

ANTONELA MURARI

**Avaliação das respostas cardiovasculares
induzidas pela bradicinina e angiotensina II em
ratas transgênicas que expressam uma proteína de
fusão produtora de angiotensina-(1-7)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**BELO HORIZONTE
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANTONELA MURARI

**Avaliação das respostas cardiovasculares induzidas pela
bradicinina e angiotensina II em ratas transgênicas que
expressam uma proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Orientador:

Prof. Dr. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

**Belo Horizonte
2010**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio da FAPEMIG e CNPQ.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que sempre esteve ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus, pela força de prosseguir sempre.

A minha mãe, irmãs, tias e primas, pelo carinho.

Ao Vicente, pelo amor, companheirismo e incentivo.

Às minhas amigas Camila Fernanda e Luciana Scarpelli.

Ao meu orientador Robson Augusto Souza dos Santos, pelos ensinamentos, apoio e generosidade.

Aos professores Andréa, Marco Antônio e Maria José, sempre dispostos a ajudar.

Ao José Roberto, Jamil, Janine, Patrícia e Dalton pela valiosa ajuda neste trabalho.

Ao Sergio Henrique, Luiza Michelle, Marilene, Gislaine e Jousie, pela amizade, e ajuda.

Ao Luiz Gonzaga, Daniel Vilela, Guilherme Santos e Rodrigo Menezes pelo apoio desde o início deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela I: Soluções utilizadas para o radioimunoensaio de angiotensina II	31
Tabela II: Soluções utilizadas para o radioimunoensaio de angiotensina-(1-7)	32
Tabela III: <i>Primers</i> e condições experimentais utilizadas para o PCR	39
Tabela IV: Níveis de Ang II e Ang-(1-7) no sangue venoso e arterial de ratas TGR(A1-7)3292 e SD	42
Tabela V: Extensão da degradação da bradicinina calculada através de doses equipressoras de bradicinina administrada intra aórtica e intra venosa, que produzem uma redução padrão de 15mmHg na pressão arterial média de ratas SD e TGR (L3292)	47
Tabela VI: Extensão da conversão da angiotensina I calculada através de doses equipressoras de angiotensinas I e angiotensinas II que produzem um aumento padrão de 15mmHg na pressão arterial média de ratas SD e TGR(A1-7)3292	56

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Ilustração simplificada do Sistema Renina Angiotensina. ECA, enzima conversora de angiotensina; AMP, aminopeptidase; Ang, angiotensina; AT, receptor de angiotensina II; IRAP, aminopeptidase regulada pela insulina; MAS, receptor de angiotensina-(1-7); NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolilendopeptidase; PCP, prolilcarboxipeptidase; RPR, receptor de renina/pró-renina.	9
Figura 2: Ilustração simplificada da síntese e metabolismo da Bradicinina. ECA, enzima conversora de angiotensina; NEP, endopeptidase neutra.	11
Figura 3: Receptores de cininas e suas vias de sinalização. Representação esquemática dos receptores B1 e B2 e liberação de segundos mensageiros devido à sua ativação. PLC: fosfolipase C; ER: retículo endoplasmático; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; PLA2: fosfolipase A2; NO: óxido nítrico; eNOS: NO sintase endotelial, BK: bradicinina; KD: calidina; B1R: receptor B1 de cininas; B2R: receptor B2 de cininas; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; GMPc: monofosfato cíclico de guanosina. (Adaptado de MOREAU e cols., 2005).	13
Figura 4: Ilustração simplificada da interação enzimática entre os Sistemas Renina Angiotensina e Calicreína Cininas. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA 2, enzima conversora de angiotensina 2; Ang, angiotensina; NEP, endopeptidase neutra; BK, bradicinina.	16
Figura 5: Representação esquemática dos componentes estruturais do construct utilizado para geração dos ratos TGR(A1-7)3292 e da proteína de fusão codificada pelo transgene. A	

Ang-(1-7) é liberada pela ação da enzima constitutiva furina após a secreção da proteína de fusão. 20

Figura 6: Diferenças dos níveis arterial e venoso de Ang-(1-7) obtidos por RIE em ratos SD e transgênicos. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos tipos de sangue obtidos dos animais SD (Mann Whitney test). 43

Figura 7: Níveis arterial e venoso de Ang II obtidos por RIE em ratos SD e transgênicos. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos tipos de sangue obtidos dos animais SD (Teste t de student). 43

Figura 8: : Média da pressão arterial média (PAM) de ratas Sprague-Dawley (SD) e TGR(A1-7)3292 (TGR) acordadas, no estado basal. Os dados representam a média \pm EPM. (n=17) 44

Figura 9: Média da frequência cardíaca (FC) de ratas SD e TGR(A1-7)3292 acordadas, no estado basal. Os dados representam a média \pm EPM (n=17). 44

Figura 10: Efeito hipotensor produzido pela injeção *in bolus* de BK i.v. (0.25 μ g – 2.0 μ g) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.01$ (Two-way ANOVA – Bonferroni). 45

Figura 11: Efeito hipotensor produzido pela injeção *in bolus* de BK i.a. (5.0 ng – 40 ng) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p <$

- 0.01 (Two-way ANOVA – Bonferroni). 46
- Figura 12:** Curva dose resposta do efeito hipotensor produzido pela injeção de Ach i.a. (3.125 ng – 25 ng) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como \pm EPM (Two-way ANOVA – Bonferroni). 48
- Figura 13:** Curva dose resposta do efeito hipotensor produzido pela injeção de NP i.v. (1 ng – 20 μ g) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como \pm EPM. * $p < 0.01$ (Two-way ANOVA – Bonferroni). 48
- Figura 14:** Alterações reflexas na FC (expressas em IP, ms) em resposta a variações na PAM (mmHg) produzidas por doses crescentes de nitroprussiato (1,25 - 20 μ g, iv) (n=4). Painel A: as linhas representam a reta de melhor ajuste obtida por regressão linear. Painel B: slope da sensibilidade da taquicardia reflexa Δ IP/ Δ PAM (ms/ mmHg). * $p < 0,05$ comparado com animais controle. (Teste t de student). 50
- Figura 15:** Gráfico mostra o efeito hipotensor do NP em ratas TGR(A1-7)3292 e SD antes (painel A) e após (painel B) 15min da administração de atenolol (1mg/Kg). Valores são expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$, Two-Way ANOVA seguido por Bonferroni (n=5). 51
- Figura 16:** Gráfico mostra as variações na PAM em ratas [TGR(A1-7)3292] e SD após 3 minutos da administração de L-NAME (10mg/Kg). Valores expressos como média \pm EPM. Mann Whitney test (n=18). 52

- Figura 17:** Gráfico mostra o efeito hipotensor da BK em ratas TGR (L3292) e SD antes e após 3 minutos da administração de L-NAME (10mg/Kg). Valores expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$, Two-way ANOVA seguido por Bonferroni (n=8). 53
- Figura 18:** Figura representativa reações de PCR corridas em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Reações de PCR usando produto de RT (cDNA). 53
- Figura 19:** Análise por PCR do RNA extraído de aorta abdominal (Painel A) e artéria mesentérica (Painel B) de ratas SD (n=3) e TGR (L3292) (n=3). Expressão de eNOS . Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*. 54
- Figura 20:** Efeito pressor produzido pela Ang I i.v. (2.5 ng – 20ng) em ratas SD (n=15) e [TGR(A1-7)3292] (n=16) conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ (Two ANOVA – Bonferroni). 55
- Figura 21:** Efeito pressor produzido pela Ang II i.v. (2.5ng-10ng) em ratas SD (n=14) e [TGR(A1-7)3292] (n=14) conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ (Two ANOVA – Bonferroni). 56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ^{125}I -Ang I – Angiotensina I marcada com iodo 125
 ^{125}I -Ang II - Angiotensina II marcada com iodo 125
A-779 – antagonista seletivo da Ang-(1-7), [D-Ala₇]Ang-(1-7)
Ach - acetilcolina
ACN - acetronitrila
AKT – proteína quinase B
AMP – aminopeptidase
AMPC – monofosfato cíclico de adenosina
Ang I - angiotensina I
Ang II – angiotensina II
Ang III – angiotensina III
Ang IV – angiotensina IV
Ang-(1-7) – angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9) – angiotensina-(1-9)
ANOVA – análise de variância
ANP - peptídeo natriurético atrial
AT₁ - receptor de angiotensina II tipo 1
AT₂ - receptor de angiotensina II tipo 2
AVP – arginina vasopressina
B₁ - receptor cininérgicos tipo 1
B₂ - receptor cininérgicos tipo 1
BK - bradicinina
Ca⁺² - íon cálcio
Cl⁻ - íon cloro
CPM - carboxipeptidases M
CPN - carboxipeptidases N
DAG - diacilglicerol

DEPC - dietil-pirocarbonato
dP/dt -
ECA - Enzima conversora de angiotensina
ECA 2 - Enzima conversora de angiotensina 2
EDHF- fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA – ácido etilenonitrilotetraacético
eNOs – óxido nítrico sintase endotelial
EPM – erro padrão da média
ER - retículo endotelial
FC – frequência cardíaca
GMPc – monofosfato cíclico de guanosina
HCl – ácido clorídrico
HFBA - ácido heptafluobutírico
HOE140 – antagonista de receptor cininérgico do tipo 2
i.a. - intra-arterial
i.v. - enovenoso
iECA- inibidores de enzima conversora de angiotensina
IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato
IRAP - aminopeptidase regulada pela insulina
L-NA – inibidor de óxido nítrico sintase
L-NAME - inibidor de óxido nítrico sintase
Lys-BK – calidina
MAS - receptor de angiotensina-(1-7)
NaCl- cloreto de sódio
NEP - endopeptidase neutra
NO – óxido nítrico
NP – nitroprussiato de sódio
PAM – pressão arterial média
PCP – prolilcarboxipeptidase
PD123177 – antagonista de receptor angiotensinérgico do tipo 2
PEP – prolilendopeptidase

PG - prostaglandina
PKA - proteína quinase A
PLA2 - fosfolipase A2
PLC - fosfolipase C
PMSF - fenil metil sulfonil fluoreto
RNAm – RNA mensageiro
ROS - espécie reativa de oxigênio
RPR - receptor de renina/pró-renina
SCC - Sistema caliceína cinina
SD - Sprague-Dawley Hannover
SRA - Sistema renina-angiotensina
V₂ - receptor de vasopressina tipo 2

RESUMO

A administração de Ang-(1-7) potencializa a ação da BK em diversas preparações e não altera o efeito pressor produzido pela Ang II. Entretanto os efeitos do aumento crônico da Ang-(1-7) sobre os efeitos cardiovasculares da BK não são conhecidos. Recentemente foi desenvolvido um rato transgênico que expressa uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) [TGR-(A1-7)L3292]. Neste estudo nós determinamos os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) e Ang II em fêmeas desta linhagem. Além disso, determinamos o efeito pressor da Ang II e efeito hipotensor da bradicinina (BK) em ratas TGR L3292. Avaliamos também a participação do óxido nítrico e ECA nos efeitos induzidos pela BK nestes animais. Ratas fêmeas foram anestesiadas com tribromoethanol (2.5%, 1ml / 100g), e cateteres foram introduzidos na artéria femoral para medir a pressão arterial média e na veia femoral e aorta descendente (através da artéria carótida) para administração de BK, Ang I e Ang II. Vinte quatro horas após a cirurgia, doses crescentes de Ang I (2.5-20ng i.v.); Ang II (1.25-10 ng, i.v.); BK (0.25 - 2.0 ug, iv; 5-40 ng, i.a.) foram administradas em ratas fêmeas TGR L3292 . Ratas fêmeas Sprague-Dawley (SD) da mesma idade foram usadas como controle. Os níveis de Ang-(1-7) estavam aumentados em no plasma arterial de ratas TGR L3292em comparação com ratas SD. Não houve diferença nos níveis de Ang II. A resposta pressora para Ang II estava significativamente atenuada em ratas TGR L3292 em comparação com as ratas SD. Em contraste, o efeito hipotensor produzido pela administração de BK i.v. estava significativamente aumentado em ratas TGR L3292 em comparação com ratas SD. Diferenças similares foram observadas para administração i.a. de BK. Não foram observadas diferenças na expressão de RNAm para eNOS e também para a atividade da ECA estimada *in vivo*. Estes dados indicam que o aumento crônico da Ang-(1-7) circulante está associado com significantes mudanças na reatividade vascular para peptídeos vasoativos.

ABSTRACT

Acute Angiotensin (Ang)-(1-7) administration potentiates bradykinin in several preparations and not change the angiotensin II pressor effect. However, the effects of chronic increases in Ang-(1-7) on the cardiovascular effects of angiotensin II and bradykinin are unknown. We have recently engineered a transgenic rat expressing an Ang- (1-7)-producing fusion protein [TGR (A-1-7) L3292]. In this study we determined plasma levels of Ang-(1-7) and Ang II in females of these animals. Indeed, we determined the Ang II pressor response and the hypotensive effect of BK in TGR L3292 females rats and evaluated the NO and ECA participation in BK effects in these animals. Female rats were anesthetized with tribromoethanol (2.5%, 1ml/100g), and polyethylene catheters were introduced into the femoral artery for mean arterial pressure measurement, in the femoral vein for administration of Ang I, Ang II or BK, and descending aorta (through the carotid artery) for administration of BK. Twenty four hours after the surgery, increasing doses of Ang I (2.5-20ng); Ang II (1.25-10 ng,i.v.); BK (0.25 - 2.0 ug, iv; 5-40 ng, i.a.) were administered in TGR L3292 female rats and age-matched female Sprague-Dawley rats (SD). Plasma levels of Ang-(1-7) are significantly increased in these animals, but not in Ang II levels. The angiotensin II pressor response was significantly attenuated in L3292 rats in comparison to SD rats. In contrast the hypotensive effect produced by intravenous BK was significantly augmented in TGR L3292 rats in comparison to SD rats. Similar differences were observed for intra-arterial administration of BK. No difference was observed in eNOS mRNA expression and ECA activity estimated in vivo. These data indicate that chronic increases of circulating Ang-(1-7) are associated with significant changes in the vascular reactivity to vasoactive peptides.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O sistema renina-angiotensina.....	2
1.1.1 Componentes do Sistema Renina Angiotensina.....	2
1.1.1.1 Renina	
1.1.1.2 Angiotensinogênio.....	3
1.1.1.3 Enzimas conversora de angiotensinas.....	3
1.1.1.4 Angiotensina II	4
1.1.1.5 Angiotensina-(1-7).....	6
1.2 O sistema caliceína-cinina.....	10
1.3 Interação entre os sistemas renina-angiotensina e caliceína-cinina..	14
1.3.1 Interação Angiotensina-(1-7)-bradicinina	15
1.4 Animal transgênico – ratos que expressam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7) [TGR(1-7)3292].....	16
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Material.....	25
3.1.1 Animais.....	25
3.1.2 Equipamentos.....	25
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Análise dos níveis de angiotensinas – Radioimunoensaio.....	28
3.2.1.1 Coleta das amostras.....	28
3.2.1.2 Radioimunoensaio (RIE).....	29
3.2.2 Procedimentos experimentais.....	33
3.2.2.1 Procedimentos cirúrgicos.....	33
3.2.2.2 Registro da Pressão arterial.....	33
3.2.2.3 Injeções de drogas.....	34
3.2.3 Cálculo da taxa de inativação da bradicinina.....	34
3.2.4 Cálculo da taxa de conversão de Angiotensina I em Angiotensina II.....	34
3.2.5 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC – Taquicardia barorreflexa.....	35
3.2.6 Protocolos Experimentais	35
3.2.7 Retrotranscrição e Reação de Polimerização em Cadeia.....	37
3.2.7.1 Extração de RNA total.....	37
3.2.7.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico da amostra de RNA total.....	38
3.2.7.3 Quantificação do RNA total.....	38
3.2.7.4 Transcrição Reversa (RT).....	38
3.2.7.5 PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose.....	38

3.3 Análise Estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Análises dos níveis plasmáticos de Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II por Radioimunoensaio.....	42
4.2 Análises dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca.....	44
4.3 Efeito hipotensor da bradicinina.....	45
4.4 Inativação da Bradicininina no pulmão.....	46
4.5 Especificidade da atividade potenciadora da Ang-(1-7).....	47
4.6 Índice de taquicardia reflexa.....	49
4.7 Participação do óxido nítrico na potenciação da bradicinina.....	52
4.8 Expressão gênica de NO sintase endotelial por PCR.....	53
4.9 Efeitos pressóricos da Angiotensina I e Angiotensina II.....	55
4.10 Taxa de conversão Angiotensina I – Angiotensina II.....	56
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema renina-angiotensina

O sistema renina – angiotensina (SRA) é um sistema peptidérgico com características endócrinas, parácrinas e autócrinas (PAUL e cols., 2006). Exerce um importante papel no controle da pressão arterial, perfusão tecidual e volume extracelular (ATLAS, 2007; POLIZIO e cols., 2007).

O substrato do sistema, angiotensinogênio, é uma alfa-glicoproteína liberada pelo fígado. É clivada na circulação pela enzima renina, que é secretada por células do aparelho justaglomerular do glomérulo renal para formar o decapeptídeo sem atividade direta conhecida, angiotensina I (Ang I). Essa última, então, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma metaloproteinase associada à membrana, que é expressa em altas concentrações na superfície de células endoteliais da circulação pulmonar, e forma o peptídeo vasoativo angiotensina II (Ang II) (PAUL e cols. 2006; ATLAS, 2007). Na última década, o conceito clássico do SRA sofreu importantes mudanças. Muitos novos componentes biologicamente ativos foram descritos, como angiotensina-(1-7), Ang III, e Ang IV (CASTRO e cols., 2005) (Figura1).

1.1.1 Componentes do sistema renina angiotensina

1.1.1.1 Renina

A enzima renina é uma aspartil protease inicialmente sintetizada como pró renina (CAMPBELL e cols., 2003). Sua secreção é regulada principalmente por 4 fatores interdependentes: o primeiro, pressão de perfusão renal; segundo, alteração na carga filtrada de NaCl (detectada como mudança na concentração de Cl⁻) da mácula densa pelas células do túbulo distal; terceiro, nível de atividade do sistema nervoso simpático renal, via receptores beta-1 adrenérgico; e ,por fim,

feedback negativo devido à ação direta da Ang II sobre as células justaglomerulares. Ang II, peptídeo natriurético atrial (ANP) e vasopressina reduzem a liberação de renina. Renina é também sintetizada por outros tecidos, incluindo cérebro, glândula adrenal, ovário, tecido adiposo visceral e, provavelmente, coração e tecido vascular (ATLAS, 2007).

1.1.1.2 Angiotensinogênio

A origem primária do angiotensinogênio é o fígado, entretanto, tem sido detectada expressão de RNA mensageiro (RNAm) em muitos outros tecidos, incluindo rim, cérebro, coração, vasos, glândula adrenal, placenta e tecido adiposo. Seus níveis plasmáticos são geralmente estáveis, contudo, há um aumento em resposta a glicocorticóides, estrógeno, citocinas inflamatórias (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), hormônios da tireóide e Ang II (ATLAS, 2007).

1.1.1.3 Enzimas Conversoras de Angiotensinas

Duas formas distintas de ECAs são expressas em humanos, uma forma somática, que é particularmente abundante na superfície endotelial dos vasos pulmonares e uma forma germinal, que é produzida exclusivamente nos testículos (FLEMING e cols., 2006).

Todas as ECAs hidrolisam um espectro de peptídeos circulantes. Por exemplo, inativam os peptídeos vasodilatadores bradicinina (BK) e calidina e clivam Ang I em Ang II. Alguns dos efeitos dos inibidores da ECA podem ser bloqueados pelo antagonista do receptor B₂, ibitican, indicando que o acúmulo de BK e não apenas prevenção da formação de Ang II podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos dessa classe de compostos (FLEMING e cols., 2006).

ECA 2 é uma carboxipeptidase com preferência para hidrólise entre prolina e resíduos hidrofóbicos carboxi – terminais (FERRARIO e cols., 2005), que foi identificada por dois grupos em 2000 (DONOGHE e cols., 2000 ; TIPNIS e cols.,

2000) É estabelecida como associada à membrana e secretada nos tecidos cardiovasculares, neural e órgãos reprodutores (FERRARIO e cols., 2005). Enzima conversora de angiotensina 2 é uma enzima homóloga à ECA; sua porção do domínio amino-terminal exibe aproximadamente 40% de seqüência idêntica a da ECA; entretanto, seu domínio citoplasmático e transmembrana possui 48% de homologia para colectrina, uma proteína não catalítica que tem mostrado um papel crítico na absorção de aminoácidos no rim, proliferação de células beta e exocitose de insulina (LAMBERT e cols., 2007).

Angiotensina I é hidrolisada muito lentamente pela ECA 2, enquanto Ang II é hidrolisada em Ang-(1-7) com alta eficiência catalítica (FERRARIO e cols., 2005). ECA 2 possui aproximadamente 400 vezes mais afinidade por Ang II do que por Ang I. Sendo assim, o maior papel da ECA 2 no metabolismo de peptídeos parece ser a produção de Ang-(1-7) (XIA e cols., 2008)

In vivo, ECA 2 é predominantemente expressa no coração, rins e testículos e, em níveis mais baixos em outros órgãos, particularmente no cólon e pulmão e fígado. (LAMBERT e cols., 2007).

1.1.1.4 Angiotensina II

Angiotensina II, hormônio octapeptídico, é um componente ativo do SRA. Exerce importante papel fisiológico na regulação da pressão sanguínea, volume plasmático e atividade nervosa simpática. Tem papel crucial na patogênese de doenças cardiovasculares e renais como, hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio, hipertensão e aterosclerose e doença renal crônica (GASPARO e cols., 2000, BERRY e cols., 2001).

Em células de mamíferos, Ang II medeia seus efeitos atuando diretamente através de dois tipos de receptores: AT₁ e AT₂. Receptores de Ang II foram localizados na vasculatura, coração, rim, adrenal, sistemas nervoso e endócrino. Entretanto, existem diferenças de distribuição anatômica e expressão entre os receptores AT₁ e AT₂, assim como diferenças nas vias de sinalização (WIDDOP e cols., 2003). Esses receptores podem ser distinguidos através da inibição com

antagonistas específicos. Receptores AT₁ são antagonizados seletivamente por bimetilimidazoles, como losartan, enquanto tetra-hidroimidazopiridinas inibem especificamente receptores AT₂. Ang II também pode exercer seus efeitos atuando indiretamente através da liberação de outros fatores, e através de *cross-talk* com cascatas de sinalização intracelulares de outros agentes vasoativos, fator de crescimento e citocinas (BERRY e cols., 2001).

O receptor AT₁ medeia a maioria dos efeitos produzidos pela Ang II. É um receptor de sete domínios transmembrana acoplado a proteína G. Embora o receptor AT₁ tenha interação com diversas proteínas G, as maiores funções fisiológicas são devidas à ativação da fosfolipase C, mediada pela G_q, seguido da hidrólise de fosfoinositol e sinalização de Ca⁺². O receptor AT₁, como muitos outros receptores acoplados à proteína G mobilizam Ca⁺², sinalizam primeiramente através do acoplamento com a proteína G_{q/11} que ativam a fosfolipase C-β (PLC-β), levando a hidrólise de polifosfoinositol, estimulação da IP₃/sinalizado por cálcio, e ativação da proteína quinase C (GASPARO e cols., 2000).

A ativação do receptor AT₁ estimula vasoconstrição, hipertrofia de células vasculares e hiperplasia, aumento da contratilidade cardíaca e hipertrofia, aumento da atividade do sistema nervoso simpático, estimulação da síntese de aldosterona, retenção de sódio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), processos trombóticos e fibróticos (ATLAS, 2007, BERRY e cols., 2001, KOBORI e cols., 2007). Além disso, infusão de Ang II causa redução de adiponectina no plasma. Outras ações metabólicas incluem modulação pró-inflamatória, aumento da secreção de insulina, apoptose de células β, redução da gliconeogênese e retirada da glicose hepática e aumento dos níveis de triglicérides do plasma (FYHRQUIST & SIJONMA, 2008). Localmente, Ang II produz inflamação, mitogênese, apoptose, migração e diferenciação, regula a expressão gênica de substâncias vasoativas e ativa múltiplas vias de sinalização intracelular, as quais podem contribuir para injúria tecidual (KOBORI e cols., 2007).

O receptor AT₂ é do tipo sete domínios transmembrana acoplado à proteína G (BERRY e cols., 2001). Esse receptor é abundante durante a vida fetal,

no cérebro, rim e outros tecidos e seus níveis reduzem, marcadamente, no período pós-natal. Evidências sugerem que o receptor AT₂ pode ter um papel fisiológico na regulação da pressão sanguínea e função renal, contrabalançando as ações vasoconstritoras e antidiuréticas da Ang II via receptor AT₁ (ATLAS, 2007). Alguns estudos mostram, ainda, que este receptor pode contribuir para a eficácia dos antagonistas de receptor AT₁ (WIDDOP e cols., 2003).

1.1.1.5 Angiotensina- (1-7)

Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um dos produtos biologicamente ativos do SRA. A primeira demonstração de uma ação biológica da Ang-(1-7) foi realizada por SCHIAVONE e cols. (1988). Nesse estudo foi demonstrado que Ang-(1-7) é capaz de estimular a secreção de AVP em *explants* hipotálamo-hipofisários de ratos. O estudo foi motivado pela observação, publicada no mesmo ano, por SANTOS e cols. (1988), utilizando homogenatos de porções ventrolateral e dorsomedial de medula bulbar de cães, que o principal produto da hidrólise tanto da ¹²⁵I-Ang I quanto da ¹²⁵I-Ang II era a Ang-(1-7). O heptapeptídeo, Ang-(1-7), é liberado pela Ang I e Ang II através da ação de diversas endopeptidases e carboxipeptidases, incluindo ECA2 (DEDDISH e cols., 1998; BENTER e cols., 2006). Ang I pode ser clivada em Ang-(1-7) através da ação da endopeptidase neutra 24.11 e da prolilendopeptidase. Prolilcarboxipeptidase, prolilendopeptidase, e ECA2 catalisam a conversão de Ang II em Ang-(1-7). Além disso, Ang-(1-9) também pode ser convertida em Ang-(1-7) através da ação seqüencial da ECA e da endopeptidase neutra. (FERRARIO e cols., 2005) (Figura 1).

Ang-(1-7) está presente na circulação e em tecidos, incluindo coração, vasos sanguíneos e rim (SANTOS e cols., 2005). Atuando através de sua ligação com o receptor acoplado à proteína G, MAS, (SANTOS e cols., 2003), a Ang-(1-7) exerce muitas ações opostas a Ang II. Enquanto um aumento crônico da Ang II pode induzir muitos efeitos deletérios no coração, Ang-(1-7) parece exercer um papel cardioprotetor, podendo prevenir remodelamento cardíaco, por redução da hipertrofia e fibrose. Este peptídeo tem atividade vasodilatadora endotélio

dependente. PORSTI e cols. (1994) demonstraram, em anéis de artéria coronária de suínos com endotélio intacto, que a injeção *in bolus* deste peptídeo provoca relaxamento, entretanto, tal efeito não foi observado em anéis de artéria coronária com endotélio desnudo ou com o pré- tratamento com inibidor da NO sintase. Ang-(1-7) pode estimular a produção de óxido nítrico (NO) (SANTOS & FERREIRA, 2007), através de uma via AKT dependente (SAMPAIO e cols., 2007b), prostaglandinas ou fator hiperpolarizante derivado do endotélio, além de potencializar a ação da BK. Sua atividade vasorrelaxante é marcadamente atenuada pelo inibidor da NO sintase, L-NA e pelo bloqueador específico do receptor B₂, HOE140, mas não pelo inibidor da ciclooxigenase, indometacina (SANTOS e cols., 2005). A efetividade desses bloqueios depende da espécie e do vaso estudado. Ang-(1-7) possui, também, efeitos antiproliferativos, antitrombóticos e antiaritmogênicos (SANTOS & FERREIRA, 2007). Foi demonstrado que Ang-(1-7) melhora a função pós-isquêmica em coração isolado de rato (FERREIRA e cols., 2002) e é também efetiva na prevenção da insuficiência cardíaca após indução de isquemia do miocárdio (LOOT e cols., 2002). Além disso, pode atuar como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial (SANTOS e cols., 2000).

RNA_m do receptor Mas foi detectado em diferentes tecidos como coração, testículo, rins e cérebro. Embora o envolvimento de segundos mensageiros na interação Ang-(1-7) – Mas não esteja completamente estabelecido, dados fisiológicos e farmacológicos indicam o envolvimento das vias NO/GMPc adenilil ciclase/proteína quinase A (PKA) e fosfolipase A₂/ciclooxigenase, nos efeitos vasculares da Ang-(1-7) (SANTOS e cols., 2005). Apesar de que muitas ações da Ang-(1-7) possam ser explicadas pela interação com o receptor Mas, sensível ao antagonista seletivo A-779 (SANTOS e cols. 1994), alguns efeitos desse heptapeptídeo são apenas parcialmente bloqueados pelo A-779. Diversos estudos têm demonstrado que Ang-(1-7) também interage com ECA, AT₁ e AT₂ em altas concentrações, sugerindo a existência de outros sítios de interação para a Ang-(1-7) (SILVA e cols., 2007). Ang-(1-7), em presença de bloqueio do receptor AT₁,

apresenta efeito vasodepressor mediado por mecanismos sensíveis a PD 123319 e A-779. (WALTERS e cols., 2005; CASTRO e cols., 2005). Além disso, DEDDISH e cols. (1998) mostraram que Ang-(1-7) pode atuar tanto como substrato, quanto como inibidor da ECA.

O pulmão é o principal sítio para o metabolismo da Ang-(1-7). Após a conversão de Ang-(1-7) em Ang-(1-5) pela ECA. O pentapeptídeo é metabolizado em Ang-(3-5) por amino ou dipeptil aminopeptidases, além disso, aminopeptidase e a endopeptidase neutra foram caracterizadas como via alternativa para o metabolismo da Ang-(1-7) no córtex renal (ALLRED e cols., 2000). As concentrações sanguíneas de Ang-(1-7) são similares às da Ang II. Entretanto, os níveis de Ang-(1-7) aumentam durante o tratamento com inibidores da ECA, este aumento é devido tanto a maiores níveis de seu precursor, Ang I, quanto à redução na sua degradação pela ECA. Além disso, foi também observado aumento nos níveis circulantes de Ang-(1-7) durante o tratamento com antagonistas de receptor AT₁, devido, provavelmente, a sua maior formação a partir da Ang II através da ação da ECA2 (SANTOS e cols., 2008).

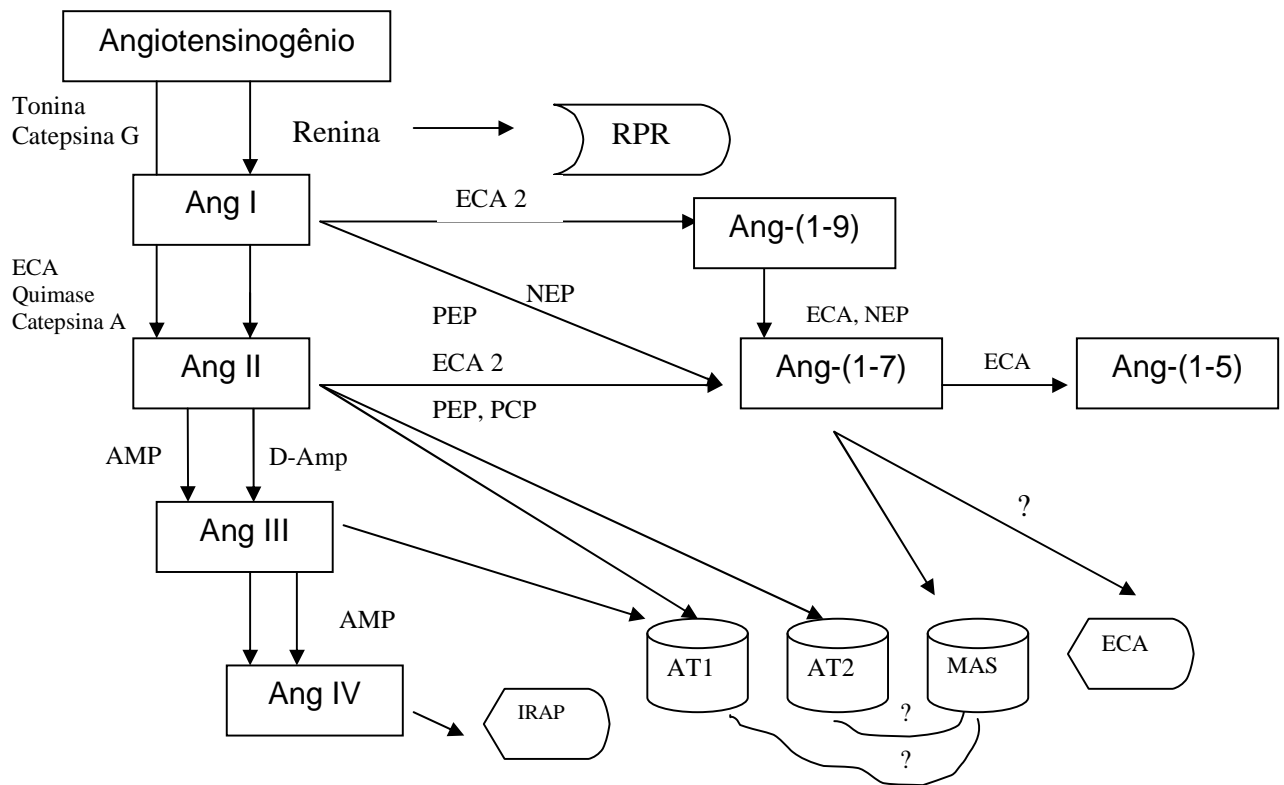


Figura 1: Ilustração simplificada do Sistema Renina Angiotensina. ECA, enzima conversora de angiotensina; AMP, aminopeptidase; Ang, angiotensina; AT, receptor de angiotensina II; IRAP, aminopeptidase regulada pela insulina; MAS, receptor de angiotensina-(1-7); NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolilendopeptidase; PCP, prolilcarboxipeptidase; RPR, receptor de renina/pró-renina. (Adaptado de: SANTOS & FERREIRA, 2007).

1.2 Sistema Calicreína – Cininas

O sistema calicreína – cininas (SCC) representa uma cascata metabólica que, quando ativada, é o gatilho para liberação de cininas vasoativas (MOREOU e cols., 2005). Cininas (BK, Lys-BK [calidina]) e Met-Lys-BK) são oligopeptídeos que contêm a seqüência da BK (Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) na sua estrutura e que, provavelmente, atuam como fatores hormonais locais por mecanismos autócrinos e parácrinos. Circulam em baixas concentrações no plasma e são rapidamente degradados em cerca de 15 segundos por um grupo de peptidases conhecidas por cininases. Em uma única passagem através do leito vascular pulmonar, cerca de 80 a 90% das cininas podem ser metabolizadas (LINZ e cols., 1995). A bradicinina (BK) foi descoberta em 1949 por ROCHA-E-SILVA e cols., que descreveram um potente agente vasodilatador liberado do plasma usando o veneno de uma cobra brasileira, *Bothrops jararaca*. Estudos subseqüentes mostraram que a enzima formadora das cininas, a calicreína, pode também ser encontrada em muitos outros tecidos (COSTA-NETO e cols., 2008).

Os cininogênios são os precursores dos peptídeos cininas e são codificados por um gene simples. Cininogênios de alto e baixo peso molecular são glicoproteínas que contêm a seqüência de cinina em sua porção média (CAMPBELL e cols., 2003). Em humanos e em muitos mamíferos, o termo “cinina” refere-se ao nonapeptídeo BK, e ao decapeptídeo calidina (Lys-BK), e seus metabólitos des-Arg carboxi-terminais (MOREOU e cols., 2005). A calicreína plasmática e a tecidual são serino proteases predominantemente expressas no fígado. Em humanos, a calicreína plasmática forma bradicinina (BK) a partir de cininogênio de alto peso molecular, enquanto a calicreína tecidual forma calidina a partir do cininogênio de alto e baixo peso molecular. Entretanto, tanto a calidina plasmática quanto a tecidual geram BK em roedores (CAMPBELL e cols. 2003) (Figura 2).

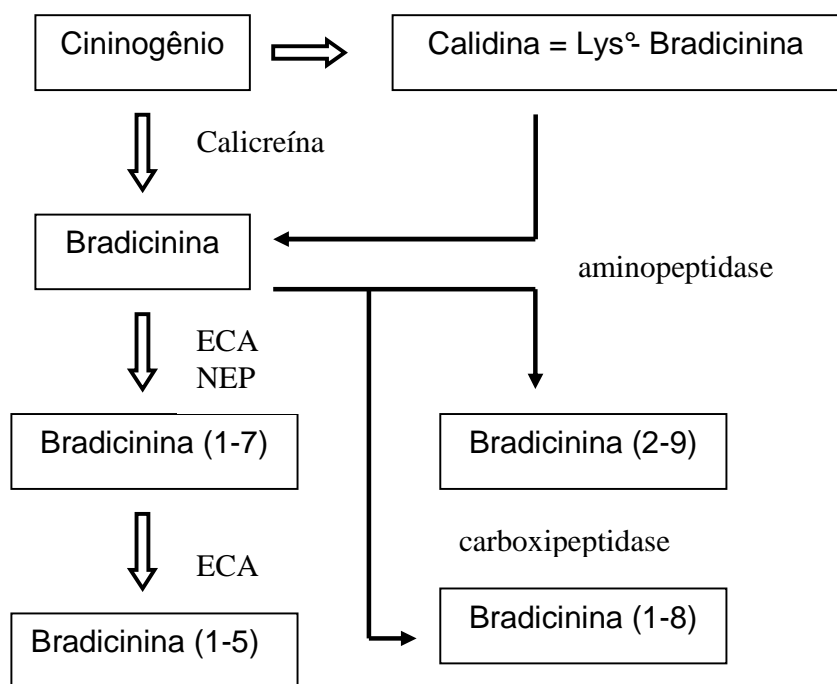


Figura 2: Ilustração simplificada da síntese e metabolismo da Bradicinina. ECA, enzima conversora de angiotensina; NEP, endopeptidase neutra. (Adaptado de TOM e cols., 2003).

Dois tipos de receptores acoplados a proteína G medeiam os efeitos das cininas, receptores tipo 1 (B_1) e tipo 2 (B_2). A transdução de sinal de receptores de cininas ativa diversos sistemas de segundos mensageiros (MOREOU e cols., 2005), em particular óxido nítrico e prostaglandinas (CAMPBELL e cols., 2003), via ativação da proteína G. Ativação da adenilato ciclase ou guanilato ciclase são mecanismos de transdução que conduzem à produção de AMPc e GMPc, eficientes mecanismos vasodilatadores em células de músculo liso vascular. Entretanto, receptores de cininas, acoplados a proteína G_q e G_i , estão apenas indiretamente relacionados à sinalização de nucleotídeo cíclico: via produção de óxido nítrico (NO) endotelial, capaz, ele mesmo, de ativar guanilato ciclase solúvel ou via produção de prostaglandinas (PGs) I_2 ou E_2 , que possuem receptores acoplados à proteína G_i (MOREOU e cols., 2005).

Cininas intactas ligam-se aos receptores de BK B₂, enquanto metabólitos de cininas, como a Des – Arg⁹ – BK ou Des – Arg¹⁰ –Lys – BK ligam-se aos receptores B₁. A ligação das cininas aos seus respectivos receptores ativam vias de sinalização como a NO –GMPc e prostaciclina –AMPc, as quais desencadeiam um grande numero de efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, contração e relaxamento de músculo liso, inflamação e dor (CHAO e cols., 2004; DUKA e cols., 2006). Sob condições normais os efeitos cardiovasculares e renais da BK são exercidos via receptor B₂, o qual é constitutivamente abundante nos tecidos cardíaco, renal e vascular e atua por ativação de componentes vasoativos da cascata prostaglandina-NO. Já os receptores B₁ são induzidos por estímulos como lesão tecidual e estão mais envolvidos em reações inflamatórias e nociceptivas (TOM e cols., 2001). O papel vasorrelaxante da BK mediada pelo receptor B₂ para manutenção do tônus vascular foi sugerido por DUKA e cols., (2001) em camundongos com deleção genética do receptor B₂, que apresentaram um leve, mas significativo aumento da pressão sanguínea sistêmica basal. A ativação do receptor B₂ pela BK promove, através da estimulação de fosfolipases A₂ e C, um aumento da concentração do cálcio citosólico e a formação de potentes vasodilatadores como PGI₂ e NO. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da ação de uma enzima constitutiva dependente da via cálcio-calmodulina, NO sintase. O NO liberado por células endoteliais é difundido para células de músculo liso vascular subjacente, onde aumenta a formação de GMPc através da ativação da guanilato ciclase solúvel. Aumento do GMPc está correlacionado com a inibição da contração e proliferação de células de músculo liso (LINZ e cols., 1995) (Figura 3).

O SCC tecidual pode ser bloqueado por HOE140 (icatibant), um antagonista específico do receptor B₂ ou Des – Arg⁹ – [Leu⁸]-BK, um antagonista específico do receptor B₁ (CHAO e cols., 2004).

A eficiência no metabolismo das cininas é um importante determinante de seus níveis sanguíneos e teciduais (CAMPBELL e cols., 2003). Existem evidências experimentais de que 4 metalopeptidases são responsáveis pelo metabolismo da BK. Estas são enzima conversora de angiotensina (ECA),

também chamada de cininase II, aminopeptidase P (APP), endopeptidase neutra 24.11 (NEP) e carboxipeptidases M e N (CPM, CPN), também conhecida como cininase I (MOREOU e cols., 2005).

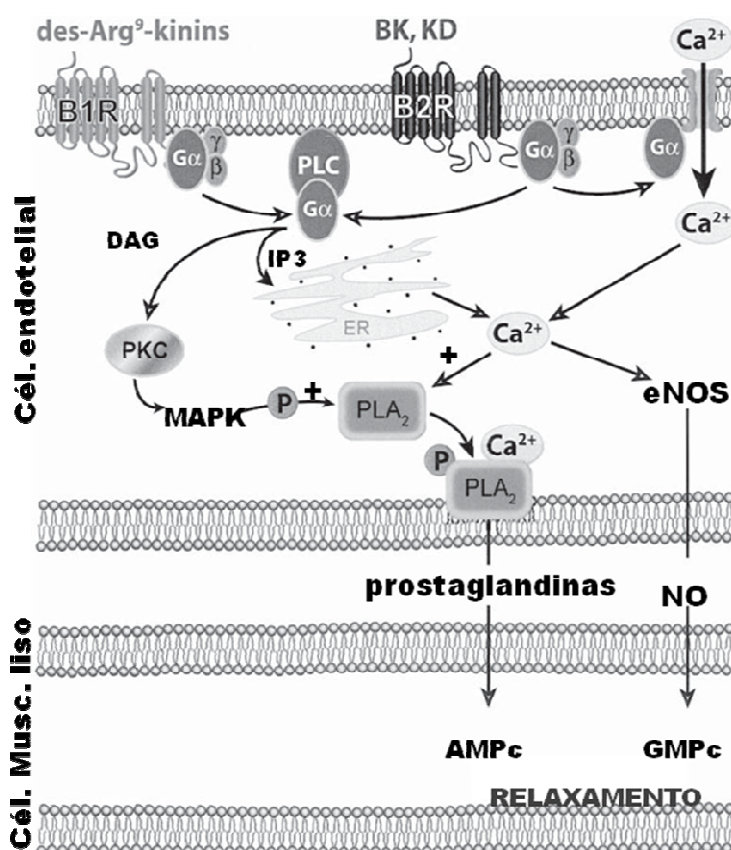


Figura 3: Receptores de cininas e suas vias de sinalização. Representação esquemática dos receptores B1 e B2 e liberação de segundos mensageiros devido à sua ativação. PLC: fosfolipase C; ER: retículo endoplasmático; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; PLA2: fosfolipase A2; NO: óxido nítrico; eNOS: NO sintase endotelial, BK: bradicinina; KD: calidina; B1R: receptor B1 de cininas; B2R: receptor B2 de cininas; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; GMPc: monofosfato cíclico de guanosina. (Adaptado de MOREAU e cols., 2005).

1.3 Interação entre os sistemas Renina-Angiotensina e Calicreína-Cininas

Os SRA e SCC interagem em diversos níveis. Revisão recente propôs que a calicreína é um ativador fisiológico da conversão de pró-renina em renina no rim. Esta hipótese é suportada pela proximidade anatômica das células produtoras de calicreína e células produtoras de renina, e pela habilidade da calicreína urinária purificada em ativar renina de plasma humano previamente acidificado, um procedimento que destrói inibidores de proteases endógenos e inibe ativação de renina (SEALY e cols., 1978 In SHEN & DAHR, 2006). Além disso, os níveis plasmáticos de pró-renina estão elevados em indivíduos com deficiência de pré-calicreína. A Calicreína pode, também, clivar angiotensinogênio e gerar Ang II diretamente (MOREAU e cols., 2005).

A ECA representa o principal elo fisiológico que conecta os SRA e SCC. Pela degradação da BK e conversão de Ang I em Ang II, ECA regula os níveis circulantes e teciduais de Ang II e cininas (Figura 4) (SHEN & DAHR, 2006).

Inibidores da ECA, além de inibirem o metabolismo da BK, potenciam os efeitos da BK por um processo dependente de *cross talk* entre ECA e receptor B₂. Por este processo, inibidores da ECA ressensibilizam o receptor B₂ para BK sem alterar os efeitos primários da BK (MOREAU e cols., 2005).

Outro exemplo da interação entre os SRA e SCC é a formação de heterodímeros entre os receptores AT₁ e B₂, causando ativação das proteínas G_{αq} e G_{αi}, as duas maiores proteínas de sinalização ativadas pelo receptor AT₁. Heterodimerização acentua a sinalização do receptor AT₁ por aumentar a formação de inositol trifosfato e a concentração de cálcio intracelular induzidas pela Ang II, embora tenha efeito oposto à formação de inositol trifosfato induzida pela BK. Aumento na sinalização do receptor AT₁ pelo heterodímero não é influenciado pela BK, entretanto, é dependente de uma interface receptor/proteína G intacta no receptor B₂ (MOREAU e cols., 2005).

Outra evidência da interação entre os sistemas é o resultado que o antagonista do receptor B₂, HOE 140, pode prevenir algumas conseqüências do

antagonismo do receptor AT₁, sugerindo que a BK pode mediar alguns dos efeitos do antagonismo do receptor AT₁ (LIU e cols., 1997).

Finalmente, esses dois sistemas podem interagir através de peptídeos Ang-(1-7) e BK (ver abaixo).

1.3.1 Interação Angiotensina-(1-7) - Bradicinina

Muitas das interações entre Ang-(1-7) e BK ocorrem nos vasos. As duas maiores interações são potenciação da BK pela Ang-(1-7) e mediação de algumas ações vasculares da Ang-(1-7) pelas cininas (SANTOS, 2001).

A administração de Ang-(1-7) potencia a resposta vasodilatadora e hipotensiva da BK em diversas preparações *in vivo* e *in situ*. Este efeito já foi estudado em ratos normotensos (OLIVEIRA e cols., 1999; PAULA e cols., 1995; ABBAS e cols., 1997), hipertensos (FERNANDES e cols., 2001; LIMA e cols., 1997), vasos de artéria coronária de suínos (TOM e cols., 2001), cães (LI e cols., 1997) e ratos (ALMEIDA e cols., 2000). Entretanto os efeitos do aumento crônico da Ang-(1-7) sobre os efeitos cardiovasculares da BK não são conhecidos. Interessantemente a potenciação da BK pela Ang-(1-7) não ocorre em ratos diabéticos, devido provavelmente a uma redução na liberação e/ou alteração na biodisponibilidade do NO produzido pela hiperglicemia (RASTELLI e cols., 2007).

Uma possível importância para interação destes peptídeos é que Ang-(1-7) pode exercer um importante papel no mecanismo de potenciação da BK através da inibição da ECA, sugerindo que Ang-(1-7) pode estar envolvida nos efeitos cardiovasculares dos inibidores da ECA, tanto por efeitos diretos do heptapeptídeo quanto indiretamente por meio da potenciação da BK. (SANTOS e cols., 2001).

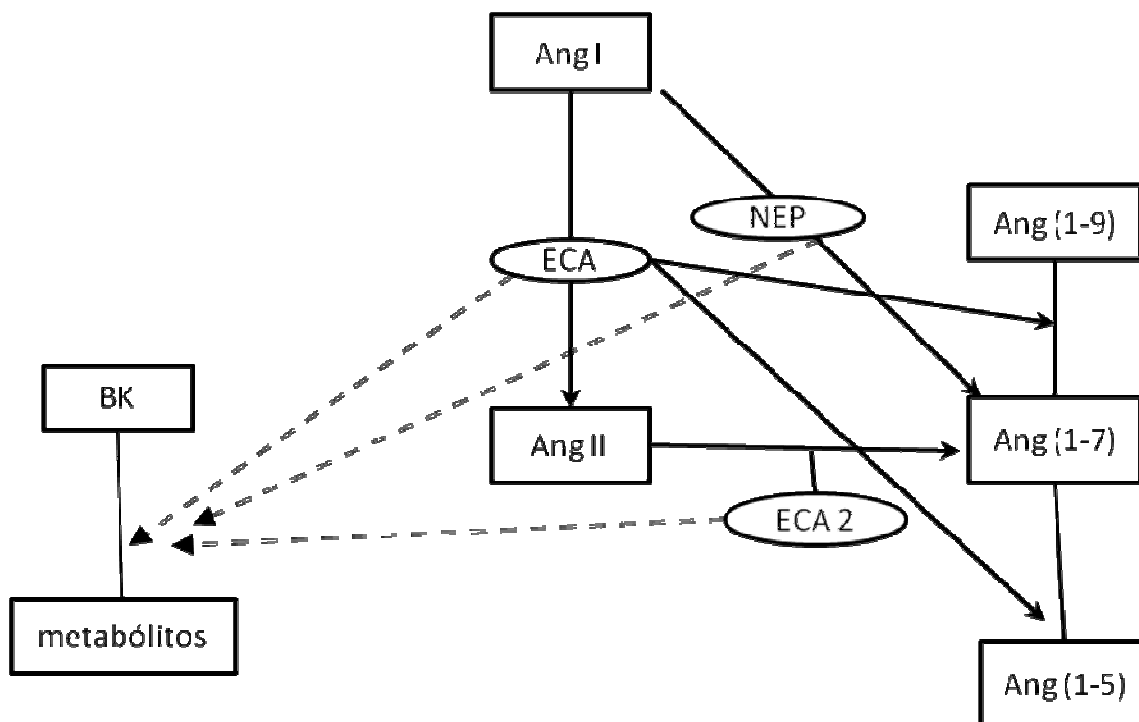


Figura 4: Ilustração simplificada da interação enzimática entre os Sistemas Renina-Angiotensina e Caliceína-Cininas. ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA 2, enzima conversora de angiotensina 2; Ang, angiotensina; NEP, endopeptidase neutra; BK, bradicinina (adaptado de TOM e cols. 2003)

1.4 Animal Transgênico – ratos que expressam uma proteína de fusão produtora de Angiotensina-(1-7) [TGR(A1-7)3292]

Foi descrita uma metodologia em que peptídeos têm a possibilidade de serem diretamente liberados na via secretória pela ação da enzima endógena furina, passando a ser produzidos constitutivamente pelas células de determinado órgão. Assim, essa nova tecnologia é capaz de direcionar a produção de uma ampla variedade de peptídeos para tecidos e tipos de células específicos em animais transgênicos (METHOD, 2001).

O tratamento com inibidor de ECA e antagonistas de receptor AT1 induz um aumento da concentração circulante e tecidual de Ang-(1-7) (SANTOS e cols.,

2000). Considerando os vários efeitos benéficos que Ang-(1-7) exerce no sistema cardiovascular (SANTOS e cols., 2007), o aumento crônico desse peptídeo poderia estar envolvido nas ações destas classes de medicamentos. Por exemplo, LOOT e cols. (2002) demonstraram que a infusão, por oito semanas, de Ang-(1-7) melhora a função endotelial aórtica e preserva a função cardíaca em ratos com insuficiência cardíaca. Com o objetivo de avaliar os efeitos de um aumento crônico de Ang-(1-7), SANTOS e cols. (2004) desenvolveram um “construct” baseado na metodologia descrita por METHOD e cols. (1997). Este “construct”, injetado em zigotos de ratas pseudogravídas, é composto pelos seguintes componentes:

(1) peptídeo sinal proveniente da prorenina humana, o qual assegura que a proteína entre no retículo endoplasmático para a futura secreção desta proteína para o meio extracelular;

(2) porção da região constante da cadeia pesada da IgG2b de camundongo, que promove massa para a proteína de fusão;

(3) porção do pró-segmento da prorenina humana, o qual funciona como um espaçador molecular, pois é necessário para expor o sítio de clivagem para a endoprotease furina o que resulta na liberação do peptídeo;

(4) sítio de clivagem na porção carboxi terminal do pró-segmento da prorenina humana, sendo que neste sítio de clivagem a endoprotease furina atuará liberando a ANG-(1-7) nos tecidos;

(5) o peptídeo que será liberado, no caso a Ang-(1-7) e a seqüência Poly A ;

(6) Na extremidade 5' do “*construct*” foi adicionado o promotor inespecífico CMV (cytomegalovirus promoter) para direcionar a expressão gênica em células de mamíferos de um modo geral. Esta nova linhagem de ratos transgênicos foi denominada de L3292 (SANTOS e cols., 2004) (Figura 5).

Em ratos machos desta linhagem, a expressão do transgene foi aparentemente restrita aos testículos (SANTOS e cols., 2004), entretanto, o local da expressão do transgene em fêmeas ainda não foi definido. Em comparação com seu controle, ratos Sprague-Dawley Hannover (SD), os ratos machos dessa

linhagem possuem uma concentração de Ang-(1-7) nos testículos 4,5 vezes mais alta, enquanto que no sangue venoso e arterial o aumento é de 2,5 vezes. Entretanto, não há diferença nos níveis de Ang-(1-7) presente nos rins, ventrículos, átrios, glândulas adrenais, pulmões e leito vascular pulmonar. As concentrações de Ang II nos átrios, ventrículo direito, glândulas adrenais, rins pulmões testículos e sangue venoso permanecem inalteradas, porém, no ventrículo esquerdo, ocorre uma redução significativa dos níveis desse peptídeo (SANTOS e cols., 2004). Medidas de radiotelemetria mostraram que ratos machos desta linhagem tiveram um leve, mas significativo aumento das medidas diurnas e noturnas de dP/dt (SANTOS e cols., 2005). Foi detectada redução da resistência periférica total e aumento do volume sistólico e do índice cardíaco nos animais TGR(A1-7)3292, quando comparados com seu controle SD (BOTELHO-SANTOS e cols., 2007). Na função renal, foram observados redução do fluxo urinário acompanhado de aumento da osmolalidade urinária, entretanto sem variação nos níveis de vasopressina, assim como da expressão do RNAm para receptor V_2 (FERREIRA e cols., 2006). Além disso, estes animais foram mais resistentes que os animais controle à indução de hipertrofia cardíaca por isoproterenol e tiveram uma menor duração das arritmias de reperfusão e melhora da função pós-isquêmica (SANTOS e cols., 2004).

COLLISTER e cols. (2010) observaram que a infusão de Ang-(1-7), em ratos normotensos, não alterou o efeito de aumento da pressão sanguínea provocada pela infusão de Ang II pelo mesmo período. Resultados semelhantes foram observados por GROBE e col. (2007), em ratos normotensos tratados com Ang-(1-7) por quatro semanas. Estes animais apresentaram inibição do aumento da pressão sanguínea provocada pela infusão de Ang II, no mesmo período, apenas após o 22º dia de tratamento. Estes dados estão de acordo com resultados prévios, em que a administração aguda de Ang-(1-7) não muda o efeito pressor da Ang II (PAULA e cols., 1995). Diferentemente, foi observado, em ratos machos TGR(A1-7)3292 que o aumento da pressão durante a infusão por duas semanas de Ang II foi significativamente atenuado e, ao contrário de ratos SD, estes animais foram protegidos da hipertrofia cardíaca provocada pela infusão

crônica de Ang II (GOMES e cols., 2010) e pelo tratamento DOCA-sal. (SANTIAGO, e cols., 2010.) Além disso, ratos TGR(A1-7)3292, quando submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-sal tiveram o aumento da pressão sanguínea atenuado, em comparação com ratos SD, e este aumento só foi significativo a partir do 20º dia após a cirurgia, enquanto este aumento ocorreu após o 10º dia em ratos SD (SANTIAGO, e cols., 2010.). Contudo, não há estudo demonstrando a resposta à administração aguda de Ang II em machos ou fêmeas da linhagem TGR(A1-7)3292. Neste estudo utilizamos ratas fêmeas das linhagens SD e TGR(A1-7)3292, devido ao fato dos efeitos de níveis circulantes aumentados de Ang-(1-7) sobre Ang II e BK serem desconhecidos em fêmeas. A diferença entre o gênero deve ser considerada, uma vez que trabalhos demonstraram a influência do estrógeno nos componentes do SRA. PENDERGRASS e cols. (2008) observaram que fêmeas de ratos da linhagem mRen.Lewis quando comparados com ratos machos apresentam menor PAM, níveis mais baixos de Ang I e Ang II circulante e níveis mais elevados de Ang-(1-7) no plasma. Além disso, XUE e cols. (2005) observaram que fêmeas de camundongos da linhagem C57/BL6J tratadas com Ang II por sete dias apresentam uma atenuação do aumento da PAM quando comparadas com machos, sugerindo que o estrógeno exerce um papel protetor no desenvolvimento destes modelos de hipertensão. Entretanto, estas diferenças não são encontradas em animais normotensos.

Os efeitos benéficos da Ang-(1-7) na hipertensão podem ser explicados não apenas por um efeito vasodilatador direto, mas também por uma atenuação do efeito pressor produzido pela Ang II e acentuação do efeito hipotensor produzido pela BK. Sabe-se que o aumento agudo da Ang-(1-7) potencializa a BK e não altera o efeito pressor produzido pela Ang II, entretanto o efeito do aumento crônico da Ang-(1-7) sobre os efeitos cardiovasculares produzidos pela BK e Ang II não são conhecidos.

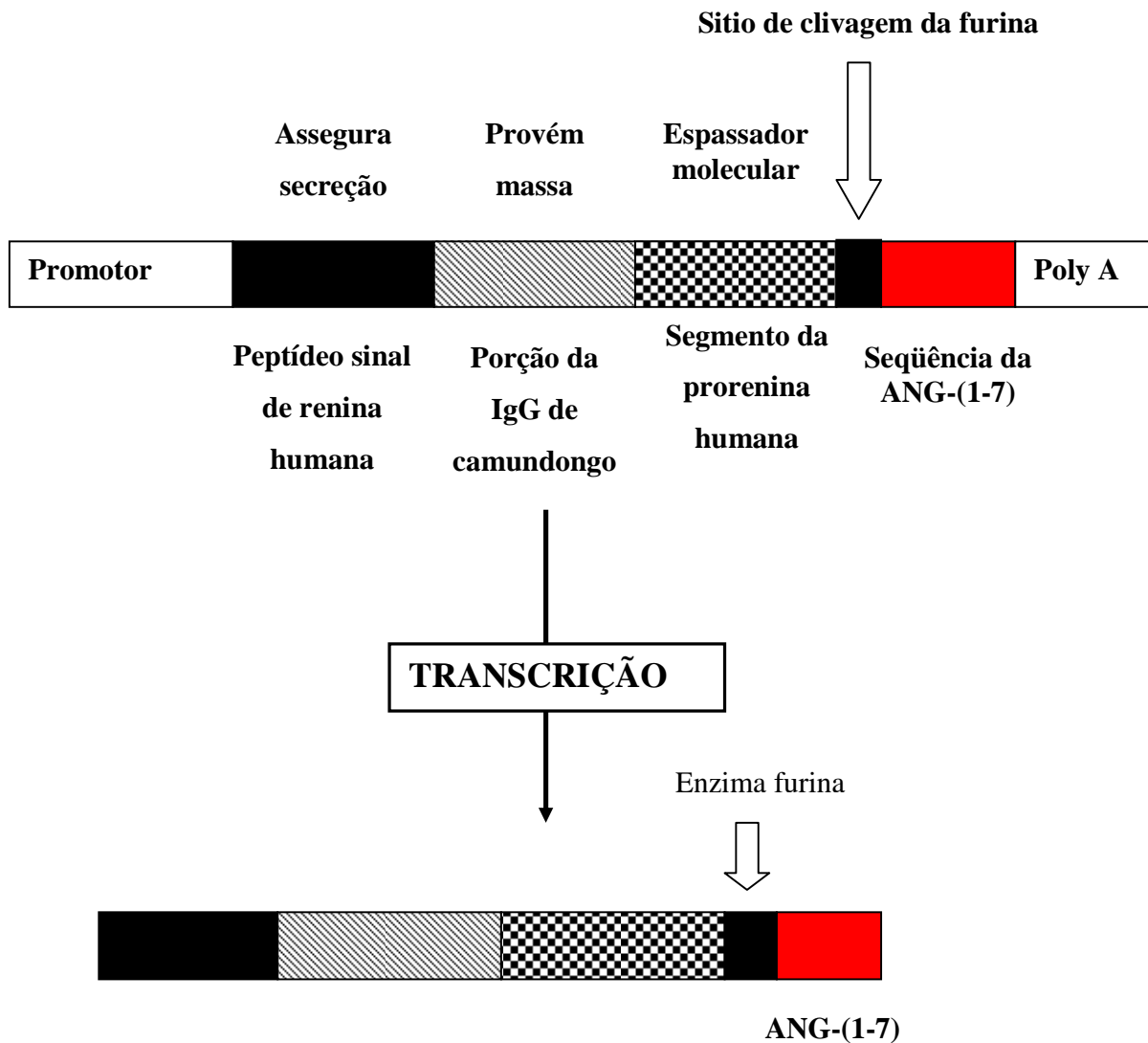


Figura 5: Representação esquemática dos componentes estruturais do “construct” utilizado para geração dos ratos TGR(A1-7)3292 e da proteína de fusão codificada pelo transgene. A Ang-(1-7) é liberada pela ação da enzima constitutiva furina após a secreção da proteína de fusão. (FONTE: FERREIRA, 2004)

OBJETIVOS

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do aumento crônico da Ang-(1-7) no efeito produzido pela BK e ANG II utilizando ratos TGR(A1-7)3292 que expressam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7).

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Determinar os níveis plasmáticos de Ang II e Ang-(1-7) em ratas fêmeas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley.
- 2) Determinar o efeito da ação hipotensora da BK, administrada por via intra-arterial e endovenosa em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley.
- 3) Determinar a taxa de degradação da BK, no pulmão, em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley
- 4) Determinar a especificidade da atividade potenciadora da Ang-(1-7) através da avaliação da ação hipotensora da acetilcolina (Ach), administrada intra-arterial, e nitroprussiato de sódio (NP), administrado por via endovenosa, em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley.
- 5) Investigar o envolvimento do oxido nítrico nas ações da Ang-(1-7) sobre a BK, em ratas Transgênicas [TGR(A1-7)3292] e Sprague-Dawley.
- 6) Determinar o efeito da ação pressora produzida pela Ang II em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley.

7) Determinar a taxa de conversão de Ang I em Ang II em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem L3292 (TGR(A1-7)3292) e Sprague-Dawley Hannover (SD) como controles, com idade de 4 meses, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), protocolo 121/2009.

3.1.2 Equipamentos

- Agitador de tubos (Quimis)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Balança Analítica AM 5500 Automarte (Marte)
- Balança Analítica Precision PR-100 (Spec)
- Centrífugas com velocidades e capacidades diferentes
- Centrífuga Evaporadora (Eppendorf, Alemanha)
- Colunas Bond – Elut fenilsilíca (Varian, Inc.,EUA)
- Contador Gama
- Fluorímetro
- Guilhotina manual
- Homogenizador (Turax)
- Microcomputador contendo sistema de dados Acqknowledge
- Ph metro
- Material instrumental cirúrgico: tesouras, pinças anatômicas, pinça dente de rato, porta agulha, agulha e fio de sutura.

- Vidraria e material de laboratório: balões volumétricos, béqueres, provetas, pipetas automáticas, placas de Petri, seringas de plástico, eppendorf, ponteiras, tubos de poliuretano, cânula de silicone e cânula de polietileno (PE-10 e PE-50)

3.1.3 Drogas e Reagentes

- Bradicinina (Bachem, Califórnia, EUA)
- Angiotensina II (Bachem, Alemanha)
- Angiotensina I (Bachem, Alemanha)
- N_ω-nitro L-methyl arginine (L-NAME) (Sigma Chemical Company-EUA)
- Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company-EUA)
- Acetilcolina (Sigma Chemical Company-EUA)
- Salina isotônica estéril (NaCl 0,9% - Merck)
- Heparina (Roche, Brasil)
- Tribromoethanol 2,5% (Aldrich Chemical Company, Mc Milwaukee EUA)
- Etanol (Merck, Alemanha)
- 1,10-fenantrolina (Sigma, EUA)
- Ácido etilenodinitrilotetraacético (EDTA) (Merck, Alemanha)
- Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) (Sigma, EUA)
- Ácido hepatofluorobutírico (Sigma, EUA)
- Metanol (Merck, Alemanha)
- Parahidróxido Mercúrio Benzoato (POHHgBz) (Sigma, EUA)
- Pepstatin A (Sigma, EUA)
- Acetronitrila (Merck, Alemanha)
- Ácido acético (Merck, Alemanha)
- Ang II marcada com ¹²⁵I

- Anticorpo para Ang II
- Anticorpo para Ang –(1-7)
- Atenolol
- Azida sódica (sigma, EUA)
- Lysozima (Sigma, EUA)
- Ang- (1-7) marcada com ¹²⁵I
- Dextran (Sigma EUA)
- Carvão ativado
- Tris (Sigma, EUA)
- Cloreto de sódio (NaCl) PM 58,44 (Merck, Alemanha)
- Albumina bovina (BSA) PM 23,43 (Sigma, EUA)
- TRizol LS Reagent (Invitrogen Life Tech, EUA)
- NaOH (Merck, Alemanha)
- Isopropanolol (Merck, Alemanha)
- Clorfórmio (Merck, Alemanha)
- MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- 10xPCRBuffer minus Mg (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Dnase I (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- H₂O DEPEC
- dNTPs (MBI Ferramentas, Alemanha)
- Transcriptase reversa M-MLV (Promega, EUA)
- Agarose (Invitrogen Life Technologies, EUA)
- Loading buffer (MBI Fermentas, EUA)
- Brometo de etídeo

- Hexanucleotídeos randômicos (pd(N)₆ sodium salt)
- PRIMERS (Invitrogen[®])
- RNAsin inhibitor (Promega, EUA)
- Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, EUA)

3.2 Métodos

3.2.1 Análise dos níveis de angiotensinas – Radioimunoensaio

3.2.1.1 Coleta das amostras

Foram determinadas as concentrações da Ang-(1-7) e Ang II no plasma arterial e venoso, em ratas transgênicas TGR(A1-7)3292 e controle (SD).

Para determinar os níveis de angiotensinas plasmáticas, o sangue venoso foi coletado através de uma cânula de silicone inserida na veia jugular e o sangue arterial era coletado através de uma cânula de polietileno inserida na artéria femoral. Os animais foram submetidos à cirurgia de implantação das cânulas 24 horas antes da coleta das amostras. O sangue coletado, aproximadamente 1ml, foi colocado em eppendorff contendo 140 µl de um coquetel de inibidores (10 µl de p-hidroxibenzoato de mercúrio (POOH) 1mM, diluído em solução salina 9% estéril; 50 µl de o-fenantrolina 30mM, diluído em etanol 3,5%; 10 µl de para-metilsulfonil fluoreto (PMSF) 1mM , diluído em metanol 50%; 50 µl de EDTA a 7,5%, diluído em água deionizada; e 20 µl de pepstatin A 1 mM, diluído em etanol.

As soluções de POHH e o PMSF foram preparadas imediatamente antes das coletas. O sangue misturado com os inibidores foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e o plasma conservado em um novo eppendorff e estocado a -80°C até o momento da extração das angiotensinas.

3.2.1.2 Radioimunoensaio (RIE)

a) Extração das amostras

A extração de angiotensinas do plasma foi realizada em colunas Bond Elut C-18. Antes das amostras serem aplicadas nas colunas, as mesmas eram centrifugadas novamente a 4°C sob 2000 rpm por 5 minutos. As colunas Bond Elut C-18 foram pré-ativada através da lavagem com 20 mL de acetronitrila 99.9% (ACN 99.9%) / ácido heptafluobutírico 0.1 % (HFBA 0.1%) e 20 mL de uma solução aquosa de HFBA 0.1%. As soluções e amostras de plasma foram injetadas na coluna através da adaptação de uma seringa que permitia aplicar pressão positiva à coluna.

A seguir, as colunas foram lavadas seqüencialmente com 3 mL de BSA 0,1%/ HFBA 0,1%, 10 mL de ACN10%/ HFBA 0,1% e 3mL de HFBA 0,1%. E, então, as amostras foram aplicadas, e os volumes de plasma colocado na coluna foram anotados. Após a aplicação das amostras, as colunas eram lavadas com 20mL de HFBA 0,1% e 3 mL de ACN 60%/ HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3 mL de ACN 99,9%/ HFBA 0,1% e armazenados a -20 °C em tubos de polietileno, previamente lavados com BSA 0,1%. O material eluído foi submetido à secagem em centrífuga evaporadora por 12-24 h e estocado a -20 °C até o processamento das amostras pelo método de Radioimunoensaio.

b) Radioimunoensaio

Os RIE foram realizados conforme os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

b.1) Determinação dos níveis de angiotensina II por RIE

- 1 Composição do Tampão I: tampão tris-ácido clorídrico (HCl) 0,1M, EDTA 15mM, lisozima 0,1% pH 7,4: 6,0g de tris juntamente com 2,79g de EDTA e 0,5g de lisozima dissolvidos em q.s.p. 500ml de H₂O deionizada. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3N
- 2 Composição Tampão II: Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1% / ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR): 4,5g de NaCl e 0,5g de BSA dissolvidos em 500ml de solução de ácido acético 0,03%.
- 3 Anticorpo policlonal (título 1:160.000): preparado a partir de uma solução do estoque diluída em tampão I baseando-se em dados de uma curva de capacidade de ligação preparada previamente.
- 4 ¹²⁵IANG II: ¹²⁵IANG II marcada e purificada, diluída com tampão I para uma concentração de 6000cpm por 0,1ml.
- 5 As concentrações da curva-padrão utilizadas foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5pg / 0,2ml, preparadas a partir de uma solução de estoque de 2mg/ ml.
- 6 A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução é obtida pela mistura de 25mg de dextran e 250mg de carvão ativado dissolvido em 100ml de tampão II. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por uma hora antes do uso.

Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 4° C durante 18 a 22 horas.

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran, foram imediatamente agitados em vórtex e centrifugados a 4°C, em 2500rpm e por 20 minutos, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ . As concentrações de Ang II foram fornecidas pela programação do próprio contador de radioatividade a partir de curva-padrão construída. Essa concentração foi, então, corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

TABELA I

Soluções utilizadas para o radioimunoensaio de angiotensina II

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão I Ang II	1100	100	_____	_____	_____
Tampão II Ang II	200	200	200	_____	_____
Padrões (80-2,5pg)	_____	_____	_____	200	_____
Amostra	_____	_____	_____	_____	200
¹²⁵ IAng II (6000cpm)	100	100	100	100	100
Anticorpo (1:160.000)	_____	_____	100	100	100
Volume Final	1400	400	400	400	400

Total = fração de peptídeo marcado ligado, Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado, Branco= fração do peptídeo marcado não ligado que não foi removido por carvão ativado.

b.2) Determinação dos níveis de angiotensina-(1-7) por RIE

- 1 Constituição Tampão I: tampão tris-HCl 50mM, BSA 0,1%, NaCl 50mM, ázida sódica 0,02% . Três gramas de tris juntamente com 0,5g de BSA, 1,46g de NaCl e 0,1g de azida sódica dissolvidos em q.s.p. 500ml de H₂O deionizada. O pH era acertado para 7,5 com HCl 3N.
- 2 Constituição Tampão II: Solução de NaCl 0,9% / BSA 0,1% / ácido acético 0,03%: 4,5g de NaCl e 0,5g de BSA foram dissolvidos em 500ml de solução de ácido acético 0,03% (solução de reconstituição, SR).
- 3 Anticorpo policlonal preparado a partir de uma solução do estoque diluída em tampão I baseando-se em dados de uma curva de capacidade de ligação preparada previamente.
- 4 ¹²⁵IAng-(1-7): ¹²⁵IAng-(1-7) marcada e purificada, diluída com tampão I para uma concentração de 6000cpm por 0,1ml.
- 5 As concentrações de padrão utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25pg/ 0,1ml, preparadas a partir de uma solução de estoque de 2 mg/ml diluído na SR.

- 6 A separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita pela adição de solução de carvão ativado-dextran ao final da incubação. Essa solução foi obtida pela mistura de 62,5mg de dextran e 625mg de carvão ativado dissolvidos em 100ml de tampão I. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo, por uma hora antes do uso.

TABELA II

Soluções utilizadas para o radioimunoensaio de Angiotensina-(1-7)

Soluções (µl)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão II de Ang II	_____	100	100	_____	_____
Tampão I	1300	200	100	100	100
Amostra	_____	_____	_____	_____	100
Padrões (200-6,25 pg)	_____	_____	_____	100	_____
¹²⁵ IAng-(1-7)(6000cpm)	100	100	100	100	100
Anticorpo (1:20.000)	_____	_____	100	100	100
Volume Final	1400	400	400	400	400

Total = fração de peptídeo marcado ligado, Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado, Branco= fração do peptídeo marcado não ligado que não foi removido por carvão ativado

Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 4°C , durante 18 a 22 horas.

Após a adição da suspensão de carvão ativado-dextran, os tubos foram imediatamente agitados em vórtex e centrifugados a 4°C em 2500rpm e por 20 minutos, sendo o sobrenadante e o precipitado separados por decantação. A fração ligada foi contada em detector de radiação γ .

As concentrações de Ang-(1-7) foram obtidas pela programação do contador de radioatividade a partir de curva-padrão construída. Essa concentração foi corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

3.2.2 Procedimentos experimentais

3.2.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram submetidos a anestesia por tribromoethanol 2,5% (1ml/100g de peso) e foram implantadas cânulas de polietileno na veia femoral e artéria carótida para administração de drogas, e uma cânula na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares, como pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Estes procedimentos foram realizados 24h antes do registro.

3.2.2.2 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por um sinal enviado a um transdutor conectado à cânula inserida na aorta abdominal pela artéria femoral, através do sistema de aquisição de dados (Biopac System, modelo MP100, serial 96122386). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas através de placa de conversão analógico/digital em sinais que alimentam a placa de aquisição de dados. Através do software de leitura da placa, Acqknowledge v.3.5.7 (Biopac System), a pressão arterial pulsátil foi coletada continuamente com uma frequência de amostragem de 2000-4000 Hz. Os valores de PAM e FC foram calculados a partir de pulsos de pressão arterial e registrados pelo sistema. Estas três variáveis foram apresentadas simultaneamente em canais diferentes no monitor e armazenadas em disco rígido.

Os registros foram feitos com os animais acordados mantidos em caixas individuais.

3.2.2.3 Injeções de drogas

As drogas usadas nos experimentos *in vivo* tiveram como veículo uma solução salina isotônica estéril (NaCl 0,9%).

Quando a via utilizada era a peritoneal, para a administração de tribromoethanol 2,5%, o volume utilizado não ultrapassou 1ml/100g de peso corporal. As injeções endovenosas e intra-arteriais *in bolus* foram padronizadas com volume de 0,1ml em cada injeção.

3.2.3 Cálculo da taxa de inativação da Bradicinina

Para avaliar a extensão da inativação da BK na circulação pulmonar em ratas conscientes, foram determinadas as doses equipressora que produziam uma queda na pressão arterial média de 15mmHg quando injetada via veia femoral ou artéria carótida, como descrito por SALGADO e cols., 1982.

3.2.4 Cálculo da taxa de conversão da Angiotensina I em Angiotensina II

A extensão da conversão de Ang I em Ang II foi calculada a partir de doses equipressoras de Ang I e Ang II injetadas via veia femoral para produzir um aumento na pressão arterial média de 15mmHg, como descrito por SALGADO e cols., 1982.

3.2.5 Teste da Sensibilidade do Controle Reflexo da FC – Taquicardia barorreflexa

A sensibilidade do reflexo pressorreceptor foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações da PAM, os animais foram submetidos a injeção *in bolus* endovenosa de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (NP) (1,25 a 20,0 µg/0,1ml). Um intervalo mínimo de um minuto foi mantido entre as injeções, para permitir que a PAM e FC retornassem aos valores basais.

A alteração máxima de FC verificada durante os primeiros cinco segundos da resposta pressora correspondente foi convertida em intervalo de pulso (IP) pela fórmula $IP = 60000/FC$ (mseg). A sensibilidade do reflexo pressorreceptor foi expressa pela razão entre a alteração da FC em intervalo de pulso (mseg) e a alteração da PAM (mmHg) sendo denominado “índice de sensibilidade do reflexo pressorreceptor”. O melhor ajuste da regressão linear foi extraído da média ± EPM para alterações de PAM e FC para cada dose de NP para cada animal. A curva de regressão linear foi usada como um índice de sensibilidade barorreflexa.

3.2.6 Protocolos Experimentais

Protocolo 1

A ação pressora da Ang II e taxa de conversão da Ang I em Ang II em ratas Transgênicas TGR(AI-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas.

Foram feitas injeções endovenosas de Ang I (2,5; 5; 10 e 20ng) e Ang II (1,25; 2,5; 5 e 10 ng) com intervalo de aproximadamente dois minutos entre as doses.

Protocolo 2

A ação hipotensora da bradicinina e inativação da mesma em ratas Transgênicas TGR(AI-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas.

Foram feitas injeções endovenosas de BK (0,25; 0,5; 1e 2 µg) e intra-arteriais (5, 10, 20, 40ng), através da aorta descendente, com intervalo de aproximadamente dois minutos entre as doses.

Protocolo 3

A ação hipotensora da acetilcolina em ratas Transgênicas TGR(AI-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas.

Foram feitas injeções intra-arteriais, através da artéria carótida, de Ach (3,125; 6,25; 12,5 e 25ng), com intervalo de aproximadamente dois minutos entre as doses.

Protocolo 4

A ação hipotensora do nitroprussiato de sódio em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas.

Foram feitas injeções endovenosas, através da veia femoral, de NP (1.25, 2.5, 5, 10 e 20µg), com intervalo de aproximadamente dois minutos entre as doses. Os dados obtidos neste protocolo foram também utilizados para o cálculo da sensibilidade barorreflexa.

Protocolo 5

A ação hipotensora do nitroprussiato de sódio em ratas Transgênicas TGR(A1-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas tratadas com β-bloqueador atenolol.

Foram feitas injeções endovenosas, através da veia femoral, de NP (1.25, 2,5; 5; 10 e 20µg), com intervalo de aproximadamente dois minutos entre as doses antes e após 15 minutos de tratamento com atenolol (1mg/Kg).

Protocolo 6

Participação do oxido nítrico no efeito hipotensor da BK em ratas Transgênicas TGR(AI-7)3292 e Sprague-Dawley acordadas.

Serão feitas injeções endovenosas de BK (0,25; 0,5; 1 e 2 μ g) antes e após 3 minutos da administração de 10mg/ Kg, por via venosa de L-NAME.

3.2.7 Retrotranscrição e Reação de Polimerização em Cadeia

3.2.7.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidinoisotiocianato-fenol-clorofórmio”. Os animais foram sacrificados e tiveram a artéria mesentérica e aorta abdominal imediatamente removidas e congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C . As amostras foram, então, homogeneizadas em tubos de poliuretano de 5 mL contendo o reagente TRIzol® (50 mg de tecido/0,5 mL do reagente extrativo), e o produto transferido para eppendorfs.

Os eppendorfs contendo o homogenato foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Então, adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio. Os tubos foram, agitados e mantidos em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente, sendo, em seguida, centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante (fase aquosa) foi recuperado em outros eppendorfs, com subsequente adição de 0,25 mL de isopropanol; em seguida o material foi levemente agitado e mantido em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos, à 4°C , o sobrenadante era cuidadosamente descartado e adicionou-se 0,5 mL de etanol 70 %, gelado (solução manufaturada em água tratada com dietil-piromcarbonato – DEPC) e mantida em freezer -20°C), agitando-se novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos mantidos a temperatura ambiente até secagem das amostras. O RNA total foi diluído em 0,05 mL de água tratada com DEPC.

3.2.7.2 Eliminação de moléculas de DNA genômico da amostra de RNA total

Para eliminação de uma possível contaminação com o DNA genômico nas amostras de RNA total, utilizou-se a enzima desoxiribonuclease I. O tratamento foi feito de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.7.3 Quantificação do RNA total

Após os procedimentos descritos anteriormente, as amostras de RNA total foram diluídas 50X e estimou-se a concentração em espectrofotômetro a 260 nm. Para o cálculo da concentração do nucleotídeo, utilizou-se a seguinte equação: $[RNA_{total}] = A_{260} \times 40 \times \text{Fator de diluição}$, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

3.2.7.4 Transcrição Reversa (RT)

O RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), a qual foi realizada num volume final de reação de 30 μL utilizando-se 1 μg de RNA total, 0,2 μg de hexadexinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM), 5 μl de MgCl_2 50 mM, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 UI de transcriptase reversa. O cDNA foi sintetizado em termociclador durante um período de 60 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min.

3.2.7.5 PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose

As reações de PCR quantitativa foram feitas utilizando “*primers*” específicos para o cDNA do gene de interesse . A análise dos pares de bases foi executada

através do programa específico BLASTN, (Tabela 3). Alíquotas na concentração de 150 µM foram feitas e guardadas em freezer a -20° C. Uma subsequente diluição para 1nmol/µl foi necessária para uso. Os *primers* do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno) foram de β-actina (Tabela 3). O cDNA obtido da etapa de RT (2 µl) foi utilizado como fita molde para a amplificação por PCR.

Tabela III. *Primers e condições experimentais utilizadas para o PCR*

Alvo	Seqüência (5'para 3') Sense	Seqüência (5' para 3') Antisense	Temperatura de anelamento (°C)	Ciclos
eNOS	5'-TCT GCG GCG ATG TCA CTA TG-3'	5'-CAT GCC GCC CTC TGT TG-3'	60°	30

Todas as reações foram realizadas num volume final de 50 µl em tubos resistentes a temperaturas elevadas (*Hot start*) com os seguintes reagentes: 1 µL (10 µM) de cada primer (*sense* e *anti-sense*), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 2 µl de MgCl₂ 50mM, dNTPs (Deoxinucleotídeos trifosfato-: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,2 mM) e 2,5 UI de *Taq DNA polimerase*. Para o processo de ciclagem térmica, realizou-se desnaturação inicial por 4 minutos a 94 °C seguida de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 30 segundos a 60 °C e extensão por 1 minuto a 72 °C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 minutos a 72 °C (extensão final) após o término do último ciclo. Realizou-se também PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação (branco). Uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). As bandas de amplicons foram visualizadas em transiluminador sob luz ultra-violeta para verificação da presença ou ausência de amplificação. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de massa molecular.

3.4 Análise Estatística

Para a análise dos resultados obtidos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, teste t ou Mann-Whitney U. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão da média (EPM) e foram considerados estatisticamente significantes valores de $p \leq 0,05$. A análise estatística foi feita utilizando-se o *software* Graph Pad Prism, versão 4.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análises dos níveis plasmáticos de Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II por Radioimunoensaio

A análise dos dados de RIE mostrou um aumento significativo dos níveis de Ang-(1-7) no plasma arterial, entretanto o aumento dos níveis de Ang-(1-7) no sangue venoso não foi estatisticamente significativo (Figura 6 e Tabela 4). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de Ang II no plasma arterial ou venoso entre os dois grupos (Figura 7 e Tabela 4)

Tabela IV. Níveis de Ang II e Ang-(1-7) no sangue venoso e arterial de ratas [TGR(A1-7)3292] e SD

	Sangue Venoso		Sangue arterial		Ang-(1-7)/Ang II (Média da soma dos valores artérias e venosos)
	Ang-(1-7) (pg/ml)	Ang II (pg/ml)	Ang-(1-7) (pg/ml)	Ang II (pg/ml)	
SD	46,04±7 (N=7)	42,16± 12 (N=6)	29,94 ± 4 (N=10)	56,87± 10 (N=10)	0,76
TGR	52,93 ± 20 (N=7)	30,84 ± 7 (N=7)	40,57 ± 12* (N=11)	41,89± 7 (N=10)	1,28

Os dados representam a média ± erro padrão da média. As figuras 4 e 5 foram traçadas com os dados desta tabela. *p<0,05 em comparação com os respectivos tipos de sangue obtidos dos animais SD (Mann Whitney test, entre parênteses o número de animais)

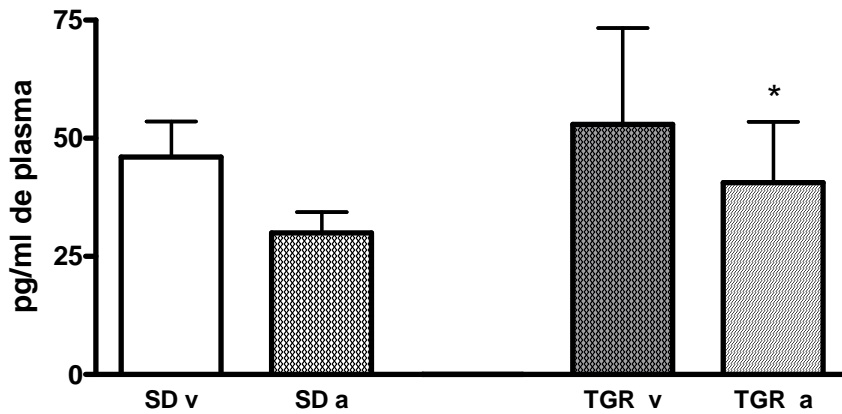


Figura 6: Diferenças dos níveis arteriais e venosos de Ang-(1-7) obtidos por RIE em ratos SD e transgênicos. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos tipos de sangue obtidos dos animais SD (Mann Whitney test)

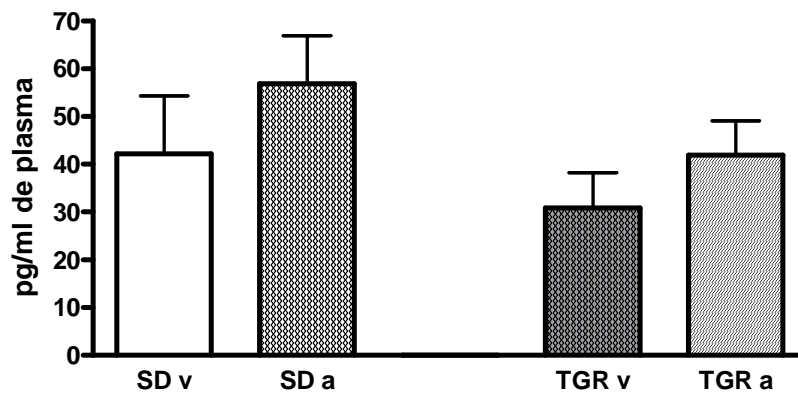


Figura 7: Níveis arteriais e venosos de Ang II obtidos por RIE em ratos SD e transgênicos. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos tipos de sangue obtidos dos animais SD (Teste t de student).

4.2 Análise dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca

Inicialmente, observamos que não houve diferença significativa entre os valores de PAM (Figura 8) e FC (Figura 9) basais entre os animais TGR(A1-7)3292 (112.7 ± 12.09 mmHg; 401.6 ± 33.01 bpm) e os animais controle (SD) (116.6 ± 11.17 mmHg; 401.1 ± 48.4 bpm), acordados.

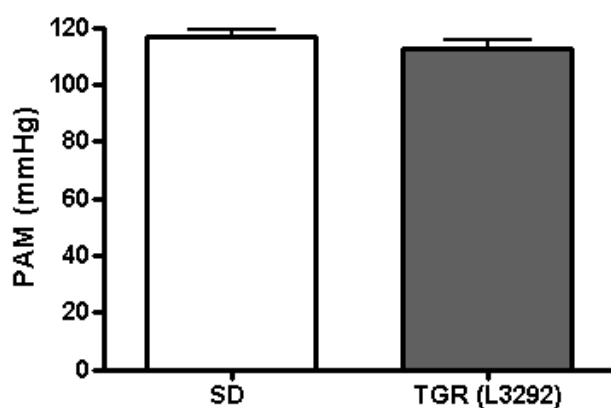


Figura 8: Média da pressão arterial média (PAM) de ratas Sprague-Dawley (SD) e TGR(A1-7)3292 (TGR) acordadas, no estado basal. Os dados representam a média \pm EPM. (n=17)

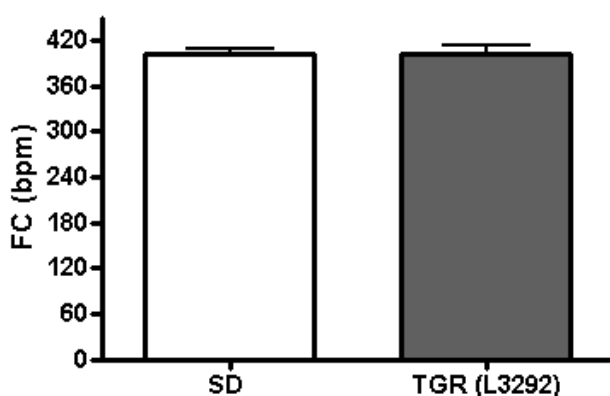


Figura 9: Média da frequência cardíaca (FC) de ratas SD e TGR(A1-7)3292 acordadas, no estado basal. Os dados representam a média \pm EPM. (n=17)

4.3 Efeito hipotensor da bradicinina

As figuras 10 e 11 mostram o efeito de diferentes doses de BK (5-40ng i.a.; 0.25-2µg i.v.) administrada in bolus através da artéria carótida e veia femoral em ratas transgênicas TGR(A1-7)3292, comparadas com seu controle SD. O efeito hipotensor da BK estava significativamente aumentado em ratas TGR(A1-7)3292 (0,5µg: 11 ± 1,5 mmHg em SD vs 17 ± 1,5 mmHg em TGR ; 1µg; 15 ± 1,5 mmHg em SD vs 19 ± 1,2 mmHg em TGR). Diferenças similares foram observadas com administração da BK intra-arterial (5ng: 10 ± 0,9 mmHg em SD vs 16 ± 1,4 mmHg em TGR ; 40ng; 22 ± 1,3 mmHg em SD vs 29 ± 2,9 mmHg em TGR) (Figura 11).

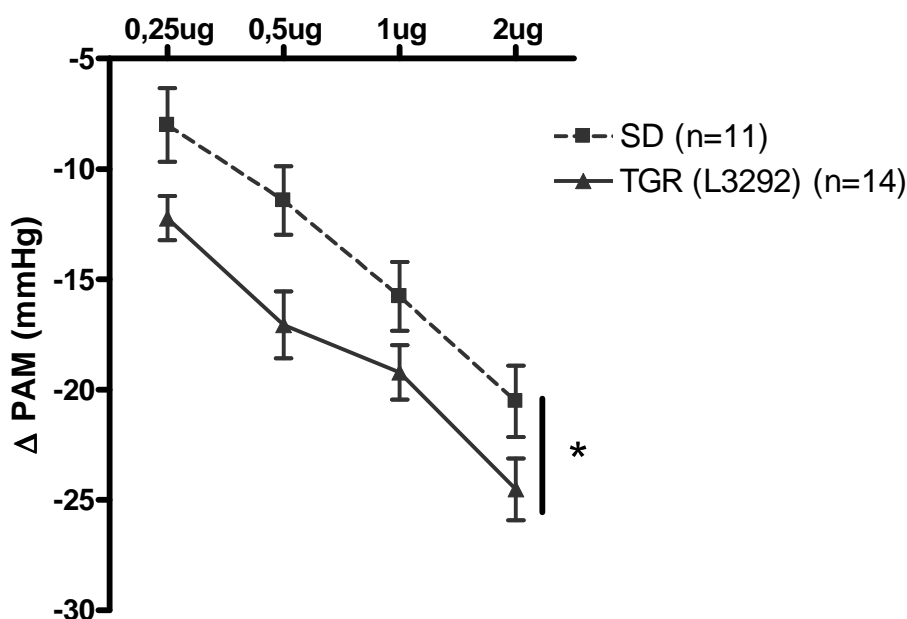


Figura 10: Efeito hipotensor produzido pela injeção in bolus de BK i.v. (0.25 µg – 2.0 µg) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0.01$ (Two-way ANOVA – Bonferroni).

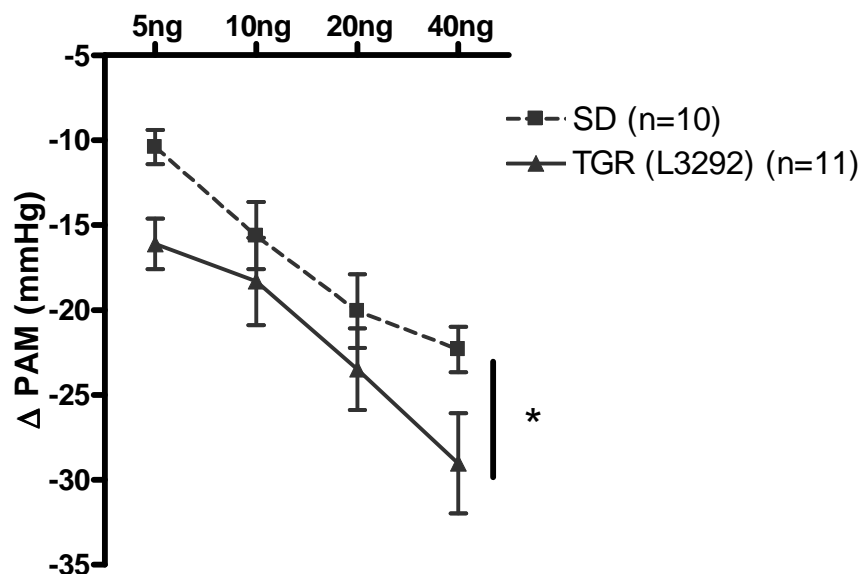


Figura 11: Efeito hipotensor produzido pela injeção *in bolus* de BK i.a. (5.0 ng – 40 ng) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.01$ (Two-way ANOVA – Bonferroni).

4.4 Inativação da Bradicinina no pulmão

A inativação pulmonar da BK foi estimada por comparação de doses intra venosa e intra aórtica que produziram uma queda de 15mmHg na pressão arterial. Apesar de haver diferenças significativas nas respostas hipotensoras provocadas pela BK administrada tanto por via aórtica quanto venosa, o percentual da inativação da BK na circulação pulmonar de ratas SD e TGR(AI-7)3292 foi similar. Apenas 1,82% nas ratas SD e 2,11% nas ratas TGR(AI-7)3292 da BK, não foram inativadas no leito pulmonar (Tabela 5). Portanto, a degradação da BK foi acentuada em ambos os grupos, e diferenças na taxa de inativação pulmonar da BK não explicam a potencialização do efeito hipotensor da BK nos ratos TGR.

Tabela V: Degradação da bradicinina calculada através de doses equipressoras de bradicinina administrada intra aórtica e intra venosa, capazes de produzir uma redução padrão de 15mmHg na pressão arterial média de ratas SD e TGR (L3292)

Ratos	Doses Equipressoras (ng)		Inativação %
	BK (i.a.)	BK (i.v.)	
SD (10)	24,17 ± 2,91	1339 ± 221	98,18 ± 0,31
TGR(A1-7)3292 (11)	22,84 ± 4,51	1154 ± 181	97,89 ± 0,34

4.5 Especificidade da atividade potenciadora da Ang-(1-7)

Com o objetivo de verificar a especificidade da atividade potenciadora da Ang-(1-7) sobre a vasodilatação induzida pela BK, doses de Ach (3.1-12.5ng i.a.) ou NP (1-20µg i.v.) foram testadas. Não foram observadas diferenças no efeito hipotensor da Ach em ratas TGR(A1-7)3292 (6.25ng: 17 ± 1.4 mmHg em SD vs 17 ± 1.8 mmHg em TGR ; 25ng; 25 ± 1.3 mmHg em SD vs 24 ± 1.9 mmHg em TGR) (Figura 12). Entretanto, o efeito hipotensor do NP de sódio estava potencializado nas ratas TGR(A1-7)3292 (2.5µg: 16 ± 0.8 mmHg em SD vs 23 ± 2.1 mmHg em TGR ; 20µg; 29 ± 3.9 mmHg em SD vs 41 ± 4 mmHg em TGR) (Figura 13).

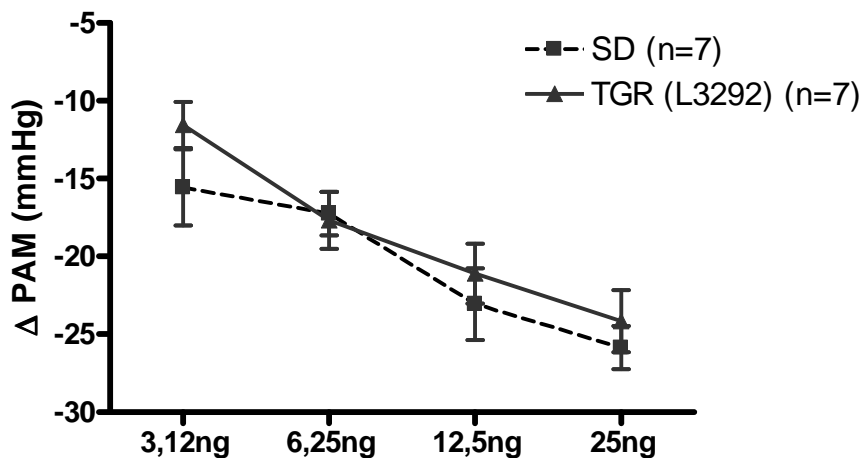


Figura 12: Curva dose resposta do efeito hipotensor produzido pela injeção de Ach i.a. (3.125 ng – 25 ng, n=) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média \pm EPM (Two-way ANOVA – Bonferroni).

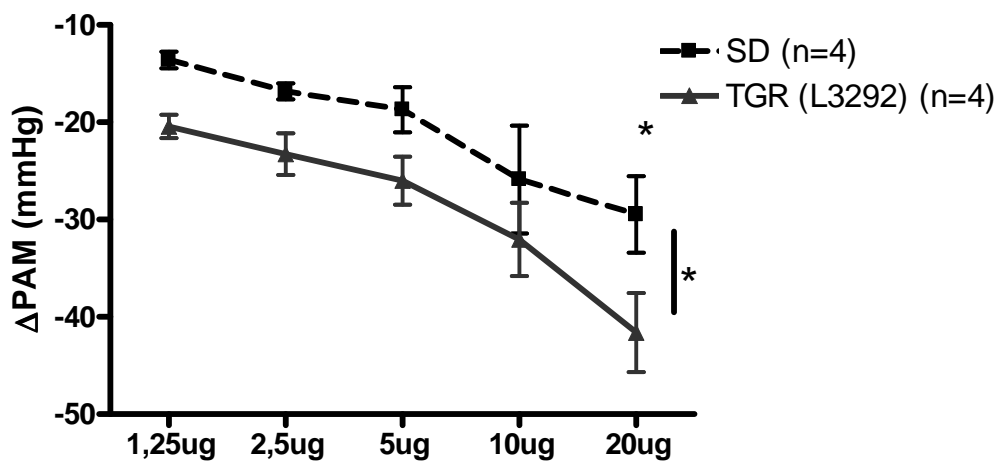


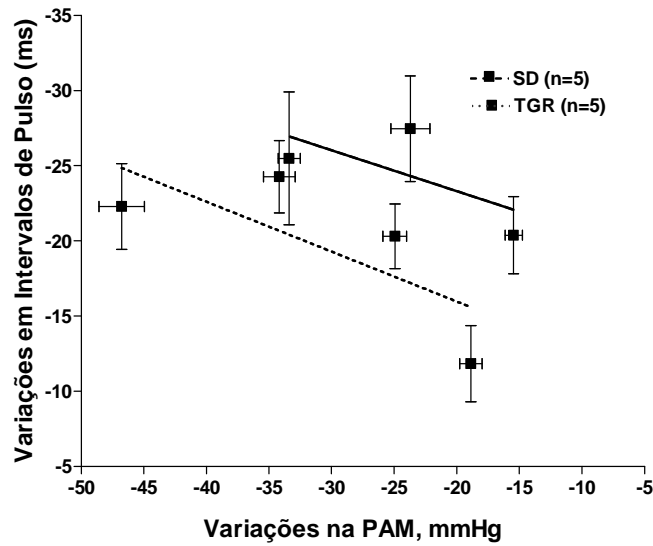
Figura 13: Curva dose resposta do efeito hipotensor produzido pela injeção de NP i.v. (1 ng – 20 μ g) em ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.01$ (Two-way ANOVA – Bonferroni).

4.6 Índice de taquicardia reflexa

Com o objetivo de avaliar se a maior resposta hipotensora ao NP seria devida, pelo menos em parte, a menor taquicardia reflexa nas ratas TGR, avaliamos essa resposta em ratas SD e TGR. A figura 14 mostra a média das relações entre as alterações de intervalo de pulso (Δ IP) e de pressão arterial média (Δ PAM) de ratas SD e TGR(A1-7)3292 conscientes, após a injeção intravenosa de doses crescentes de NP (1-20 μ g, n=4). A taquicardia barorreflexa induzida pela injeção i.v. de NP apresenta-se significativamente diminuída nas ratas TGR(A1-7)3292 quando comparada com seu controle SD ($0,7 \pm 0,08$ vs. $1,1 \pm 0,3$, ms/mmHg, $p < 0.05$).

Adicionalmente, avaliamos a resposta ao NP 15 minutos após a administração do β -bloqueador, atenolol (1mg/Kg). Foi observado que o tratamento com atenolol aboliu o aumento da resposta hipotensora observado em ratas TGR(A1-7)3292 (Figura 15).

Painel A



Painel B

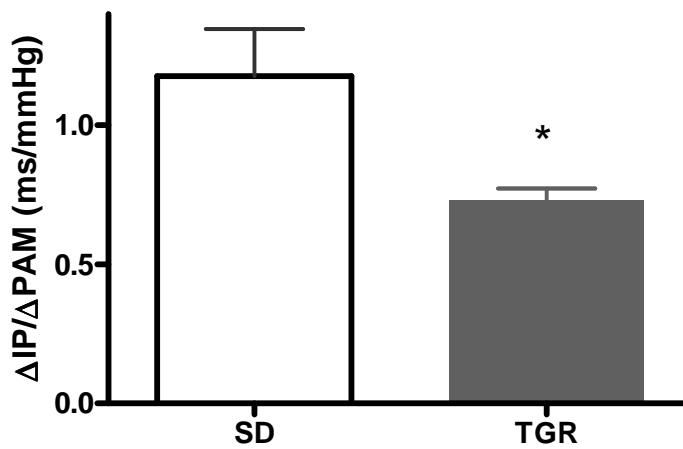
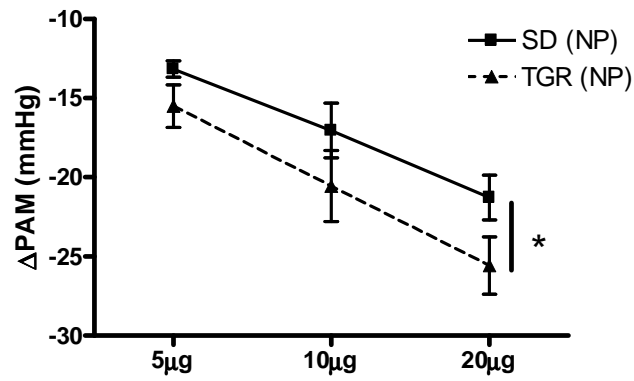


Figura 14: Alterações reflexas na FC (expressas em IP, ms) em resposta a variações na PAM (mmHg) produzidas por doses crescentes de nitroprussiato (1,25 - 20 μ g, iv) (n=4). Painel A: as linhas representam a reta de melhor ajuste obtida por regressão linear. Painel B: slope da sensibilidade da taquicardia reflexa $\Delta IP / \Delta PAM$ (ms/ mmHg). * $p < 0,05$ comparado com animais controle. (Teste t de student).

Painel A



Painel B

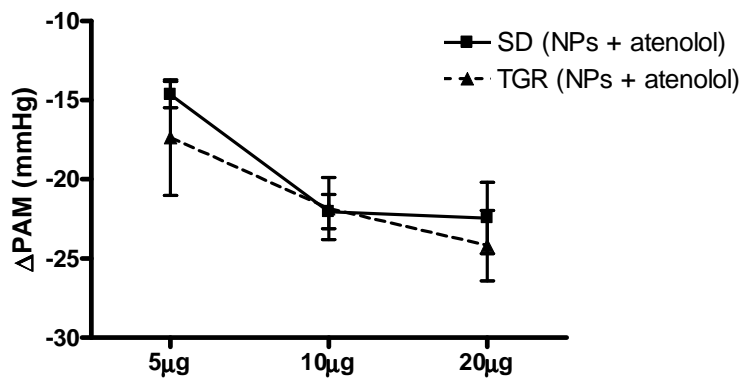


Figura 15: Gráfico mostra o efeito hipotensor do NP em ratos TGR(A1-7)3292 e SD antes (painel A) e após (painel B) 15min da administração de atenolol (1mg/Kg). Valores são expressos como média \pm EPM. *P<0,05, Two-Way ANOVA seguido por Bonferroni (n=5).

4.7 Participação do óxido nítrico na potenciação da bradicinina

A PAM basal aumentou significativamente em ambos os grupos, após o tratamento com o inibidor não seletivo de NO sintase N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10mg/Kg i.v.; N=7) (Figura 16). L-NAME não inibiu a resposta hipotensora da BK, entretanto, aboliu a potenciação da BK em ratas TGR(A1-7)3292 (Figura 17) (1 μ g: 13.8 \pm 0.9 em ratas SD vs 19.6 \pm 1 mm Hg em ratas TGR, antes do tratamento com L-NAME ; * P <0.05 e 1 μ g 30.9 \pm 2.8 mmHg em ratas SD vs 32.4 \pm 2.48 mmHg em ratas TGR, após tratamento com L-NAME) (figura 17).

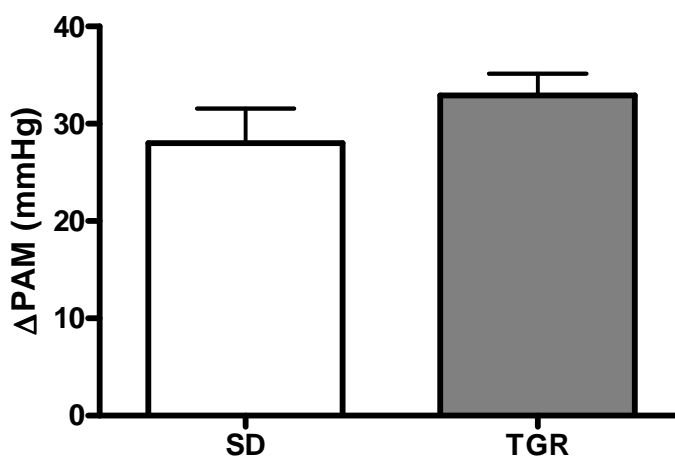


Figura 16: Gráfico mostra as variações na PAM em ratas TGR(A1-7)3292 e SD após 3 minutos da administração de L-NAME (10mg/Kg). Valores expressos como média \pm EPM. Mann Whitney test. (n=18)

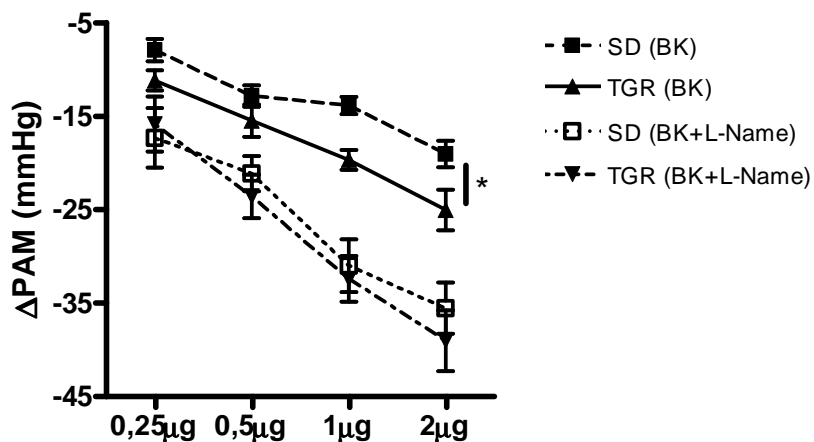


Figura 17: Gráfico mostra o efeito hipotensor da BK em ratos TGR (L3292) e SD antes e após 3 minutos da administração de L-NAME (10mg/Kg). Valores expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$, Two-way ANOVA seguido por Bonferroni. (n=8)

4.8 Expressão gênica da enzima NO sintase endotelial por PCR

A análise da expressão do mRNA para NO sintase endotelial (eNOS) por PCR em artéria mesentérica ($0,13 \pm 0,03$ em ratos TGR vs $0,15 \pm 0,05$ em ratos SD) e aorta abdominal ($0,06 \pm 0,01$ em ratos TGR vs $0,059 \pm 0,01$ em ratos SD), não mostrou diferença significativa na expressão de eNOS, como representado nas figuras 18 e 19.

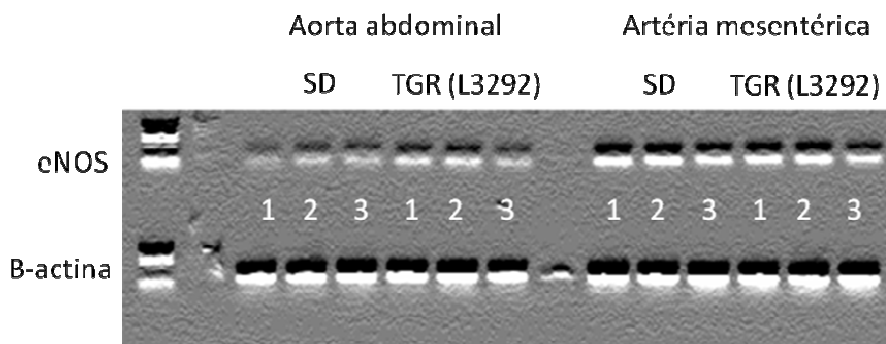
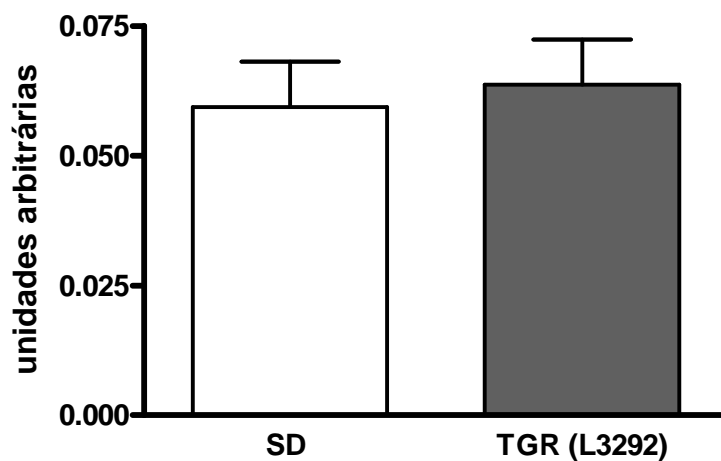


Figura 18 – Figura representativa reações de PCR reveladas em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Reações de PCR usando produto de RT (DNAc)

Painel A



Painel B

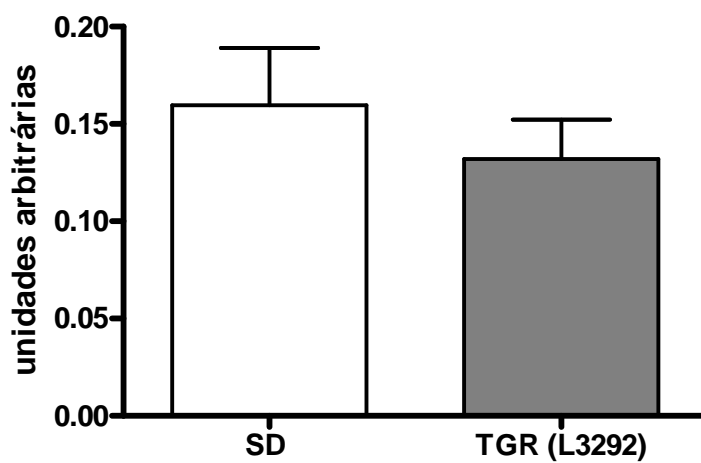


Figura 19 – Expressão de eNOS .Análise por PCR do RNAm extraído de aorta abdominal (Painel A) e artéria mesentérica (Painel B) de ratas SD (n=3) e TGR (L3292) (n=3). Os dados representam média \pm EPM e foram analisados através do teste-T de *Student*.

4.9 Efeitos pressóricos da Angiotensina I e Angiotensina II

A figura 20 mostra o efeito de diferentes doses de Ang I (2,5-20ng) administrado *in bolus* através veia femoral em ratas transgênicas TGR(A1-7)3292, comparadas com seu controle SD. O efeito pressórico observado após administração da Ang I estava significativamente reduzido em ratas TGR(A1-7)3292 (10ng: $16,7 \pm 2$ mmHg em SD vs $12,5 \pm 1,3$ mmHg em TGR). Diferenças similares foram observadas com administração endovenosa da Ang II (1,25-10ng) (5ng: 19 ± 1.3 mmHg em SD vs $14,8 \pm 1,7$ mmHg em TGR) (figura 21).

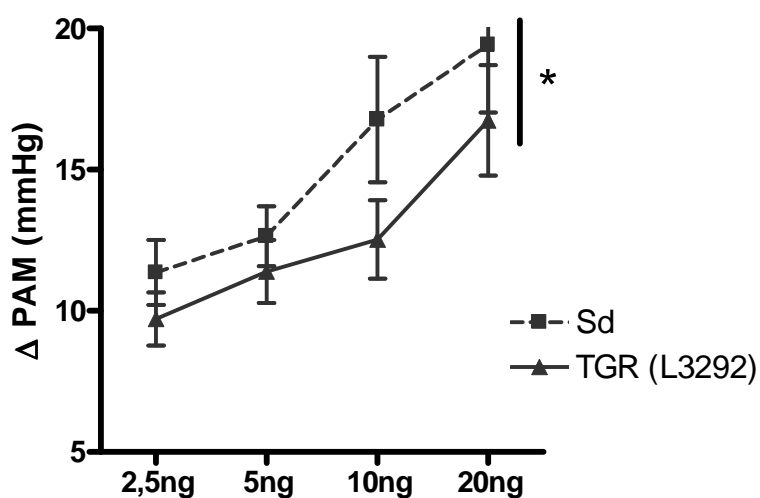


Figura 20: Efeito pressor produzido pela Ang I i.v. (2,5 ng – 20ng) em ratas SD (n=15) e TGR(A1-7)3292 (n=16) conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ (Two ANOVA – Bonferroni).

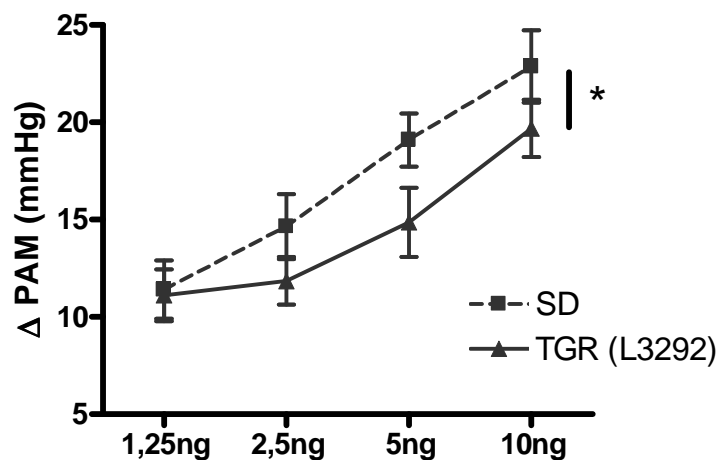


Figura 21: Efeito pressor produzido pela Ang II i.v. (2,5ng-10ng) em ratas SD (n=14) e TGR(A1-7)3292 (n=14) conscientes. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ (Two ANOVA – Bonferroni).

4.10 Taxa de conversão Angiotensina I – Angiotensina II

A conversão, *in vivo*, da Ang I em Ang II foi estimada por determinação das doses equipressoras que produziram um aumento de 15mmHg na pressão arterial média. Como mostrado na tabela 6, a taxa de conversão foi similar nos dois grupos. Na rata controle (SD), 48,92% da Ang I foi convertida em Ang II, enquanto no animal TGR (L3292) essa taxa foi de 45,87% do decapeptídeo.

Tabela VI: Extensão da conversão da angiotensina I calculada através de doses equipressoras de angiotensina I e angiotensina II que produzem um aumento padrão de 15mmHg na pressão arterial média de ratas SD e TGR(A1-7)3292

Ratos	Doses Equipressoras (ng)		Conversão %
	Ang I	Ang II	
SD (14)	12,78 \pm 1,92	5,9 \pm 0,54	48,92 \pm 5,8
[TGR(A1-7)3292] (14)	13,09 \pm 1,66	6,4 \pm 0,66	45,87 \pm 6,7

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo foram: (1) os níveis circulantes de Ang-(1-7) estão aumentados no plasma arterial de ratas TGR(A1-7)3292 (2) não há diferença nos valores basais de PAM e FC entre ratas TGR(A1-7)3292 e seu controle, Sprague-Dawley; (3) aumento da resposta hipotensora provocada pela BK em ratas TGR(A1-7)3292, quando comparadas ao seu controle; (4) aumento da resposta hipotensora provocada pelo NP e redução do componente taquicárdico da sensibilidade barorreflexa em ratas TGR(A1-7)3292, quando comparadas ao seu controle; (5) redução do efeito pressor produzido pela Ang II em ratas TGR(A1-7)3292, quando comparadas ao seu controle.

Durante a monitoração da pressão arterial, medida via artéria femoral em ratas acordadas, não observamos alterações significativas nos valores de PAM entre animais TGR(A1-7)3292 e controle (SD). Apesar disso, não podemos desconsiderar a contribuição do heptapeptídeo Ang-(1-7) para a manutenção dos níveis basais de PA, uma vez que este peptídeo promove alterações regionais diferentes em diversos leitos vasculares, retorno venoso e débito cardíaco (BOTELHO-SANTOS e cols., 2007, SAMPAIO e cols., 2003). Nesse sentido, BOTELHO-SANTOS e cols. (2007) mostraram que nesses ratos transgênicos o aumento do DC pode compensar a redução da RPT, resultando em níveis inalterados de pressão arterial.

Inúmeros estudos mostraram que Ang-(1-7) e BK desempenham importante papel protetor no sistema cardiovascular. Fármacos inibidores da ECA (iECA), largamente usados no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca, não apenas promovem a redução da formação da Ang II e da degradação da BK, mas também conduzem a um aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7), o que contribui para os efeitos benéficos destes fármacos (SIMÕES E SILVA e cols., 2006).

Diversos estudos mostraram a potenciação da BK pelos iECA (HECKER e cols., 1994; HECKER e cols., 1997; BENZING e cols. 1999). Além disso, o fato do

uso de análogos de BK resistentes à ECA serem potenciados em diversas preparações (BENZING e cols.1999, DANSER e cols. 2000) e de que a hipotensão induzida pela Ach também ser potencializada pelos iECA em algumas preparações (NAKAMURA e cols., 1992; ZANZINGER e cols., 1994) sugerem que outros mecanismos, que não apenas a redução da degradação da BK estejam envolvidos neste efeito. PAULA e cols. (1995) demonstraram que a infusão aguda de Ang-(1-7) foi capaz de potencializar o efeito hipotensor da BK em ratos Wistar acordados. Posteriormente, MAIA e cols. (2004) verificaram, em ratos Wistar acordados, que a potenciação da BK induzida pelo tratamento com captopril era atenuada após a infusão do antagonista específico do receptor Mas, A-779, o que sugeria que parte do efeito potenciador dos iECA fosse, pelo menos em parte, devido ao aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7) observados após o tratamento com esta classe de medicamentos. Além disso, o efeito potenciador da administração aguda Ang-(1-7) sobre a BK foi demonstrado em ratos hipertensos (FERNANDES e cols., 2001; LIMA e cols., 1997), vasos de artéria coronária de suínos (TOM e cols., 2001), cães (LI e cols., 1997) e ratos (ALMEIDA e cols., 2000). Entretanto, nenhum estudo havia sido feito em um modelo de aumento crônico da Ang-(1-7). Neste estudo, observamos que a BK administrada tanto por via venosa quanto arterial teve seu efeito potenciado em um modelo de ratas transgênicas que expressam uma proteína de fusão produtora de Ang-(1-7). Esta observação tem como uma de suas implicações importantes, a indicação de que a potenciação da BK pela Ang-(1-7) não apresenta taquifilaxia.

O mecanismo da atividade potenciadora da BK pela Ang-(1-7) é complexo. Este parece envolver facilitação da liberação de NO mediado por receptor e/ou prostaglandina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, ligação com a ECA facilitando o *cross-talk* entre ECA e receptor B₂, e inibição da ECA (SANTOS, 2001). A contribuição de cada um desses mecanismos parece mudar de acordo com o leito vascular, espécie e diâmetro do vaso. Neste estudo, verificamos que o efeito potenciador da BK observado em ratas TGR(A1-7)3292 foi abolido pelo tratamento com o inibidor da NO sintase, L-NAME, sugerindo que o NO está envolvido no mecanismo de potenciação da BK em ratas TGR(A1-7)3292.

Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão do mRNA da eNOS em artérias aorta abdominal ou mesentéricas.

O tratamento com L-NAME não aboliu o efeito hipotensor da BK, neste estudo. BJORNSTAD-OSTENTSEN (1997) propôs que o efeito hipotensivo da BK em ratos normotensos é mediado principalmente por prostaglandinas e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), enquanto que em ratos hipertensos parte do efeito hipotensivo da BK é mediado pelo NO. Diversos estudos demonstraram que L-NAME é capaz de abolir a resposta vasorrelaxante provocada pela Ang-(1-7) (GORELIK E COLS., 1998; BROSNIHAM e cols., 1996). Sampaio e cols. (2007b) mostraram que Ang(1-7) estimula a liberação de NO, em células CHO transfectadas com cDNA de receptor Mas, de forma dose dependente, e este efeito é bloqueado pelo antagonista do receptor Mas, A779. Foi verificado ainda, que a geração de NO estimulada pela Ang-(1-7) foi inibida pelo L-NAME, indicando que a Ang-(1-7) estimula a formação de NO através de sua ligação ao receptor Mas, o qual está acoplado à eNOS. Entretanto, HECKER (1997) observou que a venoconstrição produzida pela BK em veia femoral sem endotélio foi potenciada pela Ang(1-7), indicando que a atividade potenciadora da Ang-(1-7) não é exclusivamente um fenômeno endotélio dependente.

Foi mostrado que Ang-(1-7) é, ao mesmo tempo, um inibidor e substrato para ECA (DEDDISH e cols. 1998). Um possível mecanismo proposto para potenciação da BK pela Ang-(1-7) baseia-se no fato de que o heptapeptídeo, como um substrato para ECA, pode inibir a atividade da ECA e elevar os níveis de BK (FERNANDES e cols., 2001). LI e cols. (1997) demonstraram que em artérias coronárias isoladas de cães, a potenciação do efeito hipotensor da BK pela Ang-(1-7) foi abolido pelo pré-tratamento com o inibidor da ECA, lisinopril, e que Ang-(1-7) é capaz de inibir a atividade da ECA em pulmões purificados e de cães e atenuar a rápida degradação da ¹²⁵I-[TYR⁰]-BK. Entretanto, em nosso trabalho, o cálculo das taxas de conversão da Ang I em Ang II e de degradação da BK, que pode ser utilizado como uma medida indireta da atividade da ECA *in vivo* indica que não houve diferença nas taxas de conversão da Ang I em Ang II ou da degradação da BK no pulmão, em ratas TGR(A1-7)3292 quando comparadas com

o animal SD, sugerindo que a potenciação da BK neste modelo animal não é devido a inibição da ECA pela Ang-(1-7). Em acordo com nossos dados, PAULA e cols. observaram um aumento da atividade potenciadora da BK pela Ang-(1-7) em ratos tratados com o inibidor da ECA, enalaprilato. DEDDISH e cols. (1998) observaram que Ang-(1-7) é capaz de potencializar BK e análogos de BK resistentes à ECA em células CHO. Entretanto, esta potenciação requer a co-expressão da ECA e receptor B₂, sugerindo que a potenciação não é devida primariamente a uma menor inativação da BK pela ECA, mas também por uma indução a um “crosstalk” entre receptor B₂ e ECA. Outro mecanismo de potenciação da BK pela Ang-(1-7) foi proposto por MACHADO e cols. (2009), que observaram que o aumento da liberação de NO em células endoteliais humanas provocado pela associação destes peptídeos envolve a fosforilação/ desfosforilação do sítio inibitório/excitatório da eNOS, aumentando a atividade da enzima.

A especificidade do efeito potenciador da Ang-(1-7) sobre a BK é de difícil demonstração, devido ao efeito paralelo da Ang-(1-7) na função endotelial. No presente estudo, não houve diferença no efeito hipotensor do vasodilatador endotélio-dependente, Ach, administrada *in bolus* via artéria aorta em ratas TGR(A1-7)3292 quando comparadas com o controle. Esta observação contrasta com resultados em ratos machos, encontrados na literatura (FARIA-SILVA e cols., 2005). FARIA-SILVA e cols., (2005), verificaram que o efeito hipotensor da Ach, nas mesmas concentrações utilizadas em nosso trabalho foi potencializado pela infusão aguda de 0.7pmol/min e 7pmol/min, por 60min, de Ang-(1-7) em ratos Wistar machos acordados. Entretanto, nossos resultados são consistentes com dados obtidos em vaso sanguíneo de artéria mesentérica de ratos normotensos (FERNANDES e cols., 2001) e hipertensos (OLIVEIRA e cols., 1999), no qual a pré-incubação com Ang-(1-7) não foi capaz de potencializar o efeito hipotensor da Ach em preparação de vaso sanguíneo de mesentérica *in situ*. Além disso, Ang-(1-7) também não foi capaz de potencializar o efeito vasorrelaxante da Ach em anéis de artéria coronária de cães (BROSNIHAN e cols., 1996; LI e cols., 1997). Vale ressaltar que, RENTZSCH e cols. (2008) mostraram redução de efeito hipotensor da Ach em um modelo de rato transgênico que superexpressa ECA2 (SHRSP-

ECA2) e possuem níveis elevados de Ang-(1-7) no plasma, comparado com seu controle SHRSP. No entanto, como nestes animais a resposta ao NP está diminuída, a correção da resposta à Ach pelo NP, indica uma melhora da função endotelial. Além do sexo do animal, as variadas respostas vasculares e de variação da pressão sanguínea para a influência da Ang-(1-7) sobre a hipotensão provocada pela Ach pode ser resultado, em parte, de diferenças metodológicas. Diferentes leitos vasculares de diferentes espécies podem ter diferentes respostas para Ang-(1-7). O tempo de exposição do leito vascular a níveis aumentados de Ang-(1-7) também pode alterar o resultado.

Em contraste ao observado com a Ach, quando utilizamos o vasodilatador endotélio-independente, NP, seu efeito estava aumentado em ratas TGR (L3292), quando comparadas com o controle SD. Nossos dados divergem dos encontrados na literatura, em que a administração aguda de Ang-(1-7) não alterou o efeito do NP em ratos Wistar normotensos (PAULA e cols. 1995; FARIA-SILVA e cols. 2005) ou em anéis de artéria coronária de cães tratadas com Ang-(1-7) (LI e cols. 1997). Além disso, o efeito do NP estava reduzido em ratos SHRSP com superexpressão de ECA2 (RENTZSCH e cols., 2008). Como o objetivo de avaliar se a maior resposta hipotensora ao NP seria devida, pelo menos em parte, a uma menor taquicardia reflexa nos ratos TGR, NP também foi utilizado para avaliar a sensibilidade do barorreflexo de ratas TGR(A1-7)3292 e SD. Nossos resultados mostraram que o componente taquicárdico do barorreflexo estava reduzido em ratas TGR(A1-7)3292, o que explica, pelo menos em parte, o aumento da resposta à esta substância em ratas TGR. Adicionalmente quando testamos a resposta ao NP após o tratamento com o β -bloqueador, atenolol, o aumento da resposta ao NP foi abolido. Este resultado condiz com os dados da literatura a respeito da influência do heptapeptídeo no controle barorreflexo. Em estudo utilizando camundongos knockout para o receptor Mas foi verificado que a resposta taquicárdica barorreflexa induzida pela injeção i.v. de NP encontra-se significativamente aumentada em camundongos com deleção genética para o receptor Mas (MOURA, e cols. 2007).

Está bem estabelecido que Ang-(1-7) atuando através do receptor acoplado à proteína G, Mas, contrabalanceia as ações da Ang II em vários níveis. Ang-(1-7) modula a produção de espécies reativas de oxigênio derivadas da NAD(P)H oxidase em anéis de aorta de ratos normotensos (POLIZIO e cols., 2007) e células endoteliais humanas (SAMPAIO e cols., 2007a); reduz a fosforilação, induzida pela Ang II da PKC em células de músculo liso vascular (ZHU e cols., 2002) e das ERK1/2 em células de músculo liso vascular (ZHU e cols., 2002), células endoteliais humanas (SAMPAIO e cols., 2007a) e *in vivo* (GIANI e cols., 2008). Além disso, antagoniza a regulação para baixo do receptor AT₁ (ZHU e cols., 2002) e previne o remodelamento cardíaco induzido pela Ang II (GROBE e cols., 2007). Neste estudo observamos que o efeito pressor da Ang I e Ang II foi atenuado em ratas TGR(A1-7)3292 quando comparadas às ratas SD. A redução da resposta a Ang II em nosso experimento pode ser devida a diferentes fatores: (1) por antagonismo da Ang-(1-7) ao receptor AT₁; (2) por liberação de NO ou outros fatores vasorrelaxantes, (3) ou por mecanismos intracelulares. A liberação de NO promovida pela Ang-(1-7) pode causar inibição não específica da vasoconstrição. Entretanto, em estudo realizado por ROCKS e cols. (1999) o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir a vasoconstrição provocada pela Ang II, mas não por fenilefrina ou KCl em anéis de artérias mamárias de humano pré tratados com L-NMMA. Resultados similares foram obtidos por UEDA e cols. (2000) quando testaram a influência da Ang-(1-7) sobre a vasoconstrição produzida pela Ang II e noradrenalina. Portanto, um antagonismo não específico da vasoconstrição talvez se torna pouco provável. Um possível mecanismo foi sugerido em um estudo realizado por MAHON e cols. (1994) em aorta de coelho, no qual a redução do efeito da Ang II pela infusão Ang-(1-7) foi atenuado pela infusão do antagonista de receptor AT₁, losartan. Esse achado sugere que Ang-(1-7) e losartan possam competir pelo mesmo receptor.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Em síntese, não houve diferença nos níveis da pressão arterial média e frequência cardíaca entre os animais TGR e seu controle. Foi observada potenciação da BK em ratas TGR, indicando que este efeito não apresenta taquifilaxia. Não houve diferença nas taxas de degradação da BK ou conversão da Ang I em Ang II, indicando que a potenciação da BK observada em ratas TGR não é devido a uma menor atividade da ECA. A potenciação da BK pela Ang-(1-7) em ratas TGR foi abolida pelo tratamento com o inibidor da NO sintase, L-NAME, indicando o envolvimento do NO, entretanto não houve diferença na expressão do RNAm da eNOS em artérias mesentéricas ou aorta abdominal. A potenciação da BK pela Ang-(1-7) em ratas TGR foi específica, uma vez que não foram observadas diferenças nos efeitos produzidos pela Ach, ou NP após o tratamento com β -bloqueador. Os efeitos da administração aguda da Ang I e Ang II estavam atenuados em ratas TGR.

Em conclusão, nossos dados sugerem que o aumento crônico da Ang-(1-7) circulante atenua os efeitos da angiotensina II e facilita os efeitos cardiovasculares da bradicinina em ratos. Este efeito parece ser independente de uma inibição da ECA ou mudanças na expressão de eNOS em grandes (aorta) ou médias (mesentérica) artérias. Nossos dados ,em conjunto, indicam que a modulação das ações da angiotensina II e bradicinina podem contribuir para os efeitos benéficos produzidos por aumento crônico da Ang-(1-7).

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A., Gorelik G.; Carbini L. A.; Scicli A. G.. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. **Hypertension**. V. 30, p. 217-221, 1997.

ALLRED, A.J.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C.. Pathways for angiotensin-(17) metabolism in pulmonary and renal tissues. **Am J Physiol Renal Physiol** , v. 279, p. 841-850, 2000.

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

ATLAS, S.A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Journal Managed Care Pharmacy**, v. 13(8), suppl S-b, p. 9-20, 2007.

BENTER I. F.; MARIAM H.M.Y.; ANIM, J.T; COJOCEL, C.; DIZ D.I.. Angiotensin-(1–7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290: H684–H691, 2006.

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

BERRY, C., TOUYZ, R., DOMINICZAK, A.F.; WEBB, R.C.; JOHNS, D.G.. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, p.2337–2365. 2001.

BJØRNSTAD-ØSTENSEN, A.; HOLTE, H.R.; BERG, T..Amplification of Kinin-Induced Hypotension by Nitric Oxide Synthesis in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, V.;29, P. 53-57, 1997.

BOTELHO-SANTOS, G.A. ; SAMPAIO, W.O. ; REUDELHUBER, T.L.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S.. 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, p. H2485–H2490, 2007.

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

COLLISTER, J.P.; NAHEY, D.B.. Simultaneous administration of Ang-(1-7) or A-779 does not affect the chronic hypertensive effects of angiotensin II in normal rats. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 11, p.99-102, 2010.

CAMPBELL, D.J. The rennin-angiotensin and the kallikrein- kinin systems. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 784-791, 2003.

CASTRO C.H.; SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A.P.. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v. 46, p. 937–942, 2005.

COSTA-NETO, C.M.; DILLENBURG-PILLA, P. TASSIELE A. H.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; PEREIRA, M.G.A.G.; REIS, R.I.; SOUZA, P.P.C.. Participation of kallikrein–kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**, v. 8, p.135–142, 2008.

CHAO, J., CHAO, L. KalliKrein – kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. **Experimental Physiology**, v. 90(3), p. 291-298, 2004.

DANSER, A.H. J.; TOM, B.; VRIES, R.; SAXENA, P. R.. L-NAME-resistant bradykinin-induced relaxation in porcine coronary arteries is NO-dependent: effect of ACE inhibition. **British Journal of Pharmacology** v.131, p.195 - 202, 2002.

DEDDISH P.; MARCIC, B.; JACKMAN, H.L.; HUAN-ZHU, W.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G.. N-Domain-Specific Substrate and C-Domain Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme Angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, p. 912-917, 1998.

DONOGHE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R. BREITBART, R.E.; ACTON, S.. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin (1-9). **Circulation Research** , v. 87, p. e1-e9, 2000.

DUKA, A.; DUKA, I; GAO, G.; SHENOUDA, S.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation . **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. 268–274, 2006.

FARIA-SILVA, R., DUARTE, F.D., SANTOS, R.A.S.. Short-Term Angiotensin(1-7) Receptor Mas Stimulation Improves Endothelial Function in Normotensive Rats. **Hypertension**, V. 46 [part 2], P. 948-952, 2005.

FERNANDES L.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; TOSTES, R.C.A.; SANTOS, R.A.S.; CATELLI DE CARVALHO, M.H.. Potentiation of Bradykinin by Angiotensin-(1-7) on Arterioles of Spontaneously Hypertensive Rats Studied In Vivo. **Hypertension**, v.37 (parte 2), p. 703-709, 2001.

FERRARIO C. M.; JESSUP, J.; CHAPPELL, M.C.; AVERILL, D.B.; BROSNIHAN, K.B.; TALLANT, E.A.; DIZ, D.I.; GALLAGHER, P.E.. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockers on Cardiac Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Circulation**, v.111, p. 2605-2610, 2005.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S.; ALMEIDA, A.P.; Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Braz J Med Biol Res.**, v.35, p. 1083–1090, 2002.

FERREIRA, Anderson José. Caracterização em nível genômico, bioquímico e fisiológico de um modelo de rato transgênico que expressa uma proteína de fusão produtora de angiotensina-(1-7). 2004. 160f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.B.; CASTRO, C.H.; SILVA, G.A.B.; SIMÕES E SILVA, A.C.; ALMEIDA, A.P.; BADER, M.; RENTZSCH, B.; REUDELHUBER, T.L.; SANTOS, R.A.S.. Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1–7)-producing fusion protein. **Regulatory Peptides**, v.137(3), p.128-33, 2006.

FLEMING, I.. The tissue renin–angiotensin system and intracellular signaling. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 15, p. 8–13, 2006.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O.. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, p. 224-236, 2008.

GASPARO, M., CATT, K.J., INAGAMI, T., WRIGHT, J.W., UNGER, T.H.. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacological Reviews**, V.52, P. 415-472, 2000.

GIANI, J.F.; GIRONACCI, M.M.; MINOZ, M.C.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P.. Angiotensin-(1-7) has a dual role on growth-promoting signalling pathways in rat in vivo by stimulating STAT3 and STAT5a/b phosphorylation and inhibiting angiotensin II-stimulated ERK1/2 and Rho kinase activity. **Experimental Physiology**, p. 1-9, 2008.

GOMES, E.R.M.; LARA, A.A.; ALMEIDA, W.M.; GUIMARÃES, D.; RESENDE, R.R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BADER, M.; SANTOS, R.A.S.; GUATIMOSIN, S.. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent pathway. **Hypertension**, v. 55, p. 153-160, 2010.

GORELIK, G.; CARBINI, L.A.; SCICLI, A.G.. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 286, p. 403-410, 1998.

GROBE, J.L.; MECCA, A.P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T.A.; MACHADO, J.M.; SPETH, R.C.; RAIZADA, M.K.; KATOVICH, M.J.. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.**, v. 292, p. 736-742, 2007.

HECKER, M.; BLAUKAT, A.; BARA, A.T.; MÜLLER-ESTERL, W.; BUSSE, R.. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced vasoconstriction. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 1475-1481, 1997.

HECKER, M.; PÖRTI, I.; BARA, A.T.; BUSSE, R.. Potentiation by ACE inhibitors of the dilator response to bradykinin in the coronary microcirculation: interaction at the receptor level. **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 111, p. 238-244, 1994.

KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L.G.; NISHIYAMA, A.. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. **Pharmacol Rev.** V. 59 (3), p.251-287, 2007.

LAMBERT, D.W.; Hooper, N.M.; Turner, A.J.. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. **Biochemical Pharmacology**, 2007.

LI, P.J.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAM, B.. Angiotensin-(1-7) Augments Bradykinin-Induced Vasodilation by Competing With ACE and Releasing Nitric Oxide. **Hypertension**, v.29 (parte 2), p. 394-400, 1997.

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

LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B.A.. Contribution of Kinins to the Cardiovascular Actions of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. **Pharmacological Reviews**, Vol. 47, No. 1, P. 25-49, 1995.

LIU, Y.H.; YANG, X.P.; SHAROV, V.G.; NASS, O.; SABBAH, H.N.; PETERSON, E.; CARRETERO, O.A.. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and

angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure—role of kinins and angiotensin II type 2 receptors, **J. Clin. Invest.**, v.99, p. 1926–1935, 1997.

LOOT AE, ROKS AJM, HENNING RH, TIO RA, SUURMEIJER AJH, BOOMSMA F, VAN GILST WH. Angiotensin-(1–7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, V.105, P. 1548–1550, 2002.

MACHADO, Leonor Tapias da Mata. Avaliação dos mecanismos envolvidos na potenciação dos efeitos da bradicinina pela Angiotensina –(1-7). 2009. 90f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAHON, J.M.; CARR, R.D.; NICOL, A.K.; HENDERSON, I.W.. Angiotensin-(1-7) is na antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. **Journal of Hypertension**, v. 12, p. 1377-1381, 1994

MAIA, L.G.; RAMOS, M.C.; FERNANDES, L.; CATELLI DE CARVALHO, M.H.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S.. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 43, p. 685-691, 2004.

METHOD, D., LAPOINT, M.C.; TOUYZ, R.M.; YANG, X.P.; CARRETERO, O.A.; DESCHEPPER, C.F.; SCHIFFRIN, E.L.; THIBAUT, G.; REUDELHUBER, T.L.. Tissue targeting of angiotensin peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272 (20), p. 12994-12999, 1997.

METHOD, D., e cols.. Development and application of a biological peptide pump for the study of the *in vivo* actions of Angiotensin peptides. **American Journal of Hypertension**, v. 14, p. 38-43, 2001.

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

MOURA, Marina Matos. Reflexos cardiovasculares em camundongos com alteração na expressão do receptor da angiotensina-(1-7), Mas. 2007. 175f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NAKAMURA, M.; FUNAKISHI, T.; YOSHIDA,H.; ARAKAWA,N.; SUZUKI,T.; HIRAMORI,K.. Endothelium-dependent vasodilation is augmented by angiotensin converting enzyme inhibitors in healthy volunteers. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v.20, p. 949-954, 1992.

OLIVEIRA M.A.;; FORTES, Z.B.; SANTOS, R.A.S.; KOSLA, M.C.; CARVALHO, M.H.C. Synergistic effect of angiotensin-(1–7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. **Peptides** V. 20 (10), p. 1195-1201, October 1999.

PAUL, M.; MEHR, A.P.; KREUTZ, R... Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiology Review**, v.86, p. 747-803, 2006.

PAULA, R.D., Lima, C.V., Khosla, M.C., SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension**, v.26, p.1154- 1159, 1995.

PENDERGRASS, K.D.; PIRRO, N.T.; WESTWOOD, B.M.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** , V.295, P. 10–20, 2008.

POLIZIO, A.H., Gironacci, M.M., Tomaro, M.L., Pena, C. e cols.. Angiotensin-(1–7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. **Pharmacological Research**, v. 56, p.86–90, 2007.

PORSTI,I., BARA, A.T. BUSSE, R., Hecker, M.Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor.**Brazilian Journal Pharmacology**, v.111, p. 652-654, 1994.

RASTELLI, V.M.F.; OLIVEIRA, M.A.; SANTOS, R.; PASSAGLIA, R.C.T.; NIGRO, D., CATELLI DE CARVALHO, M.H.; FORTES, Z.B.. Lack of potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) in a type 2diabetes model: Role of insulin. **Peptides**, v. 28, p. 1040-1049, 2007

RENTZSCH, B.; TODIRAS, M.; LLIESCU, R.; POPOVA, E.; CAMPOS, A.C.; OLIVEIRA, M.L.; BALTATU, O.C.; SANTOS, R.A.; BADER, M.. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats

reduces blood pressure and improves endothelial function. **Hypertension**, v. 52, p.1-7, 2008.

ROCKS, A.J.M.; GEEL, P.P.; PINTO, Y.M.; BUIKEMA, H.; HEMMING, R.H.ZEEUW, D. GILST, W.H.. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 34, p. 296-301, 1999.

ROCHA-E-SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G.. Bradykinin, a hypotensive smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**, v.156, p. 261–73, 1949.

SALGADO, M.C.O., e cols.. Hyperreactivity to bradykinin and alterations in Angiotensin I conversion and bradykinin inactivation in renal hypertensive rats. **Hypertension**, v. 4, p. 77-83, 1982.

SAMPAIO, W.O.; NASCIMENTO, A.A.S.; SANTOS R.A.S.. Systemic and regional hemodynamics effects of angiotensin-(1–7) in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, p. H1985–H1994, 2003.

SAMPAIO, W.O.; CASTRO, C.H.; SANTOS, R.A.S.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M.. Angiotensin-(1-7) contrarregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, v. 50, p. 1093-1098, 2007a.

SAMPAIO, W.O.; SANTOS, R.A.S.; FARIA-SILVA, R.; MACHADO, L.T.M.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M.. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. **Hypertension**, v. 49, p. 185-192, 2007b.

SANTIAGO, N.M.; GUIMARÃES, P.S.; SIRVENTE, R.A.; OLIVEIRA, L.A.M.; IRIGOYEN, M.C.; SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.. Lifetime overproduction of circulating angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate –salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. **Hypertension**, v. 55, p.889-896, 2010.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAM, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.L.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M.. Converting enzyme activity

and angiotensin metabolism in dog brainstem. **Hypertension**, v.11, p. 155-157, 1988.

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

SANTOS R.A.S.; PASSAGLIO, K.T.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; SIMÕES E SILVA, A.C... Interactions Between Angiotensin-(1-7), Kinins, and Angiotensin II in Kidney and Blood Vessels. **Hypertension**, v.38 (parte 2), p. 660-664, 2001.

SANTOS R.A.S.; SIMÕES e SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.R.; MACHADO, R.P.; BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S.V.B.; LOPES, M.T.; BADER, M.; MENDES, E.P.; LEMOS, V.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SCHULTHEISS, H.P.; SPETH, R.; WALTHER, T.. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, p. 8258–8263, 2003.

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; NADU, A.P.; BRAGA, A.N.G.; ALMEIDA, A.P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BALATU, O.; ILIESCU, R.; REUDELHUBER, T.L.; BADER, M.. Expression of an angiotensin-(1–7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiol Genomics**, v.17, p. 292–299, 2004.

SANTOS R. A.S.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.B.; SAMPAIO, W.O.; TOUYZ, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 14(8), 2005.

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

SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; SIMÕES E SILVA, A.C.. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2 – angiotensin(1–7) – Mas axis. **Experimental Physiology**, V.93, p. 519–527, 2008.

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

SEALY, J.E.; ATLAS, S.A.; LARAGH, J.H.. Human urinary kallikrein converts inactive to active renin and is a possible physiological activator of renin. **Nature** v.275, p.144–145, 1978.

SHEN, B E EL-DAHR, S.S. Cross-talk of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 145–150, 2006.

SIMÕES E SILVA, A.C.; PINHEIRO, S.V.; PEREIRA, R.M.; FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. **Mini Rev Med Chem**, v.6(5), p.603-9, 2006.

SILVA D.M.R.; VIANNA, H.R.; CORTES, S.F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. SANTOS, R.A.S.; LEMOS, V.S.. Evidence for a new angiotensin-(1–7) receptor subtype in the aorta of Sprague–Dawley rats. **Peptides** v. 28 (3), P. 702-707, março 2007.

TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M.; HYDE, R.KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A.J.. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 33238-33243, 2000.

TOM, B.; VRIES, R.; SAXENA, P.R.; DANSER, A.H.J. e cols.. Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ECA inhibitors correlates with ACE c-and N-domain blockade. **Hypertension**, v. 38, p. 95-99, 2001.

UEDA, S.; MASUMORI-MAEMOTO, S.; AASHINO, K.; NAGAHARA, T.; GOTOH, E.; UMEMURA, S.; ISHII, M.. Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. **J. Hypertens**, v.19 (11), p. 2001-2009, novembro, 2001.

WALTERS, P.E., GASPARI, T.A., WIDDOP, R.E.. Angiotensin-(1–7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats. **Hypertension**, V.45, P. 960-966, 2005.

WIDDOP, R.E., JONES, E.S., HANNAN, E.S.R., GASPARI, T.A. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? **British Journal of Pharmacology** , V.140, P. 809–824, 2003.

XIA, H.; LAZARTIGUES, E.. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem.* v.107(6), p.1482-94, 2008.

XUE, B.; PAMIDIMUKKALA, J.; HAY. M.. Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v. 288, p.2177–2184, 2005.

ZANZINGER, J.; ZHENG, X.; BASSENGE, E.. Endothelium dependent vasomotor responses to endogenous agonists are potentiated following ACE inhibition by a bradykinin dependent mechanism. **Cardiovascular Research**, v. 28, p. 209-214. 1994.

ZHU, Z.; ZHONG, J.; ZHU, S.; LIU, D.; VAN DER GIET, M.; TEPEL, M.. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, p. 693-700, 2002.

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](#)