

**Graziela Scialanti Ceravolo**

**INTERAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E  
CALICREÍNA-CININAS EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL:  
ESTUDO DA INDUÇÃO DE RECEPTORES B1 DE CININAS NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR**

**São Paulo  
2008**

**Graziela Scaliati Ceravolo**

**INTERAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E  
CALICREÍNA-CININAS EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL:  
ESTUDO DA INDUÇÃO DE RECEPTORES B1 DE CININAS NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências.**

**Área de concentração: Farmacologia**

**São Paulo  
2008**

**Graziela Scaliati Ceravolo**

**INTERAÇÃO DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E  
CALICREÍNA-CININAS EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL:  
ESTUDO DA INDUÇÃO DE RECEPTORES B1 DE CININAS NO  
SISTEMA CARDIOVASCULAR**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências**

**Área de concentração: Farmacologia**

**Orientadora: Dra Maria Helena Catelli de  
Carvalho**

**São Paulo**

**2008**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Luiza e Domingos, que com carinho e amor, fizeram com que a distância entre nós fosse menos dolorosa. Obrigada pelo incentivo, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos Flávio e Michelle, meus grandes amigos, pelo amor e por compartilharem comigo todos os momentos de alegria e de dificuldade!*

*Ao David, por acreditar sempre que tudo vai dar certo, pela motivação, dedicação e amor.*

*Agradecimento especial...*

*À Dra Maria Helena Catelli de Carvalho por todas as oportunidades, pela confiança na minha capacidade, pela orientação, estímulo e críticas que muito contribuíram e continuarão contribuindo para minha formação científica. A você, deixo aqui minha admiração e gratidão!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus meu amigo fiel que em todos os momentos me acompanha e dá forças para superar os obstáculos.

À Dra Liliam Fernandes (Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema) inicialmente pelas idéias que deram origem a este trabalho e mais importante, pela grande amizade, a você minha amiga meu muito obrigada.

Às professoras do grupo de Diabetes e Hipertensão: Dra Zuleica Bruno Fortes e Rita C. A. Tostes Passaglia pelo apoio e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Dr Cristóforo Scavone, à Dra Carolina D. Munhoz e à Larissa de Sá Lima (Departamento de Farmacologia, ICB-USP), pela valorosa colaboração no ensaio de atividade do NF- $\kappa$ B.

Ao Dr Francisco R. Laurindo e a Dra Denise C. Fernandes (Laboratório de Biologia Vascular, InCor) pela avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio.

Ao Dr Renato Paulo Chopard e a Ms Maria Tereza (Departamento de Anatomia, ICB-USP) pela grande atenção e ajuda na realização e discussão da morfometria da aorta.

À Dra Lucia R. Lopes (Departamento de Farmacologia, ICB-USP) pelas conversas e discussões científicas que enriqueceram este trabalho.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, ICB-USP, Selma Regina M. Rigonati e à Julieta A. dos Santos pela amizade e ajuda nos assuntos burocráticos.

Às minhas grandes amigas Eliana (Eli) pela realização da expressão das MAPKs e mais importante por todo o apoio nos momentos difíceis, à Maria Aparecida (Cidora) por sempre ter um ombro amigo e estar pronta para ajudar e à Andréia (Dedé) pelos cafés filosóficos! Sem vocês as coisas não seriam tão divertidas...

As queridas amigas Simone (Marcieli) e Núbia (Lobatinha) por todas as ajudas nos experimentos, pelas discussões científicas e também por tornarem a convivência no laboratório muito divertida e porque não dizer, inusitada! A vocês muito obrigada!

Aos queridos amigos do laboratório de Hipertensão Maria do Carmo (Maduka, maluca), Stephen, Luciana, André, Eveline, Beatriz, Juliana, Rossana, Thiago, Fernanda pelos ótimos momentos de descontração e em especial ao Fernando (Fernandinho) pelo apoio na finalização da tese.

Ao amigo Rodrigo pela ajuda nos PCRs e por todos os divertidos e agradáveis momentos de convivência.

À amiga Maria do Carmo (Maduka) pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Às amigas Ana Alice e Maria Alicia pelos momentos de descontração e discussões científicas e não científicas.

Aos amigos Manuel Santos da Rocha (Manécas), Ana Rita A. Gonçalves (Ritinha), Alice A. Gonçalves, Antonio Garcia e em especial à Sonia Rodrigues Leite (Bazinha), Marta Rodrigues da Silva (Martinha) pela ajuda nos experimentos e pela amizade e à Dra Rosangela A. S. Eichelner (Rosa) pela ajuda nos PCRs.

Aos amigos do laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá: Dr Roberto K. N. Cuman, Dra Silvana Caparroz-Assef, Dra Ciomar Bersani-Amado, Jailson A. Dantas pelos ensinamentos fundamentais que precederam à pós-graduação e que me fizeram decidir por esta carreira em que me enveredo.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB-USP pelas correções e apoio na finalização da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.



## RESUMO

CERAVOLO, G.S. **Interação dos Sistemas Renina-Angiotensina e Calicreína-Cininas em modelo de hipertensão arterial**: estudo da indução de receptores B1 de cininas no sistema cardiovascular. 2008. 114 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os objetivos deste trabalho foram investigar os efeitos da angiotensina II (Ang II) sobre a expressão de receptor B1 de cininas na aorta de ratos Wistar e caracterizar os mecanismos envolvidos na indução deste receptor, avaliando a participação das espécies reativas de oxigênio e NF- $\kappa$ B. Avaliamos também o papel funcional do receptor B1 sobre a reatividade de anéis de aorta isolados, sobre a geração de óxido nítrico e os efeitos do antagonismo *in vivo* deste receptor sobre as alterações de pressão arterial, função endotelial, morfometria da aorta causadas pela Ang II e também sobre a expressão de MAPKs e interleucinas. Para indução da hipertensão, a Ang II foi infundida em ratos Wistar, com 10 semanas de idade por uma mini-bomba de infusão osmótica preenchida com Ang II (400ng/Kg/dia – 14 dias) e implantada no tecido subcutâneo dos ratos (grupo ANG II). Foi utilizado como controle deste modelo ratos da mesma linhagem e idade, que receberam implante de mini-bomba osmótica preenchida com solução salina 0.9% (Controle). Um grupo de ratos recebeu simultaneamente por quatorze dias infusão de ANG II (400ng/Kg/min) ou de solução salina 0,9% e tratamento com apocinina, inibidor da NAD(P)H oxidase, na água de beber (60mg/L). Outro grupo recebeu simultaneamente por quatorze dias infusão de ANG II (400ng/Kg/min) e antagonista de receptor B1, des-Arg9-Leu8-bradicinina (350ng/Kg/min). A infusão de Ang II tornou ratos Wistar hipertensos. Na aorta de ratos ANG II observamos: indução de expressão de receptor B1, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e da atividade do NF- $\kappa$ B em relação ao grupo Controle e o tratamento com apocinina reduziu todos estes parâmetros no grupo ANG II. Observamos também que a ativação de receptor B1 na aorta, pelo agonista des-Arg9-Bk, causa vasodilatação dependente de endotélio e de geração de óxido nítrico. Os ratos ANG II também apresentaram na aorta hipertrofia, aumento de atividade da ERK1/2, aumento da expressão de interleucinas pró-inflamatórias e disfunção endotelial, caracterizada por menor resposta vascular à acetilcolina. O antagonismo de

receptor B1 *in vivo* não teve efeito sobre a pressão arterial e a função endotelial da aorta nos ratos ANG II, mas reduziu a hipertrofia, a geração de espécie reativas de oxigênio, a maior fosforilação de ERK1/2 e a expressão de interleucinas. Sendo assim, podemos concluir que a Ang II pode induzir a expressão de receptor B1, na aorta de ratos, por via pró-oxidativa que envolve a ativação do NF-kB. A ativação do receptor B1 na aorta apesar de gerar de óxido nítrico, pode contribuir para alguns efeitos lesivos da Ang II, como a indução de hipertrofia neste vaso, mas não tem efeito sobre a disfunção endotelial e hipertensão causada pela Ang II. Estes resultados fornecem esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na modulação do receptor B1 e também sobre a funcionalidade deste receptor na vasculatura, mostrando também que as interações entre os Sistemas Calicreínas-Cininas e Renina-Angiotensina vão além de efeitos antagônicos, uma vez que componentes destes sistemas podem atuar sinergicamente no desenvolvimento da inflamação e hipertrofia vascular.

**Palavras-Chave:** Angiotensina II. Sistema Renina-Angiotensina. Hipertensão. Receptor B1 de cinina.

## ABSTRACT

CERAVOLO, G.S. **Renin-Angiotensin and Kallikrein-Kinin Systems interaction:** study of B1 receptor induction by angiotensin II in the cardiovascular system. 2008.114 f. PhD thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

We investigated whether angiotensin II (Ang II) infusion modulates *in vivo* the kinin B1 receptor expression and the mechanisms involved in this process. We also evaluated the role of the B1 receptor activation in aorta and the role of B1 receptor antagonism *in vivo* upon superoxide anion generation, ERK1/2 activity, interleukins expression and aorta hypertrophy. Wistar rats received 400 ng/kg/min of Ang II (ANG II rats) or saline (control rats) infusion during 14 days through an osmotic minipump. Other group of rats received a NADPH oxidase inhibitor in the drinking water (60 mg/L of apocynin) or B1 receptor antagonist (DAL 350ng/Kg/min) both during 14 days simultaneously with Ang II infusion. We Ang II-induced hypertension was not affected by treatments with apocynin or B1 receptor antagonism. The aorta of hypertensive rats presented: B1 receptor expression, increased superoxide anion and NF-kB activity and apocynin treatment reduced those parameters. The B1 receptor agonist promoted endothelium-dependent dilation and increased the NO generation in aorta of ANG II rats. The aorta of ANG II rats also presented hypertrophy, increased ERK1/2 activity and interleukins expression and the B1 receptor antagonism reduced all those parameters. These results provide evidence that Ang II induces B1 receptor expression in aorta by superoxide anion generation and NF-kB activation and that B1 receptor could participate in Ang II induced vascular hypertrophy contributing to superoxide anion generation, MAPKs activation and interleukins generation.

**Key Words:** Angiotensin II. Renin-Angiotensin System. Hypertension. Kinin B1 receptor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Esquema do Sistema Calicreína-Cininas .....                                                                                                                                                                                                                                 | 22 |
| <b>Figura 2:</b> Esquema do Sistema Renina-Angiotensina.....                                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| <b>Figura 3:</b> Oxidação da DHE por diferentes EROs e seus produtos: etídeo (E) e 2-hidróxietideo (EOH).....                                                                                                                                                                                | 38 |
| <b>Figura 4:</b> Evolução temporal da pressão arterial caudal (mmHg) de ratos ANG II, Controle, ANG II + Apocinina e Controle + Apocinina nos tempos zero, sete e treze dias após implante da mini-bomba de infusão .....                                                                    | 50 |
| <b>Figura 5:</b> Expressão de RNAm de receptor B1 realizada com a técnica de PCR em Tempo real na aorta de ratos ANG II, Controle e ANGII tratados com apocinina (ANG II+APO) .....                                                                                                          | 53 |
| <b>Figura 6:</b> Localização e expressão de receptor B1 em aorta de ratos.....                                                                                                                                                                                                               | 55 |
| <b>Figura 7:</b> Localização de espécie reativas de oxigênio em aorta de ratos... ..                                                                                                                                                                                                         | 57 |
| <b>Figura 8:</b> Efeitos da infusão de Ang II e tratamento com Apocinina na ativação do NF- $\kappa$ B em aorta de ratos.....                                                                                                                                                                | 59 |
| <b>Figura 9:</b> Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta, com (E+) e sem (E-) endotélio, isolados de ratos.....                                                                                                                                | 61 |
| <b>Figura 10:</b> Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II incubados ou não com 10 $\mu$ M HOE 140 (ANG II+HOE 140) ou com 10 $\mu$ M DAL (ANG II+DAL) e pré-contraídos com FE (0.1 $\mu$ M).....       | 62 |
| <b>Figura 11:</b> Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II incubados ou não com 5 $\mu$ M Indometacina (ANG II+IND) ou com 10 $\mu$ M L-NAME (ANG II+L-NAME) e pré-contraídos com FE (0.1 $\mu$ M)..... | 63 |
| <b>Figura 12:</b> Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, pré-contraídos com                                                                                                                          |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FE (0.1 $\mu$ M) e anéis de aorta isolados de ratos ANG II e ratos ANG II+Apocinina (ANG II+APO).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 64 |
| <b>Figura 13:</b> Imagens representativas da produção de óxido nítrico basal e após estímulo com: DABK, DABK após incubação com L-NAME e DABK após incubação com DAL em cortes de aorta de rato.....                                                                                                                                                                                                                  | 66 |
| <b>Figura 14:</b> Evolução temporal da pressão arterial caudal (mmHg) de ratos ANG II, Controle e DAL nos tempos zero, sete e treze dias após implante da mini-bomba de infusão.....                                                                                                                                                                                                                                  | 67 |
| <b>Figura 15:</b> Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio em cortes de aorta congelados de ratos ANG II, Controle e DAL.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 68 |
| <b>Figura 16:</b> Morfometria de aorta de ratos Controle, ANG II e DAL.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 70 |
| <b>Figura 17:</b> Imagens representativas dos cortes histológicos de aorta de ratos Controle, ANG II e DAL coradas com hematoxilina-eosina, obtidas com objetiva com aumento de 20X.....                                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| <b>Figura 18:</b> <i>Immunoblotting</i> para (A) ERK 1/2 total e (B) ERK1/2 fosforilada em aorta de ratos ANG II, ratos DAL e Controle.....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 73 |
| <b>Figura 19:</b> Expressão gênica de IL-1 $\beta$ (A) e IL-6 (B) na aorta dos ratos ANG II, Controle e DAL realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 74 |
| <b>Figura 20:</b> A) Curva concentração-efeito à Acetilcolina obtidas em anéis de aorta com endotélio isolados de ratos Controle, ANG II e DAL. B) Resposta máxima para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de ratos Controle, ANG II e DAL.....                                                                                                                                                    | 75 |
| <b>Figura 21:</b> Expressão de RNAm de receptor B2 realizada com a técnica de PCR em Tempo real na aorta de ratos ANG II, Controle e DAL. Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizadas pela expressão de RNAm de $\beta$ -actina. As barras representam as médias $\pm$ epm da densidade óptica relativa de cinco aortas/grupo * <i>P</i> <0,05 em relação ao Controle..... | 76 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Efeitos da infusão de Ang II sobre peso corpóreo, consumo de líquidos e ração de ratos Wistar .....52
- Tabela 2:** Resposta máxima (%) à DABK, agonista de receptor B1, em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, incubados ou não com antagonista de receptor B2, HOE-140 ou antagonista de receptor B1, DAL .....62
- Tabela 3:** Resposta máxima (%) ao agonista de receptor B1, DABK, em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, incubados ou não com Indometacina ou L-NAME.....63
- Tabela 4:** Resposta máxima (%) à DABK em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II e ratos ANG II+Apocinina .....64

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ae - Área externa

Ai - Área interna

Ang 1-7 - Angiotensina (1-7)

Ang II - Angiotensina II

Ang IV - Angiotensina (3-8)

AST - Área de Secção Transversal

Bk - Bradicinina

CCE - Curvas concentração-efeito

DAB - Diaminobenzidina

DABK - des-Arg<sup>9</sup>-Bradicinina

DAF-2 - 3,4-diaminofluoresceína

De - Diâmetro externo

DHE - Dihidroetidina

Di - Diâmetro interno

E - Etídeo

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EHO - 2-hidróxi etídeo

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FE - Fenilefrina

iECA - Inibidor da enzima conversora de Angiotensina

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

iNOS – Enzima óxido nítrico sintase induzível

Lis-Bk - Calidina

MAP quinase - *Mitogen-activated protein*

MLV - Músculo liso vascular

NAD(P)H - *Nicotine adenine dinucleotide phosphate*

NEP – Prolil-endopeptidases neutras

NF- $\kappa$ B - Fator de transcrição *kappa B*

NO - Óxido nítrico

NOS - Enzima óxido nítrico sintase

PB - Tampão fosfato

PB/DTPA – Tampão fosfato e ácido dietilenotriaminopentacético

PCR - Reação de polimerase em cadeia

PFA - Paraformaldeído 4%

PGI<sub>2</sub> - Prostaciclina

PKC - Proteína kinase C

PLC - Enzima fosfolipase C

RT - Transcriptase reversa

SCC – Sistema Calicreína-Cininas

SRA - Sistema-Renina Angiotensina



## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                                | <b>21</b> |
| <b>1.1 Sistema Caliceína-Cininas</b> .....                                                                                                               | <b>21</b> |
| <b>1.2 Sistema Renina-Angiotensina, espécies reativas de oxigênio e inflamação vascular</b> .....                                                        | <b>25</b> |
| <b>1.3 Interações dos SRA E SCC</b> .....                                                                                                                | <b>28</b> |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....                                                                                                                                 | <b>31</b> |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                                                       | <b>32</b> |
| <b>3.1 Grupos experimentais</b> .....                                                                                                                    | <b>32</b> |
| <b>3.2 Indução de hipertensão arterial em ratos por infusão de Ang II</b> .....                                                                          | <b>32</b> |
| <b>3.3 Pressão arterial caudal</b> .....                                                                                                                 | <b>33</b> |
| <b>3.4 Tratamento com apocinina</b> .....                                                                                                                | <b>33</b> |
| <b>3.5 Determinação do peso corpóreo e consumo de líquidos</b> .....                                                                                     | <b>34</b> |
| <b>3.6 Determinação da expressão de RNAm de receptores B1 e B2 e interleucinas 1<math>\beta</math> e 6 na aorta de ratos por PCR em tempo real</b> ..... | <b>35</b> |
| <b>3.7 Determinação da expressão protéica de receptores B1 de cininas na aorta de ratos por imunohistoquímica</b> .....                                  | <b>36</b> |
| <b>3.8 Determinação da produção de EROs na aorta</b> .....                                                                                               | <b>37</b> |
| <b>3.9 Determinação da translocação nuclear do NF-<math>\kappa</math>B</b> .....                                                                         | <b>40</b> |
| <b>3.10 Determinação da atividade funcional de receptores B1 na aorta de ratos</b> .....                                                                 | <b>41</b> |
| <b>3.11 Estudo efeito do antagonismo de receptor B1</b> .....                                                                                            | <b>43</b> |
| <b>3.12 Análises estatísticas</b> .....                                                                                                                  | <b>47</b> |
| <b>3.13 Soluções, reagentes, drogas e anticorpos</b> .....                                                                                               | <b>47</b> |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                | <b>50</b> |
| <b>4.1 Pressão arterial caudal</b> .....                                                                                                                 | <b>50</b> |
| <b>4.2 Avaliação do peso corpóreo de ratos</b> .....                                                                                                     | <b>51</b> |
| <b>4.3 Avaliação do consumo de líquidos e ração</b> .....                                                                                                | <b>51</b> |
| <b>4.4 Expressão de RNAm de receptores B1 na aorta de ratos</b> .....                                                                                    | <b>53</b> |

|             |                                                                                                           |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.5</b>  | <b>Localização e quantificação da expressão protéica de receptor B1 de cininas em aorta de rato .....</b> | <b>54</b>  |
| <b>4.6</b>  | <b>Determinação da geração de EROs na aorta de ratos .....</b>                                            | <b>55</b>  |
| <b>4.7</b>  | <b>Ativação do NF-κB em aorta de ratos .....</b>                                                          | <b>58</b>  |
| <b>4.8</b>  | <b>Reatividade de anéis de aorta isolados de ratos Wistar para DABK:estudo in vitro .....</b>             | <b>60</b>  |
| <b>4.9</b>  | <b>Estudo da produção de óxido nítrico (NO) em cortes histológicos de aorta de ratos .....</b>            | <b>65</b>  |
| <b>4.10</b> | <b>Efeito do antagonismo de receptor B1 in vivo em ratos ANG II.....</b>                                  | <b>67</b>  |
| <b>5</b>    | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                    | <b>77</b>  |
| <b>6</b>    | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                   | <b>89</b>  |
|             | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                   | <b>90</b>  |
|             | <b>ANEXOS .....</b>                                                                                       | <b>104</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema Calicreína-Cininas

O Sistema Calicreína-Cininas (SCC) é um importante mediador de diversos processos fisiológicos e patológicos relacionados com o sistema cardiovascular. As diferentes ações deste sistema são produzidas pelas cininas endógenas formadas a partir da ação das calicreínas plasmáticas e teciduais sobre os cininogênios hepáticos de alto e baixo peso molecular.

A descoberta da bradicinina (BK), um dos peptídeos efetores deste sistema, foi descrita em 1949 por Rocha e Silva et al., quando estes autores observaram que uma substância liberada pelo veneno da *Bothrops jararaca* causava contração em preparações isoladas de íleo de cobaia. Devido à natureza lenta da contração esta substância foi nomeada de *bradykinin* que do Grego *kinin* indica movimento e o prefixo *brady* indica lento.

Os produtos das ações das calicreínas sobre os cininogênios hepáticos são as cininas: BK, calidina (Lis-Bk) e Met-Lis-Bk. Os efeitos biológicos exercidos por esses peptídeos duram poucos segundos, devido à sua rápida metabolização por enzimas denominadas cininases. A principal via de metabolização das cininas decorre da ação da Cininase II ou Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) pela remoção do dipeptídeo C-terminal, tornando-as inativas (ERDÖS, 1975). Além disso, tanto BK quanto Lis-BK podem ser metabolizadas por outras enzimas denominadas Cininases I (carboxipeptidase N e M), que retiram resíduos de arginina da posição nove destes peptídeos, originando os fragmentos bioativos des-Arg<sup>9</sup>-BK (DABK) e Lis-des-Arg<sup>9</sup>-BK. Estes peptídeos ativos têm sua meia-vida plasmática de quatro a doze vezes maior que a BK, mas também são inativados pela ECA (ERDÖS, 1990) (Fig. 1).

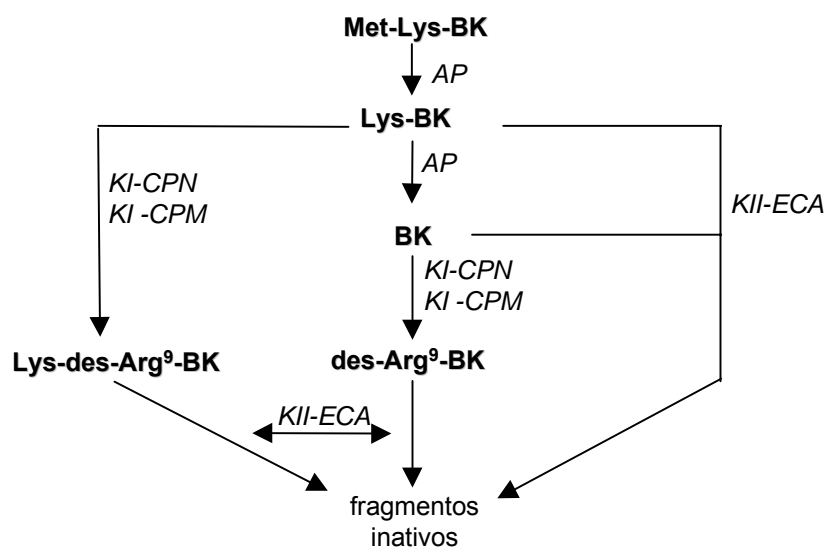


Figura 1 - Esquema do SCC.

*AP*: aminopeptidase

*KII-ECA*: cininase II, enzima conversora de angiotensina

*KI-CPN*: cininase I, carboxipeptidase N

*KI-CPM*: cininase I, carboxipeptidase M

As diferentes ações biológicas das cininas são mediadas por dois tipos de receptores classificados como B1 e B2, pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrânicos, com pesos moleculares distintos e com apenas 36% de homologia entre suas seqüências de aminoácidos. Esses receptores têm sido amplamente estudados e caracterizados de acordo com suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e moleculares (MARCEU et al., 1998).

Por meio de farmacologia clássica (REGOLI e BARABE, 1980), ensaios de "binding" em tecidos humanos (HESS et al., 1992; SCHNECK et al., 1994) e em preparações in vivo (BHOOLA et al., 1992; LINZ et al., 1995) foi demonstrado que os receptores B1 e B2 diferem significativamente no que se refere às respostas induzidas pelas diferentes cininas, sendo o receptor B2 ativado por BK e Lis-BK e o receptor B1 sensível aos peptídeos DABK e Lis-des-Arg<sup>9</sup>-BK (MARCEAU, 1998). Este perfil de afinidade pelas diferentes cininas deve-se com a presença de um resíduo de Lisina na posição 118 no terceiro domínio transmembrânico do receptor B1, que repele as cargas

positivas dos peptídeos com resíduos de Arginina na posição nove da porção C-terminal e por isso, torna o receptor B1 mais seletivo para a DABK e a Lis-des-Arg<sup>9</sup>-BK (MARCEAU, 1998).

Esses receptores diferem ainda quanto à expressão, pois enquanto os receptores B2 são expressos constitutivamente em diferentes tecidos incluindo endotélio vascular, músculo liso vascular e cardiomiócitos, os receptores B1 são geralmente ausentes ou pouco expressos em tecidos saudáveis, mas rapidamente induzidos em situações de injúria tecidual e inflamação (MARCEAU, 1998). Classicamente define-se que a indução de receptores B1 é regulada por uma série de citocinas presentes no processo inflamatório, mas vários estudos comprovaram a influência de outros fatores, como proteínas da família MAPK (“mitogen-activated protein”) (LARRIVÉ et al., 1998), o próprio agonista B1 e o fator de transcrição kappa B (NF-κB) (SCHANSTRA et al., 1998; NI et al., 1998).

Alguns autores sugerem que o receptor B2 possa estar relacionado à resposta inflamatória aguda, enquanto o receptor B1 estaria relacionado com processos inflamatórios crônicos ou prolongados (MCLEAN et al., 2000). Esta hipótese foi levantada, pois o receptor B2 é descrito por sua capacidade de internalização e dessensibilização após estímulo contínuo por seu agonista BK (SMITH et al., 1995; HAUSDORFF et al., 1989). Por outro lado, o receptor B1 uma vez induzido não sofre dessensibilização (LEVESQUE et al., 1995; HAUSDORFF et al., 1989). Essa diferença pode ser explicada por uma grande alça na porção C-terminal citoplasmática dos receptores B2 que contém resíduos de serina e tirosina que quando fosforilados induzem a dessensibilização do receptor B2 (FAUSSNER et al., 1998). Dessa forma, sugere-se que os receptores B1 sejam equipados para mediar o desenvolvimento e a progressão de processos inflamatórios crônicos.

A classificação de receptores B1 e B2 também envolve a diferenciação entre os segundos mensageiros gerados na resposta induzida pela ativação desses receptores por seus agonistas. Ambos os receptores B1 e B2 são descritos como receptores acoplados a proteína G e primariamente ligados à ativação da enzima fosfolipase C (PLC). Especificamente, a ativação do receptor B1 está relacionada com aumento de fosfatidilinositol e de cálcio intracelular na maioria dos sistemas (MARCEAU et al., 1998).

Em culturas de células de músculo liso vascular de aorta de coelho a ativação do receptor B1 pode levar a indução da síntese de DNA via PLC e diacilglicerol, que ativa proteína kinase C (PKC) (LEVESQUE et al., 1995). Também em aorta de coelho a contração provocada pelo agonista B1 leva a ativação de PKC e aumento de cálcio intracelular.

Em sistemas celulares que expressam os dois tipos de receptores a ativação de ambos leva ao aumento de cálcio intracelular, porém, a ativação do receptor B1 induz um aumento mais persistente de cálcio, ao passo que a resposta gerada pela ativação dos B2 é curta e taquifilática (BASCANDS et al., 1993). Estudos feitos em células transfectadas com os dois tipos de receptores mostram que a ativação da PLC pelo receptor B1 também é mais persistente quando comparada com a resposta do receptor B2. Esta maior intensidade de resposta poderia ser explicada pelo fato que os receptores B2 sofrem dessensibilização e internalização ao passo que o receptor B1 não é internalizado (AUSTIN et al., 1997).

A participação de receptores B2 no controle de funções cardiovasculares está bem documentada, e sua ativação resulta em hipotensão e proteção cardíaca, vasodilatação mediada por liberação de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (BHOOLA et al., 1992; BUSSE e FLEMING 1996; LINZ et al., 1995). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e manipulação de animais *knockout*, demonstrou-se que a deleção genética de receptores B2 em camundongos promove aumento de sensibilidade ao sal e aumento de pressão arterial (MADDEDU et al., 1997), além de remodelamento ventricular e prejuízos funcionais ao coração (EMANUELI et al., 1999).

A presença funcional de receptores B1 no coração foi demonstrada em circulação coronária de animais de experimentação (MCLEAN et al., 1999; DRUMMOND et al., 1995a; PRUNEAU et al., 1996) e humanos (DRUMMOND et al., 1995b), e sua estimulação promoveu relaxamento endotélio-dependente, geralmente pela liberação de NO (SU et al., 2000) e produção de GMPc (WOHLFART et al., 1997). Receptor B1 também pode ser induzido em fibras simpáticas do miocárdio (FOUCART et al., 1997). Além disso, receptor B1 pode ser induzido em cardiomiócitos e em tecidos cardíacos de condução (GOUIN et al., 1996; FERNANDES et al., 2006), e sabe-se que

sua estimulação pode prolongar a duração do potencial de ação cardíaco em ratos (GOUIN et al., 1996).

Assim como observado para receptor B2, a presença de receptor B1 em tecido cardíaco pode estar relacionada ao reparo tecidual (TSCHÖPE et al., 2000) e redução da área afetada após o infarto do miocárdio (LAGNEUX et al., 2003), de forma que sua ativação tem sido proposta como tratamento coadjuvante em situações de isquemia tecidual (EMANUELI et al., 2002).

Embora alguns autores tenham demonstrado o envolvimento de receptor B1 na patogênese da hipertensão em animais geneticamente hipertensos (EMANUELI et al., 2002; QADRI et al., 2002), a regulação da pressão arterial em condições fisiológicas parece independe deste receptor já que animais *knockout* para receptor B1 não apresentam alterações significativas dos valores pressóricos (PESQUERO et al., 2000).

## **1.2 Sistema Renina-Angiotensina, espécies reativas de oxigênio e inflamação vascular**

Os estudos sobre o Sistema-Renina Angiotensina (SRA) iniciaram-se por volta de 1898 com a descoberta da renina em extratos de rim (BASSO et al., 2001), a partir de então uma série de descobertas relacionadas com este sistema tem colaborado para entendimento e avanços na medicina do sistema cardiovascular como o desenvolvimento de drogas inibidoras desse sistema usadas na terapia antihipertensiva.

A formação dos peptídeos efetores do SRA acontece inicialmente pela ação da protease renina formada nas células justaglomerulares e liberada na circulação, que age sobre o angiotensinogênio hepático gerando a angiotensina I, que por sua vez é clivada pela ECA, formando a angiotensina II (Ang II) o principal peptídeo efetor deste sistema (Fig.2).

A ECA é uma metaloproteínasa expressa no plasma e em vários tecidos, como vasos sanguíneos. No endotélio vascular está ancorada às células endoteliais por domínio transmembrânico carboxi-terminal onde além de atuar sobre a Ang I para

originar Ang II, também inativa os peptídeos do SCC (TURNER et al., 2002). Em alguns tecidos do sistema cardiovascular a síntese de Ang II, por vias não dependentes da ECA, vêm sendo descrita. No coração e na aorta alguns autores descrevem a via das quimases como importante para a síntese de Ang II a partir de Ang I (URATA et al., 1990; VOORS et al., 1998), no leito vascular mesentérico e outros tecidos vasculares de ratos a enzima elastase-2 contribui para geração de Ang II (SANTOS et al., 2003, BECARI et al., 2005).

Ang II interage com pelo menos dois tipos de receptores acoplados a proteína G, classificados como AT1 e AT2. A maioria das ações fisiológicas da Ang II incluindo vasoconstrição, estimulação da secreção de aldosterona, retenção de sal e água e crescimento celular são mediados pelo receptor AT1, que é expresso na maioria das células incluindo as de vasos sanguíneos, coração, adrenal, rins e pulmões (SCHIFFRIN et al., 2002; SILVERSTEIN et al., 2004). O receptor AT2 parece ter efeitos opostos aos da ativação do AT1, como por exemplo, vasodilatação, inibição do crescimento celular, da diferenciação celular e de apoptose (WAGENAAR et al., 2002; SCHIFFRIN et al., 2002). Entretanto, apesar da expressão do receptor AT2 em tecidos embrionários ser bastante pronunciada, em tecidos adultos é reduzida quando comparada com a expressão de receptor AT1. Algumas patologias como doença coronária isquêmica, cardiomiopatia e fibrilação atrial parecem estar relacionadas com aumento da expressão de receptor AT2, que junto com o antagonismo do receptor AT1, pode ter efeito benéfico sobre essas patologias (FERRARIO et al., 2006).

Através de estudos recentes foram descritos outros peptídeos com atividade biológica no SRA como os fragmentos Angiotensina (1-7) (Ang 1-7), Angiotensina (3-8) (Ang IV). Dentre estes o mais estudado é a Ang 1-7 que pode ser formado pela ação da Prolil-endopeptidases neutras (NEP) que clivam a Ang I liberando a Ang 1-7 ou então por ação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA 2) que cliva a Ang II e libera a Ang 1-7, cujas as ações biológicas como vasodilatação, natriurese, diurese e efeito anti-trófico acontecem pela interação com receptor acoplado a proteína G chamado de *mas*. As ações da Ang 1-7 sobre o receptor *mas* envolvem a geração de NO e prostaciclina e por isso sugere-se que sua formação possa funcionar como efeito de feedback negativo sobre as ações da Ang II (FERRARIO et al., 2006; SANTOS et al., 2007).



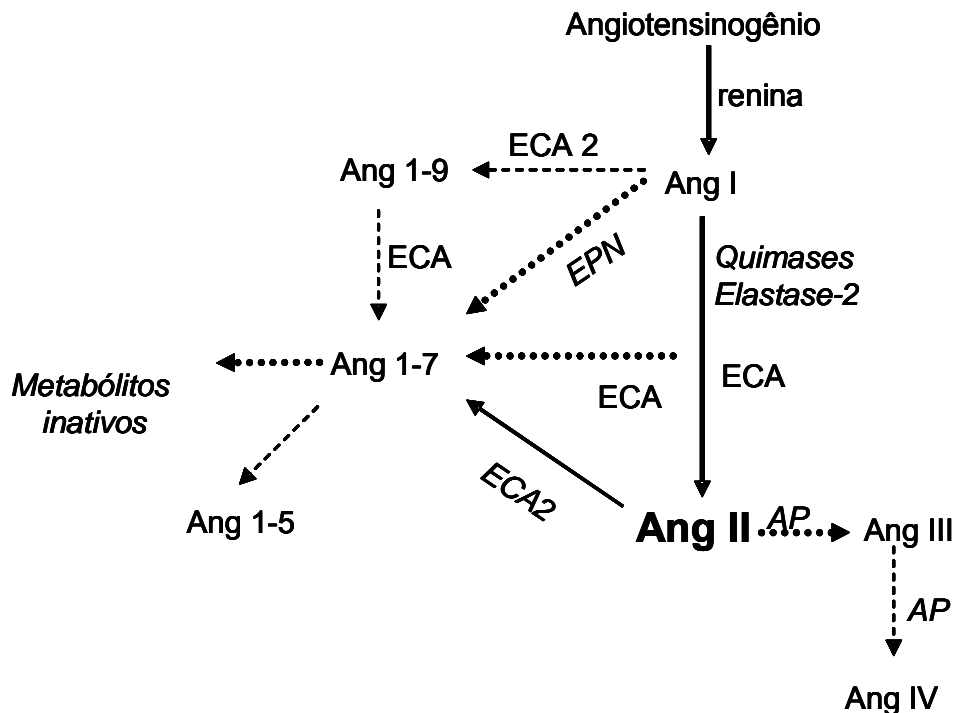


Figura 2 : Esquema representativo do SRA.

*AP: Aminopeptidase*

*EPN: Endopeptidases Neutras*

*ECA: Enzima Conversora de Angiotensina*

*ECA: Enzima Conversora de Angiotensina*

A Ang II, via receptor AT1, leva a processos característicos da resposta inflamatória tais como: alteração da permeabilidade vascular, extravasamento leucocitário e reparo tecidual (TRACEY, 2002) e é reconhecida como um importante mediador inflamatório em vários tecidos incluindo leitos vasculares (SUZUKI et al., 2003). Como parte do processo inflamatório alguns vasos passam por um remodelamento por fibrose e crescimento celular. A Ang II influencia o crescimento celular por estimular hiperplasia, hipertrofia e apoptose (TOUYZ et al., 2003; KELLI et al., 2004) e também a fibrose vascular por induzir o acúmulo de proteínas de matrix extracelular particularmente colágeno e fibronectina na camada média. Além disso, a Ang II estimula a sinalização pró-fibrótica e aumenta a síntese de colágeno e fibronectina (RUPEREZ et al., 2003) contribuindo para o remodelamento vascular.

A Ang II participa de processos inflamatórios pela a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH), peróxido de

hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico (NO) e peróxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Em células vasculares a principal fonte de ROS é a enzima NAD(P)H oxidase (*nicotine adenine dinucleotide phosphate*, na forma reduzida) (LASSEGUE et al., 2003) que nas células endoteliais, na adventícia e músculo liso vascular (MLV) catalisa a geração de  $\text{O}_2^-$  pela redução do oxigênio usando como doador de elétrons a NAD(P)H:



As oxidases vasculares são constitutivamente ativas e produzem  $\text{O}_2^-$  de maneira lenta e contínua para que estes atuem como moléculas sinalizadoras que influenciam fatores de transcrição e moléculas inflamatórias. No endotélio o aumento da geração de  $\text{O}_2^-$  gerados pela NAD(P)H ou pela enzima NO sintase (NOS) desacoplada, leva a redução da biodisponibilidade de NO e conseqüente disfunção endotelial, alteração da vasodilatação e amplificação da resposta inflamatória (LI et al., 2004). Estes processos são mediados por várias vias de sinalização redox-sensíveis ativadas pela Ang II como aumento de cálcio intracelular, ativação de tirosina quinases e MAP quinase (TOUYZ et al., 2003).

A cascata inflamatória induzida pela Ang II envolve a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- $\kappa$ B, que é particularmente importante em inflamações relacionadas com o sistema cardiovascular, uma vez que diversos genes pró-inflamatórios, como de moléculas de adesão e citocinas, são regulados por este fator (TRACEY et al., 2002). A Ang II pode influenciar o NF- $\kappa$ B estimulando sua translocação nuclear, sua ligação ao DNA e degradação da proteína inibitória I $\kappa$ B e estes efeitos sobre o NF- $\kappa$ B, também estão relacionados com a indução de crescimento celular causada pela Ang II (FORTUNO et al., 2004) e em modelos de infusão de Ang II são dependentes da geração de EROs (GUZIK et al., 2003).

### 1.3 Interações dos SRA E SCC

Funcionalmente os efeitos dos SRA e SCC se opõem, entretanto, as interações entre estes dois sistemas são complexas e nem sempre relacionadas apenas a efeitos antagônicos. Por exemplo, a Ang II conhecida por ser um potente vasoconstritor, via

receptor AT1, pode ativar a produção de prostaglandinas por vias de sinalização intracelulares semelhantes às utilizadas pela BK via receptor B2 (LINZ et al., 1995; TSCHÖSPE et al., 1997; DENDORFER et al., 1999).

Um dos pontos de interação entre SCC e SRA melhor caracterizado é a enzima ECA ou Cininase II, responsável pela formação da Ang II a partir da Ang I e também degradação das cininas bioativas. Dessa forma, todas as ações das cininas relacionadas ao sistema cardiovascular têm adquirido especial importância devido à ampla utilização de inibidores da ECA na terapia antihipertensiva, pois esses fármacos além de reduzirem a formação de Ang II, o principal agente hipertensor do SRA, também potencializam os efeitos mediados por cininas endógenas (LINZ et al., 1995). Inúmeros estudos demonstraram a importância da ativação de receptor B2 nessa potencialização de efeitos, comprovando sua contribuição decisiva para as ações cardioprotetoras dos inibidores da ECA (GOHLKE et al., 1994; SCHÖLKENS et al., 1996), incluindo a inibição de hipertrofia vascular e miocárdica, inibição de remodelamento e fibrose cardíaca, redução da área afetada após o infarto do miocárdio (LINZ et al., 1995), além de contribuir para a melhora de função e metabolismo energético cardíaco (ITO et al., 1997).

Além do acúmulo de BK a inibição de ECA promove também aumento dos níveis do peptídeo DABK (DECAIRE et al., 1996; BLAIS et al., 1997), principal agonista de receptor B1. Alguns autores sugerem que inibidores de ECA podem ativar diretamente receptor B1 em culturas de endotélio vascular ou em células transfectadas com cDNA para receptor B1, resultando em aumento de cálcio intracelular e produção de NO (IGNJAVOTIC et al., 2002). Além disso, Marin-Castaño et al., (2002) demonstraram que a inibição da ECA induz aumento nos níveis de RNAm para receptor B1 em rim, vasos e coração de ratos e que o bloqueio farmacológico deste receptor causa reversão do efeito sobre a pressão arterial de animais tratados com esses inibidores. Sabendo que a própria ativação de receptor B1, por seus agonistas, pode induzir sua expressão, o aumento nas concentrações de DABK decorrente da inibição de ECA poderia ser responsável por essa indução (SCHANSTRA et al., 1998).

O fato de o receptor B1 ser induzido por moléculas relacionadas com o processo inflamatório como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  está bem documentado (MARCEU et al., 1998) e

vem sendo descrito que a Ang II, por atuar como um agente pró-inflamatório, pode modular a expressão de receptor B1 em órgãos do sistema cardiovascular. De fato, foi demonstrado em culturas MLV de ratos que a incubação com Ang II induziu a expressão gênica de receptor B1 e esse efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptores AT1 de Ang II, losartan (KINTSURASHIVILI et al., 2001).

Em trabalho recentemente realizado em nosso laboratório verificou-se aumento de RNAm e da expressão protéica de receptor B1 em coração de ratos hipertensos 2rins-1clipe e esse aumento foi totalmente revertido após o tratamento dos animais com o antagonista de receptor AT1, losartan, durante 7 dias confirmando a participação da Ang II na indução dos receptor B1 em ratos 2rins-1clipe (FERNANDES et al., 2006).

Embora os trabalhos acima citados sugere a participação da Ang II na indução da expressão de receptor B1, pouco se sabe sobre a expressão protéica deste receptor no sistema cardiovascular de ratos hipertensos por infusão de Ang II, os mecanismos envolvidos nesta expressão e também quais as funções da ativação de receptor B1 nestes animais.

## 2 OBJETIVOS

Investigar a modulação exercida pela Ang II na expressão de receptor B1 na aorta de ratos e os mecanismos envolvidos nesta modulação. Paralelamente, caracterizar a atividade funcional de receptor B1 na aorta de ratos hipertensos por infusão de Ang II e seus respectivos controles.

Dentro os objetivos específicos foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Determinação da expressão gênica de receptores B1 e B2 por PCR- tempo real em ratos que receberam infusão de Ang II;
- Localização e quantificação da expressão protéica do receptor B1 na aorta de ratos que receberam infusão de Ang II;
- Caracterização dos mecanismos pelos quais a Ang II induz a expressão receptor B1, avaliando a participação das EROs e do NF- $\kappa$ B;
- Atividade funcional do receptor B1 sobre o tônus e a geração de NO na aorta de ratos que receberam infusão de Ang II;
- Estudo do antagonismo de receptor B1 sobre geração ROS, a estrutura da parede vascular e a função endotelial na aorta de ratos que receberam infusão de Ang II;
- Estudo do antagonismo de receptor B1 sobre a pressão arterial de ratos que receberam infusão de Ang II;
- Estudo do antagonismo de receptor B1 sobre a expressão gênica de IL-1 e IL-6 e sobre a expressão total de MAPK (p42/44) e fosforilada na aorta de ratos que receberam infusão de Ang II.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, com 10 semanas de idade, com peso entre 180 a 210 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada, ciclo claro/escuro, 60% de umidade e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

#### 3.1 Grupos experimentais

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

**ANG II** - Ratos Wistar que receberam infusão de Ang II (400 ng/Kg/min) durante quatorze dias, através de mini-bomba de infusão osmótica (Alzet 2002<sup>®</sup>, Cupertino, CA, EUA).

**Controle** – Ratos Wistar que receberam infusão de salina 0,9% (0,5µL/hr) durante quatorze dias, através de mini-bomba de infusão osmótica (Alzet 2002<sup>®</sup>).

**ANG II + Apocinina** - Ratos Wistar que receberam simultaneamente infusão de Ang II (400ng/Kg/min), através de mini-bomba de infusão osmótica (Alzet 2002<sup>®</sup>) e apocinina (60mg/L na água de beber) durante quatorze dias.

**Controle + Apocinina** - Ratos Wistar que receberam infusão de salina 0,9% (0,5µL/hr), através de mini-bomba de infusão osmótica tica (Alzet 2002<sup>®</sup>) e apocinina (60mg/L na água de beber) durante quatorze dias.

**DAL** - Ratos Wistar que receberam simultaneamente infusão de Ang II (400 ng/Kg/min) e antagonista de receptor B1 des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-BK (DAL – 350 ng/Kg/min), através de mini-bomba de infusão osmótica (Alzet 2002<sup>®</sup>) durante quatorze dias.

#### 3.2 Indução de hipertensão arterial em ratos por infusão de Ang II

Ratos Wistar machos com dez semanas de idade foram pesados e tiveram a pressão arterial caudal aferida. Após este procedimento os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico (45 mg/Kg, *ip*) e uma incisão de aproximadamente

um centímetro foi feita no dorso do rato onde foi implantada, no tecido subcutâneo mini-bomba de infusão osmótica de 14 dias, com velocidade de liberação de 0,5 µL/hora (Alzet 2002<sup>®</sup>) preenchida com Ang II (400ng/Kg/minuto) diluída em salina 0,9% estéril. Após esse procedimento a incisão foi suturada. Nos animais Controle também foram implantadas mini-bombas preenchidas com 200µL de solução salina 0,9% estéril. A confirmação da eficácia da indução de hipertensão arterial foi detectada pela aferição da pressão arterial caudal no sétimo e décimo terceiro dias após o implante da mini-bomba de infusão osmótica.

### **3.3 Pressão arterial caudal**

A pressão arterial caudal dos grupos experimentais foi determinada por método indireto, através de pletismografia de cauda, nos dias zero, sétimo e décimo terceiro após o implante da mini-bomba de infusão osmótica. Dois dias antes da primeira medida de pressão arterial caudal os ratos foram submetidos a um período de adaptação que envolvia o aquecimento dos animais em estufa especial por 10 min a 40° C e posterior contenção em cilindro de acrílico com abertura para o focinho e cauda, por cinco min. Este procedimento foi realizado uma vez ao dia durante dois dias.

Após o procedimento de adaptação foram determinados os níveis pressóricos dos animais. Para isso os ratos foram aquecidos por 10 min a 40°C e colocados no cilindro de contenção. Um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-399 conectado a um sistema de transdução (PowerLab, AD Instruments, Melbourne, Australia). O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média aritmética de três medidas seqüenciais.

### **3.4 Tratamento com apocinina**

Para verificarmos a participação de EROs na indução do receptor B1 de cininas, um grupo de animais recebeu simultaneamente infusão de Ang II (400 ng/Kg/minuto) ou solução salina 0,9% (0,5µL/hr) e tratamento com inibidor da NAD(P)H oxidase, apocinina (60 mg/L na água de beber) por quatorze dias.

### **3.5 Determinação do peso corpóreo e consumo de líquidos**

Para avaliarmos se a infusão de Ang II (400ng/Kg/min) ou os demais tratamentos realizados poderiam induzir alterações biológicas nos ratos e se estas poderiam influenciar na expressão de receptores B1, foram investigados os seguintes parâmetros:

#### **3.5.1 Peso corpóreo**

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados antes do implante da mini-bomba de infusão (tempo 0), no sétimo e décimo quarto dias após implante das mesma.

#### **3.5.2 Consumo de líquidos**

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e um frasco bebedouro foi preenchido com 250ml de água para os grupos ANG II e Controle. Também avaliamos se o tratamento com apocinina na água de beber, alteraria a ingestão de líquidos nos diferentes grupos experimentais. Para isso, os ratos ANG II+Apocinina, Controle+Apocinina, alocados em gaiolas individuais receberam um frasco preenchido com 250 ml da solução de Apocinina (60 mg/L). Após 24 h, o volume de líquido remanescente no frasco foi medido em proveta, e por diferença obteve-se o volume de líquido ingerido pelo animal. Os dados foram expressos em mL de líquido ingerido por dia (ml/dia).

#### **3.5.3 Consumo de alimento**

Foram colocados 100g de alimento (ração) em cada gaiola. Após 24 h pesou-se o alimento que restou e por diferença obteve-se a massa de alimento consumida pelo animal. Os dados foram expressos em grama de ração por 100g de peso de rato (g/100g).



### **3.6 Determinação da expressão de RNAm de receptores B1 e B2 e interleucinas 1 $\beta$ e 6 (IL-1 $\beta$ , IL-6) na aorta de ratos por PCR em tempo real**

#### **3.6.1 Obtenção do RNAm, reação de RT (Transcriptase reversa) e PCR (reação de polimerase em cadeia) em tempo real**

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal, *ip*) e a aorta foi removida, dissecada, separada de sua conexão tissular, congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C. O RNA celular total foi isolado utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Co., USA), seguindo as orientações do fabricante. Foi utilizado DNase I para digerir o DNA que ocasionalmente pudesse estar presente na amostra de RNA após o processo de extração. Foi realizada a síntese da fita simples de cDNA - RT - a partir de 2  $\mu$ g do RNA total, utilizando a enzima SuperScript II, e adicionando RNaseOUT para proteger o RNA durante esse processo. A amplificação do cDNA foi realizada usando os seguintes “primers”: B1: Sense—GCA TCC CCA CAT TCC TTC TA; anti-sense—AAG AAG TGG TAA GGG CAC CA; B2: sense—CTT GGG TGA GCT CAG TGT CA; anti-sense—TAG GGG CAG ACA TTT GAA GG; IL-1 $\beta$ : sense-TCT TCG AGG CAC AAG GCA C; anti-sense: CAG AGG TCC AGG TCC TGG AA; IL-6: sense-CAG CTA TGA AGT TTC TCT CCG CA; anti-sense: CAG AAT TGC CAT TGC ACA ACT C;  $\beta$ -actina: sense- GGTGCTGAGTATGTCGTGGA e anti-sense-ACT GTG GTC ATG AGC CCT TC. A quantidade de cDNA foi analisada por PCR em tempo real utilizando o reagente Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Australia).

As condições do PCR utilizadas para amplificação de receptor B2,  $\beta$ -actina, IL-1 $\beta$  e IL-6 foram: 2 min a 95°C seguindo-se 40 ciclos na seguinte seqüência: 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min e 72°C por 20 seg e para o receptor B1: 2 min a 95°C seguindo-se 40 ciclos na seguinte seqüência: 95°C por 15 seg, 65°C por 1 min e 72°C por 20 seg. A especificidade da reação com SYBR<sup>®</sup> green foi confirmada pela análise da curva de dissociação tomando como base a temperatura de dissociação - “melting point”. A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do  $\Delta$ Ct (“cycle threshold”) (PFAFFL, 2001). O cDNA sintetizado a partir do mRNA do  $\beta$ -actina foi utilizado para

normalização. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias relativas à variação da expressão de RNAm.

### **3.7 Determinação da expressão protéica de receptores B1 de cininas na aorta de ratos por imunohistoquímica**

#### **3.7.1 Obtenção do material**

Os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal, *ip*) e após toracotomia a aorta torácica ascendente foi dissecada, removendo-se todo o tecido conectivo e adiposo. Este vaso sanguíneo foi então dividido em três porções: uma porção foi utilizada para os estudos de reatividade vascular, outra para produção de NO (descritos abaixo) e outra imersa na solução fixadora paraformaldeído 4% (PFA) por 6 h. Após a fixação as aortas foram crioprotégidas em solução de sacarose 30% e emblocados em meio para congelamento (Leica Instruments), congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-70^{\circ}$  C. Para garantir que os cortes usados abrangessem uma porção significativa da aorta, foram feitos dez cortes não seriados de 7  $\mu$ m a  $-25^{\circ}$  C em criostato Leica CM 1850 (Leica Instruments, North Ryde, NSW, Australia) e estes foram colocados em lâminas com poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich).

#### **3.7.2 Imunohistoquímica**

Os anticorpos primários anti-receptor B1 (IgG policlonal de coelho anti-rato/Santa Cruz Biotechnology) foram diluídos em tampão fosfato (PB 0,1M contendo 0,3% Tween 20 e 5% de soro normal de coelho) na proporção de 1:50 e colocados sobre os cortes de aorta para incubação por um período de aproximadamente 18 h a  $4^{\circ}$ C. Paralelamente, foram realizadas reações controles substituindo o anticorpo primário por PB 0,1M contendo 0,3% Tween 20 e 5% de soro normal de coelho.

Após 18 h, os cortes de aorta foram lavados em PB e incubados com anticorpo secundário conjugado a biotina (Vector Laboratories - USA), na diluição 1:1000 por uma hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes de aorta

foram novamente lavados em PB e incubados, em câmara úmida com solução do kit ABC Vectastain (Vector Laboratories - USA) por uma hora, à temperatura ambiente.

A revelação da imunoreatividade foi realizada com DAB (Diaminobenzidina, 0,5 mg/1 mL – Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06%. Os cortes foram lavados com PB e água destilada e após as lavagens foram desidratados em álcool, lavadas com xilol e as lâminas foram montadas em Permount<sup>®</sup> (Fisher Chemical).

### **3.7.3 Comparação da expressão protéica de receptor B1 de cininas nos grupos experimentais**

A análise semi-quantitativa da imunoreatividade de aorta ao anticorpo anti-receptor B1 foi realizada em microscópio óptico, equipado com uma câmara fotográfica, utilizando-se uma objetiva com aumento de 400x. As análises foram determinadas em cinco cortes do mesmo órgão, utilizando-se quatro aortas por grupo experimental. Em cada corte foram escolhidas aleatoriamente cinco áreas com 1000 µm<sup>2</sup>, nas quais foi determinada a densidade óptica média com programa de análise de imagem KS-300<sup>®</sup> (ZEISS). A expressão do receptor B1 foi expressa em unidades arbitrárias.

### **3.8 Determinação da produção de EROs na aorta de ratos**

Para avaliarmos a participação de EROs na expressão protéica do receptor B1, na aorta dos ratos de diferentes grupos experimentais, utilizamos dois métodos um qualitativo com a intenção de localizar a EROs na aorta e um outro método quantitativo que permitiu determinar quais as EROs eram geradas nas aortas dos diferentes grupos experimentais.

Ambos os métodos envolveram a dihidroetidina (DHE) que quando oxidada dá origem a dois produtos fluorescentes, etídeo (E) e 2-hidróxi etídeo (EHO), os quais têm afinidade pelo DNA nuclear. A formação do EHO deve-se principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o E é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como a água oxigenada (Fig. 3).

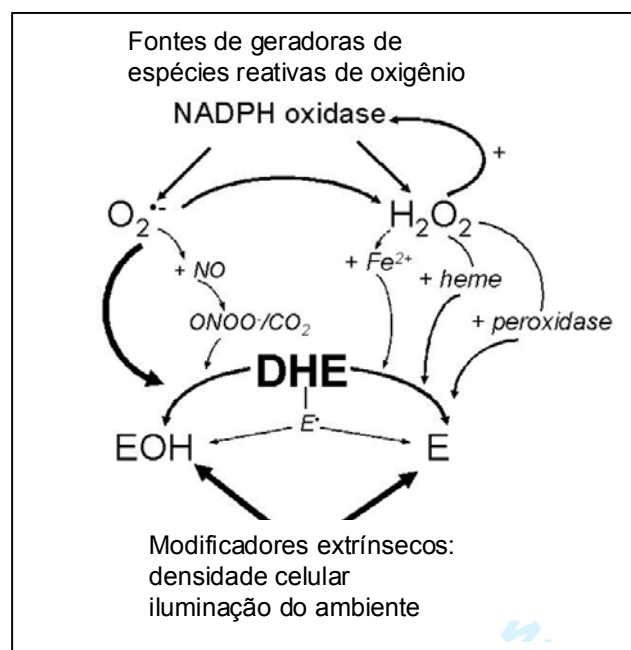


Figura 3 – Oxidação da DHE por diferentes EROs e seus produtos: etídeo (E) e 2-hidróxietideo (EOH).

### 3.8.1 Determinação da localização da geração de EROs em cortes de aorta

Segmentos de aortas torácicas foram dissecados, imersos em meio para congelamento (Leica Instruments) e congelados em gelo seco. Foram feitos cortes transversais de 7  $\mu$ m em criostato que foram colocados em lâminas silanizadas. Os cortes de aorta foram incubados com 50  $\mu$ L de DHE 5  $\mu$ M (30 min, a 37° C) em câmara úmida e protegidos da luz. Após este período as lâminas foram observadas em microscópio óptico (ZEISS) equipado com filtro para rodamina e câmera fotográfica, utilizando uma objetiva para fluorescência com aumento de 400X. A localização da geração de EROs foi realizada visualmente em três áreas diferentes de cada corte de aorta onde se observou a região da aorta, onde haviam núcleos marcados com fluorescência vermelha proveniente dos produtos de oxidação da DHE.

### **3.8.2 Determinação das EROs envolvidas na oxidação da DHE em fragmentos de aorta, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

#### **3.8.2.1 Obtenção da aorta**

Os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal, *ip*) e após toracotomia a aorta torácica ascendente foi dissecada, removendo-se todo o tecido conectivo e adiposo. Este vaso sanguíneo foi então dividido em duas partes: um segmento de 3mm foi utilizado para detecção da geração de ânion superóxido e o restante da aorta para determinação da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (descritos a seguir).

#### **3.8.2.2 Incubação com DHE e homogeneização de aortas**

O segmento de aorta torácica (3 mm) foi incubado com PB/ácido dietilenotriaminopentacético (PB/DTPA, 15 min, 37° C). Após este período a DHE (50 $\mu$ M) foi adicionada à solução e incubada com os segmentos de aorta por 30 min a 37° C, no escuro. Os segmentos foram transferidos para um gral de porcelana congelado em nitrogênio líquido, triturados, suspensos em acetonitrila (Sigma-Aldrich), processados no sonificador (1 ciclo, 10 seg, 8W) e centrifugado (12,000 g, por 10 min, 4° C). O sobrenadante foi removido e seco a vácuo (Speed Vacuum). O pellet formado foi suspenso em 100 $\mu$ L de PB/DTPA e analisado em HPLC.

#### **3.8.2.3 Quantificação dos produtos da oxidação da DHE por HPLC**

A separação da DHE e de seus metabólitos oxidados, EOH e E, foi realizada em sistema HPLC (Waters) equipado com detectores de fluorescência (W2475). Para separação cromatográfica utilizou-se uma coluna NovaPak C18, solução A (acetonitrila pura) e solução B (água, 10% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético) como fase móvel com fluxo de 0,4 mL/min.

A DHE e os produtos de sua oxidação pelo ânion superóxido (EOH) e outras espécies reativas (E) foram monitorados por UV a 245 nm e por fluorescência (excitação de 510 nm e emissão de 595 nm) respectivamente. A quantificação dos produtos da oxidação da DHE foi realizada por integração da área dos picos de cada

produto e expressos como a razão dos produtos (EOH ou E) pela quantidade de DHE consumida (DHE inicial – DHE final) (FERNANDES, D.C.; et al., 2006).

### **3.9 Determinação da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B**

#### **3.9.1 Extração de proteínas nucleares**

A aorta torácica isolada de ratos dos diferentes grupos experimentais foi congelada em nitrogênio líquido, triturada em gral de porcelana congelado e homogeneizada em tampão-fosfato salina gelado (PBS 0,1M) contendo inibidores de proteases e EDTA 0,1 mM. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 12000xg por 30 min a 4° C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em tampão de lise e incubado em gelo por 10 min. Após a incubação adicionou-se aos tubos NP-40 a 10% com agitação vigorosa por 30 seg a 4° C e o sobrenadante foi descartado novamente. O precipitado foi suspenso em tampão de extração, incubado em gelo por 20 min, centrifugado a 12000g por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi recolhido e estocado a –80° C e a concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (kit BioRad).

#### **3.9.2 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (*Gel shift*)**

A ativação do NF- $\kappa$ B na aorta de ratos foi realizada por ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética. Para isso, o oligonucleotídeo de DNA contendo a seqüência (5'- AGT TGA GGG GAG TTT CCC AGG C – 3') foi marcado com a adição de <sup>32</sup>P ATP numa solução contendo tampão T4 quinase, T4 quinase e água nas concentrações de: 3,5pmol de oligonucleotídeo, 1U/ $\mu$ L de T4 quinase, 1  $\mu$ L de <sup>32</sup>P ATP (300mCi/mmol), 1 $\mu$ L de tampão T4 quinase em 10 $\mu$ L de reação. Após incubação a 37° C por dez min, o excesso de <sup>32</sup>P ATP foi retirado com resina sephadex G-25 (Microspin G-25, Amersham). No dia seguinte 1 $\mu$ L da solução contendo a sonda marcada foi adicionado ao líquido de cintilação para determinar a atividade obtida em contador para emissão beta.

Para ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética foram adicionados a um tubo de microcentrifuga tampão de lise e extrato nuclear em quantidade suficiente

para 10µg de proteína. Em alguns casos foram adicionados oligonucleotídeo frio em excesso para caracterizar a especificidade e água *qsp* 20 µL, contando a adição da sonda marcada. Os tubos foram incubados por 20 min à temperatura ambiente, adicionando em seguida a sonda marcada.

Para os ensaios de competição específica ou inespecífica, o extrato nuclear foi incubado com excesso de oligonucleotídeo não-marcado, 20 min antes da adição do oligonucleotídeo marcado. Para a competição específica foi utilizada a mesma seqüência do oligonucleotídeo marcado 10 a 20 vezes em excesso. Para a competição inespecífica foi utilizada a seqüência para o fator de transcrição TFIID (5'- GCA GAG CAT ATA AGC TGA GGT AGG A – 3') 20 vezes em excesso.

O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida de 5,5%. A corrida foi visualizada com a adição de 1µL de Bromophenol Blue ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5%. Para eletroforese foi utilizado tampão de corrida 0,5xTBE. O gel foi submetido a eletroforese por 2 h a 150-160 V. Ao final da eletroforese o gel foi seco e em seguida exposto ao filme (Kodak, X-OMAT) em cassete, a -20° C, por 5 dias e a revelação do filme foi realizada em sala escura com solução reveladora (Kodak, GBX), ácido acético 2% e solução fixadora (Kodak, GBX).

### **3.10 Determinação da atividade funcional de receptores B1 na aorta de ratos**

#### **3.10.1 Estudo *in vitro* da reatividade de anéis de aorta torácica isolada de ratos**

As aortas torácicas dos ratos foram removidas e rapidamente imersas em solução nutriente Krebs-Henseleit modificada e seccionadas em anéis transversais de 4mm. Em um desses anéis o endotélio foi mantido intacto e no outro foi removido mecanicamente com uma haste fina de algodão.

Os anéis com e sem endotélio foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável sendo que um gancho foi fixado à base da cuba de vidro para estudo de órgão isolado, e o outro conectado a um transdutor de sinal (ML T001 transdutor isométrico de tensão, Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália) acoplado a um computador. As cubas de vidro continham 15 ml de solução de Krebs-Henseleit

modificada que permaneceu gaseificada com mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e mantida aquecida à temperatura de 37±0,5° C durante todo o protocolo experimental. As preparações permaneceram sob tensão de 1,5 g por um período de 60 min para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 20 min quando as curvas concentração-efeito (CCE) para os diferentes agonistas foram iniciadas.

### **3.10.1.1 CCE à DABK**

Os anéis de aorta com e sem endotélio isolados de ratos Ang II e Controle foram incubados previamente com iECA, 10µM enalaprilato (Merck) por 60 min, para impedir que as cininas administradas posteriormente na cuba fossem degradadas pela ECA. Esta concentração e tempo de inibição da ECA, com enalaprilato, foi determinada em estudos prévios, onde observou-se que o enalaprilato na concentração de 5 µM por 15 e 30 min não inibia a degradação da DABK, uma vez que não se observava resposta ao agonista nestas condições (resultados de padronização não mostrados). Após incubação com iECA por 60 min os anéis de aorta foram pré-contraídos com 0.1µM Fenilefrina (FE – Sigma Aldrich). Esta concentração de FE foi determinada mediante estudos de padronização onde foram feitas CCE para FE e observou-se que concentração induz tensão equivalente a 60-80% da tensão máxima induzida por esse agonista, tanto em anéis de aorta de ratos Ang II como de ratos controle incubados ou não com enalaprilato (dados não mostrados). Após a pré-contracção foram realizadas CCE à DABK (0,1nM a 1µM - Bachem), agonista específico para receptor B1. O relaxamento induzido pela DABK foi expresso em porcentagem de relaxamento em relação à contracção obtida com a FE.

### **3.10.1.2 Estudo participação dos receptores B1 e B2 na resposta vascular induzida pela DABK**

Para verificar qual a participação dos receptores B1 e B2 na reatividade vascular à DABK, em outra série de experimentos, foram utilizados apenas anéis de aorta com endotélio de ratos ANG II. Nesse estudo os receptores B1 ou B2 foram antagonizados com des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-Bk (DAL - 10µM, Bachem) ou HOE 140 (10µM) respectivamente e mantidos em contato com as preparações por 30 min em presença de enalaprilato



(10 $\mu$ M). Após este período, os anéis de aorta foram pré-contraídos com FE 0.1 $\mu$ M e foi realizada a CCE para o agonista B1, DABK.

### **3.10.1.3 Determinação dos mediadores envolvidos na resposta vascular à DABK**

Para determinar os possíveis mediadores envolvidos na vasodilatação induzida pela DABK em anéis de aorta, as preparações foram incubadas com inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (10 $\mu$ M), ou com inibidor da ciclooxygenase, indometacina (IND – 5 $\mu$ M) por 30min na presença de enalaprilato. Após este período os anéis de aorta foram contraídos com FE e a CCE para o agonista B1, DABK, foi realizada.

### **3.10.2 Efeito da ativação dos receptores B1 sobre a produção de NO em cortes de aorta isolada de ratos**

Segmentos de aorta torácica foram dissecados, imersos em meio para congelamento (Tissuetech, Leica Instruments) e congelados em gelo seco. Foram feitos cortes transversais de 7 $\mu$ m em criostato e os cortes de aorta foram colocadas em lâminas silanizadas. Para verificar a produção de NO foi utilizada sonda fluorescente 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich) (KOJIMA et al, 1998). Para isso os cortes foram incubadas a 37° C por 1 hora, em câmara úmida, com 100 $\mu$ L de DAF-2 (12,5 $\mu$ M) diluído em solução de PB 0,1M contendo 0,45 $\mu$ M de cloreto de cálcio. Os cortes foram estimulados então com agonista B1, DABK (10 $\mu$ M), por 60 min. Em outra série de experimentos os cortes foram incubados com inibidor da NO sintase, L-NAME (10 $\mu$ M, Sigma-Aldrich), ou antagonista de receptor B1, DAL (10 $\mu$ M), durante 30 min e então estimuladas com agonista B1, DABK (10 $\mu$ M), por 60 min. Foram utilizados para controle cortes que receberam o mesmo volume dos antagonistas ou agonistas em PB. As lâminas foram observadas em microscópio óptico equipado com câmera fotográfica e filtro para fluoresceína. A produção de NO basal ou após as diferentes incubações foi determinada pela densidade óptica média de fluorescência analisada em três diferentes áreas da aorta (1000 $\mu$ m<sup>2</sup>) que abrangiam as camadas musculares e o endotélio utilizando o programa de análise de imagens KS-300<sup>®</sup> (ZEISS) e a geração de NO foi expressa em unidades arbitrárias.

### **3.11 Estudo do efeito do antagonismo de receptor B1 sobre diferentes parâmetros biológicos**

Nesta etapa do trabalho o objetivo foi caracterizar a consequência do antagonismo de receptores B1 sobre os efeitos da Ang II na pressão arterial e na aorta de ratos. Para isso, um grupo de animais recebeu infusão de Ang II (400ng/Kg/min) simultaneamente com antagonista de receptor B1 (DAL- 350ng/Kg/min) por 14 dias. Neste grupo de animais foi avaliada a geração de espécies reativas em cortes congelados de aorta, espessura da parede vascular, expressão de MAPKs e de citocinas e a função endotelial na aorta.

#### **3.11.1 Determinação de EROs em cortes de aorta**

Estes experimentos foram realizados como descrito anteriormente na seção 3.8.1 (determinação da localização da geração de EROs em cortes de aorta). Brevemente, cortes (7  $\mu\text{m}$ ) de aortas torácicas dos ratos Ang II, Controle e DAL, foram incubados com 50  $\mu\text{L}$  de DHE 5  $\mu\text{M}$  (30 min, a 37° C) em câmara úmida. As lâminas foram observadas em microscópio óptico equipado com filtro para rodamina, câmera fotográfica e objetiva para fluorescência (400X). A geração de EROs foi determinada pela densidade óptica média de fluorescência analisada em três diferentes áreas da aorta (1000 $\mu\text{m}^2$ ) que abrangiam as camadas musculares e o endotélio utilizando o programa de análise de imagens KS-300<sup>®</sup> (ZEISS) e a geração de EROs foi expressa em unidades arbitrárias.

#### **3.11.2 Morfometria da Aorta Torácica**

Para este estudo foram utilizados cortes seriados (7 $\mu\text{m}$ ) obtidos de aortas fixadas com PFA 4%, desidratados em concentrações crescentes de álcool (álcool 70%, 85%, 90%, 100% banhos de 10 min), diafanizados em banhos de xilol (5 min cada), banhados por três vezes em parafina (30 min cada banho) e emblocados em parafina. Foram feitos cortes não seriados das aortas em Micrótomo (Leica) que foram colocados em lâminas de vidro.

### **3.11.2.1 Coloração com hematoxilina-eosina**

Os cortes foram desparafinizados em banhos de xilol e hidratados em banhos de álcool em concentrações decrescentes (100%, 90%, 85%, 70%). Após este processo as lâminas com cortes de aorta foram imersas em hematoxilina de Méier por 3 min, lavadas em água corrente por 10 min. Em seguida foram imersas em eosina por 30 seg e lavadas rapidamente em água destilada.

Após a coloração as lâminas foram imersas por 10 min em álcool 50%, 70%, 80%, 90% e 100%. Em seguida as mesmas foram banhadas por 10 min em álcool+xilol (1:1), por 10 min em xilol e depois secas e fechadas com Entellan (Merck) e lamínulas.

### **3.11.2.2 Medidas Morfométricas**

Os cortes com Hematoxilina/Eosina foram analisados com aumento de 20X. A escolha dos cortes foi feita adotando-se os seguintes critérios: a lâmina foi observada inicialmente com objetiva de 2X, selecionando-se o corte apropriado (sem ranhuras, dobras ou bolhas). Foram escolhidos cinco cortes, onde então, foram realizadas as medidas. Foi selecionada a Área externa (Ae) (lâmina elástica externa) e Área interna (Ai) (lâmina elástica interna), diâmetro interno (Di) e diâmetro externo (De) do corte analisado. As medidas de Área de Secção Transversal (AST) foram obtidas pela diferença entre Ae-Ai ( $AST = Ae - Ai$ ); as medidas de espessura foram obtidas dividindo-se por dois a diferença entre o De-Di ( $\delta = (De - Di) / 2$ ) e a razão parede/luz foi obtida pela razão entre espessura ( $\delta$ ) e Di ( $razão\ parede/luz = \delta / Di$ ).

As imagens selecionadas foram capturadas e medidas utilizando um sistema computadorizado acoplado ao microscópio (Nikon Eclipse E1000), com um software específico para realização de medidas morfométricas (Image Pro Plus 5). Todas as medidas morfométricas foram expressas em micrômetros ( $\mu m$ ).

### **3.11.3 Estudo do antagonismo de receptor B1 sobre a expressão de ERK1/2 total e fosforilada na aorta de ratos**

#### **3.11.3.1 Extrato total**

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal, *ip*) e a aorta foi removida e dissecada, separada de sua conexão tissular, congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C. A aorta foi homogeneizada em tampão contendo Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml utilizando Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments).

Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 5 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo protéico total, utilizando o método de Bradford (BioRad) e as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e 90 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (8%).

#### **3.11.3.2 Immunoblotting**

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um aparelho também da BioRad por 1h a 120V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Após transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico desnatado 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por 2 h em temperatura ambiente para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana.

As membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra as proteínas ERK1/2 ou contra as proteínas fosforiladas ERK1/2. Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (0,3% de BSA), por 4h em temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora sem leite ou BSA por 30 min. Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase, por 1h em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência, como descrito no protocolo do kit (Amersham). A

emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (Scion Image). Os resultados foram expressos como porcentagem de expressão ou fosforilação em relação às aortas dos animais controle de cada experimento (Controle=100%).

#### **3.11.4 Determinação da função endotelial: CCE à Acetilcolina**

Para determinação da função endotelial nos diferentes grupos experimentais foram realizadas CCE à acetilcolina (Sigma-Aldrich), vasodilatador dependente do endotélio em anéis de aorta isolados (como descrito anteriormente na seção 3.10). Para isso, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com FE 0.1 $\mu$ M, em seguida foi realizada CCE para acetilcolina (0,1nM a 1 $\mu$ M). O relaxamento induzido pela acetilcolina foi expresso em porcentagem de relaxamento em relação à contração obtida com a FE.

#### **3.12 Análises estatísticas**

Para a análise estatística dos resultados obtidos na pressão arterial foi utilizado o teste One-way ANOVA para dados repetidos, seguido do teste de Kramer-Tukey para comparação entre os grupos. Para as demais análises foram utilizados os testes One-way ANOVA e Kramer-Tukey ou teste T-student quando apropriado.

#### **3.13 Soluções, reagentes, drogas e anticorpos.**

##### **Soluções**

##### **a) Tampão fosfato (PB 0,1M)**

Composição em mM: Fosfato de sódio monobásico anidro 0.10; Fosfato de sódio dibásico anidro 0.10, pH 7.4.

##### **b) Tampão fosfato/ DTPA (PB/DTPA)**

Composição: Fosfato de sódio monobásico anidro 0.10M; Fosfato de sódio dibásico anidro 0.10M; ácido dietilenotriaminopentacético 100 $\mu$ M, pH 7.4.

##### **c) PBS adicionado de inibidores de proteases**

Composição: Fosfato de sódio monobásico anidro 0.10M; Fosfato de sódio dibásico anidro 0.10M; NaCl 0.4M; PMSF 0.5M; DTT 0.5M; leupeptina 2µg/mL; anitpaína 2µg/mL, pH 7.4.

**d) Tampão de lise**

Composição: HEPE pH 7,9 10mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; KCl 10mM; DTT 0,5mM; PMSF 0,5mM; leupeptina 2µg/mL; anitpaína 2µg/mL.

**e) Tampão de extração**

Composição; HEPES pH 7,9 20mM; glicerol 25%; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; NaCl 300mM; EDTA 0,25mM; DTT 0,5mM; PMSF 0,5mM; leupeptina 2µg/mL; anitpaína 2µg/mL.

**f) TBE 1x**

Tris 90mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 1Mm.

**g) Krebs-Henseleit modificada**

Composição em mM: Glicose 11; Cloreto de sódio 117.5; Sulfato de magnésio 1.18; Fosfato de potássio 1.2; Bicarbonato de sódio 25; Cloreto de potássio, 4.7; Cloreto de cálcio, 2.5, pH 7.4.

**h) Tampão de extração de proteínas *immunoblotting*:** Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml

**Sais**

Os sais utilizados na preparação dos tampões foram adquiridos da Merck S/A, Ind. Química.

**Reagentes**

Inibidores de proteases: PMSF, DTT, Leupeptina, antipaína Sigma Aldrich.

Paraformaldeído - Merck S/A, Ind. Química

Poli-L-lisina – Sigma-Aldrich

Peróxido de hidrogênio – Merck S/A, Ind. Química

2-diaminofluoresceína – Sigma Aldrich

DHE – Invitrogen.

4-5 diaminobenzidina – Sigma Aldrich

**Drogas**

des-Arg<sup>9</sup>-Bk – Bachem Group

des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-Bk – Bachem Group

Angiotensina II – Bachem Group

Hoe 140 – Sigma Aldrich

L-NAME – Sigma Aldrich

Apocinina – Sigma Aldrich

Acetilcolina - Sigma Aldrich

Fenilefrina - Sigma Aldrich

**Anticorpos**

p42/44 - IgG policlonal de coelho anti-rato, específico ERK1/2, Upstate Biotechnology Inc.

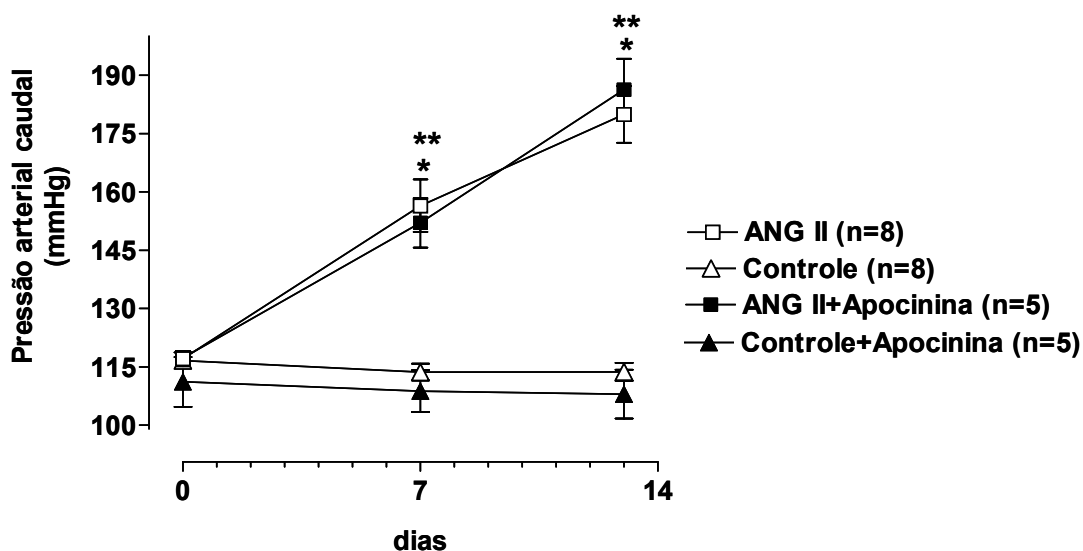
Anti-p42/44 fosforilado - IgG policlonal de coelho anti-rato, específico para fosfo-ERK (Thr202/Tyr204), Upstate Biotechnology Inc.

anti-receptor B1 - IgG policlonal de coelho anti-rato/Santa Cruz Biotechnology

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pressão arterial caudal

Os animais que receberam infusão de Ang II apresentaram elevação significativa da pressão arterial no sétimo e décimo terceiro dias após o implante da mini-bomba de infusão osmótica, quando comparados com os animais Controle. O tratamento com apocinina na água de beber não alterou os níveis pressóricos tanto dos ratos ANG II quanto dos ratos Controle (Fig.4).



**Figura 4** – Evolução temporal da pressão arterial caudal (mmHg) de ratos ANG II, Controle, ANG II + Apocinina e Controle + Apocinina nos tempos zero, sete e treze dias após implante da mini-bomba de infusão osmótica. Os valores foram expressos como média  $\pm$  epm da pressão arterial caudal. \* $P < 0,05$  comparado com Controle, \*\* $P < 0,05$  comparado com Controle +Apocinina . (n) representa o tamanho das amostras.



#### **4.2 Avaliação do peso corpóreo de ratos**

Não houve diferença entre os pesos corpóreos dos ratos ANG II, Controle e ANG II+Apocinina nos tempos zero, sete e treze dias após o implante da mini-bomba de infusão osmótica (Tab.1).

#### **4.3 Avaliação do consumo de líquidos e ração**

Não houve diferença no consumo de água e ração nos tempo zero, sete e treze dias após o implante da mini-bomba entre os ratos Controle e ANG II. Os grupos que receberam tratamento com Apocinina, diluída na água de beber, também não apresentaram alterações no consumo de líquidos e ração quando comparados com os grupos que receberam água sem Apocinina nos tempo zero, sete e treze dias após o implante da mini-bomba infusão osmótica (Tab.1).

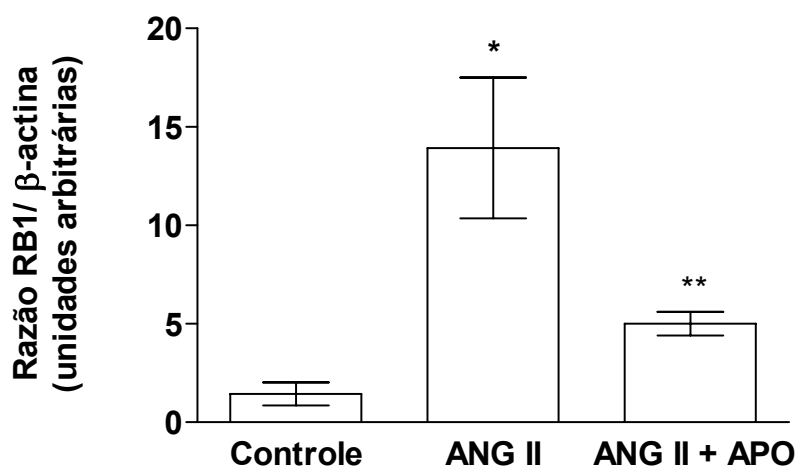
Tabela 1 – Efeitos da infusão de Ang II sobre peso corpóreo, consumo de líquidos e ração de ratos Wistar.

| Dias<br>Grupos                 | Peso (g)          |                   |                   | Consumo de<br>líquidos (mL/dia) | Consumo de ração<br>(g/dia) |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                                | 0                 | 7                 | 13                |                                 |                             |
| <b>Controle</b>                | 257.0±12.0<br>(8) | 281.1±4.94<br>(8) | 306.0±8.50<br>(8) | 30.10 ± 2.05 (8)                | 36.00 ± 5.50 (8)            |
| <b>ANG II</b>                  | 262.4±12.5<br>(8) | 269.9±11.0<br>(8) | 280.3±8.80<br>(8) | 33.40 ± 2.50 (8)                | 38.50 ±5.50 (8)             |
| <b>Controle+<br/>Apocinina</b> | 244.4±5.77<br>(8) | 254.3±4.27<br>(8) | 283.6±6.40<br>(8) | 32.80 ± 5.30 (8)                | 38.90 ± 4.30 (8)            |
| <b>ANGII+<br/>Apocinina</b>    | 267.9±8.40<br>(8) | 282.2±7.54<br>(8) | 295.0±5.10<br>(8) | 31.90 ± 2.30 (8)                | 37.10 ± 4.00 (8)            |

Peso corpóreo antes do implante de mini-bomba de infusão osmótica (dia 0) e nos dias 7 e 13 após implante da mini-bomba de infusão. A ingestão de água (Controle, ANG II), Apocinina 60mg/L (Controle+Apocinina e ANG II+Apocinina) e ração foram determinadas durante 13 dias após o implante de mini-bomba de infusão osmótica. Resultados expressos como médias±e.p.m. (n) número de animais/grupo.

#### 4.4 Expressão de RNAm de receptor B1 de cininas na aorta de rato

Observamos que a aorta de ratos ANG II apresentaram maior expressão de RNAm de receptor B1 quando comparada àquela de ratos Controle. Isto nos sugere que a infusão de Ang II induziu a expressão gênica deste receptor na aorta de ratos Wistar. O tratamento com inibidor da NADPH oxidase, apocinina, na água de beber reduziu a expressão de RNAm de receptores B1 na aorta dos ratos ANG II (Fig. 5).

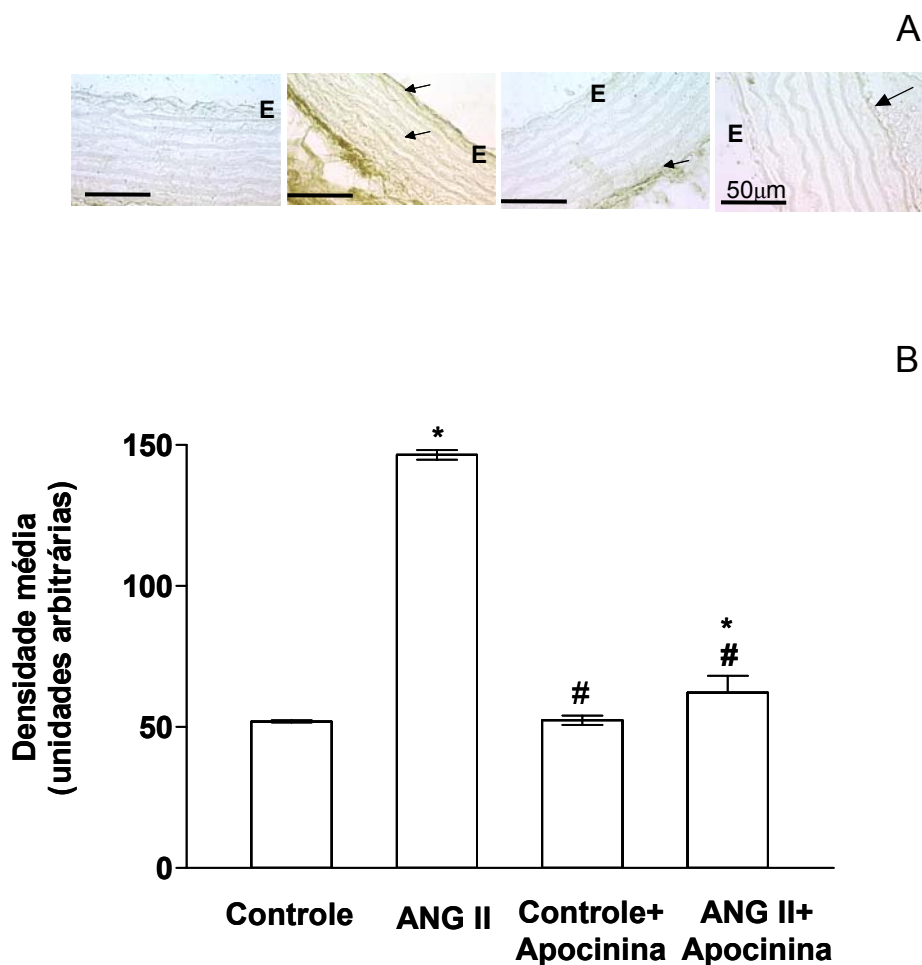


**Figura 5 -** Expressão de RNAm de receptor B1 realizada com a técnica de PCR em Tempo real na aorta de ratos ANG II, Controle e ANGII tratados com apocinina (ANG II+APO). Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de β-actina. As barras representam as médias±epm da densidade óptica relativa de cinco aortas/grupo \* $P < 0,05$  em relação ao Controle, \*\* $P < 0,05$  em relação aos ANG II.

#### **4.5 Localização e quantificação da expressão protéica de receptor B1 de cininas em aorta de rato**

As aortas de ratos ANG II e Controle apresentaram imunorreatividade ao anticorpo anti-receptor B1 (Fig. 6A e B). A expressão desse receptor nas aortas do grupo Controle localizou-se na adventícia, enquanto na aorta dos ratos que receberam infusão de Ang II houve a expressão no endotélio, camadas musculares e na adventícia. As aortas do grupo ANG II apresentaram aumento na expressão protéica de receptor B1 quando comparadas com aquelas do grupo Controle.

O tratamento com apocinina (60mg/L, 14 dias, na água de beber) diminuiu a expressão de receptor B1 nas aortas dos ratos ANG II quando comparadas com a expressão nas aortas dos ratos que receberam apenas infusão de Ang II e não alterou a expressão nas aortas dos Controles (Fig 6B). Os controles negativos dos diferentes grupos não apresentaram nenhum tipo de marcação. Esses dados nos sugerem que a Ang II induziu a expressão protéica de receptor B1 na aorta de ratos Wistar.



**Figura 6** – Localização e expressão de receptor B1 em aorta de ratos. **A)** Imagens representativas da imunorreatividade para o anticorpo anti-receptor B1 em cortes de aorta de ratos Controle, ANG II (400ng/Kg/min), Controle+ Apocinina (60mg/L), ANGII+Apocinina (60mg/L), onde E indica a camada endotelial e as setas indicam a localização de receptor B1; **B)** Quantificação da expressão de receptor B1 em cortes de aorta. As barras representam as médias±epm da densidade óptica analisada em cinco áreas aleatoriamente determinadas em cinco cortes de aorta do mesmo animal. Foram utilizados quatro cortes/grupo experimental. \* $P < 0,001$  comparado com Controle e # $P < 0,001$  comparado com ANG II.

## **4.6 Determinação da geração de EROs na aorta de ratos**

### **4.6.1 Localização da geração de EROs em cortes de aorta**

Para verificarmos a participação de EROs na indução de receptor B1 pela infusão de Ang II, determinamos por método qualitativo as células geradoras de EROs na aorta dos ratos dos diferentes grupos. Este procedimento foi possível uma vez que a dihidroetidina (DHE) quando oxidada dá origem a produtos fluorescentes que têm afinidade pelo DNA nuclear, dessa forma, a região celular nos cortes de aorta que apresentassem maior marcação nuclear seriam as células geradoras de EROs.

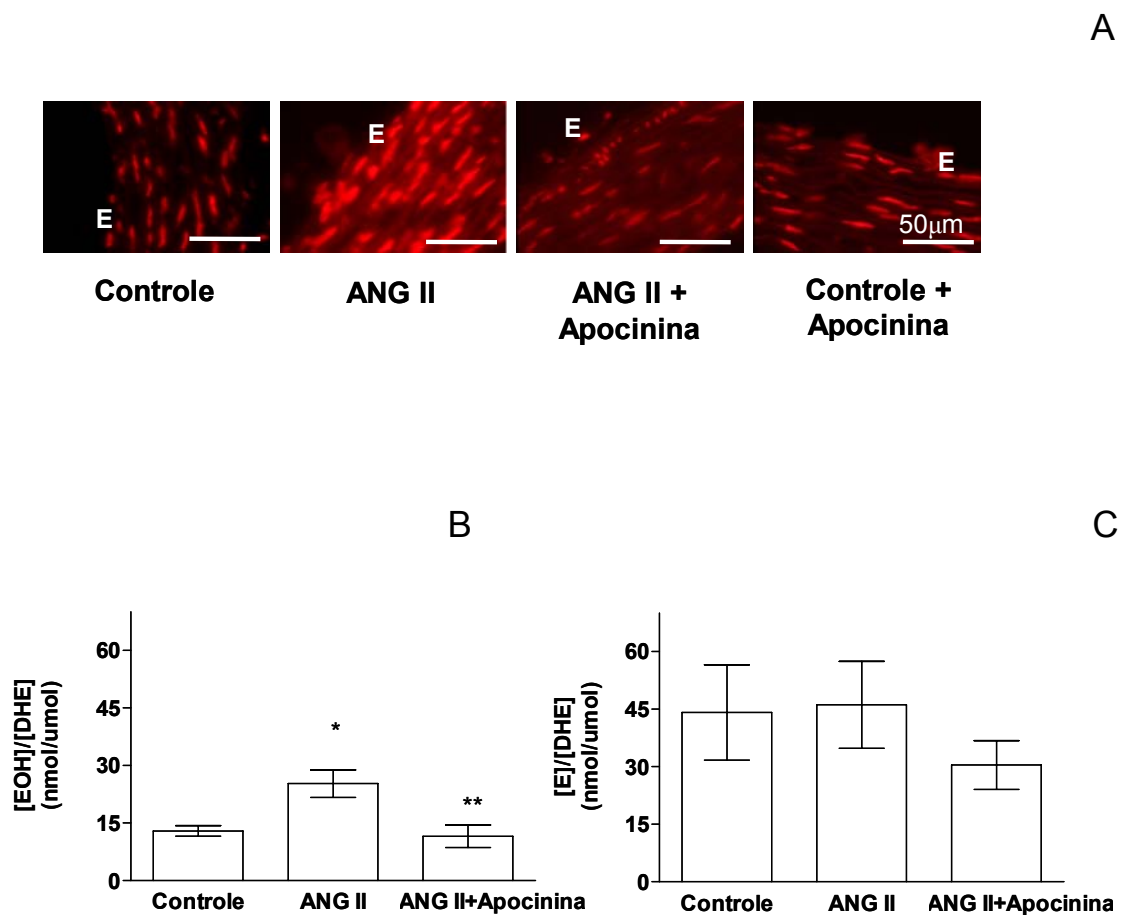
Observamos que nos cortes de aorta dos diferentes grupos experimentais havia emissão de fluorescência vermelha do núcleo das células musculares lisas, sugerindo que essas células seriam uma das principais geradoras de EROs na aorta de ratos. E na aorta dos ratos ANG II houve aumento de fluorescência quando comparados ao Controle, sugerindo que infusão de Ang II aumentava a geração de EROs neste leito vascular.

O tratamento de ratos ANG II com apocinina, na água de beber, reduziu a geração de EROs mas não alterou a geração na aorta dos ratos Controle (Fig. 7A).

### **4.6.2 Quantificação das EROs em aorta de ratos**

Para verificarmos quais EROs foram geradas pela Ang II utilizamos um método quantitativo capaz de aferir os produtos de oxidação da DHE pelo  $O_2^-$ , o EOH e por outras EROs, E. Para isso foram feitas análises em HPLC onde observamos aumento da relação EOH/DHE na aorta dos ANG II, quando comparada com esta relação na aorta dos ratos Controle (Fig. 7B). A infusão de ANG II, aparentemente, não alterou a geração de outras EROs uma vez que a relação E/DHE não foi diferente entre os grupos avaliados (Fig. 7C).

Para confirmarmos estes resultados os animais ANG II foram tratados com apocinina, inibidor da principal enzima geradora de  $O_2^-$  no sistema cardiovascular a NAD(P)H oxidase. Observamos que o tratamento reduziu a relação EOH/DHE nos ratos ANG II para valores semelhantes aqueles obtidos na aorta dos ratos Controle. Estes resultados sugerem maior geração de  $O_2^-$  na aorta dos ratos ANG II uma vez que o EOH é o principal produto da oxidação da DHE pelo  $O_2^-$ .



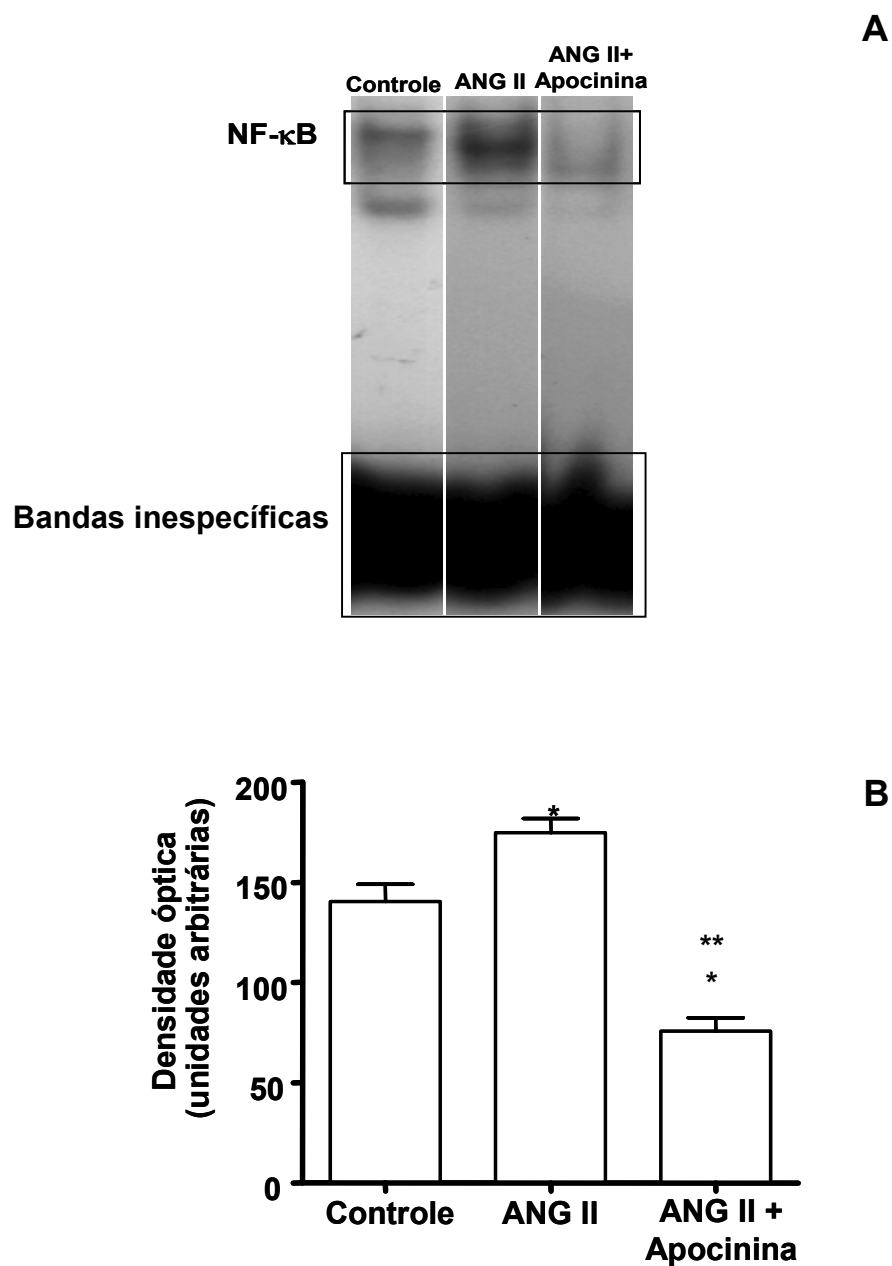
**Figura 7 – A)** Imagens representativas da produção de espécie reativas de oxigênio em aorta de ratos Controle, ANG II, Controle+Apocinina, ANGII+Apocinina (60mg/L), onde **E** indica o endotélio da aorta. **B)** Razão 2-hidroxiéideo (EOH) e dihidroetidina (DHE) determinados por HPLC na aorta de ratos Controle, ANG II, ANGII+Apocinina (60mg/L). **C)** Razão etídeo (E) e dihidroetidina (DHE) determinados por HPLC na aorta de ratos Controle, ANG II e ANGII+Apocinina (60mg/L). As barras representam as médias±epm, n= 4 ratos/grupo. \* $P<0,05$  comparado com Controle e \*\* $P<0,05$  comparado com ANG II.

#### **4.7 Ativação do NF- $\kappa$ B em aorta de ratos**

A ativação do NF- $\kappa$ B na aorta de ratos foi analisada por ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Observamos que aortas isoladas de ratos ANG II apresentaram aumento na atividade de ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA quando comparada com a atividade na aorta isolada de ratos Controle, sugerindo que a infusão de Ang II aumentou a atividade do NF- $\kappa$ B na aorta de ratos.

Para analisarmos a participação da geração de ânion superóxido causada pela Ang II na aorta de ratos ANG II estes animais foram tratados com apocinina. Foi verificado que este tratamento reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B na aorta dos ratos ANG II, sugerindo a importância do ânion superóxido na ativação do NF- $\kappa$ B neste modelo de hipertensão experimental (Fig 8).





**Figura 8** – Efeitos da infusão de Ang II e tratamento com Apocinina na ativação do NF-κB em aorta de ratos Controle, ANG II e ANG II+Apocinina (60mg/mL). **A)** Imagens representativas das auto-radiografias provenientes do ensaio de retardo da mobilidade eletroforética, o complexo NF-κB está sinalizado na figura. **B)** Análise densitométrica a laser (unidades arbitrárias) da banda de NF-κB em aorta de ratos Controle, ANG II e ANGII+Apocinina (60mg/L). As barras representam as médias±epm, n= 5 ratos/grupo. \* $P<0,05$  comparado com Controle e \*\* $P<0,05$  comparado com ANG II.

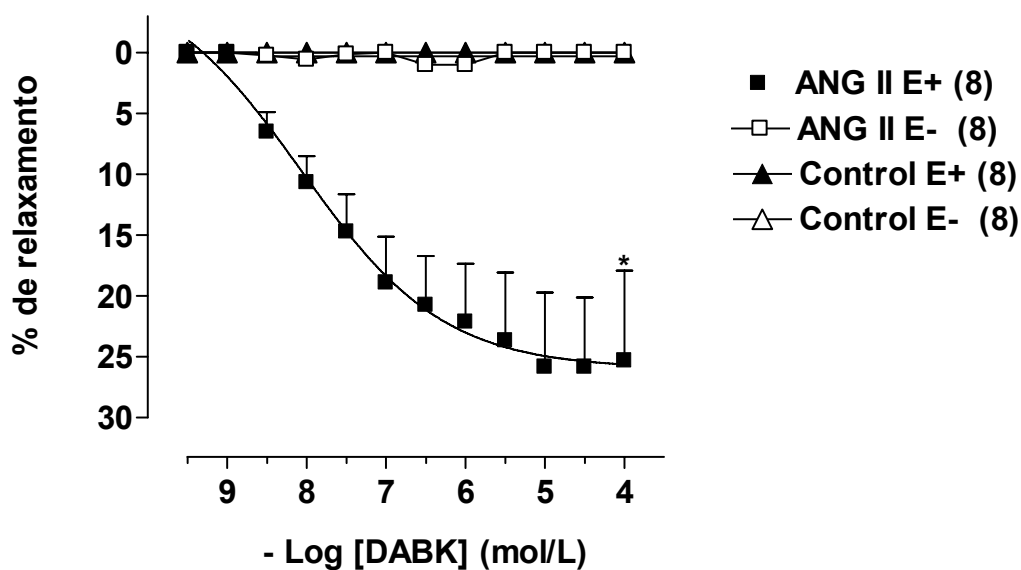
#### **4.8 Reatividade de anéis de aorta isolados de ratos Wistar para DABK: estudo *in vitro***

Nos anéis de aorta com endotélio isolados de animais ANG II e pré-contraídos com FE o agonista de receptor B1, DABK (0,1nM a 1 $\mu$ M), promoveu vasodilatação concentração-dependente e a remoção do endotélio aboliu a resposta vasodilatadora a este agonista. Esses dados sugerem que a vasodilatação causada pela DABK é dependente de endotélio. Entretanto, nos anéis de aorta com e sem endotélio dos animais Controle a DABK não causou nenhum tipo de alteração no tônus vascular (Fig.9). A partir destes resultados as demais séries de experimentos de reatividade vascular foram realizadas apenas em anéis de aorta com endotélio isolados dos ratos ANG II.

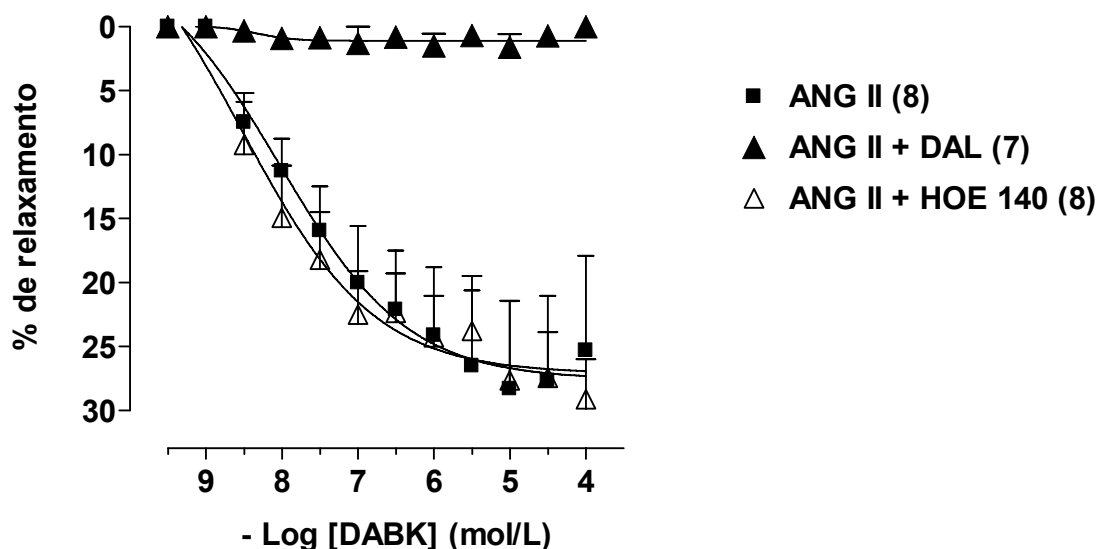
Estudamos então a possível participação de receptores B1 e B2 na resposta vasodilatadora induzida pela DABK. Para tanto, anéis de aorta com endotélio de ratos ANG II foram tratados com antagonista de receptores B1, DAL, e verificamos que a resposta vasodilatadora à DABK foi totalmente bloqueada. Além do mais, o tratamento das aortas com antagonista de receptor B2, HOE 140, não alterou a resposta vasodilatadora da DABK (Tab. 2, Fig. 10). Esses dados em conjunto nos sugerem que há participação de receptor B1 e não de receptor B2 de cininas, na resposta vasodilatadora à DABK.

Para esclarecermos quais os mediadores envolvidos nas alterações de tônus vascular promovidas pela DABK, anéis de aorta foram incubadas com L-NAME, inibidor da NO sintase ou com indometacina, inibidor da ciclooxigenase. Observamos que o L-NAME bloqueou a resposta à DABK em anéis de aorta de ratos ANG II e a indometacina não alterou a vasodilatação neste leito vascular (Tab. 3, Fig. 11). Esses dados nos sugerem que a vasodilatação induzida pela DABK é dependente da geração de NO e não envolve a participação de prostaglandinas vasodilatadoras.

Analisamos também a resposta à DABK em aortas isoladas de ratos ANG II tratados com apocinina na água de beber. E observamos que a vasodilatação induzida pelo agonista de receptor B1 foi praticamente abolida, confirmando que este tratamento inibe a expressão de receptores B1 na aorta de ratos ANG II (Tab.4, Fig. 12).



**Figura 9 –** Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta, com (E+) e sem (E-) endotélio, isolados de ratos Controle e ANG II, pré-contraídos com FE (0.1 $\mu$ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ epm das porcentagens de relaxamento, (n) tamanho das amostras. \* $P$ <0,01 comparado com ANG II.

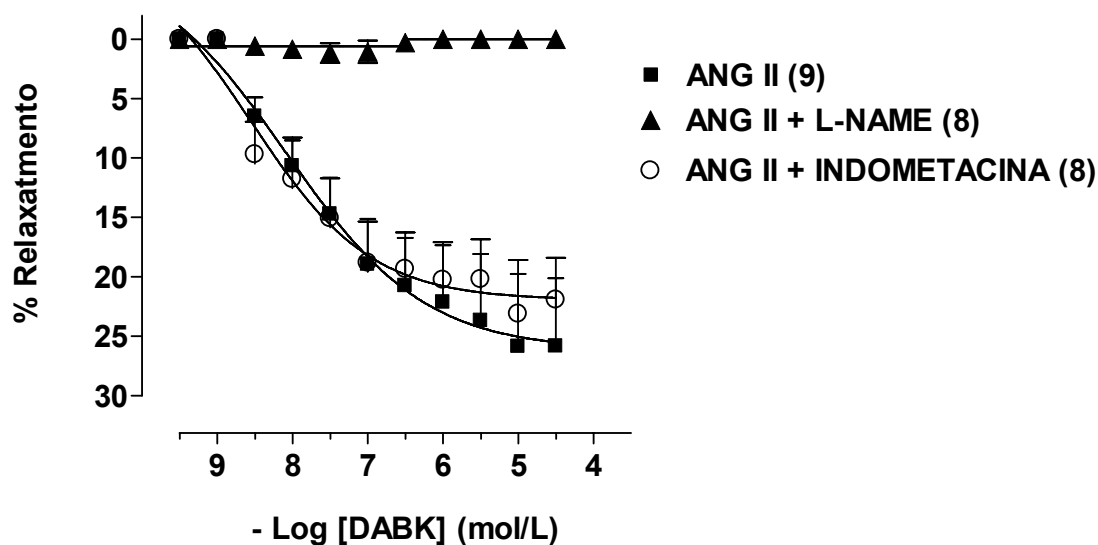


**Figura 10** – Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II incubados ou não com 10 $\mu$ M HOE 140 (ANG II+HOE 140) ou com 10 $\mu$ M DAL, antagonista de receptor B1, (ANG II+DAL) e pré-contraídos com FE (0.1 $\mu$ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ epm das porcentagens de relaxamento. (n) tamanho das amostras.

**Tabela 2** – Resposta máxima (%) à DABK, agonista de receptor B1, em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, incubados ou não com antagonista de receptor B2, HOE-140 ou antagonista de receptor B1, DAL.

| Grupo            | Relaxamento máximo (%)    |
|------------------|---------------------------|
| ANG II E+        | 27.60 $\pm$ 3.32<br>(8)   |
| ANG II + HOE 140 | 27.15 $\pm$ 2.57<br>(7)   |
| ANG II + DAL     | 0.035 $\pm$ 0.57 *<br>(7) |

Resultados expressos como média $\pm$ epm, (n) número de animais por grupo.  
\* $P$ <0,01 comparado com ANG II.

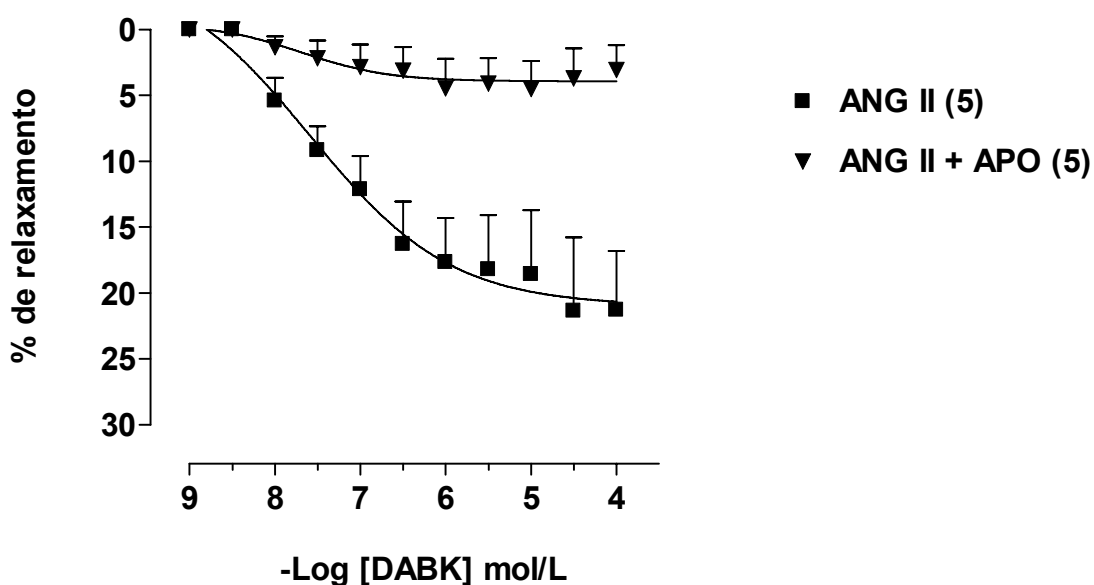


**Figura 11** – Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II incubados ou não com 5 $\mu$ M Indometacina (ANG II+IND) ou com 10 $\mu$ M L-NAME (ANG II+L-NAME) e pré-contraídos com FE (0.1 $\mu$ M). Os valores foram expressos como média $\pm$ epm das porcentagens de relaxamento. (n) tamanho das amostras.

**Tabela 3** – Resposta máxima (%) ao agonista de receptor B1, DABK, em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, incubados ou não com indometacina ou L-NAME.

| Grupo               | Relaxamento máximo (%)  |
|---------------------|-------------------------|
| ANG II E+           | 29.70 $\pm$ 5.08<br>(9) |
| ANG II+INDOMETACINA | 22.25 $\pm$ 3.55<br>(8) |
| ANG II + L-NAME     | 0.60 $\pm$ 3.95*<br>(8) |

Resultados expressos como média $\pm$ epm, (n) número de animais por grupo.  
\* $P$ <0,01 comparado com ANG II.



**Figura 12** – Curvas concentração-efeito à DABK, agonista de receptor B1, obtidas em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II, pré-contráidos com FE (0.1 $\mu$ M) e anéis de aorta isolados de ratos ANG II e ratos ANG II tratados com apocinina na água de beber (ANG II+APO). Os valores foram expressos como média $\pm$ epm das porcentagens de relaxamento. (n) tamanho das amostras.

**Tabela 4** – Resposta máxima (%) à DABK em anéis de aorta com endotélio, isolados de ratos ANG II e ratos ANG II+Apocinina.

| Grupos     | Relaxamento máximo (%)  |
|------------|-------------------------|
| ANG II     | 20.99 $\pm$ 2.84<br>(5) |
| ANG II+APO | 3.94 $\pm$ 0.83*<br>(5) |

Resultados expressos como média $\pm$ epm, (n) número de animais por grupo.  
\* $P$ <0,01 comparado com ANG II.

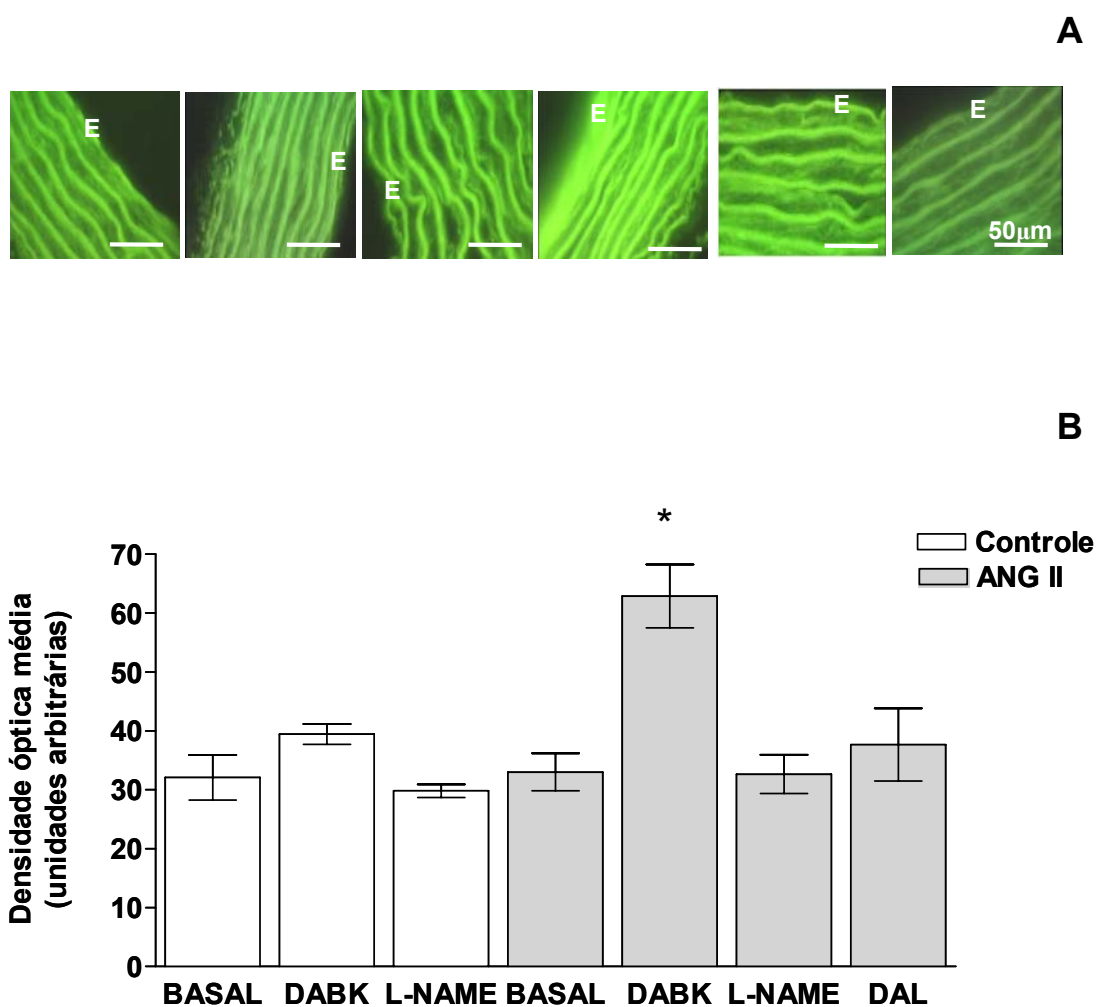
#### **4.9 Estudo da produção de óxido nítrico (NO) em cortes histológicos de aorta de ratos**

Para confirmarmos os dados funcionais que indicavam que a resposta vasodilatadora da DABK em aorta de ratos ANG II era dependente de NO, aferimos a geração de NO em cortes de aorta dos ratos ANG II e Controle, antes e após estímulo com agonista B1, DABK.

Como demonstrado na figura 13, observamos que os cortes de aorta dos animais Controle e ANG II apresentaram produção basal de NO. A produção de NO nos cortes de aorta do grupo ANG II após estímulo com DABK (10 $\mu$ M) foi duas vezes maior do que a produção basal, confirmando que a ativação de receptor B1 por seu agonista DABK na aorta de ratos ANG II induz a geração de NO.

No grupo Controle o estímulo com DABK (10 $\mu$ M) não alterou a produção basal de NO nos cortes de aorta Controle, confirmando os resultados obtidos com reatividade vascular, onde o agonista B1 não causou nenhum tipo de alteração do tônus vascular na aorta do grupo Controle.

A incubação com L-NAME (10 $\mu$ M) bloqueou a produção de NO induzida pela DABK em cortes de aorta dos animais ANG II (Fig. 13 A, B). O antagonismo de receptor B1 nos cortes de aorta com DAL (10 $\mu$ M), bloqueou a geração de NO induzida pela DABK. (Fig. 13 A, B).



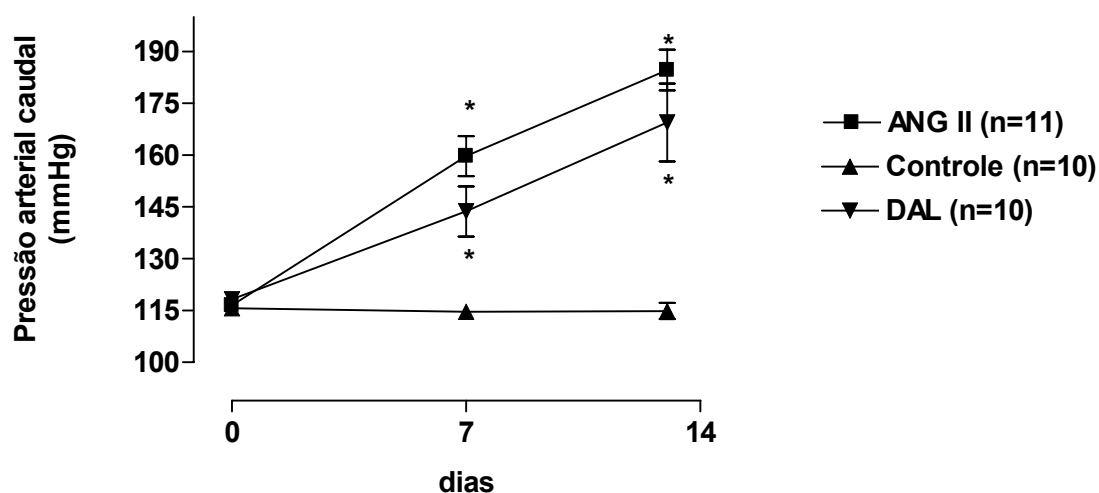
**Figura 13** – **A)** Imagens representativas da produção de óxido nítrico basal e após estímulo com: DABK, DABK após incubação com L-NAME e DABK após incubação com DAL em cortes de aorta de ratos Controle e ANG II, onde E indica a camada endotelial. **B)** Quantificação da produção de óxido nítrico por intensidade de fluorescência em cortes de aorta na condição basal, estimulado com DABK e estimulado com DABK após incubação com L-NAME ou DAL. Valores expressos como média±epm, n=4 por grupo. \*\* $P < 0,05$  comparado com ANG II basal.



#### 4.10 Efeito do antagonismo de receptor B1 *in vivo* em ratos ANG II

##### 4.10.1 Pressão arterial

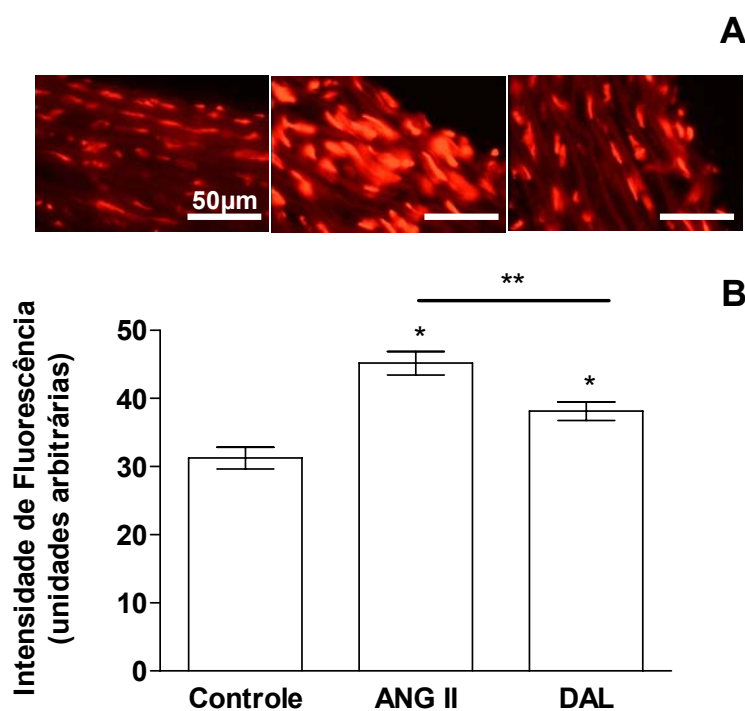
Observamos que não houve diferença nos níveis pressóricos de ratos ANG II e DAL. Entretanto os níveis pressóricos nestes dois grupos foram diferentes aos do grupo Controle nos tempos 7 e 13 dias após implante das mini-bombas de infusão osmótica (Fig. 14).



**Figura 14** – Evolução temporal da pressão arterial caudal (mmHg) de ratos ANG II, Controle e DAL nos tempos zero, sete e treze dias após implante da mini-bomba de infusão. Os valores foram expressos como média  $\pm$  epm da pressão arterial caudal. \* $P < 0,05$  comparado com Controle, (n) representa o tamanho das amostras.

#### 4.10.2 Geração de EROS na aorta de ratos ANG II após antagonismo de receptor B1

Nas imagens abaixo (Fig. 15A) a geração de EROs pode ser observada nos núcleos celulares que emitem fluorescência vermelha. Como descrito anteriormente, a infusão de Ang II aumentou a geração de EROs na aorta de ratos em relação à geração na aorta dos ratos Controle. O antagonismo de receptor B1 reduziu significativamente a geração de EROs na aorta dos ratos DAL, mas não tornou esta igual à geração nas aortas do grupo Controle (Fig. 15B).

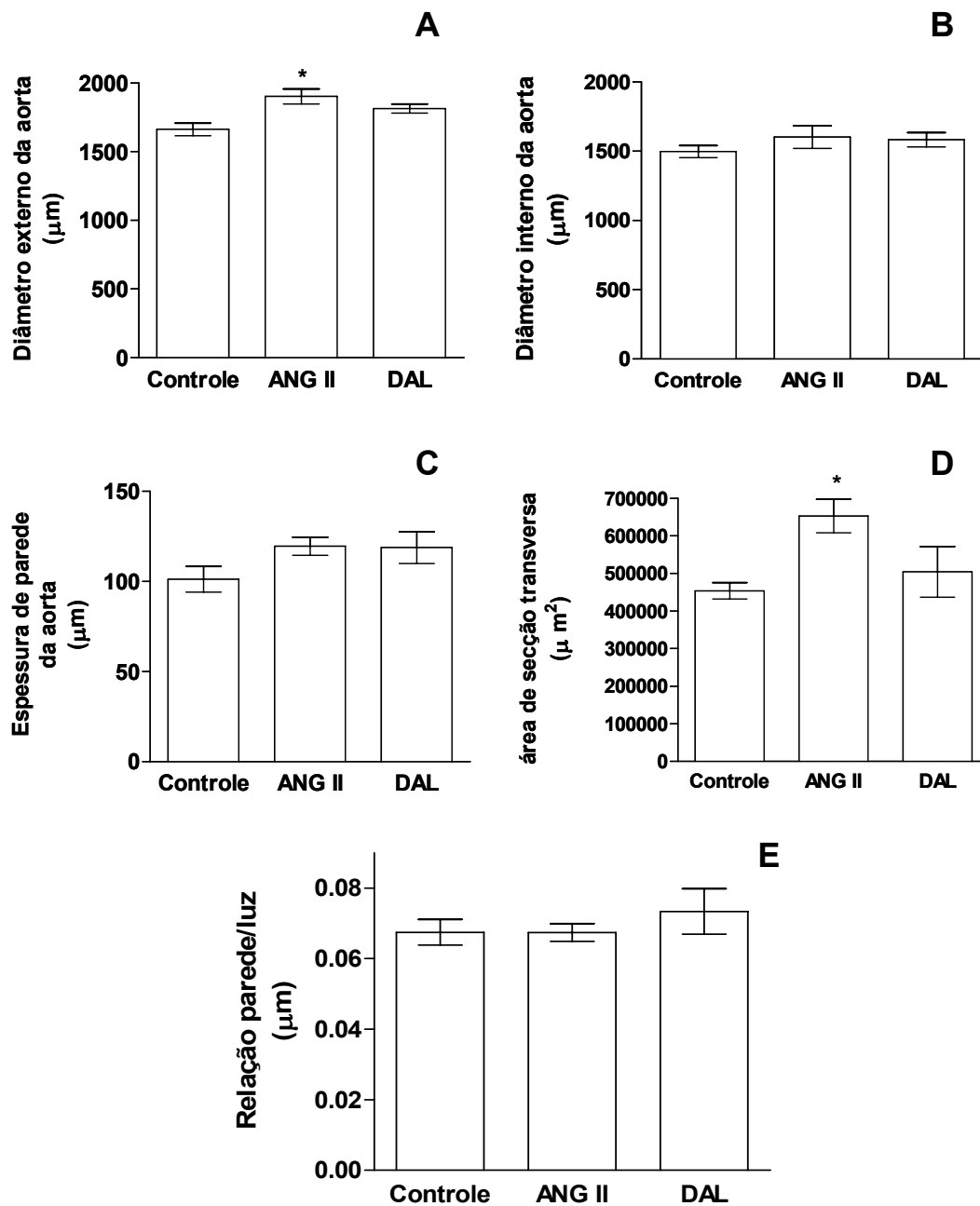


**Figura 15** - Determinação da geração de EROs em cortes de aorta de ratos ANG II, Controle e DAL. **A)** Imagens representativas da geração de espécies reativas em cortes de aorta. **B)** Quantificação da geração de EROs por intensidade de fluorescência em cortes de aorta. Valores expressos como média±epm, n=6 animais/grupo. \* $P<0,05$  em relação ao Controle, \*\* $P<0,05$  em relação ANG II.

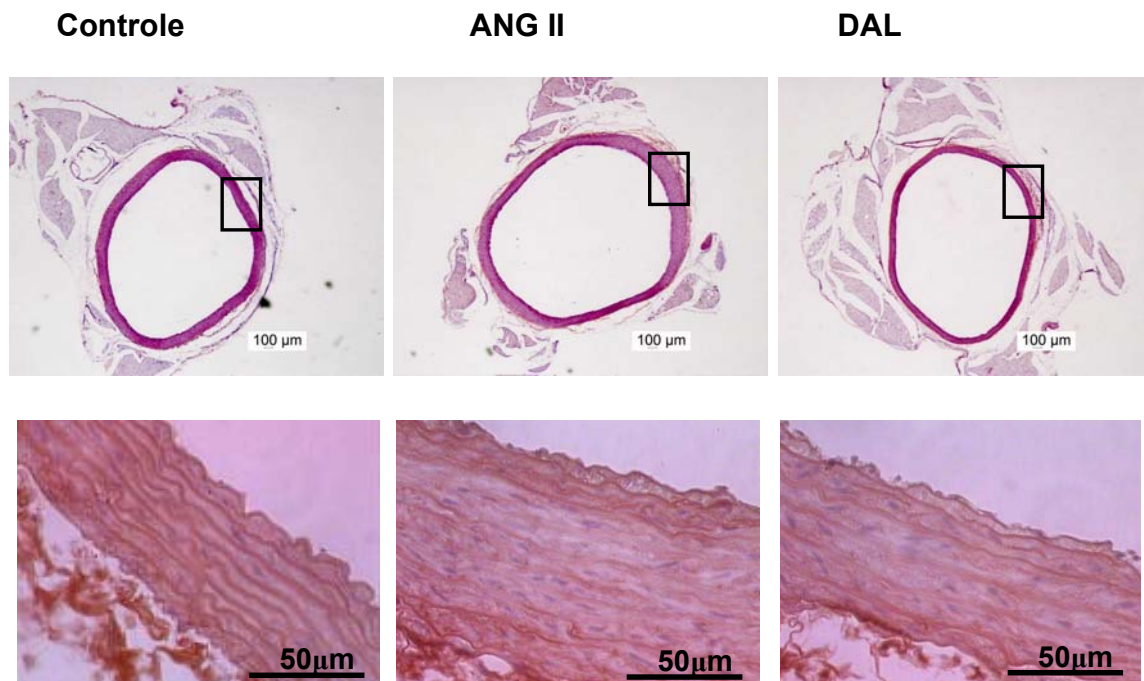
#### **4.10.3 Morfometria de aorta de ratos ANG II após antagonismo de receptores B1**

Através de cortes histológicos de aorta foi possível observar que a infusão de Ang II causou aumento do diâmetro externo (Fig. 16A) e da área de secção transversa (Fig. 16D) neste vaso sanguíneo quando comparado com os mesmos parâmetros nas aortas de ratos Controle, indicando que a infusão de Ang II causou hipertrofia na aorta de ratos Wistar. Entretanto, não observamos alterações no diâmetro interno (Fig. 16B), na espessura da parede (Fig. 16C) e na relação parede/luz (Fig. 16E) da aorta.

A infusão simultânea do antagonista de receptor B1, DAL com a Ang II reduziu o desenvolvimento de hipertrofia observada na aorta dos ratos ANG II (Fig. 16 A, D), mas, não alterou o diâmetro interno (Fig. 16B), a espessura da parede (Fig. 16C) e a relação parede/luz (Fig. 16E) da aorta. Na figura 17 estão imagens representativas das aortas dos diferentes grupos.



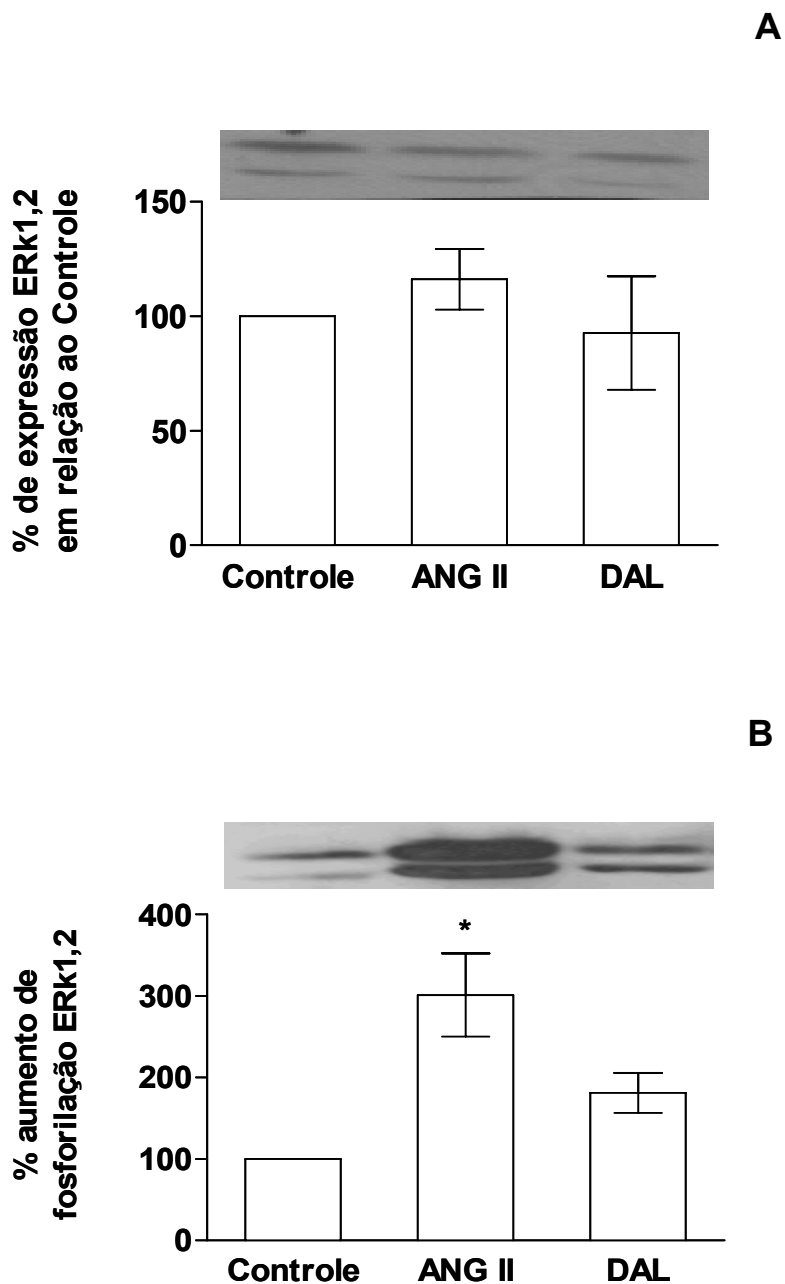
**Figura 16** – Morfometria de aorta de ratos Controle, ANG II e DAL. **A)** Diâmetro externo, **B)** diâmetro interno, **C)** espessura da parede vascular, **D)** área de secção transversa, **E)** relação parede/luz. As barras representam as médias±epm, n=5 ratos/ grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao Controle.



**Figura 17** - Painel de cima: Imagens representativas dos cortes histológicos de aorta de ratos Controle, ANG II e DAL coradas com hematoxilina-eosina, obtidas com objetiva com aumento de 20X. As barras representam 100µm. Painel de baixo: Ampliação da região selecionada no painel de cima. Imagens representativas dos cortes histológicos de aorta de ratos Controle, ANG II e DAL coradas com hematoxilina-eosina obtidas com objetiva com aumento de 400X. As barras representam 50 µm.

#### **4.10.4 Expressão de MAPKs (ERK1/2) total e fosforilada na aorta de ratos após antagonismo de receptor B1**

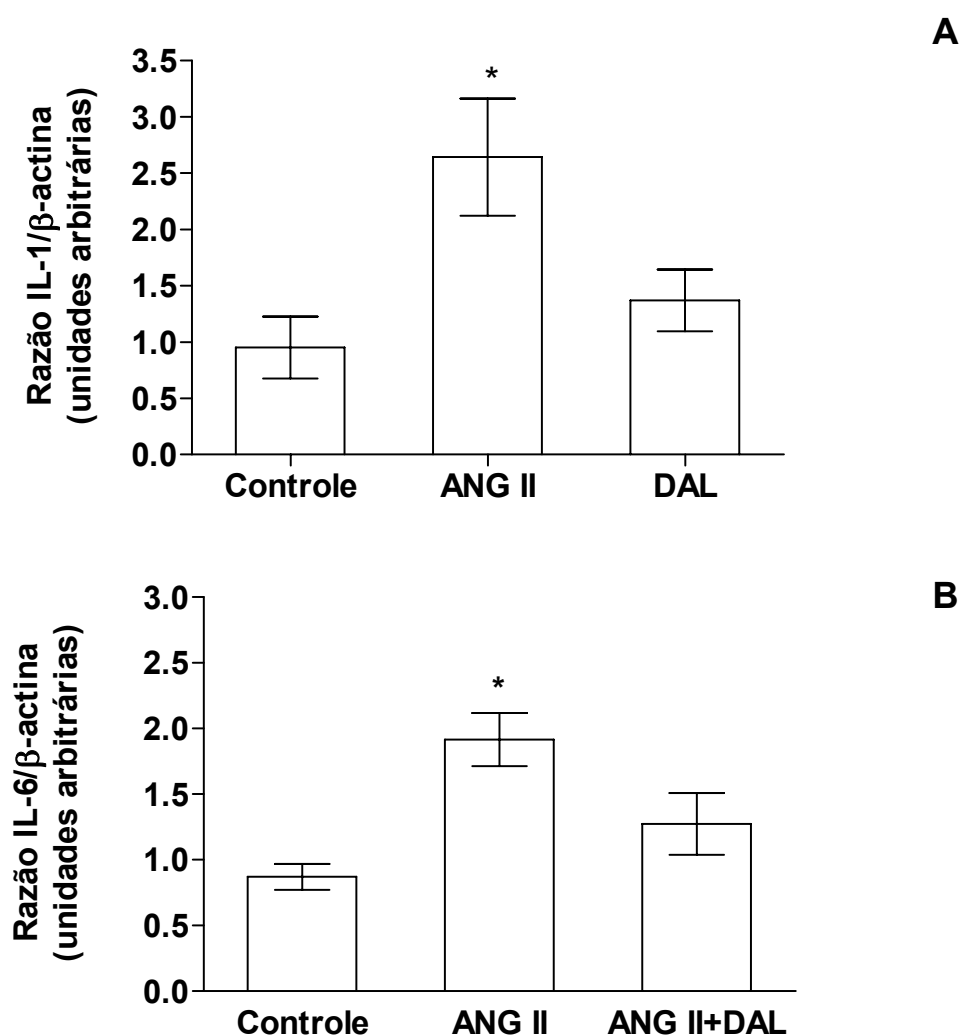
Com a técnica de *immunoblotting* foi possível observar que a expressão total das MAPKs, ERK1/2, não diferia entre os grupos ANG II, Controle e DAL (Fig. 18A). Por outro lado, quando analisada a expressão da fração fosforilada das ERK1/2 houve aumento de 200% na expressão dessas proteínas na aorta dos ratos ANG II, quando comparada com a expressão na aorta dos ratos Controle. O tratamento dos ratos ANG II, com antagonista de receptor B1 (ratos DAL), reduziu a expressão da fração fosforilada, tornando esta apenas 100% maior que a expressão na aorta dos animais Controle (Fig. 18B). Esses resultados indicam a ativação das ERK1/2, uma vez que, essas proteínas encontram-se ativas quando fosforiladas, dessa forma, estes experimentos sugerem uma participação dos receptores B1 na ativação das ERK1/2 na aorta de ratos que recebem infusão de Ang II.



**Figura 18** – *Immunoblotting* para (A) ERK 1/2 total e (B) ERK1/2 fosforilada em aorta de ratos ANG II, ratos DAL e Controle. As barras representam as médias $\pm$ epm, n=3 ratos/grupo, da expressão total em relação ao Controle (100%) e a porcentagem de aumento de expressão da fração fosforilada em relação à expressão no grupo Controle (100%). \* $P < 0,05$  em relação ao Controle.

#### 4.10.5 Expressão gênica de IL-1 $\beta$ e IL-6 em aorta de ratos ANG II após antagonismo de receptor B1

Com a técnica de RT-PCR em tempo real observamos que havia aumento da expressão gênica de IL-1 $\beta$  (Fig 19A) e de IL-6 (Fig 19B) na aorta de ratos ANG II quando comparada com a expressão na aorta dos ratos Controle. Observamos também, que o antagonismo de receptor B1 reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 na aorta dos DAL, tornando esta semelhante a dos ratos Controle.

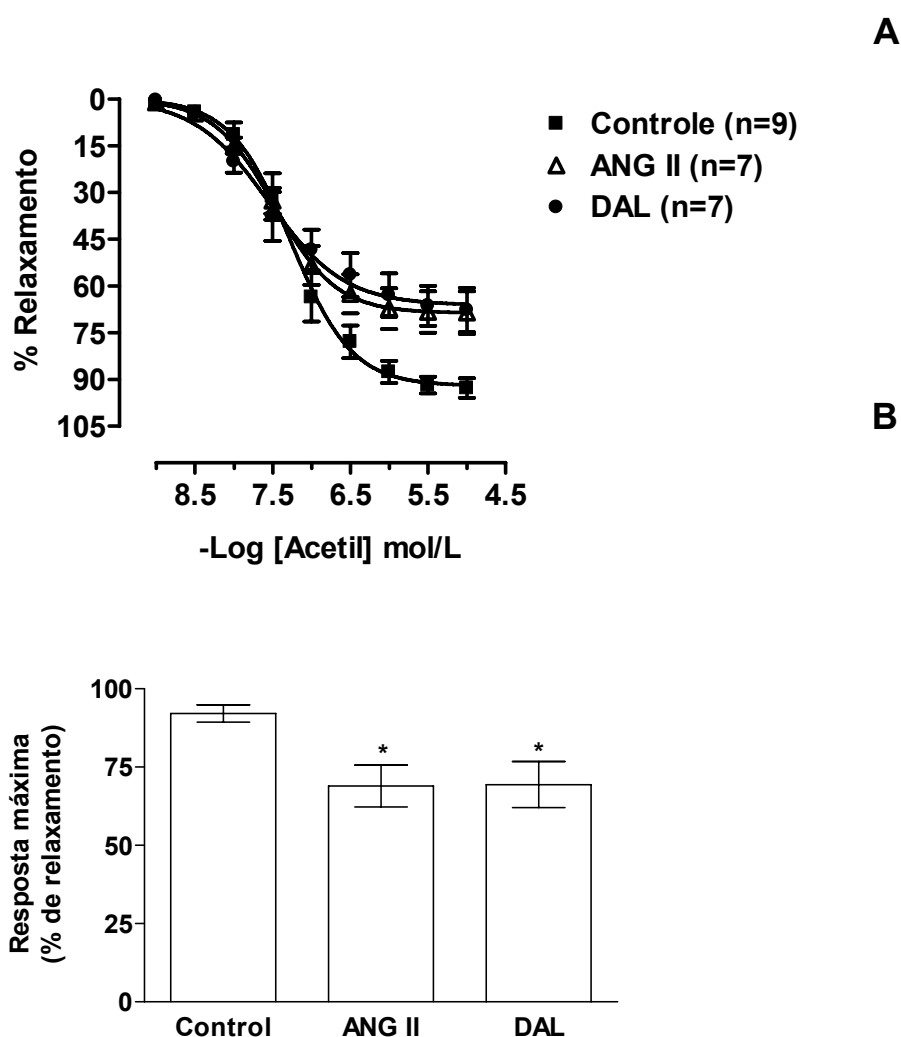


**Figura 19** - Expressão gênica de **(A)** IL-1 $\beta$  (n=10 ratos/grupo) e **(B)** IL-6 (n=6 ratos/grupo) na aorta dos ratos ANG II, Controle e DAL realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real. As barras representam as médias  $\pm$  epm. \* $P < 0,01$  em comparação ao Controle.



#### 4.10.6 Reatividade em anéis de aorta com endotélio para Acetilcolina após antagonismo de receptor B1 em ratos ANG II

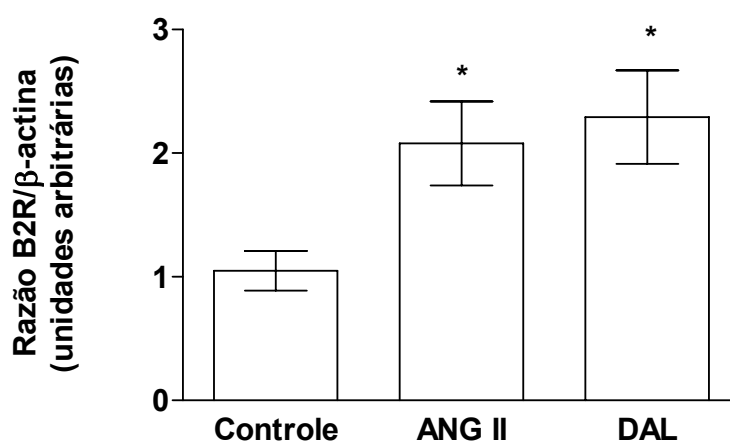
Observamos que a infusão de Ang II reduziu a resposta máxima dos anéis de aorta para acetilcolina quando comparada com a resposta nos anéis de aorta dos ratos Controle, o que nos indica disfunção endotelial na aorta dos ratos ANG II. Esta resposta diminuída à acetilcolina não foi alterada pela infusão simultânea de Ang II e do antagonista de receptor B1, DAL (Fig.20 A e B).



**Figura 20 – A)** CCE à Acetilcolina obtidas em anéis de aorta com endotélio isolados de ratos Controle, ANG II e DAL. **B)** Resposta máxima para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio isolados de ratos Controle, ANG II e DAL. Os valores foram expressos como média±epm das porcentagens de relaxamento. (n) tamanho das amostras. \* $P < 0,05$  comparado com Controle.

#### 4.10.7 Efeito do antagonismo de receptor B1 sobre a expressão de receptores B2 de cininas na aorta de ratos ANG II

Observamos que a aorta dos ratos ANG II e DAL apresentam aumento da expressão gênica de receptores B2 de BK quando comparada com a expressão na aorta dos ratos Controle (Fig. 21).



**Figura 21** - Expressão de RNAm de receptor B2 realizada com a técnica de PCR em Tempo real na aorta de ratos ANG II, Controle e DAL. Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizadas pela expressão de RNAm de  $\beta$ -actina. As barras representam as médias  $\pm$  epm da densidade óptica, n=5 aortas/grupo \* $P$ <0,05 em relação ao Controle.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho caracterizamos dois novos pontos de interação entre os SCC e SRA no sistema cardiovascular. Inicialmente observamos que a infusão de Ang II induz a expressão de receptor B1 na aorta de ratos Wistar, indicando uma função moduladora da Ang II na expressão de receptores de cininas. Verificamos também que o receptor B1 atua de maneira sinérgica com a Ang II, contribuindo para alguns de seus efeitos lesivos na vasculatura.

Algumas hipóteses podem ser aventadas na tentativa de esclarecer os mecanismos responsáveis pela indução da expressão de receptor B1 pela Ang II. Uma delas seria a elevação do nível pressórico induzido pela Ang II.

No presente trabalho observamos que o tratamento dos ratos ANG II com inibidor da NAD(P)H oxidase reduz a expressão de receptor B1, sem alterar os níveis pressóricos desses animais. Esses dados estão de acordo com resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo onde observamos o receptor B1 não se expressa no sistema cardiovascular de ratos com hipertensão genética SHR (FERNANDES et al., 2005) e também com aqueles descritos por Petchu et al. (2005), onde a infusão de Ang II em doses sub-pressóricas induziu a expressão de receptor B1 na medula espinhal de ratos. Além disso, estudo realizado em cultura de células de MLV, condição onde não há interferência de efeitos hemodinâmicos, demonstra que a incubação dessas células com Ang II induz a expressão de receptor B1 (KINTSURASHIVILI et al., 2001), confirmando a hipótese de que a indução deste receptor por Ang II parece não ser secundária ao aumento de pressão arterial.

A Ang II é considerada um mediador pró-inflamatório em diversos tecidos inclusive na vasculatura. Estes efeitos estariam relacionados primariamente com a geração de EROs e aumento do estresse oxidativo, que via NF- $\kappa$ B pode aumentar a expressão de moléculas pró-inflamatórias (TOUYZ, 2003). Demonstramos que a infusão de Ang II induz a expressão de receptor B1 na aorta concomitantemente com aumento da geração de  $O_2^-$  e da atividade do NF- $\kappa$ B neste vaso sanguíneo.

Observamos também que o tratamento com apocinina, inibidor da NADPH oxidase, reduziu a geração de  $O_2^-$ , a atividade do NF- $\kappa$ B e a expressão de B1 na aorta de ratos, sugerindo uma relação do  $O_2^-$  com a expressão destes receptores.

De fato, o estresse oxidativo ou as EROs, como  $O_2^-$ , são considerados potentes ativadores do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (BRASIER et al., 2000). A regulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B se dá pela interação com uma proteína inibitória chamada I $\kappa$ B. Na maioria das células o NF- $\kappa$ B é encontrado no citoplasma associado ao I $\kappa$ B, que inibe a translocação do fator para o núcleo. A estimulação celular por uma série de fatores, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, infecções virais e  $O_2^-$ , ocasiona rápida fosforilação e poliubiquitinação do I $\kappa$ B, o que leva a degradação desta proteína. A degradação do I $\kappa$ B permite a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde irá regular a transcrição de uma série de genes (GHOSH et al., 2002, LI et al., 2002), inclusive do receptor B1 (SCHANSTRA et al., 1998, NI et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004).

A indução da expressão de receptor B1 por EROs foi inicialmente sugerida por Petchu et al. (2005). Esses autores observaram que a infusão de Ang II poderia induzir a expressão de receptor B1 na coluna espinal de ratos e que o tratamento antioxidante reduzia a expressão deste receptor. Entretanto, os autores não demonstraram a co-localização de EROs, aumentadas pela infusão de Ang II, e receptor B1, nem tão pouco demonstraram a expressão deste receptor no sistema cardiovascular de ratos. De forma que, o nosso estudo é o primeiro a demonstrar uma relação direta entre a Ang II, as EROs e a expressão de receptor B1 no sistema cardiovascular de ratos hipertensos.

No modelo de hipertensão utilizado em nosso estudo, a infusão de Ang II aumentou a expressão gênica de IL-1 $\beta$  e IL-6 no mesmo vaso sanguíneo onde induziu a expressão de receptor B1, o que poderia sugerir uma participação destas citocinas na expressão dos receptores de cininas. A indução de receptor B1, por estímulos como LPS e TNF- $\alpha$ , envolve a liberação de citocinas presentes no processo inflamatório (MCLEAN et al., 2000) e foi demonstrado recentemente por Bawolak e colaboradores (2008) que a injeção de LPS em coelhos induzia a expressão de receptor B1, o que seria acompanhado do aumento de níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ .

As interleucinas também estão envolvidas no processo de “auto-regulação” da expressão de receptor B1 por seus agonistas. Alguns autores descrevem este receptor como um “auto-regulador” de sua expressão o que dependeria da geração de IL-1 $\beta$  e ativação do NF- $\kappa$ B (SCHANSTRA et al., 1998; MCLEAN, 2000). De fato, observamos que o antagonismo do receptor B1 reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6, o que poderia sugerir a participação das citocinas na “auto-indução” do receptor B1, entretanto experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Está bem estabelecido que as MAPKs representam uma das mais importantes vias de sinalização celular em mamíferos. A ativação da cascata de sinalização das MAPKs pode acontecer por diversos estímulos (KYRIAKIS et al., 2001) como estiramento mecânico, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (MARCEU et al., 1998; PRADO et al., 2002; TOUYZ et al., 2003). Alguns autores sugerem ainda que a indução *in vitro* e *in vivo* da expressão de receptores B1 pode envolver a ativação de proteínas da família das MAPKs (LARRIVÉ et al., 1998; CAMPOS et al., 1999). Medeiros et al. (2004) descreveram que a indução da expressão de receptor B1 na veia porta *in vitro* envolve a ativação da subunidade p38<sup>MAPK</sup>, JNK juntamente com a ativação do NF- $\kappa$ B.

Os mecanismos envolvidos na ativação de MAPKs e NF- $\kappa$ B ainda não estão completamente elucidados. Alguns estudos sugerem que a p38<sup>MAPK</sup> pode ativar o NF- $\kappa$ B, outros descrevem que esta proteína pode apenas aumentar o recrutamento do NF- $\kappa$ B para determinados genes (SACCANI et al., 2002; TSAI et al., 2003). Até o presente momento não existem estudos que caracterizem a participação das MAPKs na indução de receptor B1 *in vivo* pela Ang II, portanto, estudos adicionais seriam necessários para esclarecer como a interação entre MAPKs e NF- $\kappa$ B poderiam modular a expressão de receptores de cininas. Dessa forma, o que nós podemos sugerir com nosso estudo é que a modulação da expressão de receptor B1 pela Ang II pode ser mediada, via receptores AT1, pela ativação do sistema NADPH oxidase e conseqüentemente pela geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que por sua vez, pode estimular a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e induzir a expressão do receptor B1 na aorta de ratos.

A expressão de receptor B1 no sistema cardiovascular vem sendo demonstrada em artérias, veias e no tecido cardíaco de diversas espécies e modelos de inflamação, estes estudos também mostram uma heterogeneidade de resultados quanto a sua ativação (MCLEAN et al., 2000).

Uma vez que a expressão de receptor B1, em ratos hipertensos por infusão de Ang II, foi identificada no MLV e nas células endoteliais de aorta torna-se de grande importância avaliar o papel destes receptores sobre o tônus vascular e para tanto foram construídas CCE à DABK, agonista específico de receptores B1.

Verificamos que nos anéis de aorta isolados de ratos ANG II, a DABK causou vasodilatação dependente de endotélio, pois a remoção mecânica do endotélio aboliu a resposta a esse agonista. Quando os anéis de aorta de ratos ANG II foram tratados com inibidor da NO sintase, L-NAME, a resposta vasodilatadora à DABK foi abolida. Entretanto, o tratamento de anéis de aorta de ratos ANG II com inibidor da ciclooxigenase, indometacina, não alterou a resposta à DABK, sugerindo que a vasodilatação causada pela ativação de receptor B1 na aorta de ratos hipertensos por infusão de Ang II é mediada pelo NO e não envolve a participação de prostaglandinas vasodilatadoras.

Nossos dados estão de acordo com o observado em modelos de inflamação onde o agonista de receptor B1 causou vasodilatação dependente do endotélio na circulação coronária de ratos (MCLEAN et al., 1999), boi (DRUMMOND, 1995b) e porcos (PRUNEAU et al., 1996) e também em arteríolas mesentéricas e artéria carótida de coelho (PRUNEAU et al., 1993). Além disso, trabalhos realizados em carótida de diversas espécies animais como de coelho (PRUNEAU et al., 1993) de porco (PRUNEAU et al., 1996), boi (DRUMMOND et al., 1995a) e humanos (DRUMMOND et al., 1995b) demonstraram que vasodilatação mediada pelo receptor B1 não envolve a ativação da ciclooxigenase e geração de prostaciclina, mas depende da geração de NO.

Ao contrário do demonstrado em nosso trabalho alguns estudos sugerem que na circulação coronária de ratos e na artéria mesentérica de coelhos a vasodilatação causada pelo receptor B1 envolve a geração de eicosanóides, em particular de

prostaciclina (MCLEAN et al., 1999; DEBLOIS et al., 1987). As discrepâncias entre os referidos trabalhos podem estar relacionadas com as diferentes espécies animais, e/ou a diversidade de vasos e/ou a sensibilidade dos vasos estudados aos mediadores da vasodilatação. Por exemplo, a aorta de coelhos não relaxa na presença de PGI<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub> (FORSTERMANN et al., 1984), mas por outro lado, em arteríolas mesentéricas de coelho e na circulação coronária de ratos estas prostaciclina causam potente vasodilatação (DEMIREL et al., 1991).

Alguns estudos descrevem ainda que a ativação de receptor B<sub>1</sub> pode causar constrição em aorta de coelho (LEVESQUE et al., 1995; BAWOLAK et al., 2007), em veia mesentérica de coelho (REGOLI et al., 1978), em veia renal de porcos (RIZZI et al., 1997) e em veia e artéria umbilical de humanos (GOBEIL et al., 1996; ABBAS et al., 1998). Essa vasoconstrição geralmente é independente do endotélio e envolve a ativação de PKC e liberação de cálcio (MCLEAN et al., 2000). Portanto, podemos concluir com os dados da literatura e com nossos resultados que a reatividade vascular causada pela ativação do receptor B<sub>1</sub> é bastante heterogênea e depende da espécie animal e do vaso estudado principalmente.

Os experimentos de reatividade para DABK em aorta isolada foram realizados na presença do iECA, enalaprilato, a fim de reduzir a metabolização da DABK pela ECA presente na aorta. Alguns autores sugerem que os inibidores da ECA possam atuar como agonistas de receptores B<sub>1</sub> em culturas de células endoteliais e que esta ativação levaria a geração de NO e aumento de cálcio intracelular (IGNJATOVIC et al., 2002).

Em nossos experimentos a presença do enalaprilato na cuba de reatividade vascular não alterou o tônus basal e o tônus da aorta após estímulo com fenilefrina, o que nos indica que neste leito vascular, aparentemente, o enalaprilato não atue como agonista de receptor B<sub>1</sub>. Nossos dados estão em concordância com Fortin et al., 2003, que demonstraram em aorta de coelho e em estômago de camundongos que expressavam receptor B<sub>1</sub>, que os iECA não causavam nenhum tipo de alteração de tônus muscular, indicando que os iECA não atuam como agonistas de receptor B<sub>1</sub> nestes tecidos. Em conjunto podemos sugerir que na aorta de ratos hipertensos por infusão de Ang II o iECA não ativa receptor B<sub>1</sub>.

A injúria vascular e a disfunção endotelial são consideradas os principais eventos para o desenvolvimento de doenças vasculares. Como os receptores B1 são induzidos em situações de injúria tecidual e inflamação (MCLEAN et al., 2000), avaliamos qual o papel desses receptores nas alterações vasculares causadas pela Ang II nos ratos Wistar.

Assim demonstramos que a infusão de Ang II além de ter aumentado a geração de EROs em aorta de ratos Wistar, também causou disfunção endotelial e hipertrofia. Além disso, a Ang II aumentou a fosforilação das ERK1/2 e a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 o que nos dá indícios de inflamação e disfunção vascular neste modelo. Nossos resultados estão de acordo com estudos realizados em humanos e animais de experimentação que demonstram que a Ang II pode estimular hipertrofia de células do MLV por aumentar a síntese de DNA e de proteínas (GEISTERFER et al., 1988; GRIFFIN et al., 1991) e também causar disfunção endotelial (RAJAGOPALAN et al., 1996).

Observamos também que o tratamento com antagonista de receptor B1 preveniu o desenvolvimento de hipertrofia, reduziu a geração de EROs, mas não alterou a disfunção endotelial observada na aorta dos ratos hipertensos. Além disso, o antagonista de receptor B1 reduziu a fosforilação das proteínas ERK1/2 e a expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6.

A Ang II causa hipertrofia de MLV via receptor AT1 e vários sinais intracelulares estão relacionados com este efeito inclusive a via das MAPKs (TOUYZ et al., 2003). A ativação dos membros da família das MAPKs, como ERK1/2 e p48<sup>MAPK</sup>, que integram sinais de vários segundos mensageiros podem levar a proliferação e crescimento celular (DAIGLE et al., 2004). De fato, observamos que as aortas dos ratos tratados com Ang II apresentavam, além de hipertrofia e maior geração de EROs, aumento da fosforilação das ERK1/2. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Laplante et al., (2003) onde Ang II, em cultura de células de MLV, ativou ERK1/2 e um tratamento anti-oxidante reduziu a atividade destas proteínas. Foi demonstrado também em MLV que a atividade mitogênica da Ang II envolve a geração de EROs e ativação ERK1/2 e p38<sup>MAPK</sup>. As EROs são produzidas nos vasos sanguíneos principalmente pelo sistema NADH/NADPH oxidase e sugere-se que a ativação do componente p22<sup>phox</sup> é



essencial para o desenvolvimento de hipertrofia de células de MLV (AZUMI et al., 2001).

O antagonismo de receptor B1 reduziu os efeitos hipertróficos da Ang II e também a ativação das MAPKs, sugerindo que esses receptores podem cooperar para os efeitos lesivos da Ang II sobre o MLV.

Nossos experimentos estão de acordo com os descritos por Christopher et al., (2001), onde em cultura de células de MLV de aorta de ratos o receptor B1, induzido por IL-1 $\beta$ , causou fosforilação das proteínas ERK1/2. Essa ativação parece depender da ativação de PKC, da quinase Src e MEK, e causar translocação de suas subunidades para o núcleo, onde ativam fatores de transcrição como c-fos e a formação do complexo AP-1 que levam a proliferação e crescimento celular (GILL et al., 1992; FROST et al., 1994).

Foi descrito recentemente também que a ativação de receptores B1 em cultura de células endoteliais pode ativar MAPK (ERK1/2) e que esta via causaria uma grande produção de NO nestas células pela ativação da enzima NOS induzível (iNOS) (ZANG et al., 2007). Em situações fisiológicas as células endoteliais geram NO principalmente através da enzima NOS endotelial e em situações como inflamação crônica a geração de NO parece depender da ativação da iNOS (MONCADA et al., 1991). Em geral, o NO em baixa concentração tem efeito protetor sobre os vasos sanguíneos, na inflamação, onde é gerado em excesso juntamente com o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, pode contribuir para as lesões vasculares. Esta contribuição se daria especialmente por sua interação com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> causando formação do peróxinitrito (ZAMORA et al., 2002).

De fato, observamos que a infusão de Ang II aumentou a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na aorta de ratos e a ativação de receptor B1 causou geração de NO. Esta molécula vasodilatadora, aparentemente, não está envolvida com proteção vascular no modelo de infusão de Ang II, uma vez que o antagonismo de receptor B1 reduz a geração de NO por esse receptor e previne a hipertrofia induzida pela Ang II. Demonstramos também que o antagonismo de receptor B1 reduziu a geração de EROs na aorta dos ratos hipertensos por infusão de Ang II confirmando a nossa hipótese de que a geração de NO, causada pela ativação do receptor B1 na aorta, pode contribuir para os efeitos lesivos da Ang II neste vaso.

Muitos dos eventos mediados pela ativação de receptores B1 estão envolvidos no processo inflamatório e de maneira geral, levam a geração de IL-1 $\beta$  (MARCEU, 1998; CUNHA et al., 2007).

Existem evidências que marcadores inflamatórios podem estar relacionados com hipertrofia vascular em indivíduos hipertensos e modelos de hipertensão (BAUTISTA, 2003; SANZ-ROSA et al., 2005). Estudos recentes demonstram que animais *knockout* para IL-6 não apresentam disfunção endotelial e hipertrofia vascular quando recebem infusão de Ang II, por apresentarem menor ativação da NADPH oxidase e conseqüente menor geração de EROs (SCHRADER et al., 2007; COLES et al., 2007) confirmando a participação desta citocina nas alterações vasculares causadas pela Ang II.

No presente trabalho a infusão de Ang II aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e IL-6, na aorta de ratos concomitantemente com a disfunção endotelial e hipertrofia vascular e o antagonismo de receptores B1 causou redução da expressão das interleucinas.

A participação das citocinas nos efeitos cardiovasculares do receptor B1 ainda não está bem descrita. Entretanto, nossos resultados nos permitem sugerir que o aumento de expressão de interleucinas pode participar da hipertrofia vascular causada pela Ang II e também dos efeitos do receptor B1 sobre a hipertrofia vascular uma vez que o antagonismo deste receptor reduziu a geração de IL-1 $\beta$  e IL-6.

Como demonstrado na aorta dos ratos hipertensos por infusão de Ang II, existe um desequilíbrio entre a geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e de moléculas anti-oxidantes e este desequilíbrio seria um dos responsáveis pela menor resposta endotelial ao agente vasodilatador, acetilcolina, pela hipertrofia vascular. Em condições fisiológicas as EROs geradas são utilizadas em processos de sinalização celular chamados de sinalização redox, onde pelo menos uma molécula que participa da reação é oxidada pelas EROs, como o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (KOH et al., 2003). No endotélio, por exemplo, o aumento da geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, por aumento da atividade da NAD(P)H oxidase ou por um desacoplamento da NOS, leva a diminuição da biodisponibilidade do NO por uma maior formação de peroxinitrito o que causa disfunção endotelial (LI et al., 2004; CAI et al., 2002).

As aortas dos ratos que receberam infusão de Ang II apresentaram redução da resposta à acetilcolina agente vasodilatador dependente do endotélio, demonstrando portanto, disfunção endotelial neste vaso.

Como descrito anteriormente, as alterações da função endotelial em diversos leitos vasculares pela Ang II pode estar relacionada com aumentar da geração de EROs e redução da expressão da eNOS (CONSTANZO et al., 2003; LI et al., 2004). Entretanto, apesar do antagonismo do receptor B1 reduzir a geração de EROs, esta redução aparentemente não foi suficiente para corrigir a biodisponibilidade do NO e assim corrigir a resposta para à acetilcolina.

A infusão de Ang II em ratos causou hipertensão a qual não foi alterada pelo antagonismo do receptor B1, sugerindo que este receptor não participa do controle da pressão arterial no modelo de hipertensão experimental estudado. Esses resultados estão concordam com os demonstrados em camundongos por Emanuelli et al. (1999) e Pesquero et al. (2000), onde a deleção gênica de receptores B1 não alterou os níveis pressóricos. Por outro lado, em camundongo *knockout* para receptor B2, onde há indução dos receptores B1 no sistema cardiovascular, sua ativação causaria aumento os níveis pressóricos (DUKA et al., 2001) e após estímulos inflamatórios com LPS a ativação do receptor B1 causa hipotensão em coelho (REGOLI et al., 1981) e cachorro (NAKHOSTINE et al., 1993).

Outros autores sugerem também, que este receptor participa no controle central da pressão arterial de ratos SHR (ALVAREZ et al., 1992) e que sua expressão no hipocampo seria responsável pela manutenção dos níveis pressóricos elevados neste modelo de hipertensão experimental (QADRI et al., 2002). Como é possível observar, o envolvimento de receptor B1 sobre o controle da pressão arterial ainda é bastante contraditório e as divergências dos nossos resultados com os trabalhos descritos pode estar relacionada com a espécie e modelo animal estudado e ainda com o tecido onde este receptor foi induzido, no nosso estudo o receptor B1 foi induzido e investigado em um vaso de condutância com participação pouco expressiva no controle da pressão arterial.

Os dados obtidos com o antagonismo de receptor B1 sobre a estrutura a sinalização celular na aorta de ratos hipertensos por infusão de Ang II nos sugerem uma interação sinérgica entre os SRA e SCC.

Em 2000, Abdalla e colaboradores demonstraram através de experimentos realizados em cultura de células que os receptores AT1 de Ang II e B2 de BK formam heterodímeros que levam ao aumento da atividade do receptor AT1. As conseqüência desta heterodimerização AT1/B2 foi descrita pelo mesmo grupo em modelo de pré-eclampsia e em células mesangiais de SHR onde a interação entre estes receptores é responsável pela hiper-responsividade à Ang II (ABDALLA et al., 2001; ABDALLA et al., 2005). Nosso estudo, entretanto é o primeiro a demonstrar que os receptores B1 e AT1 podem interagir de forma que as respostas à Ang II sejam potencializadas, sugerindo um novo ponto de interação entre os SRA e SCC.

Demonstramos também que a infusão de Ang II aumentou a expressão de receptores B2 na aorta dos ratos Wistar. Estes dados estão de acordo com os descritos em miócitos cardíacos (KINTSURASHVILI et al., 2001), em culturas de MLV (TAN et al., 2004) e em camundongos (SHEN et al., 2007) onde a indução deste receptor pela Ang II acontece via AT1. Foi recentemente descrito por Shen et al., 2007 que o tratamento de células do epitélio renal com Ang II aumenta a sinalização mediada pela BK, via receptor B2. Alguns trabalhos sugerem que a ativação do receptor B2 pode causar proteção vascular em alguns modelos experimentais de hipertensão e em humanos, principalmente após o uso de iECA (LINZ et al., 1995; MARCEU 1998).

Sugere-se ainda que o efeito protetor observado com a administração de calicreína sobre a função cardíaca e redução do remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio e esquemia/reperfusão, esteja envolvido com a redução da geração de EROs, da atividade da MAPK e da ativação do NF- $\kappa$ B e ainda com aumento da geração de NO via receptor B2, uma vez que o antagonismo desse receptor com icatiban bloqueou os efeitos benéficos da calicreína (YIN et al., 2005; ÁGATA et al., 2002). De fato, quando o receptor B1 foi antagonizado nos ratos ANG II os efeitos do SCC dependiam do receptor B2, de forma que a redução da hipertrofia vascular, no modelo de hipertensão avaliado, pode ser conseqüência da maior expressão e ativação do

receptor B2. Entretanto, novos estudos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Ao contrário do demonstrado em nosso trabalho, que a ativação de receptor B1 pode contribuir para efeitos lesivos da Ang II na hipertensão, vem sendo sugerido que em modelos experimentais como esquiemia do miocárdio (MAZENOT et al., 2000, LAGNEUX et al., 2003) e infarto do miocárdio (TSCHÖPE et al., 2000) este receptor parece ser reponsável pelo reparo, proteção tecidual (CHAHINE et al., 1993) e angiogênese (EMANUELI et al., 2001).

Lagnex et al. (2003), demonstraram que a infusão de DABK em corações isolados tem efeito protetor após a isquemia/reperfusão neste órgão, e que este efeito seria mediado tanto pelo NO quanto pela liberação de prostanóides. Além disso, a bradicinina em geral tem efeitos opostos aos descritos para Ang II, como efeitos anti-mitótico e anti-proliferativo, anti-oxidante, anti-trombótico e anti-arrítmico (GOHLKE et al., 1994) sendo a maioria destes efeitos mediados pela liberação de NO e prostanóides vasodilatadores (LAGNEX et al., 2003). As discrepâncias entre nossos dados e os descritos pelos autores citados, provavelmente se devem aos diferentes modelos experimentais utilizados.

Observamos também no presente trabalho que a infusão de Ang II e o tratamento com apocinina em ratos Wistar não alteraram o consumo de líquidos e de ração e também não tiveram efeito sobre o ganho de peso nestes animais, indicando que não existe a participação desses parâmetros em nenhum dos resultados encontrados neste estudo.

Em resumo descrevemos que:

- A infusão de Ang II induziu a expressão de receptor B1 na aorta de ratos provavelmente por via pró-oxidativa e ativação do NF- $\kappa$ B.
- A vasodilatação causada pelo agonista de receptor B1, DABK, em aortas de ratos ANG II é dependente de endotélio e de liberação de NO.
- Que a infusão de Ang II causou hipertrofia e disfunção endotelial na aorta, juntamente com aumento da fosforilação das proteínas ERK1/2 e a expressão dos marcadores inflamatórios IL-1 $\beta$  e IL-6 e que estes efeitos podem ter

participação do receptor B1, uma vez que o antagonismo deste receptor reduziu as ações descritas para Ang II.

## 6 CONCLUSÕES

Com os resultados aqui apresentados podemos aventar a hipótese de que a indução de receptor B1 pela Ang II envolve vias de sinalização redox e ativação do NF- $\kappa$ B e que o receptor B1 pode participar do controle do tônus vascular pela geração de NO na aorta de ratos hipertensos por infusão de Ang II.

Além disso, podemos concluir que o receptor B1 participa do efeito pró-inflamatório e hipertrófico da Ang II sobre a vasculatura.

Estes resultados fornecem esclarecimentos importantes sobre os mecanismos envolvidos na modulação do receptor B1 e também sobre a importância da funcionalidade destes receptores no sistema cardiovascular mostrando que as interações entre os SCC e SRA vão além de efeitos antagônicos, uma vez que componentes destes sistemas podem atuar sinergicamente no desenvolvimento da inflamação e hipertrofia vascular.

## REFERÊNCIAS\*

ABBAS, F.; CLAYTON, J.K.; MARSHALL, K.M.; SENIOR, J. Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery. **J. Endocrinol.**, v.156, n.2, p.389–394, 1998.

ABDALLA, S.; ABDEL-BASET, A.; LOTHER, H.; EL MASSIERY, A.; QUITTERER, U. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. **J. Mol. Neurosci.**, v.26, n.2, p.185-92, 2005.

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; EL MASSIERY, A.; QUITTERER, U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. **Nat. Med.**, v.7, n.9, p.1003-9, 2001.

AGATA, J.; CHAO, L.; CHAO, J. Kallikrein gene delivery improves cardiac reserve and attenuates remodeling after myocardial infarction. **Hypertension**, v.40, n.5, p.653-9, 2002.

ALVAREZ, A.L.; et al. Central kininergic system in normotensive and hypertensive rats. **Clin. Sci. (Colch)**, v.82, n.5, p.513-519, 1992.

AUSTIN, C.E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H.E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D.J.; BATHON, J.M. Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.17, p.11420-5, 1997.

AZUMI, H.; INOUE, N.; TAKESHITA, S.; et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. **Circulation**, v.100, p.1494-1498, 1999.

BAAS, A.S.; BERK, B.C. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v.77, n.1, p.29-36, 1995.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



BASCANDS, J.L.; PECHER, C.; ROUAUD, S.; EMOND, C.; TACK, J.L.; BASTIE, M.J.; BURCH, R.; REGOLI, D.; GIROLAMI, J.P. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. **Am. J. Physiol.**, v.264, n.3, p.F548-56, 1993.

BASSO, N.; TERRAGNO, N.A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v.38, n.6, p.1246-9, 2001.

BAUTISTA, L.E. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence, **J. Hum. Hypertens.**, v.17, n.4, p. 223–230, 2003.

BAWOLAK, M.T.; TOUZIN, K.; MOREAU, M.E.; DÉSORMEAUX, A.; ADAM, A.; MARCEAU, F. Cardiovascular expression of inflammatory signaling molecules, the kinin B1 receptor and COX2, in the rabbit: effects of LPS, anti-inflammatory and anti-hypertensive drugs. **Regul. Pept.**, v.146, n. 1-3, p.157-68, 2008.

BECARI C, SIVIERI DO JR, SANTOS CF, MOYSÉS MK, OLIVEIRA EB, SALGADO MC. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.46, n.4, p.498-504, 2005.

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

BLAIS, C.Jr.; DRAPEAU, G.; RAYMOND, P.; LAMONTAGNE, D.; GERVAIS, N.; VENNEMAN, I.; ADAM, A. Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. **Am. J. Physiol.**, v.273, p.H2263-H2271, 1997.

BRASIER, A.R.; JAMALUDDIN, M.; HAN, Y.; PATTERSON, C.; RUNGE, M.S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. **Mol. Cell. Biochem.**, v.212, n.1-2, p.155-69, 2000.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Molecular responses of endothelial tissue to kinins. **Diabetes**, v.45, p.S8-S13, 1996.

CAI, H. et al. NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.48311-48317, 2002.

CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. **Br. J. Pharmacol.**, v.127, n.8, p.1851-9, 1999.

CHAHINE, R. et al Protective effects of bradykinin on ischaemic heart: implication of the B1 receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v.108, p.318-322, 1993.

CHRISTOPHER, J.; VELARDE, V.; JAFFA, A.A. Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. **Hypertension**, v.38, n.3, p.602-5, 2001.

COLES, B.; FIELDING, C.A.; ROSE-JOHN, S.; SCHELLER, J.; JONES, S.A.; O'DONNELL, V.B. Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. **Am. J. Pathol.**, v.171, n.1, p.315-25, 2007.

CONSTANZO, A.; MORETTI, F.; BURGIO, V.L.; et al., Endothelial activation by Angiotensin II through NF-kB and p38 pathways: involvement of NF-kB inductive kinase (NIK), free oxygen radicals and selective inhibition by aspirin. **J. Cell Physiol.**, v.195, p.402-403, 2003.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.; FUKADA, S.Y.; GUERRERO, A.T.; SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v.14, n.573, p.221-9, 2007.

DAIGLE, C.; MARTENS, F.M.; GIRARDOT, D.; DAO, H.H.; TOUYZ, R.M.; MOREAU, P. Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. **BMC Cardiovasc. Disord.**, v.10, p.4-6, 2004.

DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. The ability of des-Arg9-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired during in vitro incubation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.142, p.141-144, 1987.

DECARIE, A.; RAYMOND, P.; GERVAIS, N.; COUTURE, R.; ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg<sup>9</sup>]BK: influence of enalaprilat. **Am. J. Physiol.**, v.270, p.H1340-1347, 1996.

DEMIREL, E.; TURKER, R.K. Inhibition of iloprost of the contractile effect of noradrenaline in mesenteric artery rings: evidence for a possible calcium-dependent mechanism. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.42, p.185–189, 1991.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications in kinin-kallikrein system. **JPN J. Pharmacol.**, v.79, p.403-426, 1999.

DRUMMOND, G.R.; COCKS, T.M. Endothelium-dependent relaxation to the B1 kinin receptor agonist des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in human coronary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v.116, p.3083-3085, 1995b.

DRUMMOND, G.R.; COCKS, T.M. Endothelium-dependent relaxation mediated by inducible B1 and B2 constitutive kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, v.116, p.2473-2481, 1995a.

DUKA, I.; KINTSURASHVILI, E.; GAVRAS, I.; JOHNS, C.; BRESNAHAN, M.; GAVRAS, H. Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. **Circ. Res.**, v.88, p.275-281, 2001.

EMANUELI C.; CHAO J.; REGOLI D.; CHAO L.; NI A.; MADEDDU, P. The bradykinin B1 receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.126, n.8, p.1769-1776, 1999.

EMANUELI C.; MINASI, A.; ZACHEO, A.; CHAO, L.; SALIS, M.B.; STRAINO, S.; TOZZI, M.G.; SMITH, R.; GASPA, L.; BIANCHINI, G.; STILLO, F.; CAPOGOSSI, M.C.; MADEDDU, P. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. **Circulation**, v.103, p.152-132, 2001.

EMANUELI, C.; SALIS, M.B.; STACCA, T.; PNTUS, G.; KIRCHMAIR, R.; ISNER, J.M.; PINA, A.; GASPA, L.; REGOLID, C.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; MADEDDU, P. Targeting kinin B1 receptor for therapeutic neovascularization. **Circulation**, v.105, p.360-366, 2002.

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

ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 15, n.6, p. S20-S24.

FAUSSNER, A.; PROUD, D.; TOWNS, M.; BATHON, J.M. Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.5, p.2617-23, 1998.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK, J.; PESCATORE, L.A.; BERTOLINE, M.A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.; SANTOS, C.X. Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.292, n.1, p.C413-22, 2007.

FERNANDES, L.; CERAVOLO, G.S.; FORTES, Z.B.; TOSTES, R.; NIGRO, D.; MORI, M.A.S.; PESQUERO, J.B.; CARVALHO, M.H.C. Modulation of Kinin B1 receptor expression by AT1 receptor activation in hypertensive rats. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE INTERAMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION, 15., 2005, Cancun-México. **Abstracts...** Cancun-México: Interamerican Society Of Hypertension, 2005. v. 8, p. 73.

FERNANDES, L.; CERAVOLO, G.S.; MORI, M.A.S.; PESQUERO, J.B.; CARVALHO, M.H.C. Modulation of Kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. **Peptides**, v.136, n.1-3, p.92-7, 2006.

FERRARIO, C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v.7, n.1, p.3-14, 2006.

FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.18, p.11009-15, 1996.

FORSTERMANN, U.; HERTTING, G.; NEUFANG, B. The importance of endogenous prostaglandins other than prostacyclin, for the modulation of contractility of some rabbit blood vessels. **Br. J. Pharmacol.**, v.81, p.623-630, 1984.

FORTIN, J.P.; GOBEIL, F.; ADAM, A.; REGOLI, D.; MARCEAU, F. Do angiotensin-converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B1 receptor? **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.285, n1., p.H277-82, 2003.

FORTUNO, A.; OLIVAN, S.; BELOQUI, O.; SAN JOSE, G.; MORENO, M.U.; DIEZ, J.; ZALBA, G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. **J. Hypertens.**, v.11, p.2169-75, 2004.

FOUCART, S.; GRODIN, L.; COUTURE, R.; NADEU, R. Modulation of noradrenaline release by B1 and B2 kinin receptor during metabolic anoxia in the rat isolated atria. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.75, p.639-645, 1997.

FROST, J.A.; GEPPERT, T.G.; COBB, M.E.; FERAMISCAR, J.R. A requirement for extracellular signal regulates kinase function in the activation of AP-1 by Ha-Ras phorbol 12-myristate 13 acetate and serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.91, n.9, p.3844-3848, 1994.

GEISTERFER, A.A.T.; PEACH, M.J.; OWENS, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v.62, n. p.749-756, 1988.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v.109, p.S81-S96, 2002. Suppl.

GILL, H.; SHARROCKS, A.D.; SHAW, P.E. Phosphorylation of transcription factor p6ZTCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. **Nature**, v.358, p.414-417, 1992.

GOBEIL, F. et al. Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. **Br. J. Pharmacol.**, v.118, n.2, p.289-294, 1996.

GOHLKE, P.; LINZ, W.; SCHÖLKENS, B.A.; KUWER, I.; BARTENBACH, S.; SCHNELL, A.; UNGER, T. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves cardiac function – role of bradykinin. **Hypertension**, v.23, n.4, p.411-418, 1994.

GOUIN, L.; CARDINAL, R.; ADAM, A.; DRAPEU, G.; NADEU, R. Kinin-induced prolongation of action-potential duration in right ventricular muscle from rat: involvement of B1 and B2 receptors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.28, n.2 p.333-343, 1996.

GRIENDLING, K.K.; USHIO-FUKAI, M.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. **Hypertension**, v.29, n.2, p.366-373, 1997.

GRIFFIN, S.A.; BROWN, W.C.B.; MACPHERSON, F.; MCGRAWTH, J.C.; WILSON, V.G.; KORSGAARD, N.; MULVANY, M.J.; LEVER, A.F. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. **Hypertension**, v.17, n.15, p.626-635, 1991.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.54, n.4, p.469-87, 2003.

HAUSDORFF, W.P. et al., Phosphorylation sites on two domains of the beta2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.12657-12665, 1989.

HESS, J.F.; BORKOWSKY, J.A.; YOUNG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.184, p.260-268, 1992.

IGNJATOVIC, T.; TAN, F.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct action of bradykinin B1 receptor. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.19, p.16847-16852, 2002.

ITO, K.; ZHU, Y.Z.; ZHU, Y.C.; GOHLKE, P.; UNGER, T. Contribution of bradykinin to the cardioprotective action of angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension and after myocardial infarction. **JPN J. Pharmacol.**, v.75, n.4, p.311-318, 1997.

KELLY, D.J.; COX, A.J.; GOW, R.M.; ZHANG, Y.; KEMP, B.E.; GILBERT, R.E. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. **Hypertension**, v.44, n.2, p.195-202, 2004.

KINTSURASHIVILI, E.; DUKA, I.; GAVRAS, I.; JOHNS, C.; FARMAKIOTIS, D.; GAVRAS, H. Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 281, p.H1778-1783, 2001.

KOH, K.K.; AHN, J.Y.; HAN, S.H.; KIM, D.S.; JIN, D.K.; KIM, H.S.; SHIN, M.S.; AHN, TH.; CHOI, I.S.; SHIN, E.K. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.42, n.5, p.905-10, 2003.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Anal. Chem.**, v.70, n.13, p.2446-53, 1998.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, v.81, p.807-869, 2001.

LAGNEUX, C.; ADAM, A.; LAMONTAGNE, D. A study of the mediators involved in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart. **Int. Immunopharmacol.**, v.3, n.10, p.1511-1518, 2003.

LAPLANTE, M.A.; WU, R.; EL MIDAOU, A.; DE CHAMPLAIN, J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, v.5, n.21, p.927-36, 2003.

LARRIVÉ, J.F.; BACHVAROV, D.R.; HOULE, F.; LANDRY, J.; HUOT, J.; MARCEAU, F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. **J. Immunol.**, v.160, n.3, p.1419-1426, 1998.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.285, n.2, p.R277-97, 2003.

LEVESQUE, L.; LARRIVÉE, J.F.; BACHVAROV, D.R.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v.116, n.1, p.1673-9, 1995.

LI, J.M.; SHAH, A.M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.287, n.5, p.R1014-30, 2004.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, p.725–734, 2002.

LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHÖLKENS, B.A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Pharmacol. Rev.**, v.47, n.1, p.25-49, 1995.

MADEDDU, P.; VARONI, M.V.; PALOMBA, D.; EMANUELI, C.; DEMONTIS, M.P.; GLORIOSO, N.; DESSI-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; ANANIA, V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. **Circulation**, v.96, n.10, p.3570-3578, 1997.

MARCEAU, F.; LARRIVÉE, J.F.; BOUTHILLIER J.; BACHVAROVA, M.; HOULE, S.; BACHVAROV, D.R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. **Am. J. Physiol.** v.277, p.R1568–R1578, 1999.

MARCEU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.**, v.50, p.357-386, 1998.

MARIN-CASTAÑO, M.E.; SCHANSTRA, J.P.; NEAU, E.; PRADDAUDE, F.; PECHER, C.; ADER, J.L.; GIROLAMI, J.P.; BASCANDS, J.L. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. **Circulation**, v.105, n.5, p.627-32.

MAZENOT, C.; HERION, D.; RIBUOT C.; MÜLLER-ESTERL, W.; GODIN-RIBOUT, D. Endothelial kinin B1-receptors are induced by myocardial ischaemia-reperfusion in rabbit. **J. Physiol.**, v.530, n.1, p.69-78, 2001.

MCLEAN, P.G.; PERRETI, M.; AHLUWALIA, A. Kinin B1 receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. **Cardiovasc. Res.**, n.48, p.194-210, 2000.



MCLEAN, PG.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. Inducible expression of kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg<sup>9</sup>bradykinin-induced coronary vasodilatation. **Br. J. Pharmacol.**, v.128, n.2, p.275-282, 1999.

MEDEIROS, R.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; FERNADES, E.S.; MORI, M.A.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; AVELLAR, M.C.W.; CAPÔS, M.; CALIXTO, J.B. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways. **Circ. Res.**, n.94, n.10, p.1375-1382, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, n.2, p.109-42, 1991.

NAKHOSTINE, N.; RIBUOT, C.; LAMONTAGNE, D.; NADEAU, R.; COUTURE R. Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinin in anaesthetized dogs. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, n.1, p.71-76, 1993.

NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.5, p.2784-2791, 1998.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA Jr, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.M.; CALIXTO, J.B.; LEWIN G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **PNAS**, v.97, n.14, p.8140-8145, 2000.

PETCHU, M.; ONGALI, B.; EL MIDAOU, A.; DE CHAMPLAIN, J.; COUTURE. R. Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. **Peptides**, v.26, n.8, p.1331-8, 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.29, n.9, p.E45, 2001.

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

PRUNEAU, D.; BELICHARD, P. Induction of bradykinin B<sub>1</sub> receptor-mediated relaxation in the isolated rabbit carotid artery. **Eur. J. Pharmacol.**, v.239, n.1-3, p. 63–67, 1993.

PRUNEAU, D.; LUCCARINI, J.M.; DEFRENE, E.; PAQUET, J.L.; BELICHARD, P. Characterisation of bradykinin receptors from juvenile pig coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.**, v.297, n.1-2, p. 53–60, 1996.

QUADRI, F.; HÄUSER, W.; JÖUREN, O.; DOMINIAK, P. Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.80, n.4, p.258-263, 2002.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, v.32, n.1, p.1-46, 1980.

REGOLI, D.; MARCEAU, F.; BARABE, J. De novo formation of vascular receptors for bradykinin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.56, n., p.674–677, 1978.

REGOLI, D.C.; NSA, A.S.; RIZZI, A.; GOBEIL, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, n.348, p.1-10, 1981.

RIZZI, A.; CALO, G.; AMADESI, S.; REGOLI, D. Kinin B1 and B2 receptors in pig vessels: characterization of two monoreceptor systems. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v.356, p.662–670, 1997.

ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v.156, n.2, p.261-73, 1949.

RUPEREZ, M.; LORENZO, O.; BLANCO-COLIO, L.M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J.; RUIZ-ORTEGA, M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. **Circulation**, v.108, n.12, p.1499-505, 2003.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappaB recruitment. **Nat. Immunol.**, v.3, n.1, p.69–75, 2002.

SANTOS, C.F.; CAPRIO, M.A.; OLIVEIRA, E.B.; SALGADO, M.C.; SCHIPPERS, D.N.; MUNZENMAIER, D.H.; GREENE, A.S. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.285, n.2, p.H775-83, 2003.

SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.6, n.2, p.122-128, 2007.

SANZ-ROSA, D.; OUBIÑA, M.P.; CEDIEL, E.; DE LAS HERAS, N.; VEGAZO, O.; JIMÉNEZ, J.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, n.1, p.H1111-5, 2005.

SCHANSTRA, J.P.; BATAILLÉ, E.; MARIN-CASTAÑO, M.E.; BARASCUD, Y.; HIRTZ, C.; PESQUERO, J.B.; PECHER, C.; GAUTHIER, F.; GIROLAMI, J.; BASCANDS, J. The B1-agonist [des-Arg<sup>10</sup>]-kallidin activates transcription factor NF-κB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. **J. Clin. Invest.**, v.101, n.10, p.2080-2091, 1998.

SCHIFFRIN, E.L. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. **Am. J. Med.**, v.113, n.5, p.409-18, 2002.

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.**, v.266, n.3, p.277-82, 1994.

SCHÖLKENS, B.A. Kinins in the cardiovascular system. **Immunopharmacology**, v.33, n.1-3, p.209-216, 1996.

SCHRADER, L.I.; KINZENBAW, D.A.; JOHNSON, A.W.; FARACI, F.M.; DIDION, S.P. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, n.12, p.2576-81, 2007.

SHEN, B.; HARRISON-BERNARD, L.M.; FULLER, A.J.; VANDERPOOL, V.; SAIFUDEEN, Z.; EL-DAHR, S.S. The Bradykinin B2 receptor gene is a target of angiotensin II type 1 receptor signaling. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.18, n.4, p.1140-1149, 2007.

SILVERSTEIN, R.L.; FENVES, A.Z.; RAM, C.V. ARBs and target organ protection. Exploring benefits beyond their antihypertensive effects. **Postgrad. Med.**, v.116, p.31-38, 2004.

SMITH, J.A.; WEBB, C.; HOLFORD, J.; BURGESS, G.M. Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. **Mol. Pharmacol.**, v.47, n.3, p.525-34, 1995.

SU, J.B.; HOÜEL, R.; HÉLOIRE, F.; BARBE, F.; BEVERELLI, F.; SAMBIN, L.; CASTAIGNE, A.; BERDEAUX, A.; CROZATIER, B.; HITTINGER, L. Stimulation of bradykinin B1 receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs. Comparison with B2 receptor stimulation. **Circulation**, v.101, n.15, p.1848-1853, 2000.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.35, n.6, p.881-900, 2003.

TAN, Y.; HUTCHISON, F.N.; JAFFA, A.A. Mechanisms of angiotensin II-induced expression of B2 receptors. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.286, n.3, p.H929-932, 2004.

TOUYZ, R.M.; TABET, F.; SCHIFFRIN, E.L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.30, n.11, p.860-6, 2003.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-9, 2002.

TSAI, P.W.; SHIAH, S.G.; LIN, M.T.; WU, C.W.; KUO, M.L. Upregulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappaB signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.8, p. 5750-5759, 2003.

TSCHÖPE, C. et al., Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. **J. Card. Fail**, v.3, n.2, p.133-148, 1997.

TSCHÖPE, C.; HERINGER-WALTHER, S.; WALTHER, T. Regulation of the kinin receptor after induction of myocardial infarction: a mini-review. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.6, p.701-708, 2000.

TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. the angiotensin-converting enzyme family: genomics and pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.23, p.177-183, 2002.

URATA, H.; HEALY, B.; STEWARD, R.W.; et al. Angiotensin ii-forming pathways in normal and failing human hearts. **Circ. Res.**, v.66, p.883-889, 1990.

VOORS, A.A.; PINTO, Y.M.; BUIKEMA, H. Dual pathways in angiotensin ii formation in human internal mammary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, v.125, p.1028-1032.

WAGENAAR, L.J.; VOORS, A.A.; BUIKEMA, H.; VAN GILST, W.H. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. **Can. J. Cardiol.**, v.18, n.12, p.1331-1339, 2002.

WOHLFART, P.; DEDIO, J.; WIRTH, K.; SCHÖLKENS, B.A.; WIEMER, G. Different B1 kinin receptor expression and pharmacology in endothelial cells of different origins and species. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.280, n.2, p.1109-1116, 1997.

YIN, H.; CHAO, L.; CHAO, J. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.9, p.8022-30, 2005.

ZAMORA, R.; VODOVOTZ, Y.; BILLIAR, T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. **Mol. Med.**, v.6, n.5, p.347-73, 2000.

ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.O. IL-1beta-induced transcriptional up-regulation of bradykinin B1 and B2 receptors in murine airways. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.36, n.6, p.697-705, 2007.

**ANEXO A**  
**ARTIGOS DE PERIÓDICOS**

**Artigo 1:**

CERAVOLO, G.S.; FERNANDES, L.; MUNHOZ, C.D.; FERNANDES, D.C.; TOSTES, R.C.; LAURINDO, F.R.; SCAVONE, C.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. **Hypertension**, v.50, n.4, p.756-761, 2007.

**Artigo 2:**

FERNANDES, L.; CERAVOLO, G.S.; FORTES, Z.B.; TOSTES, R.; SANTOS, R.A.; SANTOS, J.A.; MORI, M.A.; PESQUERO, J.B.; DE CARVALHO, M.H. Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. **Regul. Pept.**, v.136, n.1-3, p.92-97, 2006.