MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA

**INTERAÇÃO ANGIOTENSINA-(1-7) E
BRADICININA NA MICROCIRCULAÇÃO
MESENTÉRICA, *IN VIVO IN SITU***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção de título de mestre em
ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes

SÃO PAULO

2000

Aos meus pais, *Benedito* e *Zilah*. Obrigado pela compreensão, amparo e carinho dispensados durante toda minha vida.

À Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes, profissional competente que aprendi a respeitar ao longo de todos esses anos. Obrigada pela oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes dos grupos de *Hipertensão e Inflamação*, pelo apoio constante e exemplo de dedicação profissional.

Aos pós-graduandos e estagiários dos grupos de *Hipertensão e Inflamação*, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários dos grupos de *Hipertensão e Inflamação*, pelo companheirismo e apoio durante todos esse anos.

Aos docentes e funcionários dos grupos de *Anestésicos Locais e Quimioterapia*, pela amizade no decorrer desta jornada.

À Selma e Julieta, pela amizade e orientação quanto aos assuntos burocráticos.

À minha grande amiga Liliam, pela oportunidade de usufruir não somente de sua amizade, mas de sua capacidade profissional.

Ao meu grande amigo Hermes, pelo companheirismo desses anos em que trabalhamos juntos.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
1.1. Sistema renina-angiotensina	10
1.1.1. Angiotensinogênio	10
1.1.2. Renina	11
1.1.3. Enzima conversora de angiotensina	13
1.1.4. Angiotensina II	14
1.1.5. Receptores de angiotensina	16
1.1.6. Angiotensina -(1-7)	16
1.1.7. Sistema calicreína-cininas	18
1.1.8. Endotélio vascular	21
1.1.9. Interação Ang-(1-7) e BK	23
2.OBJETIVOS	25
3.MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Procedimento cirúrgico	26
3.3 Microscopia intravital	27
3.4 Aplicação tópica de drogas	27
3.5 Protocolo experimental	28
3.6. Análise estatística	32
3.7. Drogas utilizadas	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779	[d-Ala ⁷]-Ang-(1-7)
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
AmP	aminopeptidase
Ang I	angiotensina I
Ang II	angiotensina II
Ang-(1-7)	angiotensina-(1-7)
BK	bradicinina
CaM	Ca ⁺⁺ /calmodulina
CbP	carboxipeptidase
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDCFs	fatores contráteis derivados do endotélio
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRFs	fatores relaxantes derivados do endotélio
EnP	endopeptidase
IM	intramuscular
IV	endovenosa
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginina-Metil-Éster
MAP	“mitogen-activated protein”
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NPS	nitroprussiato de sódio
O₂⁻	ânion superóxido
PGI₂	prostaciclina

RHR	rato hipertenso renal
sc	subcutâneo
SCC	sistema calicreína-cininas
SHR	rato espontaneamente hipertenso
SNC	sistema nervoso central
SRA	sistema renina angiotensina
TEA	tetraetilamônio

Resumo

Interação entre angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e bradicinina (BK) foi estudada na microcirculação mesentérica de ratos machos Wistar normotensos (10 a 12 semanas de idade). Para isso os animais foram anestesiados (hidrato de cloral, 400-450 mg/kg, sc) e utilizando circuito fechado de televisão (microscopia intravital) a resposta induzida por aplicação tópica de BK (1, 10 e 30 pmol), Ang-(1-7) (1, 10, 100 e 1000 pmol) bem como de BK (1 pmol)+ Ang-(1-7) (100 pmol) foi estudada em arteríolas de 2º ordem (diâmetro entre 15 e 25 μ m). BK (1 pmol) e Ang-(1-7) (100 pmol) promoveram vasodilatação quando aplicadas isoladamente. A vasodilatação induzida por BK foi abolida pelo antagonista de receptor B₂ de BK, HOE-140 (100 pmol, aplicado topicamente durante 60 segundos). A vasodilatação induzida por Ang-(1-7) foi abolida pelo antagonista de receptor de Ang- (1-7), A-779 (aplicado topicamente, durante 15 segundos). A resposta vasodilatadora de BK (1pmol) foi potencializada por Ang-(1-7) (10 e 100 pmol). Outros vasodilatadores como acetilcolina (1,6 nmol), nitroprussiato de sódio (38 pmol), histamina (5,4 nmol)) e ácido araquidônico (10 nmol) utilizados em doses equipotentes à BK, não foram potencializados pela Ang-(1-7), na dose de 100 pmol. A-779; HOE-140; o inibidor de ciclooxigenase, indometacina (5mg/kg, IM, 30 minutos antes do experimento); o inibidor de óxido nítrico sintase, (L-NAME) (10 nmol, aplicado topicamente durante 3 minutos); o inibidor inespecífico de canais de potássio, TEA (90 pmol, aplicado topicamente) aboliram o efeito potencializador de Ang-(1-7) (100 pmol) sobre a resposta vasodilatadora de BK (1 pmol). O antagonista de receptor AT₁ de angiotensina II, losartan (15 mg/kg, IV, quarenta minutos antes do experimento) não modificou este efeito. Tratamento com inibidor da enzima

conversora de angiotensina, enalaprilato (10 mg/kg, IV, 30 minutos antes do experimento), aumentou o efeito vasodilatador promovido pela Ang-(1-7) e BK, porém não alterou a resposta potencializadora da primeira sobre a segunda. Pode-se concluir que: 1) efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre BK depende da interação de Ang-(1-7) e BK com seus respectivos receptores pois foi abolida por antagonistas específicos desses receptores; 2) é dependente de óxido nítrico, produtos da cicloxigenase e hiperpolarização de membrana via canais de potássio, pois foi abolido por inibidores desses agentes; 3) o mecanismo de potencialização não parece depender da atividade catalítica da ECA.

1- Introdução

1.1. Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal e parácrino cujo principal componente, a angiotensina II (Ang II), é potente vasoconstritor que desempenha papel importante na manutenção da homeostasia hidroeletrolítica do organismo e no controle da pressão arterial. O SRA é considerado sistema endócrino cuja substância ativa, Ang II, é produzida por clivagem seqüencial enzimática dupla, a partir do substrato angiotensinogênio de origem hepática. A produção de renina, uma protease altamente específica, se dá no aparelho justaglomerular renal e sua liberação faz-se, principalmente, em resposta a reduções de pressão arterial na circulação renal, alterações de sal na dieta (queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa) e variações da intensidade da estimulação simpática do rim. Na circulação sangüínea a renina converte o angiotensinogênio circulante no decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A conversão da Ang I em Ang II (octapeptídeo) ocorre pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) presente, principalmente, nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar.

1.1.1. Angiotensinogênio

Esta substância corresponde a uma α_2 globulina que circula em quantidades abundantes no plasma. O angiotensinogênio humano contém 452 aminoácidos e é sintetizado, basicamente, no fígado, embora o RNAm que

codifica a proteína também seja abundante no tecido gorduroso, em determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC) e nos rins (Campbell & Habener, 1986; Cassis e cols., 1988). A síntese do angiotensinogênio é estimulada por vários hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônio tireoideano e pela própria Ang II (Bem-Ari & Garrison, 1988).

1.1.2. Renina

O principal determinante da taxa de produção de Ang II é a quantidade de renina liberada pelos rins. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação arterial renal pelas células justaglomerulares granulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes. Vale a pena salientar que outros órgãos como cérebro, coração e útero podem produzir renina. A forma ativa da renina é uma glicoproteína que contém 340 aminoácidos.

A secreção de renina pelas células justaglomerulares é controlada por três mecanismos, dois que agem predominantemente no rim, e o terceiro, que age através do SNC e é mediado pela liberação de noradrenalina pelos nervos noradrenérgicos renais.

O primeiro mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo da mácula densa. Aumentos do fluxo de NaCl através da mácula densa inibem a liberação de renina, e reduções do fluxo de NaCl estimulam a liberação de renina (Jackson e cols., 1982).

O segundo mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo barorreceptor intra-renal. Aumentos e reduções da pressão sanguínea nos vasos pré-glomerulares inibem e estimulam a liberação de renina, respectivamente. Acredita-se que o estímulo imediato para a

secreção seja uma redução da tensão da parede da arteríola aferente o que, talvez, controle, em parte, o mecanismo barorreceptor intra-renal (Data e cols., 1978; Linas, 1984).

O terceiro mecanismo, denominado mecanismo do receptor β -adrenérgico, é mediado pela liberação de noradrenalina das terminações dos nervos simpáticos pós-ganglionares. Ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos por esta catecolamina, nas células justaglomerulares, aumenta a secreção de renina (Jackson & Garrison, 1995). Vale a pena salientar que receptores α -adrenérgicos renais podem também mediar a secreção de renina. Alguns autores afirmam que, *in vitro*, a estimulação desses receptores inibe a liberação de renina (DeSaulles e cols., 1975; Vandongen e cols., 1979), outros, porém, afirmam que, *in vivo*, esse receptores podem ativar a liberação de renina (Blair e cols., 1985; Chen e cols., 1988).

Os três mecanismos que regulam a secreção de renina estão interligados constituindo rede fisiológica. Elevações da secreção de renina aumentam a formação de Ang II que, interagindo com seus receptores renais, inibe, nas células justaglomerulares, a liberação de renina. Este sistema foi denominado mecanismo de “*feedback*” negativo de alça curta (Jackson & Garrison, 1995). Além disso aumentos da pressão sangüínea inibem a liberação de renina: (1) ativando os barorreceptores carotídeos e aórticos, portanto reduzindo o tônus simpático renal; (2) aumentando a pressão nos vasos pré-glomerulares; e (3) reduzindo a reabsorção de NaCl no túbulo proximal (natriurese pressórica), o que aumenta a liberação tubular de NaCl para a mácula densa. A inibição da liberação de renina devida a aumentos da pressão sangüínea induzidos pela Ang II foi denominada de mecanismo de “*feedback*” negativo de alça longa (Jackson & Garrison, 1995).

1.1.3. Enzima conversora de angiotensina (ECA; cininase II; dipeptidilcarboxipeptidase)

BK circulante é constantemente inativada durante sua passagem pelo pulmão (Kroneberg & Stoepel, 1963; Ferreira & Vane, 1967). Ao mesmo tempo, a ECA converte a Ang I em Ang II na circulação pulmonar (Helmer, 1957). Embora a ECA tenha sido descrita pela primeira vez na década de 50 (Skeggs, 1956), somente em 1970 ela foi considerada idêntica à cininase II (Yang e cols., 1970 a,b).

A ECA humana contém 1278 resíduos de aminoácidos e possui dois domínios homólogos, cada um com um local catalítico e com uma região para ligação do Zn^{2+} (Soubrier e cols., 1988; Bernstein e cols., 1989). Esta enzima é inespecífica e cliva unidades de dipeptídeo de substratos com diferentes seqüências de aminoácidos. Várias substâncias podem ser hidrolizadas pela ECA, tais como encefalinas, neurotensina e substância P (Skidel & Erdös, 1985, 1987; Skidel e cols., 1987).

A ECA pode ser encontrada no plasma bem como em diversos tecidos orgânicos. Esta enzima pode ser encontrada no endotélio vascular (Caldwell e cols., 1976; Ryan e cols., 1976), cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (Hall e cols., 1976; Erdös & Skidgel, 1986; Schulz e cols., 1988). Estudos mostraram grande quantidade de ECA nos vasos sanguíneos pulmonares (Ryan e cols., 1975, 1976).

O esquema a seguir ilustra a participação da ECA na formação de algumas angiotensinas, bem como na degradação de BK. Podem ser observados, também, outras vias enzimáticas formadoras de angiotensinas.

AmP (aminopeptidases), CbP (carboxipeptidases), EnP (endopeptidases).

Adaptado de Santos e cols., 1994.

1.1.4. Angiotensina II

Este octapeptídeo até pouco tempo atrás foi considerado o único hormônio biologicamente ativo do SRA. Atualmente acredita-se que vários metabólitos deste sistema apresentam atividade biológica e sejam responsáveis por vários dos efeitos anteriormente atribuídos apenas à Ang II, que continua sendo, sem dúvida, o membro mais importante desta família. Seus efeitos na regulação cardiovascular são múltiplos e de grande importância:

- Tem ação vasoconstritora direta,
- Potencializa os efeitos da noradrenalina liberada pelas terminações nervosas; inibe a captação neuronal, aumentando a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica,

- Potencializa a transmissão ganglionar,
- Aumenta a síntese e a liberação de aldosterona pelo córtex adrenal resultando em aumento da reabsorção de sódio pelos túbulos renais,
- Estimula diversas regiões do SNC (área postrema, órgão subfornical, região anterolateral do terceiro ventrículo, PVN, entre outras), o que provoca aumento do tônus simpático no coração, vasos e na medula adrenal, aumentando a liberação de catecolaminas (Jackson & Garrison, 1995).

No SNC a Ang II estimula a secreção de vasopressina (Mouw e cols., 1971), contribuindo para o aumento da volemia; deprime também o funcionamento do próprio reflexo pressorreceptor (Santos e cols., 1995), reduzindo sua sensibilidade e tornando-o menos apto a tamponar as oscilações de pressão arterial. A Ang II é ainda um potente fator trófico, determinando a longo-prazo, hipertrofia e crescimento da musculatura lisa vascular (Itoh e cols., 1993).

Os efeitos da Ang II não estão restritos somente ao músculo liso vascular, mas também atingem a camada endotelial, onde receptores angiotensinérgicos também estão presentes. Recentemente foi demonstrado que a Ang II, além de promover vasoconstrição, pode também induzir a liberação de óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta de rato (Pueyo e cols., 1998). Essa liberação de NO, provavelmente, deve modular (em parte) o efeito vasoconstritor desse peptídeo nas células do músculo liso vascular. Porém, esses mesmos autores demonstraram que simultaneamente à liberação de NO, a Ang II também induz a formação de peroxinitrito, que é formado pela reação do NO com ânion superóxido (O_2^-). Nesta reação o NO é inativado.

1.1.5. Receptores de angiotensina

Os efeitos da angiotensina II são exercidos através de receptores específicos presentes na superfície celular. Whitebread e cols. (1989) caracterizaram farmacologicamente dois subtipos de receptores de Ang II denominados AT₁ e AT₂. Os receptores AT₁ (Murphy e cols., 1991; Sasaki e cols., 1991) e AT₂ (Mukoyama e cols., 1993) já foram clonados. O receptor AT₁ é um membro da família de receptores ligados às proteínas G com sete regiões transmembrana e tem 359 aminoácidos. O receptor AT₂ tem 363 aminoácidos, também possui sete regiões transmembrana, mas não é fortemente ligado às proteínas G. Os receptores AT₁ e AT₂ apresentam apenas 32% de homologia na seqüência de aminoácidos. Até o momento os efeitos farmacológicos principais da Ang II são atribuídos à sua interação com receptor AT₁. O receptor AT₂ está amplamente distribuído nos tecidos fetais e em adultos sua distribuição é mais restrita.

1.1.6. Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7), um componente bioativo do SRA, é um heptapeptídeo amino-terminal formado a partir da Ang I por ação de endopeptidases neutras, ou seja, por uma via independente da ECA (Santos e cols., 1988 e 1994). Em cultura de célula endotelial humana, Ang-(1-7) é o principal metabólito formado a partir de Ang I, por via independente de ECA (Santos e cols., 1992). É sabido que quando ocorre aumento tecidual ou plasmático de Ang I, também ocorre aumento da produção de Ang-(1-7). Sabe-se que os níveis circulantes de Ang-(1-7) aumentam de 25 a 50 vezes durante a inibição da ECA (Kohara e cols.,

1993; Campbell e cols., 1994; Moriguchi e cols., 1994). A formação de Ang-(1-7) a partir da Ang I requer a participação de endopeptidases específicas em cada tecido tais como metaloendopeptidase 24.15, encontrada no músculo liso vascular; endopeptidase 24.11, presente na circulação periférica; prolilendopeptidase 24.26, encontrada no cérebro e endotélio vascular (Ferrario e cols., 1991). A diversidade de vias enzimáticas sintetizadoras de Ang-(1-7), a partir de Ang I sugere que a produção desse heptapeptídeo deve ser controlada paracrinamente nos tecidos (Ferrario e cols., 1997).

A Ang II, em menor grau, também pode ser metabolizada em Ang-(1-7) pelas enzimas prolilendopeptidase (Koida & Walter, 1976; Welches e cols., 1991) e carboxipeptidase (Kumamoto e cols., 1981). A formação da Ang-(1-7) a partir da Ang II ainda não tem um significado biológico bem estabelecido.

Ang-(1-7) não possui fenilalanina na porção C terminal (Khosla e cols., 1974; Brosnihan e cols., 1988; Ferrario e cols., 1988). Esta ausência faz com que a Ang-(1-7) seja desprovida de significantes atividades pressora e dipsogênica, quando injetada periféricamente ou por via intracerebroventricular (Kono e cols., 1986; Brosnihan e cols., 1988; Ferrario e cols., 1988; Campagnole-Santos e cols., 1992).

Este peptídeo induz relaxamento de artéria coronária de porco e cão (Pörsti e cols., 1994; Brosnihan e cols., 1996), de microvasos cerebrais de pequenos porcos modificados geneticamente (Meng & Busija, 1993) e do leito mesentérico de gatos (Osei e cols., 1993), possivelmente via liberação de NO. A Ang-(1-7) facilita o barorreflexo e exibe efeito depressor em sítios da medula dorsal (Campagnole-Santos e cols., 1989 e 1992; Ferrario e cols., 1991). De forma geral, a Ang-(1-7) é um peptídeo com perfil farmacológico próprio dentro do grupo das angiotensinas (Ferrario e cols., 1997). A Ang-(1-7) produz

respostas opostas àsquelas obtidas com Ang II, seja em cultura de células, em órgãos isolados ou em animais intactos (Ferrario e cols., 1997). Foi demonstrado, por exemplo, que a Ang-(1-7) inibe o crescimento de células musculares lisas, de origem vascular (Freeman e cols., 1996), enquanto, em concentrações equimolares, Ang II estimula o crescimento celular. A Ang-(1-7) não promove liberação de aldosterona, nem facilita a transmissão noradrenérgica, efeitos estes característicos da Ang II. Semelhantemente à Ang II, a Ang-(1-7) libera vasopressina e estimula a biossíntese das prostaglandinas em cultura de células e em vasos sangüíneos (Tallant e cols., 1991). A Ang-(1-7) também pode promover fraca ação vasoconstritora, que foi descrita em artéria coronária de hamster (Kumagai e cols., 1990).

Há evidências da existência de receptor específico para Ang-(1-7) pois já foi descrito antagonista seletivo capaz de inibir seus efeitos (Santos e cols., 1994). Os efeitos deste peptídeo na medula dorsal são bloqueados por antagonista seletivo [d-Ala⁷]-Ang-(1-7) (A-779) de Ang-(1-7) (Santos & Campagnole-Santos, 1994).

Em resumo, pode-se afirmar que a Ang-(1-7) é o principal metabólito da Ang I produzido por via independente da ECA (Santos e cols., 1988). Este peptídeo tem ações diferentes da Ang II e por esse fato parece agir de forma a contrarregular as ações da Ang II no sistema cardiovascular e na homeostase hidroeletrolítica.

1.1.7. Sistema Caliceína-Cininas

As cininas são grupo de potentes peptídeos vasodilatadores formadas enzimaticamente pela ação de enzimas conhecidas como caliceínas ou cininogenases, agindo sobre substratos protéicos denominados cininogênios.

Há cada vez mais evidências da existência dos componentes do sistema calicreína-cininas (SCC) nos tecidos cardíaco e vascular, formando vias dos sistemas calicreína-cininas local e sistêmico, vias essas que envolvem diferentes tipos de células, como células endoteliais, células do músculo liso vascular (Nakagawa & Nasjletti, 1989; Campbell e cols., 1993) e cardiomiócitos (Minshall e cols., 1995). As cininas podem contribuir para a regulação do sistema cardiovascular e para os efeitos farmacológicos de agentes cardiovasculares via mecanismos autócrinos e parácrinos. Ao longo do sistema circulatório, a parede vascular e o sangue contêm os precursores das cininas, os cininogênios bem como as cininogenases, capazes de gerar constitutivamente os peptídeos vasoativos, as cininas (Schölkens, 1996).

Existem dois tipos de cininogênio, o de alto peso molecular e o de baixo peso molecular. Estes cininogênios são sintetizados no fígado e são produtos de um gene comum que produz dois RNAm diferentes (Kitamura e cols., 1986). O cininogênio de alto peso molecular é clivado pelas calicreínas plasmática e tecidual, gerando bradicinina e calidina, respectivamente. O de baixo peso molecular é substrato somente para a calicreína tecidual e o produto é a calidina (Nakanishi, 1987).

As principais cininogenases são serino proteases com propriedades catalíticas semelhantes à tripsina, quimiotripsina, plasmina, as chamadas calicreínas plasmáticas teciduais. A calicreína plasmática, sintetizada no fígado, é codificada por um único gene e circula no sangue em sua forma pró-enzimática, a pré-calicreína, que pode ser ativada pelo fator de Hageman (fator XII da cascata de coagulação sangüínea) ou pelo fator XI desta mesma cascata, formando a calicreína. As calicreínas teciduais são expressas, em células endoteliais, em células musculares lisas vasculares e em leucócitos e

são codificadas por vários genes. A abundância de cininogênio no sangue e na parede vascular sugere que a atividade da cininogenase é o fator limitante no acúmulo de cininas nos tecidos. A presença de cininogenases e cininogênios nos vários compartimentos do coração sugere que neste órgão as cininas estão disponíveis para exercer seus efeitos biológicos (Margolius e cols., 1995). Três cininas foram identificadas em mamíferos: a BK, a lisil-BK ou calidina e a metionil-lisil BK. Vale a pena salientar que os efeitos biológicos atribuídos às cininas devem estar diretamente relacionados à BK pois até hoje pouco se sabe a respeito das outras cininas. Tais efeitos biológicos são:

- Diminuição rápida de pressão sangüínea, de duração muito curta, por vasodilatação arterial, quando injetadas intravenosamente (Rocha e Silva e cols., 1949);

- Dor, pelo estímulo de aferentes nociceptivos na pele e vísceras (Ferreira, 1972);

- Aumento da permeabilidade vascular na inflamação e mediação da hiperemia reativa (Bhoola e cols., 1960; Majno e cols., 1969; Reis e cols., 1971; Carter e cols., 1974);

- Contração da musculatura lisa intestinal e uterina (Beraldo e cols., 1966);

- Estímulo da absorção celular de glicose (Needleman e cols., 1975);

- Diurese e natriurese e alteração da resistência vascular renal (Welbster & Gilmore, 1964).

As cininas também podem modular a secreção de renina pelos rins (Beierwaltes e cols., 1985), a liberação de vasopressina pela neurohipófise (Baertschi e cols., 1981) e a secreção de catecolaminas pela medula adrenal (Staszewska-Barczak & Vane, 1967).

As ações biológicas das cininas são mediadas por dois tipos de receptores, B₁ e B₂. A BK e a lisil-BK interagem especificamente com os receptores B₂ enquanto que seus metabólitos (desArg⁸-bradicinina e a desArg⁸-lisilbradicinina) interagem com receptores B₁ (Regoli & Barabe, 1980; Burch & Kyle, 1992). Os receptores B₁ são menos freqüentes que B₂ e estão presentes em vasos de coelho principalmente após indução com endotoxina de *E. coli* ou lipopolissacarídeo (Schneck e cols., 1994). O receptor B₁ parece estar acoplado às proteínas G e age via fosfolipase C (Menke e cols., 1994; Schneck e cols., 1994). Existem sugestões de que este tipo de receptor esteja relacionado com a inflamação crônica e dor, porém estes estudos ainda estão no início (Margolius, 1995). Os receptores B₂ são expressos constitutivamente em células endoteliais e participam da maioria das ações biológicas das cininas. Estes receptores de cininas são ligados às proteínas G, que por sua vez são ligadas à fosfolipase C e/ou A₂ (Whorton e cols., 1982; Clark e cols., 1986; Schrör, 1992).

1.1.8. Endotélio Vascular:

O endotélio vascular foi considerado por muito tempo apenas como uma barreira entre o músculo liso vascular e o sangue. Hoje, porém, sabe-se que ele é capaz de produzir inúmeras substâncias, seja de natureza vasoconstritora ou vasodilatadora, exercendo papel de verdadeiro órgão endócrino, parácrino e autócrino.

Dentre as substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio temos os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e os fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Os relaxantes compreendem o NO, fator

hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI_2). Como fatores constritores temos as endotelinas, Ang II, espécies reativas de oxigênio e fatores constritores derivados da cicloxigenase, tais como prostaglandina H_2 e tromboxano A_2 (Moncada & Vane, 1979; Furchgott e cols., 1980; Feletou & Vanhoutte, 1988; Furchgott & Vanhoutte, 1989).

O NO é um radical livre, gasoso, sintetizado a partir de um aminoácido, L-arginina, que sofre ação de grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). A ligação de agonistas como acetilcolina (ACh) e BK a seus respectivos receptores, que são acoplados à proteína G, promove ativação da fosfolipase C e a produção de dois segundos mensageiros, diacilglicerol e trifosfato de inositol. Este último aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular, favorecendo a interação Ca^{2+} -calmodulina, o que promove a estimulação da NOS. O NO promove relaxamento da musculatura lisa através do aumento dos níveis de GMP cíclico (Rapoport & Murad, 1983; Ignarro e cols., 1987; Palmer e cols. 1988).

A PGI_2 , derivada do ácido araquidônico via cicloxigenase, é considerada um outro EDRF. É sintetizada na célula endotelial e promove relaxamento da musculatura lisa vascular e inibição da função plaquetária via AMP cíclico (Moncada & Vane, 1979).

O terceiro fator relaxante derivado do endotélio é o EDHF. Este fator não é liberado em condições basais, mas através de estímulos como ACh, BK, nucleotídeos da adenosina, histamina, trombina e substância P. O mecanismo pelo qual o EDHF promove relaxamento envolve a abertura de canais de potássio de tipo ainda não especificado (Chen e cols., 1991).

1.1.9. Interação Ang-(1-7) e BK:

Foi demonstrado, recentemente, que a Ang-(1-7) potencializa o efeito hipotensor de BK, tanto em ratos normotensos (Paula e cols., 1995), quanto em ratos hipertensos (Lima e cols., 1997). Em experimentos realizados *in vitro*, a Ang-(1-7) potencializou o efeito vasodilatador de BK em artéria coronária de cão (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997) e o efeito vasoconstritor em veia jugular de coelho (Hecker e cols., 1997).

A resposta potencializadora de Ang-(1-7) sobre BK, em artéria coronária de cão é dependente da liberação de NO, mas não de PGI₂ (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997). Foi constatado que esta resposta pode ser específica para BK pelo fato de que o heptapeptídeo não potencializou o efeito vasodilatador promovido por ACh e nitroprussiato de sódio (NPS) (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997). Este efeito potencializador parece ser mediado por receptor próprio de Ang-(1-7), levando-se em conta que o mesmo persiste após o bloqueio de receptor AT₁ (CV 11974) e AT₂ (PD 123319) ou o bloqueio de ambos receptores com saralazina (Li e cols., 1997).

Por outro lado, em pressão arterial de ratos Wistar normotensos não anestesiados, este efeito parece depender de prostaglandinas vasodilatadoras, pois o efeito potencializador foi abolido na presença de indometacina (Paula e cols., 1995). O aumento da resposta hipotensora de BK em ratos normotensos Wistar não anestesiados, na presença de Ang-(1-7), parece ser mediado por receptor específico, levando-se em conta que esta resposta foi abolida por A-779, antagonista seletivo de Ang-(1-7) (Lima e cols., 1997). Em estudos realizados em ratos não anestesiados, o tratamento com inibidor de ECA (enalaprilato) promoveu aumento da resposta potencializadora de Ang-(1-7)

sobre a resposta hipotensora de BK em animais Wistar normotensos (Paula e cols., 1995 ; Lima e cols., 1997), não alterou a resposta potencializadora em SHR (ratos espontaneamente hipertensos) e aboliu a resposta potencializadora em RHR (ratos hipertensos renais) (Lima e cols., 1997).

As observações de que a Ang-(1-7) potencializa o efeito de BK são importantes levando-se em conta que a Ang-(1-7) pode estar aumentada após o bloqueio crônico de receptores AT₁ (Fagundes Moura , 1997) ou após inibição da ECA (Campbell e cols., 1993; Kohara e cols., 1993). Outras observações de que a via sintetizadora de BK está presente no coração, que BK administrada localmente e a inibição de sua degradação promovem efeitos cardíacos benéficos e que os inibidores de receptor B₂ de BK pioram os efeitos promovidos pela isquemia (Schölkens, 1996) sugerem que, provavelmente, a interação entre Ang-(1-7) e BK possa contribuir para os efeitos cardiovasculares benéficos produzidos por esses dois grupos de medicamentos.

Em resumo, a interação Ang-(1-7) e BK pode ocorrer via liberação de PGI₂ e NO, dependendo do leito estudado e provavelmente existe a participação de receptor específico para Ang-(1-7) neste fenômeno. Portanto, é importante estudar a vasodilatação direta promovida pela Ang-(1-7) e/ou o seu efeito potencializador sobre BK em vasos de resistência, que são os principais responsáveis pelo controle da resistência vascular periférica (Vanhoutte & Lüscher, 1986.).

2 - Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

1 - Avaliar a ação direta da Ang-(1-7),

2 - Avaliar a interação da Ang-(1-7) com BK,

3 - Avaliar os mecanismos envolvidos nesta interação,

em arteríolas mesentéricas de ratos Wistar normotensos, *in vivo* –
in situ.

3 - Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 200 e 240g (10 a 12 semanas de idade) provenientes do Biotério do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em sala com temperatura e umidade constantes (24°C - 60%), com ciclos claro/escuro (12/12 horas). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400-450 mg/Kg, subcutaneamente) e após laparotomia lateral direita, o mesentério foi exposto e os vasos da microcirculação foram observados ao microscópio (Zweifach, 1948; Fortes e cols., 1983). Os animais foram colocados sobre a platina do microscópio em placa aquecida a 37°C, a qual possui um orifício transparente para transiluminação do tecido. O mesentério foi irrigado, intermitentemente, com solução de Ringer-Locke contendo 1% de gelatina cuja composição, em mM, é a seguinte: NaCl - 154,0; KCL - 5,6; CaCl₂. 2H₂O - 2,0; NaHCO₃ - 6,0 e glicose - 5,0; à temperatura de 37°C (pH 7,2-7,4)

3.3. Microscopia intravital

Para o presente estudo foram escolhidas arteríolas que foram classificadas partindo-se dos capilares até as arteríolas maiores. As arteríolas pré-capilares são classificadas como A_4 , que se ligam a ramos maiores classificados como A_3 , que por sua vez se ligam a arteríolas maiores denominadas A_2 (Goren & Bohlen, 1977). Em nosso estudo utilizamos ramos A_2 (15 a 25 μm).

A medida do diâmetro de arteríolas foi realizada utilizando câmera de televisão de 500 linhas (Hitachi) que foi acoplada ao microscópio tri-ocular (Carl Zeiss) para facilitar a observação da imagem ampliada (3.400 vezes) no monitor de TV (Philips). Interposto entre o microscópio e a câmera de TV encontra-se sistema de lentes que faz a divisão de imagem na tela. Este é mantido em ângulo reto em relação à parede do vaso para se fazer a medida; este divisor de imagem divide a imagem óptica em duas, deslocando uma em relação à outra. Este sistema está conectado a parafuso micrométrico, permitindo a medida direta (em micrômetros) do diâmetro do vaso.

3.4. Aplicação tópica de drogas

As drogas utilizadas foram dissolvidas em Ringer-Locke-gelatina e aplicadas, topicamente, em volume de 10 μL . Mediu-se o diâmetro antes e após a aplicação das mesmas.

3.5. Protocolo Experimental

3.5.1. Efeito da Ang-(1-7) e BK em arteríolas.

Ang-(1-7) nas doses de 1, 10, 100 e 1000 pmol e BK nas doses de 1, 10 e 30 pmol, isoladamente, foram ensaiadas. O objetivo foi selecionar doses sub-máximas, ou seja, doses que promovessem pequeno, porém significativo, efeito sobre os vasos para, posteriormente, estudar a interação entre essas duas drogas.

3.5.2. Efeito da Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador de BK.

As doses de 1 e 10 pmol de BK foram escolhidas para serem testadas em conjunto com Ang-(1-7) 1, 10, 100 e 1000 pmol. Inicialmente mediu-se a vasodilatação promovida por BK. Após lavagem da preparação com Ringer Locke-gelatina e um período de espera de 3 min foi aplicada Ang-(1-7) nas quatro doses citadas acima e após 30 s foi aplicada BK nas doses de 1 e 10 pmol. Foram estabelecidas doses de 1 pmol e 100 pmol para BK e Ang-(1-7), respectivamente, pois estas induziram pequena mas significativa resposta vasodilatadora. O efeito vasodilatador promovido por BK e Ang-(1-7) ocorreu imediatamente após a aplicação tópica das drogas. Ang-(1-7) (100 pmol) promoveu potencialização do efeito vasodilatador de BK (1 pmol). O mesmo protocolo experimental foi também utilizado substituindo-se a Ang-(1-7) por solução de Ringer Locke-gelatina. Para verificar se havia ação de BK sobre Ang-(1-7), inverteu-se a ordem de aplicação das drogas.

3.5.3. Especificidade do efeito da Ang-(1-7) sobre BK.

Em ensaios prévios determinamos as doses equipotentes de NPS, ACh, histamina e ácido araquidônico (AA) à BK (1 pmol) que foram, respectivamente, 38 pmol; 1,6 nmol; 5,4 nmol e 10 nmol. Esses agentes foram aplicados isoladamente e após lavagem com Ringer Locke-gelatina e intervalo de 3 min foi aplicada Ang-(1-7) 100 pmol. Após trinta segundos, ACh, NPS, histamina ou AA foram novamente aplicados topicamente.

3.5.4. Influência dos produtos de cicloxigenase no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK.

Para se estudar a participação de produtos derivados da cicloxigenase no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK, a indometacina (5 mg/kg), um inibidor dessa enzima, foi administrado por via intra muscular (IM). Como controle, um grupo de animais recebeu mesmo volume de tampão Tris (diluente da indometacina). Após 30 min foi estudada a ação vasodilatadora de BK (1 pmol) isolada e na presença de Ang-(1-7) (100 pmol). O esquema de tratamento dos animais com indometacina foi aquele estabelecido por Paula e cols. (1995).

3.5.5. Participação do NO no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK .

Para estudar a participação do NO no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK, utilizamos N ω -Nitro-L-arginina-Metil-Éster (L-NAME) (10 nmol), inibidor da enzima NOS, aplicado topicamente, em um volume de 10 μ L. Três minutos após a aplicação do inibidor, a vasodilatação promovida por BK e BK na presença de Ang-(1-7), nas doses citadas no item 3.5.4., foi investigada. A dose utilizada e o tempo de contato do inibidor com a preparação foram aqueles utilizados em trabalho prévio por Fortes e cols. (1990).

3.5.6. Participação da hiperpolarização de membrana via canais de potássio no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK .

O inibidor inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio (TEA) (90 pmol topicamente), foi utilizado para se estudar a participação da hiperpolarização de membrana via canais de potássio no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK. BK ou BK + Ang-(1-7), nas doses citadas no item 3.5.4., foram diluídas na solução de TEA pois se verificou em ensaios prévios que o efeito desse agente era muito fugaz. A dose utilizada foi escolhida pelo fato de não promover resposta vascular própria, nem alterar significativamente o efeito vasodilatador de BK e Ang-(1-7).

3.5.7. Caracterização do receptor de BK envolvido no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK.

Neste grupo foi estudada a ação do HOE-140 (bloqueador de receptor B₂) sobre o efeito vasodilatador de BK e de BK na presença de Ang-(1-7). O bloqueador foi aplicado topicamente (100 pmol, 10 µL), 1 min antes da aplicação de BK isolada e na presença de Ang-(1-7) (100 pmol) e a medida de diâmetro foi realizada. O esquema utilizado no tratamento com o bloqueador foi estabelecido usando como critério o bloqueio total da vasodilatação induzida por BK (1 pmol) após menor tempo de contato para atingir bloqueio estável.

3.5.8. Caracterização do receptor de Ang-(1-7) envolvido no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK.

Para se estudar o receptor envolvido no efeito da Ang-(1-7) sobre BK, estudamos o efeito vasodilatador de BK isolada e de BK na presença de Ang-(1-7), após a aplicação tópica de A-779 (100 pmol, 10 µL, 15 s), bloqueador específico de receptor de Ang-(1-7). O esquema utilizado no tratamento com o bloqueador foi estabelecido usando como critério o bloqueio total da resposta induzida por Ang-(1-7) (100 pmol) no menor tempo de contato necessário para atingir bloqueio estável.

Da mesma forma, para verificar se Ang-(1-7) interagia com receptor próprio, losartan, bloqueador de receptor AT₁, foi administrado por via endovenosa (IV), na dose de 15 mg/kg e animais do grupo controle

receberam mesmo volume de salina. Quarenta min depois foi feita aplicação de BK isolada e BK na presença de Ang-(1-7) nas doses e condições descritas anteriormente. O esquema utilizado no tratamento com o bloqueador foi estabelecido usando como critério o bloqueio total de resposta induzida por Ang II (10 pmol) no menor tempo de contato necessário para atingir bloqueio estável.

3.5.9. Influência da ECA no efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK.

O inibidor da ECA, enalaprilato, foi aplicado endovenosamente, na dose de 10 mg/kg, 30 min antes do início do experimento. Animais do grupo controle foram injetados com solução salina. O experimento consistiu de aplicação tópica de BK isolada e de BK na presença de Ang-(1-7), nas doses e condições descritas anteriormente. O esquema utilizado no tratamento com o inibidor foi aquele estabelecido por Paula e cols. (1995).

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como porcentagem de aumento do diâmetro arteriolar em relação ao diâmetro inicial e plotados como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Como nível de significância adotamos $p < 0,05$. As médias foram analisadas utilizando ANOVA seguido de teste de Tukey-Kramer ou teste t de Student pareado ou não pareado.

3.7. Drogas utilizadas

Hidrato de cloral é proveniente da Merck S/A, Ind. Química, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. ACh, NPS, histamina, L-NAME, AA, TEA e indometacina são provenientes da Sigma Chemical Company S/A (ST. Louis, Mo, USA); losartan e enalaprilato, da Merck Sharp & Dohme (São Paulo, Brasil); BK, da Peptide Institute INC. (Osaka, Japão); Ang-(1-7), da Bachem (Califórnia, USA); HOE-140, da Hoechst (São Paulo, Brasil). A-779 foi sintetizada por Mahesh C. Khosla, da Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, OH, USA).

4 - Resultados

4.1. Efeito vascular de BK e Ang-(1-7), isoladamente, e em conjunto.

A BK, nas doses de 1, 10 e 30 pmol e a Ang-(1-7), nas doses de 1, 10, 100 e 1000 pmol, aplicadas tópica e isoladamente, induziram vasodilatação que foi proporcional à dose, em arteríolas mesentéricas de 2º ordem de ratos Wistar (Figura 1 e tabela 1).

A vasodilatação promovida por BK (1pmol) foi potencializada, significativamente, pela aplicação prévia (30 segundos antes) de Ang-(1-7) 10 pmol e 100 pmol. Por outro lado, doses menor (1 pmol) ou maior (1000 pmol) de Ang-(1-7) não modificaram o efeito vasodilatador promovido pela BK (Figura 2 e Tabela 2). É oportuno mencionar que após 30 s da aplicação da Ang-(1-7) o seu efeito vasodilatador já havia desaparecido, porém foi verificada resposta potencializada da vasodilatação promovida pela BK (1 pmol). Ang-(1-7) (100 pmol) não potencializou o efeito vasodilatador de BK (10 pmol) [$15,4 \pm 1,0\%$, na ausência de Ang-(1-7) vs. $14,6 \pm 0,4\%$, na presença de Ang-(1-7)].

A vasodilatação promovida pela Ang-(1-7) (100 pmol) ($4,9 \pm 0,4\%$; n=4) não foi aumentada pela adição prévia de BK (1 pmol) ($5,8 \pm 1,0$; n=4) e da mesma forma que ocorreu com Ang-(1-7), o efeito vasodilatador de BK já havia desaparecido quando esta foi adicionada previamente à Ang-(1-7). Também não houve alteração do efeito vasodilatador de BK quando adicionou-se Ringer Locke-gelatina em substituição à Ang-(1-7).

Portanto, as doses de 1 pmol de BK e 100 pmol de Ang-(1-7) foram escolhidas para os próximos grupos experimentais, pois induziram pequeno, mas estatisticamente significativo, aumento do diâmetro arteriolar (3-5%) quando testadas separadamente.

4.2. Especificidade do efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador de BK.

Para verificar a especificidade do efeito de Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador de BK, substituiu-se esta última por outros quatro vasodilatadores, NPS (38 pmol), ACh (1,6 nmol), histamina (5,4 nmol) e AA (10 nmol). Esses agentes foram ensaiados na ausência e na presença de Ang-(1-7) (100 pmol). A vasodilatação promovida por esses agentes não foi alterada significativamente pela Ang-(1-7) (Tabela 3).

4.3. Estudo do efeito do tratamento com indometacina sobre BK isolada e na presença de Ang-(1-7).

A indometacina, inibidor da cicloxigenase, não alterou a resposta vasodilatadora promovida pela BK aplicada isoladamente (Figura 3 e Tabela 4). Por outro lado, este tratamento inibiu totalmente o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre vasodilatação induzida por BK (Figura 3 e Tabela 4). Verificamos também que o bloqueio da cicloxigenase diminuiu significativamente a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) (Tabela 5). O

tratamento com indometacina não promoveu alteração do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

4.4. Estudo do efeito do tratamento com L-NAME sobre BK isolada e na presença de Ang-(1-7).

Com a finalidade de estudar a participação do NO no efeito potencializador que a Ang-(1-7) exerce sobre BK, fizemos a aplicação tópica de L-NAME, 10 nmol, 3 min antes da aplicação de BK isolada e na presença de Ang-(1-7). Não ocorreu alteração da resposta vasodilatadora de BK (Figura 4 e Tabela 4), porém estava ausente a ação potencializadora da Ang-(1-7) sobre a resposta da BK (Figura.4 e Tabela 4). A resposta vasodilatadora promovida pela Ang-(1-7) foi diminuída, significativamente, na presença de L-NAME (Tabela 5). O tratamento com L-NAME não promoveu alteração do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

4.5. Estudo do efeito do tratamento com TEA sobre BK isolada e na presença de Ang-(1-7).

Com a finalidade de estudar a participação da hiperpolarização de membrana via canais de potássio no efeito potencializador que a Ang-(1-7) exerce sobre BK, fizemos a aplicação tópica de BK ou BK + Ang-(1-7), diluídos em TEA 90 pmol. Não ocorreu alteração da resposta vasodilatadora de BK (Figura 5 e Tabela 4) ou de Ang-(1-7) (Tabela 5), porém a ação potencializadora da Ang-(1-7) sobre a resposta da BK foi abolida por TEA (Figura.5 e Tabela 4).

4.6. Ação do HOE-140 sobre o efeito vasodilatador de Ang-(1-7) e sobre o efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK.

Não ocorreu alteração significativa da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) na presença do HOE-140 (100 pmol, 1 min) bloqueador de receptor B₂ de BK (Tabela 5). A resposta potencializadora de Ang-(1-7) sobre BK foi abolida na presença de HOE-140, assim como a resposta vasodilatadora de BK (Figura 6 e Tabela 4). O tratamento com HOE-140 não promoveu alteração do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

4.7. Ação do A-779 sobre BK aplicada isoladamente e sobre o efeito potencializador da Ang-(1-7) na resposta vasodilatadora da BK.

Com o objetivo de se verificar a participação do receptor da Ang-(1-7) na potencialização promovida por esta sobre o efeito vasodilatador de BK, fizemos a aplicação tópica de A-779 anteriormente à aplicação de BK sozinha e de BK na presença de Ang-(1-7). Verificamos que não ocorreu alteração significativa da resposta vasodilatadora de BK (Figura 7 e Tabela 4), porém o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre BK desapareceu (Figura 7 e Tabela 4). A-779 aboliu totalmente a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) aplicada isoladamente (Tabela 5). Este agente não promoveu alteração do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

4.8. Estudo do efeito do tratamento com losartan sobre BK isolada e na presença de Ang-(1-7).

Para verificar a possibilidade da participação do receptor AT_1 sobre a potencialização, fizemos o tratamento com losartan (15 mg/kg, 40 min) e este não promoveu alteração da resposta vasodilatadora de BK isolada, bem como de BK na presença de Ang-(1-7) (Figura 8 e Tabela 4). O inibidor de receptor AT_1 não promoveu alteração da resposta vasodilatadora de Ang-(1-7) (Tabela 5), nem do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

4.9. Estudo do efeito do tratamento com enalaprilato sobre BK isolada e na presença de Ang-(1-7).

O tratamento com inibidor de ECA promoveu aumento significativo da resposta vasodilatadora de BK isolada, não modificou o efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK (Figura 9 e Tabela 4), apesar de ter aumentado significativamente a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) (Tabela 5). O tratamento com enalaprilato não promoveu alteração do diâmetro arteriolar basal (Tabela 6).

Figura 1: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK aplicada topicamente (**em A**) e Ang-(1-7), aplicada topicamente (**em B**).

Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

Em A * $p < 0,001$ e † $p < 0,001$, comparados com os valores obtidos com BK 1 pmol e BK 10 pmol, respectivamente.

Em B ‡ $p < 0,05$ em comparação com o valor obtido com Ang-(1-7) 1 pmol;

§ $p < 0,001$ em comparação com os valores obtidos com Ang-(1-7) 1, 10 e 100 pmol.

Figura 2: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente. Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

* $p < 0,05$ e $^{\dagger}p < 0,001$ comparado com os valores obtidos com BK (1 pmol).

Figura 3: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam injeção IM de indometacina 5mg/kg, 30 min antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas

* $p < 0,05$ em comparação com BK 1 pmol e † $p < 0,001$ em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol).

Figura 4: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam aplicação tópica de L-NAME 10 nmol, 3 min antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os número dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

* $p < 0,05$ em comparação com BK 1 pmol e $^{\dagger}p < 0,001$ em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol).

Figura 5: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), bem como de arteríolas mesentéricas que receberam aplicação tópica de BK e BK na presença de Ang-(1-7) diluídas em TEA 90 pmol. Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

$^{\ddagger}p < 0,001$ em comparação com BK 1 pmol e $^{\dagger}p < 0,001$ em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol).

Figura 6: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam aplicação tópica de HOE-140 100 pmol, 60 s antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

‡ $p < 0,001$ em comparação com BK (1 pmol); § $p < 0,01$ em comparação com BK (1 pmol) e §§ $p < 0,0001$ em comparação com Ang-(1-7) + BK (1 pmol).

Figura 7: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam aplicação tópica de A-779 100 pmol, 15 s antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

‡ $p < 0,001$ em comparação com BK 1 pmol e † $p < 0,001$ em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol).

Figura 8: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam injeção IV de losartan 15mg/kg, 40 min antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

[‡]p < 0,001 em comparação com BK 1 pmol.

Figura 9: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam injeção IV de enalaprilato 10mg/kg, 30 min antes da aplicação de BK ou de BK na presença de Ang-(1-7). Os resultados estão representados como Média $\pm$ EPM. Os números dentro das barras indicam o número de preparações testadas.

‡ $p < 0,001$ em comparação com BK (1 pmol); † $p < 0,001$ em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol); # $p < 0,001$ em comparação com BK (1 pmol) tratado com enalaprilato.

Tabela 1: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e Ang-(1-7) , aplicados topicamente.

BK (pmol)			
1	10	30	
4,1 ± 0,2	14 ± 0,7*	19,5 ± 1,5* [†]	
(n=16)	(n=16)	(n=7)	
Ang (1-7) (pmol)			
1	10	100	1000
1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,6	3,4 ± 0,3 [‡]	9,8 ± 0,9 [§]
(n=15)	(n=11)	(n=15)	(n=14)

Os resultados estão representados como Média ± EPM.

* $p < 0,001$ e [†] $p < 0,001$, comparados com os valores obtidos com BK 1 pmol e BK 10 pmol, respectivamente; [‡] $p < 0,05$ em comparação com o valor obtido em Ang-(1-7) 1 pmol; [§] $p < 0,001$ em comparação com os valores obtidos em Ang-(1-7) 1, 10 e 100 pmol.

Tabela 2: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK (1 pmol) e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente.

BK 1 pmol		
- Ang-(1-7)	+ Ang-(1-7) (em pmol)	n
1		
2,6 ± 0,8	2,5 ± 1,6	4
10		
2,6 ± 0,9	5,2 ± 1,0*	6
100		
4,1 ± 0,4	11,1 ± 1,2 [†]	7
1000		
1,6 ± 0,8	3,2 ± 1,3	5

Os resultados estão representados como Média ± EPM. *p< 0,05 e [†]p< 0,001 comparado com os valores obtidos com BK 1 pmol.

(-) ausência de Ang-(1-7)

(+) presença de Ang-(1-7)

Tabela 3: Mesentério *in vivo*: aumento (em %) do diâmetro arteriolar induzido por BK (1 pmol), ACh (1,6 nmol), NPS (38 pmol), histamina (Hist – 5,4 nmol) e AA (10 nmol) na ausência e na presença de Ang-(1-7) (100 pmol), aplicados topicamente.

Agente	Ang-(1-7)		n
	Ausência	Presença	
BK	4,3 ± 0,5	11,1 ± 1,2*	7
ACh	6,5 ± 0,3	5,0 ± 0,5	6
SNP	4,4 ± 0,3	3,7 ± 0,7	5
Hist	4,4 ± 0,3	3,0 ± 0,8	7
AA	6,1 ± 0,6	5,9 ± 0,8	8

Os valores correspondem à Média ± EPM. n= número de animais testados.

*p< 0,001 comparado com os valores na ausência de Ang-(1-7).

Tabela 4: Aumento (%) do diâmetro de arteríolas mesentéricas induzido por BK e BK na presença de Ang-(1-7), aplicadas topicamente, em animais não tratados e em animais que receberam diferentes tratamentos.

Grupo	BK (1 pmol)	Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol)
<u>Indometacina</u>		
Não tratado (n=8)	3,0 ± 0,4	9,1 ± 0,6*
Tratado (n=8)	2,6 ± 0,6	2,8 ± 0,6 [†]
<u>L-NAME</u>		
Não tratado (n=9)	3,7 ± 0,3	12 ± 0,4*
Tratado (n=9)	4,5 ± 0,6	4,5 ± 0,4 [†]
<u>TEA</u>		
Não tratado (n=7)	3,4 ± 0,4	9,8 ± 0,8 [‡]
Tratado (n=7)	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,6 [†]
<u>HOE-140</u>		
Não tratado (n=9)	3,7 ± 0,3	12 ± 0,4 [‡]
Tratado (n=10)	0,8 ± 0,5 [§]	1,1 ± 0,7 ^{§§}
<u>A-779</u>		
Não tratado (n=13)	4,4 ± 0,4	12 ± 0,4 [‡]
Tratado (n=13)	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,6 [†]
<u>Losartan</u>		
Não tratado (n=13)	3,3 ± 0,5	9,5 ± 0,5 [‡]
Tratado (n=13)	3,7 ± 0,3	9,9 ± 0,6 [‡]
<u>Enalaprilato</u>		
Não tratado	3,7 ± 0,3	10,5 ± 0,2 [‡]
Tratado	7,9 ± 0,4 [‡]	15,3 ± 0,8 ^{†#}

Os resultados estão representados como Média ± EPM. *p< 0,05 em comparação com BK (1 pmol) no respectivo grupo não tratado; [†]p< 0,001 em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol) no respectivo grupo não tratado; [‡]p< 0,001 em comparação com BK (1 pmol) no respectivo grupo não tratado; [§]p< 0,01 em comparação com BK (1 pmol) no respectivo grupo não tratado; ^{§§}p< 0,0001 em comparação com Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol) no respectivo grupo não tratado; [#]p<0,001 em comparação com BK (1 pmol) tratado.

Tabela 5. Efeitos de antagonistas e bloqueadores enzimáticos sobre o aumento (expresso em %) do diâmetro arteriolar mesentérico promovido pela Ang-(1-7).

	Sem tratamento	Tratado	n
Indometacina 5mg/kg, IM	2,7 ± 0,4	1,3 ± 0,5*	8
L-NAME 10 nmol a.t.	4,7 ± 0,5	3,2 ± 0,6*	9
HOE 100 pmol a.t.	4,7 ± 0,5	4,6 ± 0,3	10
A-779 100 pmol a.t.	4,4 ± 0,5	-0,5 ± 0,5 [‡]	10
Losartan 15 mg/kg, IV	3,8 ± 0,4	3,4 ± 0,2	6
Enalaprilato 10 mg/kg, IV	4,4 ± 0,5	8,1 ± 0,4 [†]	6
TEA 90 pmol a.t.	3,1 ± 0,5	3,5 ± 0,5	7

Os valores correspondem à Média ± EPM da porcentagem de aumento do diâmetro arteriolar induzido por Ang-(1-7), aplicada topicamente.

*p< 0,05; [†]p< 0,001 e [‡]p< 0,0001 em comparação com o grupo sem tratamento.

(-) contração

n-número de animais

IM-intra-muscular

IV-intra-venosa

a.t.-aplicação tópica

Tabela 6. Mesentério *in vivo*: efeitos de antagonistas e bloqueadores enzimáticos sobre o diâmetro arteriolar basal.

	Sem tratamento	Tratado	n
Indometacina 5mg/kg, IM	17,9 ± 0,8	18,7 ± 0,8	14
L-NAME 10 nmol a.t.	16,0 ± 1,1	15,8 ± 1,0	10
HOE 100 pmol a.t.	23,2 ± 2,2	23,3 ± 2,1	9
A-779 100 pmol a.t.	16,7 ± 1,0	16,5 ± 0,9	9
Losartan 15 mg/kg, IV	20,1 ± 0,8	19,9 ± 0,6	9
Enalaprilato 10 mg/kg, IV	18,8 ± 0,8	18,9 ± 1,3	11

Os valores correspondem à Média ± EPM do diâmetro arteriolar basal (em μm) de animais não tratados e tratados.

n-número de animais

IM-intra-muscular

IV-intra-venosa

a.t.-aplicação tópica

5 – Discussão

No presente trabalho foi demonstrado que a Ang-(1-7) provoca vasodilatação em arteríolas mesentéricas estudadas *in vivo* – *in situ* bem como potencializa o efeito vasodilatador produzido pela BK nesse território. A Ang-(1-7) tem sido descrita como vasodilatador seja em vasos de maior calibre como artéria coronária de porco (Pörsti e cols., 1994) e de cão (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997), seja em leito mesentérico de gatos (Osei e cols., 1993) ou em microvasos piais estudados *in vivo* em pequenos porcos modificados geneticamente (Meng & Busija, 1993). Entretanto foi observada resposta vasoconstritora a este heptapeptídeo em coração isolado de hamster (Kumagai e cols., 1990) e de ratos (Neves e cols., 1995). Estes dados aliados aos obtidos no presente trabalho demonstram que os efeitos vasculares da Ang-(1-7) variam com o leito vascular e/ou com a espécie animal. Observamos, também, que a Ang-(1-7) promove vasodilatação dependente de dose, no leito mesentérico de ratos. Doses tão baixas quanto 1 e 10 pmol promoveram vasodilatação neste leito, indicando que a microcirculação mesentérica é bastante sensível a este peptídeo.

O efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre a resposta vasodilatadora de BK foi demonstrado em artéria coronária de cão (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997), bem como na pressão arterial de ratos Wistar normotensos (Paula e cols., 1995), SHR e RHR (Lima e cols., 1997). Além disso, efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre o efeito vasoconstritor de BK em anéis isolados de jugular de coelho foi também descrito (Hecker e cols., 1997). Com o objetivo de verificar se Ang-(1-7) potencializa o efeito

vasodilatador de BK em vasos de resistência (arteríolas), a interação Ang-(1-7) e BK foi estudada na microcirculação mesentérica de ratos anestesiados, utilizando microscopia intravital.

Em arteríolas mesentéricas (diâmetro em torno de 20 μm) observou-se efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK que foi dependente de dose. A curva dose-resposta apresentou aspecto em sino pois o efeito foi máximo quando se utilizou a dose de 100 pmol de Ang-(1-7) (potencialização da ordem de 2,5 vezes). A dose de 1000 pmol do heptapeptídeo não promoveu potencialização, apesar de ter promovido vasodilatação maior do que a de 100 pmol. Este fato nos leva a acreditar que a potencialização não ocorre em função, apenas, do efeito vasodilatador dessas duas drogas. Além do mais, este efeito é específico da Ang-(1-7) sobre BK pois, protocolo inverso, ou seja, aplicação de BK anterior à Ang-(1-7), não promoveu o efeito potencializador.

Para entender o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na potencialização de BK pela Ang-(1-7), diferentes inibidores de enzimas ou antagonistas de receptores foram utilizados. A participação de prostanóides vasodilatadores e de NO no efeito vasodilatador de Ang-(1-7) foi demonstrada pois o tratamento com indometacina (inibidor de ciclooxigenase) ou L-NAME (inibidor da síntese de NO) reduziu o efeito vasodilatador desse peptídeo. O mecanismo de potencialização da Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador de BK também parece depender de prostanóides vasodilatadores e NO pois estes tratamentos aboliram a potencialização. Da mesma forma, o tratamento dos animais com TEA, inibidor inespecífico de canais de potássio, também aboliu o efeito potencializador levando-nos a sugerir a participação de hiperpolarização

de membrana via canais de potássio nesse efeito. Para se identificar o canal de potássio envolvido, outros inibidores devem ser ensaiados. Entretanto, em arteríolas coronárias isoladas de humanos demonstrou-se que a vasodilatação induzida por BK depende de hiperpolarização de membrana via canais de potássio dependente de cálcio, com menor contribuição do NO (Miura e cols., 1999). Se o mesmo ocorre em arteríolas mesentéricas, os dados até hoje obtidos por nós não permitem afirmar.

O fato da inibição da cicloxigenase, NOS e de canais de potássio terem abolido a atividade potencializadora da Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador de BK sugere que cada sistema de transdução intracelular, em particular, pode promover a resposta potencializadora. Por outro lado, o desaparecimento da resposta potencializadora de Ang-(1-7) sobre BK após tratamento com indometacina, L-NAME e TEA nos leva a crer que, se um dos sistemas está bloqueado, o outro não é ativado. Parece que esses sistemas se encontram em série, sendo necessário que todos estejam ativados para que ocorra o efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK. Além do mais foi demonstrado por Kaley & Koller (1995) que L-NNA, um análogo da L-arginina, inibiu não somente a vasodilatação promovida por ACh, cuja ação é dependente da liberação de NO do endotélio, mas também a vasodilatação promovida pelo ácido araquidônico, precursor da formação de prostaglandinas vasoconstritoras e vasodilatadoras. Estes resultados permitiram aos autores sugerir que análogos da L-arginina, além de inibirem a síntese de NO, podem também interferir com a síntese endotelial de prostaglandinas e/ou sua atividade sobre os vasos (Kaley & Koller, 1995). Tais resultados nos levam a sugerir, por similaridade, que o bloqueio total da potencialização promovido por

L-NAME, outro análogo da L-arginina, pode ser em decorrência da inibição de NO e de prostaglandinas vasodilatadoras.

O efeito vasodilatador direto de Ang-(1-7) bem como sua atividade potencializadora sobre BK em arteríolas mesentéricas foram bloqueados pelo A-779, bloqueador específico do receptor de Ang-(1-7). Esta observação nos leva a propor que, em vasos de resistência, a interação entre esses dois peptídeos depende da interação de Ang-(1-7) com receptor específico, à semelhança do que ocorre em grandes vasos (Brosnihan e cols., 1996; Li e cols., 1997). Verificou-se ainda que a atividade potencializadora de Ang-(1-7) sobre BK parece não estar relacionada ao receptor de Ang II (subtipo AT₁) pois o tratamento com losartan não interferiu com este mecanismo. Resultados similares foram obtidos por Li e cols. (1997) em artéria coronária de cão.

O fato de que a Ang-(1-7) não potencializa a vasodilatação produzida pela ACh, NPS, histamina e AA, em arteríolas do leito mesentérico, sugere que a atividade potencializadora de Ang-(1-7) é específica, ou seja, a Ang-(1-7) não potencializa qualquer agente que libere NO e/ou prostaciclina. Resultados semelhantes foram obtidos por Paula e cols. (1995) e Li e cols. (1997), estudando a ação da Ang-(1-7) sobre BK na pressão arterial de ratos normotensos acordados e a ação da Ang-(1-7) sobre BK em anéis de artéria coronária de cão, respectivamente.

Não podemos, com nossos dados, identificar o local exato em que se dá a interação de Ang-(1-7) com BK, aumentando o seu efeito vasodilatador, entretanto algumas possibilidades podem ser consideradas. Em cultura de células musculares lisas, a Ang-(1-7) promove a liberação de ácido araquidônico via ativação de seu receptor específico. Este

mecanismo envolve estimulação da CaM (Ca^{++} /calmodulina) quinase II, que por sua vez, via ativação de MAP-quinase ("mitogen-activated protein"), aumenta a atividade da fosfolipase A_2 (Muthalif e cols., 1998). Se mecanismo similar está envolvido nos efeitos vasculares da Ang-(1-7), na microcirculação mesentérica, é hipótese que deve ser ensaiada.

Recentemente foi sugerido que algumas ações da Ang-(1-7) podem ser mediadas por potencialização de BK endógena através da facilitação de um mecanismo de "cross-talk" entre ECA e receptor B_2 de BK (Deddish e cols., 1998). De acordo com este estudo, a ligação de Ang-(1-7) à ECA facilitaria o "cross-talk" de ECA e receptor B_2 , levando à potencialização de BK endógena, independente da interferência com a hidrólise de BK. Este parece não ser o mecanismo envolvido na vasodilatação produzida por Ang-(1-7) no leito vascular mesentérico pois: 1) a vasodilatação promovida por Ang-(1-7) não foi bloqueada pelo tratamento com HOE-140 (antagonista de receptor B_2 de BK), utilizado em dose suficiente para abolir a resposta vasodilatadora de BK; 2) o efeito vasodilatador de Ang-(1-7) foi completamente abolido pelo tratamento com A-779, que não alterou o efeito vasodilatador promovido por BK; 3) o tratamento com enalaprilato aumentou a resposta vasodilatadora de Ang-(1-7). Este tratamento deveria reduzir ou abolir o efeito de Ang-(1-7), de acordo com mecanismo proposto por Deddish e cols. (1998), o que não ocorreu.

Como descrito previamente em animais não anestesiados (Paula e cols., 1995; Lima e cols., 1997), o tratamento com enalaprilato, um inibidor de ECA, não impediu a interação entre Ang-(1-7) e BK. Este resultado indica que o mecanismo de potencialização não é dependente do bloqueio da atividade catalítica da ECA (Chappell e cols., 1998; Deddish e cols.,

1998). Nossos resultados, aliados a achados anteriores (Paula e cols., 1995; Li e cols., 1997; Deddish e cols., 1998), levam a sugerir que a interação de Ang-(1-7) e BK é complexa, envolvendo receptor específico para Ang-(1-7) e vias dependentes de prostanóides vasodilatadores, NO e hiperpolarização de membrana via canais de potássio.

6- Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho nos levam a concluir que:

- 1) Em microvasos do leito mesentérico a Ang-(1-7) promove efeito vasodilatador mediado por receptor específico e dependente de prostanóides vasodiladores e NO.
- 2) O efeito potencializador de Ang-(1-7) sobre BK envolve receptor específico para Ang-(1-7) e requer a participação de prostanóides vasodiladores, NO e hiperpolarização de membrana via canais de potássio.
- 3) O efeito potencializador de Ang-(1-7) parece ser específico para BK, não ocorrendo este fenômeno quando outros agentes vasodiladores que dependem de NO e/ou prostaciclina são ensaiados. Da mesma forma, também não ocorre efeito potencializador de BK sobre Ang-(1-7).
- 4) O mecanismo de potencialização não parece ser dependente da atividade catalítica da ECA.

7 - Referências Bibliográficas

BAERTSCHI, A.J.; ZINGG, H.H.; DREIFUSS, J.J. Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurohypophyseal system. **Brain Res.**, 220: 107-19, 1981.

BEIERWALTES, W.H.; PRADO, J.; CARRETERO, O. A. Kinin stimulation of renin release in isolated rat glomeruli. **Am. J. Physiol.** 248: F757-61, 1985.

BEM-ARI, E.T. & GARRISON, J.C. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, 255: E70-9, 1988.

BERALDO, W.T.; ARAUJO, R.L.; MARES-GUIA, M. Oxytocic esterase in rat urine. **Am. J. Physiol.**, 975-80, 1966.

BERNSTEIN, K.E.; MARTIN, B.M.; EDWARDS, A.S.; BERNSTEIN, E.A. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. **J. Biol. Chem.**, 264: 11945-51, 1989.

BHoola, K.D.; CALLE, J.D.; SCHACHTER, M. The effect of bradykinin, serum kallikrein and other endogenous substances on capillary permeability in the guinea pig. **J. Physiol.**, 152: 75-86, 1960.

BLAIR, M.L.; CHEN, Y-H; IZZO JR., J.L. Influence of renal perfusion pressure on alpha-and beta-adrenergic stimulation of renin release. **Am. J. Physiol.**, 248: E317-26, 1985.

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

BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, 27: 523-8, 1996.

BURCH, R.M. & KYLE, D.J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. **Life Sci.**, 50: 829-38, 1992.

CALDWELL, P.R.B.; SEEGAL, B.C.; HSU, K.C.; DAS, M.; SOFFER, R.L. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. **Science**, 191: 1050-1, 1976.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; DIZ, D.I.; SANTOS, R.A.S.; KHOSLA, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7) microinjected into the dorsomedial medulla of rats. **Am. J. Physiol.**, 257: H324-9, 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; HERINGER, S.B.; BATISTA, E.N.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am. J. Physiol.**, 263: R89-94, 1992.

CAMPBELL, D.J. & HABENER, J.F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. **J. Clin. Invest.**, 78: 31-9, 1986.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A.M. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. **Hypertension**, 21: 155-65, 1993.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A.M. Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. **Hypertension**, 23: 439-49, 1994.

CARTER, R.D.; JOYNER, W.L.; RENKIN, E.M. Effect of histamin and some other substances on molecular selectivity of the capillary wall to plasma proteins and dextran. **Microvasc. Res.**, 7: 31-48, 1974.

CASSIS, L.A.; SAYE, J.; PEACH, M.J. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. **Hypertension**, 11: 591-6, 1988.

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

CHEN, Y-H; HISA, H.; RADKE, K.J.; IZZO JR., J.L.; SLADEK, C.D.; BLAIR, M.L. Adrenergic control of renin in euhydrated and water-deprived conscious dogs. **Am. J. Physiol.**, 255: E793-800, 1988.

CHEN, G.; YAMAMOTO, Y.; MIWA, K. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. **Am. J. Physiol.**, 260: H1888-92, 1991.

CLARK, M.A.; BOMALASKI, J.S.; CONWAY, T.M.; WARTELL, J.; CROOKE, T. Differential effects of aspirin and dexamethasone on phospholipase A₂ and C activities and arachidonic acid release from endothelial cells in response to bradykinin and leukotriene D₄. **Prostaglandins**, 32: 703-8, 1986.

DATA, J.L.; GERBER, J.G.; CRUMP, W.J.; FRÖLICH, J.C.; HOLLIFIELD, J.W.; NIES, A.S. The prostaglandin system. A role in canine barorreceptor control of renin release. **Circ. Res.**, 42: 454-8, 1978.

DEDDISH, P.A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H.L.; WANG, H.Z.; SKIDGEL, A.R.; ERDOS, E.G. N-domain specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. **Hypertension**, 31: 912-17, 1998.

DESAULLES, E.I.; FORLER, C.; VELLY, J.; SCHWARTZ, J. Effect of catecholamines on renin release *in vitro*. **Biomedicine**, 23: 433-9, 1975.

ERDÖS, E.G. & SKIDGEL, R.A. The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensin I converting enzyme. **Hypertension**, 8 (suppl. 1): 34-7, 1986.

FAGUNDES MOURA, C.R. Perfil plasmático de angiotensinas durante o desenvolvimento da hipertensão renal tipo um rim um clip, em ratos. Minas Gerais, 1997. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. Federal de Minas Gerais].

FELETOU, M. & VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 93: 515-24, 1988.

FERRARIO, C.M.; SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; BLOCK, C.H.; SCHIAVONE, M.T.; KHOSLA, M.C.; GREENE, L.J. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clinical and Exp. Hypertens.**, A 10 (Suppl. 1): 107-21, 1988.

FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.J.; JAISWAL, N.; KHOSLA, M.C.; MILSTED, A.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension**, 18 (suppl. 3): 126-33, 1991.

FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C.; TALLANT, A.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D. Counterregulatory actions of Ang-(1-7). **Hypertension**, 30 (suppl 2): 535-41, 1997.

FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. **Br. J. Pharmacol.**, 30: 417-24, 1967.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, 240: 200-3, 1972.

FORTES, Z.B.; LEME, J.G.; SCIVOLETTO, R. Influence of diabetes on the reactivity of mesentery microvessels to histamine, bradykinin and acetylcholine. **Br. J. Pharmacol.**, 79: 39-48, 1983.

FORTES, Z.B.; OLIVEIRA, M.A.; SCIVOLETTO, R.; CARVALHO, M.H.C.; DE NUCCI, G.; NIGRO, D. Nitric oxide release may be involved in microcirculatory response to acetylcholine. **Eur. J. Pharmacol.**, 182: 143-7, 1990.

FREEMAN, E.J.; CHISOLM, G.M.; FERRARIO, C.M.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. **Hypertension**, 28: 104-8, 1996.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle acetylcholine. **Nature**, 288: 373-6, 1980.

FURCHGOTT, R.F. & VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **Faseb J.**, 3: 2007-18, 1989.

- GOREN, R.W. & BOHLEN, H.G. Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi. **Am. J. Physiol.**, 233: H685-93, 1977.
- HALL, E.R.; KATO, J.; ERDÖS, E.G.; ROBINSON, C.J.G.; OSHIMA, G. Angiotensin I-converting enzyme in the nephron. **Life Sci.**, 18: 1299-303, 1976.
- HECKER, M.; BLAUKAT, A.; BARA, A.T.; MÜLLER-ESTERL, W.; BUSSE, R. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced vasoconstriction. **Br. J. Pharmacol.**, 1475-81, 1997.
- HELMER, O.M. Differentiation between two forms of angiotensin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, 188: 571-7, 1957.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and release from artery and veins is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84: 9265-69, 1987.
- ITOH, H.; MUKOYAMA, M.; PRATT, R.E.; GIBBONS, G.H.; DZAU, V.J. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.**, 91: 2268-74, 1993.
- JACKSON, E.; BRANCH, R.; OATES, J. Participation of prostaglandins in the control of renin release. In: OATES, J.A. (Ed.). Prostaglandins and cardiovascular system. New York: Raven Press, 1982. p. 255-76.

JACKSON, E.K. & GARRISON, J.C. Renin and angiotensin. In: MOLINOFF, P.B.; RUDOON, GOODMAN & GILMAN'S The pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 733-58.

KALEY, G. & KOLLER, A. Prostaglandin-nitric oxide interactions in the microcirculation. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.**, 23: 485-90, 1995.

KHOSLA, M.C.; SMEBY, R.R.; BUMPUS, F.M. Structure-activity relationship in angiotensin II analogues. In; PAGE, I.H.; BUMPUS, F.M. (Eds.). Handbook pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, 1974. V. 37, p. 126-61.

KITAMURA, N.; KITAGAWA, H.; FUKUSHIMA, D.; TAKAGAKI, Y; MYIATA, T.; NAKANISHI, S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. **J. Biol. Chem.**, 260: 8610-17, 1986.

KOHARA, K.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7) in the spontaneously hipertensive rat. **Peptides**, 14: 883-91, 1993.

KOIDA, M. & WALTER, R. Prost-proline cleaving enzyme. **J. Biol. Chem.**, 251: 7593-9, 1976.

KONO, T.; TANIGUCHI, H.; IMURA, H.; OSEKO, F.; KHOSLA, M.C. Biological activities of angiotensin II-(1-6) hexapeptide and angiotensin II-(1-7) heptapeptide in man. **Life Sci.**, 38: 1515, 1986.

KRONEBERG, G. & STOEPEL, K. Untersuchungen über die kreislaufwirkung von kallikrein (Padutin), kallidin und bradykinin. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, 245: 284-5, 1963.

KUMAGAI, H.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M.; FOUAD-TARAZI, F.M. Biological activity of angiotensin-(1-7) heptapeptide in the hamster heart. **Hypertension**, 15: 1-29 - 33, 1990.

KUMAMOTO, K.; STEWART, T.A.; JOHNSON, A.R.; ERDOS, E.G. Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) in human lung and cultured cells. **J.Clin. Invest.**, 67: 210-15, 1981.

LI, P.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M.; BROSNIHAN, K.B. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE releasing nitric oxide. **Hypertension**, 29 (pt. 2): 394-400, 1997.

LIMA, C.V.; PAULA, R.D.; RESENDE, F.L.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, 30(pt. 2): 542-8, 1997.

LINAS, S.L. Role of prostaglandins in renin secretion in the isolated kidney. **Am. J. Physiol.**, 246: F811-8, 1984.

MAJNO, E.; SHEA, S.M.; LEVENTHAL, M. Endothelial contraction induced by histamine type mediators: an electron microscopic study. **J. Cell. Biol.**, 42: 647-72, 1969.

MARGOLIUS, H.S. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hypertension**, 26: 221-9, 1995.

MENG, W. & BUSIJA, D.W. Comparative effects of angiotensin-(1-7) and angiotensin II on piglet pial arterioles. **Stroke**, 24: 2041-5, 1993.

MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMAYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269: 21583-7, 1994.

MINSHALL, R.D.; NAKAMURA, F.; BECKER, R.P.; RABITO, S.F. Characterization of bradykinin B₂ receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. **Circ. Res.**, 76: 773-80, 1995.

MIURA, H.; LIU, YANPING; GUTTERMAN, D.D. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization. **Circulation**, 99: 3132-38, 1999.

MONCADA, S. & VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, 30: 293-331, 1979.

MORIGUCHI, A.; BROSNIHAN, K.B.; KUMAGAI, H.; GANTEM, D.; FERRARIO, C.M. Mechanisms of hypertension in transgenic rats expressing the mouse Ren-2 gene. **Am. J. Physiol.**, 266: R1273-8, 1994.

MOUW, D.; BONJOUR, J.P.; MALVIN, R.L.; VANDER, A.J. Central action of angiotensin in stimulating ADH release. **Am. J. Physiol.**, 220: 239-42, 1971.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R.E.; DZAU, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. **J. Biol.Chem.**, 268: 24539-42, 1993.

MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R.W.; GRIENDLING, K.K.; RUNGE, M.S.; BERNSTEIN, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, 351: 233-6, 1991.

MUTHALIF, M.M.; BENTER, I.F.; UDDIN, M.R.; HARPER, H.L.; MALIK, K.U. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 284: 388-98, 1998.

NAKAGAWA, M. & NASJLETTI, A. Plasma kinin levels in experimental hypertension in rats. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 247: 115-9, 1989.

NAKANISHI, S. Substance P precursor and Kininogen: their structures, gene organizations and regulation. **Physiol. Rev.**, 67: 1117-41, 1987.

NEEDLEMAN, P.; DENNY, S.E.; ISAKSON, P.C.; MARSHALL, G.R. The mechanism and modification of bradykinin-induced coronary vasodilation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 72: 2060-3, 1975.

NEVES, L.A.A., Almeida, A.P.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, 50: 1451-9, 1995.

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

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 336: 664-6, 1988.

PAULA, R.D.; LIMA, C.V.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension**, 26 (pt. 2): 1154-9, 1995.

PÖRSTI, 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. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 652-4, 1994.

PUEYO, M.E.; ARNAL, J.F.; RAMIS, J.; MICHEL, J.B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, 274 (pt 1): C214-20, 1998.

RAPOPORT, R.M. & MURAD, F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Cir. Res.**, 52: 352-7, 1983.

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

REIS, J.W.; DAY, A.R.; ROCHA E SILVA, M. Comparative pharmacological actions of bradykinin and related kinins of larger molecular weights. **Biochem. Pharmacol.**, 20: 2935-46, 1971.

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

RYAN, J.W.; RYAN, U.S.; SCHULTZ, D.R.; WHITAKER, C.; CHUNG, A.; DORER, F.E. Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). **Biochem. J.**, 146: 497-9, 1975.

RYAN, J.W.; DAY, A.R.; SCHULTZ, D.R.; RYAN, U.S.; CHUNG, A.; MARLBOROUGH, D.I.; DORER, F.E. Localization of angiotensin-converting enzyme (kininase II). Preparation of antibody-hemeoctapeptide conjugates. **Tissue Cell**, 8: 111-24, 1976.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.L.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, 11: 153-7, 1988.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; JACOBSEN, D.W.; DICORLETO, P.E.; FERRARIO, C.M. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. **Hypertension**, 19 (suppl. 2): II-56-61, 1992.

SANTOS, R.A.S. & CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27: 1033-47, 1994.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BARACHO, N.C.V.; FONTES, M.A.P.; SILVA, L.C.S.; NEVES, L.A.A.; OLIVEIRA, D.R.; CALIGIORNE, S.M.; RODRIGUES, A.R.V., GROPEL, C.JR.; CARVALHO, W.S.; SILVA, ASCE; KHOSLA, M.C. Characterization of a

new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res. Bull.**, 35: 293-8, 1994.

SANTOS, C.M.; PONTIERI, V.; LEOMIL-NETO, M.; MICHELINI, L.C. Losartan improves baroreflex control of heart rate in coarcted hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, 269: H812-8, 1995.

SASAKI, K.; YAMANO, Y.; BARDHAN, S.; IWAI, N.; MURRAY, J.; HASEGAWA, M.; MATSUDA, Y.; INAGAMI, T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. **Nature**, 351: 230-3, 1991.

SCHNECK, K.A.; HESS, J.F.; STONESIFER, G.Y.; RANSOM, R.W. Bradykinin B₁ receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture. **Eur. J. Pharmacol.**, 266: 277-82, 1994.

SCHÖLKENS, B.A. Kinins in the cardiovascular system. **Immunopharmacology**, 33: 209-16, 1996.

SCHRÖR, K. Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 20 (Suppl. 9): S68-73, 1992.

SCHULZ, W.W.; HAGLER, H.K.; BUJA, L.M.; ERDÖS, E.G. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral

metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. **Lab. Invest.**, 59: 789-97, 1988.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J.R.; SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J. Exper. Med.**, 103: 295-9, 1956.

SKIDGEL, R.A. & ERDÖS, E.G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82: 1025-29, 1985.

SKIDGEL, R.A. & ERDÖS, E.G. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. **Clin. Exp. Hypertens.**, A9: 243-59, 1987.

SKIDGEL, R.A.; SCHULZ, W.W.; TAM, L.T.; ERDÖS, E.G. Human renal angiotensin I converting enzyme and its "helper enzyme". **Kidney Int.**, 31 (suppl. 20): 45-8, 1987.

SOUBRIER, F.; ALHENG-GELAS, F.; HUBERT, C.; ALLEGRI, J.; JOHN, M.; TREGGAR, G.; CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85: 9386-90, 1988.

STASZEWSKA-BARCZAK, J. & VANE, J.R. The release of catecholamines from the adrenal medulla by peptides. **Br. J. Pharmacol.**, 30: 655-67, 1967.

TALLANT, E.A.; JAISWAL, N.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Human astrocytes contain two distinct angiotensin receptor subtypes. **Hypertension**, 18: 32-9, 1991.

VANDONGEN, R.; STRANG, K.D.; POESSE, M.H.; BIRKENHAGER, W.H. Suppression of renin secretion in the rat kidney by a nonvascular α -adrenergic mechanism. **Cir. Res.**, 45: 435-9, 1979.

VANHOUTTE, P.M. & LÜSCHER, T.F. Peripheral mechanism in cardiovascular regulation transmitters, receptor and endothelium. In: TARAZI, R.C.; ZANCHETTI, A. Handbook of hypertension: physiology and pathophysiology of hypertension. Amsterdam: Elsevier. 1986. v. 8, p. 93-123.

WEBSTER, M.E. & GILMORE, J.P. Influence of kallidin-10 on renal function. **Am. J. Physiol.**, 206: 714-18, 1964.

WELCHES, W.R.; SANTOS, R.A.S.; CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C. M. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. **J. Hypertens.**, 9: 631-8, 1991.

WHITEBREAD, S.; MELE, M.; KAMBER, B.; GASPARO, M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 163: 284-91, 1989.

WHORTON, A.R.; YOUNG, S.L.; DATA, J.L.; BARCHOWSKY, A.; KENT, R.S. Mechanism of bradykinin-stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Acta.**, 712: 79-87, 1982.

YANG, H.Y.T.; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxipeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochem. Biophys. Acta**, 214: 374-6, 1970 a.

YANG, H.Y.T.; JENSSEN, T.A.; ERDÖS, E.G. Conversion of angiotensin I by a kinase preparation. **Clin. Res.**, 18: 88, 1970 b.

ZWEIFACH, B.W. Indirect methods for regional blood flow. Microscopic observation of circulation in rat mesoappendix and dog omentum. Use in study of vasotropic substances. **Meth. Med. Rev.**, 1: 131-8, 1948.

Abstract

The interaction between angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] and bradykinin (BK) was determined in the mesentery of anesthetized Wistar rats using intravital microscopy. The response-induced by topical application of BK (1, 10 and 30 pmol), Ang-(1-7) (1, 10, 100 and 1000 pmol) and Ang-(1-7) (100 pmol) + BK (1 pmol) was determined in mesenteric arterioles (15-20 μ m diameter). The BK (1 pmol)- and Ang-(1-7) (100 pmol)- induced vasodilation was abolished by BK B₂ receptor antagonist HOE-140 (100 pmol applied during 60 seconds) and the Ang-(1-7) antagonist [d-Ala⁷]-Ang-(1-7)] (A-779) (100 pmol applied during 15 seconds), respectively. Indomethacin (5 mg/kg; IM, 30 min before), a cyclooxygenase inhibitor; L-NAME (10 nmol; topical application, 3 min before), a NO synthase inhibitor, decreased the Ang-(1-7)-induced vasodilation. However, TEA (90 pmol; topical application), a non specific K⁺ channels blocker, did not alter the response to BK or Ang-(1-7). BK (1 pmol)-induced vasodilation, however, was potentiated by Ang-(1-7) 100 pmol. Sodium nitroprusside (38 pmol), acetylcholine (1,6 nmol), histamine (5,4 nmol) and arachdonic acid (10 nmol) responses were not modified by Ang-(1-7) 100 pmol. The Ang-(1-7)-potentiating effect on BK-induced vasodilation was abolished by A-779, HOE-140, indomethacin, L-NAME and TEA. Losartan (15 mg/kg.IV, 40 min before), an AT₁ angiotensin receptor antagonist was without effect. On the other hand, enalaprilat treatment (10 mg/kg; IV, 30 min before), to inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE), enhanced the BK and Ang-(1-7)-induced vasodilation but did not modify the effect of Ang-(1-7) on BK

vasodilation. In conclusion, the potentiation of BK-induced vasodilation by Ang-(1-7) is a receptor-mediated phenomenon dependent on cyclooxygenase-related products, NO release and K^+ channel-mediated membrane hyperpolarization. The potentiating mechanism, apparently, is not related to ACE catalytic activity.