction and beyond. J Nucl Cardiol, v.8, n.2, Mar-Apr, p.197-206. 2001.

Ishiyama, Y., P. E. Gallagher, *et al.* Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. Hypertension, v.43, n.5, May, p.970-6. 2004.

Iyer, S. N., M. C. Chappell, *et al.* Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. Hypertension, v.31, n.2, Feb, p.699-705. 1998.

Iyer, S. N., C. M. Ferrario, *et al.* Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. Hypertension, v.31, n.1 Pt 2, Jan, p.356-61. 1998.

Jaiswal, N., D. I. Diz, *et al.* Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. Hypertension, v.19, n.2 Suppl, Feb, p.1149-55. 1992.

Jaiswal, N., R. K. Jaiswal, *et al.* Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. Hypertension, v.21, n.6 Pt 2, Jun, p.900-5. 1993.

Khosla, M. C., M. M. Hall, *et al.* Agonist and antagonist relationships in 1- and 8-substituted analogs of angiotensin II. J Med Chem, v.17, n.11, Nov, p.1156-60. 1974.

Kim, S. e H. Iwao. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. Pharmacol Rev, v.52, n.1, Mar, p.11-34. 2000.

Kohara, K., K. B. Brosnihan, *et al.* Angiotensin(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. Peptides, v.14, n.5, Sep-Oct, p.883-91. 1993.

Kojima, H., N. Nakatsubo, *et al.* Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal Chem, v.70, n.13, Jul 1, p.2446-53. 1998.

Kostenis, E., G. Milligan, *et al.* G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. Circulation, v.111, n.14, Apr 12, p.1806-13. 2005.

Kucharewicz, I., R. Pawlak, *et al.* Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). Hypertension, v.40, n.5, Nov, p.774-9. 2002.

Lawrence, A. C., G. Evin, *et al.* An alternative strategy for the radioimmunoassay of angiotensin peptides using amino-terminal-directed antisera: measurement of eight angiotensin peptides in human plasma. J Hypertens, v.8, n.8, Aug, p.715-24. 1990.

Le Tran, Y. e C. Forster. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. J Cardiovasc Pharmacol, v.30, n.5, Nov, p.676-82. 1997.

Lemos, V. S., S. F. Cortes, *et al.* 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, v.135, n.7, Apr, p.1743-8. 2002.

Lemos, V. S., D. M. Silva, *et al.* 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, v.46, n.3, Sep, p.274-9. 2005.

Lentz, K. E., L. T. Skeggs, Jr., *et al.* The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. J Exp Med, v.104, n.2, Aug 1, p.183-91. 1956.

Li, P., M. C. Chappell, *et al.* Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. Hypertension, v.29, n.1 Pt 2, Jan, p.394-400. 1997.

Lima, C. V., R. D. Paula, *et al.* Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. Hypertension, v.30, n.3 Pt 2, Sep, p.542-8. 1997.

Linz, W., G. Wiemer, *et al.* Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Pharmacol Rev, v.47, n.1, Mar, p.25-49. 1995.

Linz, W., P. Wohlfart, *et al.* Interactions among ACE, kinins and NO. Cardiovasc Res, v.43, n.3, Aug 15, p.549-61. 1999.

Loot, A. E., A. J. Roks, *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. Circulation, v.105, n.13, Apr 2, p.1548-50. 2002.

Machado, R. D., R. A. Santos, *et al.* Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.280, n.4, Apr, p.R994-R1000. 2001.

Maia, L. G., M. C. Ramos, *et al.* Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. J Cardiovasc Pharmacol, v.43, n.5, May, p.685-91. 2004.

Marcic, B., P. A. Deddish, *et al.* Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. Hypertension, v.33, n.3, Mar, p.835-43. 1999.

Meng, W. e D. W. Busija. Comparative effects of angiotensin-(1-7) and angiotensin II on piglet pial arterioles. Stroke, v.24, n.12, Dec, p.2041-4; discussion 2045. 1993.

Muthalif, M. M., I. F. Benter, *et al.* Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther, v.284, n.1, Jan, p.388-98. 1998.

Nolly, H., O. A. Carretero, *et al.* Kallikrein release by vascular tissue. Am J Physiol, v.265, n.4 Pt 2, Oct, p.H1209-14. 1993.

Oliveira, M. A., Z. B. Fortes, *et al.* Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. Peptides, v.20, n.10, p.1195-201. 1999.

Osei, S. Y., R. S. Ahima, *et al.* Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. Eur J Pharmacol, v.234, n.1, Mar 30, p.35-42. 1993.

Paula, R. D., C. V. Lima, *et al.* Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7)-related peptides. Peptides, v.20, n.4, p.493-500. 1999.

_____. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. Hypertension, v.26, n.6 Pt 2, Dec, p.1154-9. 1995.

Pinheiro, S. V., A. C. Simoes E Silva, *et al.* Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. Hypertension, v.44, n.4, Oct, p.490-6. 2004.

Porsti, I., A. T. Bara, *et al.* Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. Br J Pharmacol, v.111, n.3, Mar, p.652-4. 1994.

Ren, Y., J. L. Garvin, *et al.* Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. Hypertension, v.39, n.3, Mar 1, p.799-802. 2002.

Sampaio, W. O., A. A. Nascimento, *et al.* Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.6, Jun, p.H1985-94. 2003.

Santos, R. A., K. B. Brosnihan, *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. Hypertension, v.11, n.2 Pt 2, Feb, p.1153-7. 1988.

Santos, R. A., J. M. Brum, *et al.* The renin-angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. Hypertension, v.15, n.2 Suppl, Feb, p.1121-7. 1990.

Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, *et al.* Angiotensin-(1-7): an update. Regul Pept, v.91, n.1-3, Jul 28, p.45-62. 2000.

_____. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. Brain Res Bull, v.35, n.4, p.293-8. 1994.

Santos, R. A., C. H. Castro, *et al.* Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, v.47, n.5, May, p.996-1002. 2006.

Santos, R. A., A. J. Ferreira, *et al.* Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. Physiol Genomics, v.17, n.3, May 19, p.292-9. 2004.

_____. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. Expert Opin Investig Drugs, v.14, n.8, Aug, p.1019-31. 2005.

_____. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. Exp Physiol, v.93, n.5, May, p.519-27. 2008.

Santos, R. A., E. M. Krieger, *et al.* An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. Hypertension, v.7, n.2, Mar-Apr, p.244-52. 1985.

Santos, R. A., A. C. Simoes E Silva, *et al.* Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. Hypertension, v.27, n.4, Apr, p.875-84. 1996.

_____. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.14, Jul 8, p.8258-63. 2003.

Sasaki, S., Y. Higashi, *et al.* Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. Hypertension, v.38, n.1, Jul, p.90-4. 2001.

Schiavone, M. T., R. A. Santos, *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.11, Jun, p.4095-8. 1988.

Seyedi, N., X. Xu, *et al.* Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. Hypertension, v.26, n.1, Jul, p.164-70. 1995.

Silva, D. M., H. R. Vianna, *et al.* Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. Peptides, v.28, n.3, Mar, p.702-7. 2007.

Simoes E Silva, A. C., J. S. Diniz, *et al.* Circulating renin Angiotensin system in childhood chronic renal failure: marked increase of Angiotensin-(1-7) in end-stage renal disease. Pediatr Res, v.60, n.6, Dec, p.734-9. 2006.

Simoes E Silva, A. C., S. V. Pinheiro, *et al.* The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. Mini Rev Med Chem, v.6, n.5, May, p.603-9. 2006.

Stanziola, L., L. J. Greene, *et al.* Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats. Am J Hypertens, v.12, n.10 Pt 1, Oct, p.1021-9. 1999.

Strawn, W. B., C. M. Ferrario, *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. Hypertension, v.33, n.1 Pt 2, Jan, p.207-11. 1999.

Tallant, E. A. e M. A. Clark. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). Hypertension, v.42, n.4, Oct, p.574-9. 2003.

Tallant, E. A., D. I. Diz, *et al.* State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. Hypertension, v.34, n.4 Pt 2, Oct, p.950-7. 1999.

Tallant, E. A., C. M. Ferrario, *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.289, n.4, Oct, p.H1560-6. 2005.

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J Biol Chem, v.275, n.43, Oct 27, p.33238-43. 2000.

Tom, B., R. De Vries, *et al.* Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. Hypertension, v.38, n.1, Jul, p.95-9. 2001.

Tom, B., A. Dendorfer, *et al.* Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? Int J Biochem Cell Biol, v.35, n.6, Jun, p.792-801. 2003.

Ueda, S., S. Masumori-Maemoto, *et al.* Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. J Hypertens, v.19, n.11, Nov, p.2001-9. 2001.

Vickers, C., P. Hales, *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. J Biol Chem, v.277, n.17, Apr 26, p.14838-43. 2002.

Wiemer, G., L. W. Dobrucki, *et al.* AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. Hypertension, v.40, n.6, Dec, p.847-52. 2002.

Wilsdorf, T., J. V. Gainer, *et al.* Angiotensin-(1-7) does not affect vasodilator or TPA responses to bradykinin in human forearm. Hypertension, v.37, n.4, Apr, p.1136-40. 2001.

Zisman, L. S., R. S. Keller, *et al.* Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. Circulation, v.108, n.14, Oct 7, p.1707-12. 2003.

ANEXO

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](#)