

## Los receptores AT<sub>2</sub> median los efectos inhibitorios de la angiotensina-(1-7) sobre la neurotransmisión noradrenérgica a nivel central

MARIELA M. GIRONACCI<sup>1</sup>, MARCELO VATTA<sup>2</sup>, MARTIN RODRIGUEZ-FERMEPIN<sup>3</sup>, CLARA PEÑA<sup>1</sup>, BELISARIO E. FERNANDEZ<sup>3</sup>

### RESUMEN

En trabajos previos demostramos que la angiotensina (Ang)-(1-7) ejerce un efecto facilitador de la neurotransmisión noradrenérgica periférica, y debido a que muchas de sus respuestas biológicas son tejido-específicas, el objetivo del presente trabajo fue estudiar su efecto sobre la neurotransmisión noradrenérgica a nivel central. En el hipotálamo de rata, previamente marcado con <sup>3</sup>H-noradrenalina (NA), la Ang-(1-7) (100-600 nM) disminuyó significativamente la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por KCl 25 mM. Este efecto fue bloqueado por el antagonista selectivo de receptores AT<sub>2</sub>, PD 123319 (0,1-1,0 μM) y no por el antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, losartán (10 nM a 1 μM). Por otro lado, cuando se incubó el hipotálamo de rata con <sup>3</sup>H-NA en presencia de Ang-(1-7) (0,1 a 10 μM) no se observaron diferencias en el contenido de tritio del tejido respecto del grupo control, sugiriendo que el heptapéptido no modificó la captación neuronal de aquella amina. Asimismo, la Ang-(1-7) (0,1-1,0 μM) no modificó las actividades enzimáticas de la monoaminoxidasa y de la catecol-O-metiltransferasa, enzimas metabólicas de la NA captada neuronal y extraneuronamente, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que la Ang-(1-7) presenta un efecto neuromodulatorio sobre la neurotransmisión noradrenérgica que es tejido-específico, siendo inhibitorio a nivel central y mediado por estimulación de receptores AT<sub>2</sub>. Este efecto lo ejerce disminuyendo la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por KCl 25 mM sin modificar la captación neuronal o el metabolismo de aquella amina. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 577-582.

*Palabras clave* Angiotensina - Noradrenalina - Captación neuronal - Actividad de monoaminoxidasa y catecol-O-metiltransferasa

### INTRODUCCION

La angiotensina (Ang)-(1-7), denominada así porque carece de la Phe que ocupa la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de la Ang II, es considerada un producto bioactivo del sistema renina-angiotensina formado a partir de la Ang I por un camino enzimático independiente de la enzima de conversión. (1, 2) Las enzimas que clivan el enlace Pro-Phe de la Ang I o la Ang II para producir Ang-(1-7) son la prolil-endopeptidasa, la metaloendopeptidasa o la endopeptidasa neutra. (1, 2)

Aún no se ha determinado el papel fisiológico de la Ang-(1-7), pero los estudios efectuados hasta el presente demuestran que sus efectos son circunstancialmente equipotentes u opuestos a los de la Ang II. (1, 2) Así la Ang-(1-7) carece del efecto presor, dipsogénico o estimulador de la secreción de aldosterona característico de la Ang II; (3) sin embargo, es tan potente como la Ang II para aumentar la secreción de vasopresina, (4) la síntesis de prostaglandina, (1-3) producir excitación neuronal (5) o facilitar la neurotransmisión noradrenérgica.

<sup>1</sup> Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB) y Cátedra de <sup>2</sup> Fisiología y <sup>3</sup> Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 4/00 Aceptado: 6/00

Dirección para separatas: Dr. Belisario E. Fernández, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina - Tel.: 54-11-4964/8268 - Fax: 54-11-4962/5457 - E-mail: bef@arnet.com.ar

gica. (6) Por otra parte, en contraste con la Ang II, la Ang-(1-7) produce vasodilatación, (2) natriuresis (7) y diuresis, (8) aumenta la velocidad de filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal, (8) estimula el barorreflejo (5) e inhibe el crecimiento celular, (9) motivo por el cual se ha sugerido que el SRA balancearía los efectos de la Ang II aumentando la producción de Ang-(1-7). (10)

Numerosas evidencias indican que los efectos de la Ang-(1-7) son tejido-específicos; por ejemplo, el heptapéptido estimula la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa en membranas sinaptosomales de cerebro de rata, mientras que se observa un efecto bifásico sobre este sistema enzimático en membranas renales. (11) Otro ejemplo es el efecto de la Ang-(1-7) sobre el lecho vascular de gato, donde produce vasodilatación o una ligera vasoconstricción, dependiendo de la dosis de péptido y de la zona del lecho vascular estudiado. (12) Además, Gironacci y colaboradores (6) demostraron un efecto facilitador de este péptido sobre la neurotransmisión noradrenérgica en aurículas de rata, mientras que este efecto no se observó en el conducto deferente de conejo. (13) Debido a la actividad tejido-específica sugerida para la Ang-(1-7) y la actividad facilitadora presináptica sobre la neurotransmisión noradrenérgica periférica producida por la Ang-(1-7), (6) el objetivo de nuestro trabajo fue el de estudiar el efecto del heptapéptido sobre la neurotransmisión noradrenérgica a nivel central, utilizándose para ello hipotálamos aislados de rata.

## MATERIAL Y METODO

### Reactivos

Dl-[7,8- $^3\text{H}$ ] norepinephrine (actividad específica 32 Ci/mmol) fue obtenida de Amersham Life Science, England; pargilina, de Sigma Chemical Co.; losartán, de DuPont Co. y PD 123319 fue obsequiado por el doctor Jack Hodges, de Parke Davis. La Ang-(1-7) fue sintetizada en nuestro laboratorio por la técnica en fase sólida de Merrifield, como se describió previamente. (6)

### Preparación del tejido

Se utilizaron ratas Wistar hembras (200-230 g) del bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), hospedadas a 22°C-25°C con un ciclo luz/oscuridad cada 12 horas. Se decapitaron, se extrajeron los cerebros y se disecaron los hipotálamos en solución fría de Krebs de la siguiente composición (nM):  $\text{NaCl}$ , 118,0;  $\text{KCl}$ , 4,5;  $\text{CaCl}_2$ , 2,6;  $\text{MgCl}_2$ , 1,2;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,0;  $\text{NaHCO}_3$ , 25,0; glucosa, 11,1 y ácido ascórbico, 0,11.

Se utilizó un hipotálamo por experimento, el cual fue trozado en cortes de 1 mm<sup>3</sup>; éstos se dispusieron en un cilindro de vidrio cuya base estaba cubierta

por un cedazo de nailon para permitir el intercambio libre con el medio, y este sistema se ubicó en vasos que contenían 5 ml de solución de Krebs (pH: 7,4) a 37°C, gaseados continuamente con 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ . Previo a la aplicación del protocolo experimental, los tejidos se dejaron estabilizar por un período de 30 minutos.

### Liberación de $^3\text{H}$ -NA

Los tejidos se incubaron durante 30 minutos con 1,35  $\mu\text{Ci/ml}$  (0,1  $\mu\text{M}$ ) de d-1-[ $^3\text{H}$ ]-NA (actividad específica: 13,5 Ci/mmol). Al finalizar la marcación, los tejidos se lavaron con solución de Krebs durante 90 minutos con intervalos de 5 minutos. A partir de este momento, el medio se renovó con solución de Krebs cada 2 minutos durante 10 minutos, y luego se estimuló durante 2 minutos con solución de Krebs que contenía  $\text{KCl}$  25 mM. La Ang-(1-7) se agregó 2 minutos antes del agregado de  $\text{KCl}$  25 mM. La radiactividad presente en las muestras se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como el cociente entre la  $^3\text{H}$ -NA liberada por  $\text{KCl}$  25 mM (S) y el tritio liberado espontáneamente (B), lo que representa el aumento del tritio liberado inducido por  $\text{KCl}$  25 mM (S/B).

### Captación neuronal de $^3\text{H}$ -NA

El hipotálamo trozado fue preincubado durante 30 minutos en solución de Krebs (pH 7,4) conteniendo pargilina 1  $\mu\text{M}$  a 37°C en presencia y en ausencia (controles) de distintas concentraciones de Ang-(1-7) (1-10  $\mu\text{M}$ ). Luego se incubó con 0,1  $\mu\text{M}$  de d-1-[ $^3\text{H}$ ]-NA (actividad específica: 13,5 Ci/mmol) durante 15 minutos. Al finalizar dicho período, el tejido se lavó durante 5 minutos con solución de Krebs, se pesó, se homogeneizó y se centrifugó a 1.000 xg durante 10 minutos, determinándose la radiactividad presente en el sobrenadante.

### Catabolismo de la NA

Se determinó el efecto del péptido sobre la actividad enzimática de la monoaminoxidasa (MAO) y de la catecol-O-metiltransferasa (COMT).

Los hipotálamos aislados de rata se incubaron en solución de Krebs a 37°C durante 30 minutos en ausencia y presencia de Ang-(1-7). Los tejidos se homogeneizaron y se centrifugaron a 1.000 xg durante 15 minutos, utilizándose el sobrenadante como fuente enzimática.

La actividad enzimática de la MAO y de la COMT se determinaron según Holt y colaboradores (14) y Jarrot, (15) respectivamente.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). El análisis esta-

dístico de los resultados se realizó mediante la prueba de la varianza (ANOVA) y posterior aplicación de la prueba de Scheffé. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Liberación de <sup>3</sup>H-NA

Como se observa en la Figura 1, concentraciones de 10 nM a 1 μM de Ang-(1-7) disminuyeron significativamente la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por KCl 25 mM en hipotálamos de rata. El agregado de concentraciones crecientes del heptapéptido no modificó la liberación espontánea de <sup>3</sup>H-NA (datos no mostrados).

Para determinar el tipo de receptores acoplados al efecto inhibitorio de la Ang-(1-7) sobre la liberación de NA, se evaluó el efecto del péptido en presencia de antagonistas selectivos de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Como se observa en la Figura 2A, el losartán (10 nM a 1 μM), antagonista selectivo de receptores AT<sub>1</sub>, si bien tuvo un efecto *per se* sobre la liberación de tritio en hipotálamo de rata, ya que disminuyó el flujo de NA inducido por KCl 25 mM, no modificó la disminución de la liberación de <sup>3</sup>H-NA provocado por Ang-(1-7) 100 nM (Figura 2A).

Por otro lado, el papel de los receptores AT<sub>2</sub> acoplados al efecto inhibitorio de la Ang-(1-7) sobre la liberación de NA fue estudiado en presencia de PD 123319, un antagonista selectivo de receptores AT<sub>2</sub>.

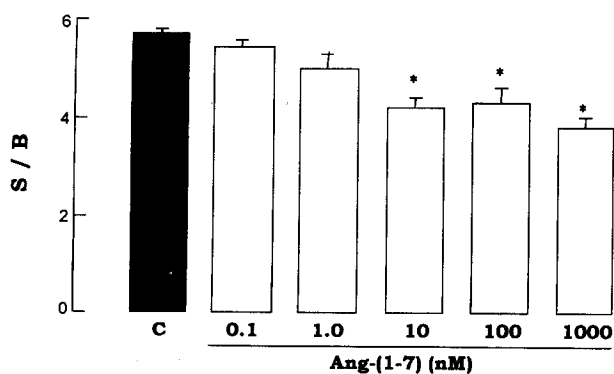


Fig. 1. Efecto de la Ang-(1-7) sobre la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por KCl 25 mM en hipotálamo de rata. Los depósitos noradrenérgicos de hipotálamo de rata fueron marcados con <sup>3</sup>H-NA y luego incubados en presencia de KCl 25 mM (C) o KCl 25 mM con las concentraciones especificadas de Ang-(1-7). La liberación de <sup>3</sup>H-NA al medio se expresó como el cociente entre el tritio liberado por KCl 25 mM (S) (control) o Ang-(1-7) y el tritio basal liberado espontáneamente (B), lo que representa el aumento de la liberación de <sup>3</sup>H-NA. Se representan las medias  $\pm$  ESM de 7 experimentos. \*  $p < 0,05$  respecto del control.

Concentraciones de 0,1 y 1,0 μM de este antagonista bloquearon el efecto inhibitorio del heptapéptido sobre la liberación de NA inducida por KCl 25 mM en hipotálamo de rata (Figura 2B), sugiriendo que ese efecto estaría mediado por activación de receptores AT<sub>2</sub>. El antagonista no tuvo efecto *per se* sobre la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por K<sup>+</sup>. La adición simultánea de losartán y PD 123319 no modificó la liberación de NA (datos no mostrados).

### Captación neuronal de <sup>3</sup>H-NA

Para determinar si la menor liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por K<sup>+</sup> en presencia de Ang-(1-7) era consecuencia de una activación de la captación neuronal de aquella enzima se estudió el efecto de

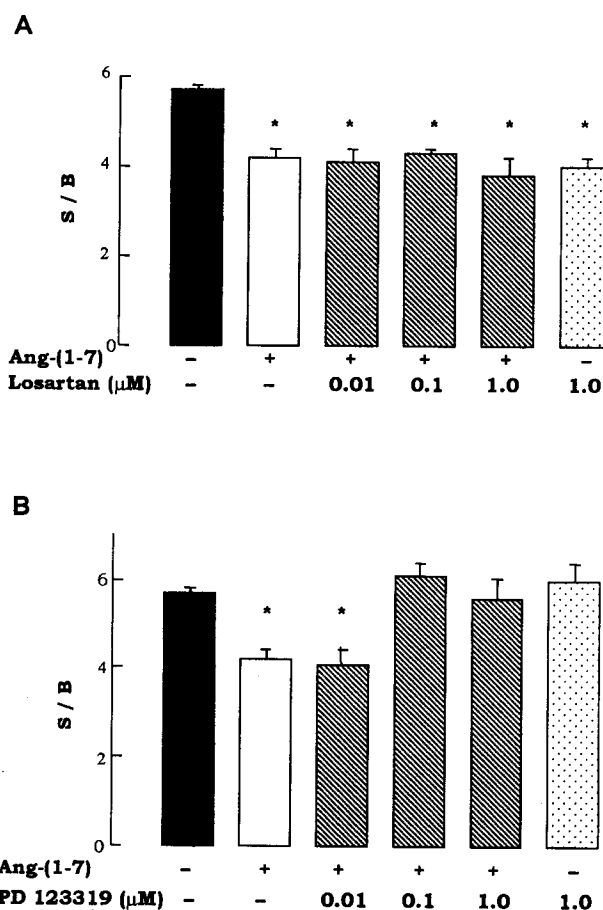


Fig. 2. Efecto del losartán (A) y PD 123319 (B) sobre el efecto de la Ang-(1-7) en la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por KCl 25 mM en hipotálamo de rata. Los depósitos noradrenérgicos de hipotálamo de rata fueron marcados con <sup>3</sup>H-NA y luego incubados en presencia de KCl 25 mM. Cuando se indica, Ang-(1-7) 100 nM se coincubó con losartán (A) o PD 123319 (B). La liberación de <sup>3</sup>H-NA al medio se expresó como el cociente entre el tritio liberado por KCl 25 mM (S) (control) o Ang-(1-7) y el tritio basal liberado espontáneamente (B), lo que representa el aumento de la liberación de <sup>3</sup>H-NA. Se representan las medias  $\pm$  ESM de 7 experimentos. \*  $p < 0,05$  respecto del control.

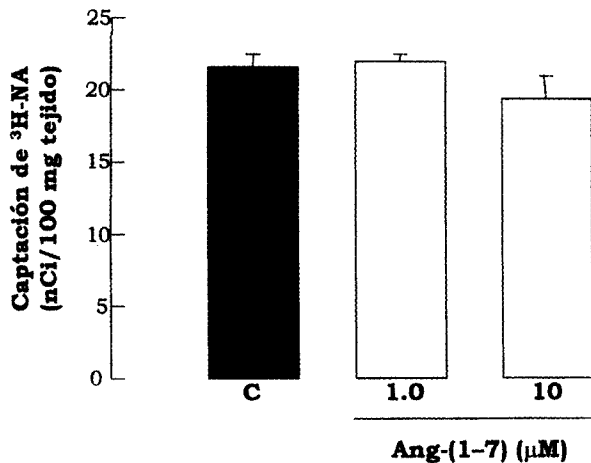


Fig. 3. Efecto de Ang-(1-7) sobre la captación neuronal de <sup>3</sup>H-NA en hipotálamo de rata. Los hipotálamos de rata se incubaron durante 15 minutos con <sup>3</sup>H-NA en ausencia (C) y presencia de Ang-(1-7). La radiactividad presente en el tejido se expresó como nCi por 100 mg de tejido. Se representan las medias  $\pm$  ESM de 6 experimentos.

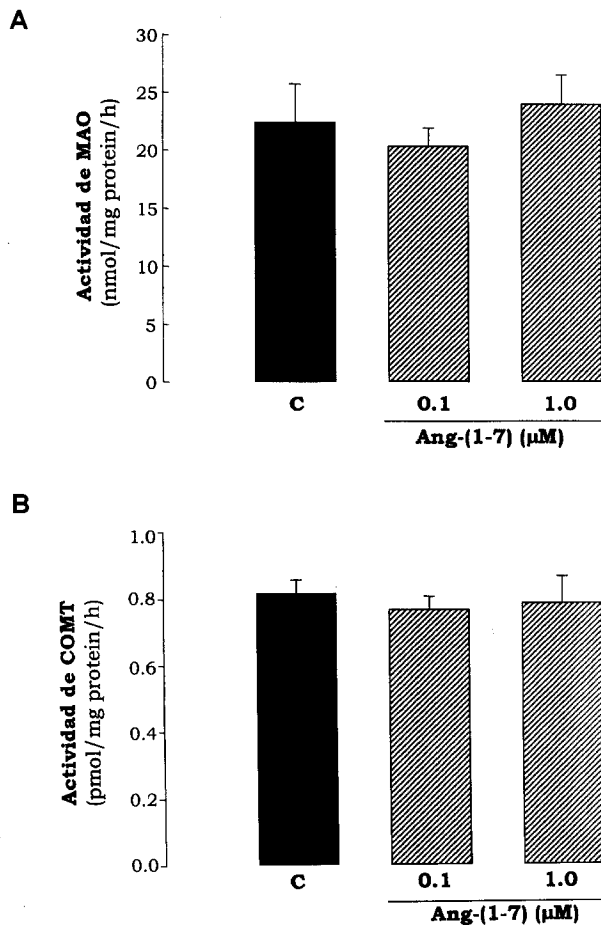


Fig. 4. Efecto de Ang-(1-7) sobre la actividad enzimática de la MAO (A) y de la COMT (B) en hipotálamo de rata. El hipotálamo de rata se preincubó en ausencia (C) y presencia de Ang-(1-7) durante 30 minutos. Se midió la actividad enzimática correspondiente en homogeneizados de hipotálamo, expresada en nmol/mg proteína/h. Se representan las medias  $\pm$  ESM.

concentraciones crecientes del heptapéptido en ese proceso. Como se observa en la Figura 3, el contenido de tritio del tejido, como índice de la <sup>3</sup>H-NA recaptada, no fue modificado por Ang-(1-7) (1-10 µM).

#### Actividad de la MAO y de la COMT

Tanto la actividad enzimática de la MAO como la de la COMT en hipotálamo de rata no fueron modificadas por concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (Figuras 4A y 4B, respectivamente).

#### DISCUSION

En concordancia con estudios realizados en bulbo raquídeo de rata, (16) los resultados presentes indican que la Ang-(1-7) atenúa la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por K<sup>+</sup> en el hipotálamo de rata. Este efecto inhibitorio a nivel central difiere del ejercido a nivel periférico, donde el péptido actúa presinápticamente aumentando la liberación de NA inducida por estímulo nervioso. (6)

Estos resultados sugieren que la Ang-(1-7) ejerce un efecto neuromodulador tejido-específico. Soporata esta hipótesis el hecho de que en aurículas aisladas de rata presenta un efecto facilitador de la neurotransmisión noradrenérgica, (6) mientras que no la modifica en el conducto deferente de conejo. (13)

Muchos de los efectos de la Ang-(1-7) son opuestos a los de la Ang II. (10) Por ejemplo, la Ang-(1-7) facilita el barorreflejo, (5) así como también produce vasodilatación, (12, 17, 18) efectos no observados para la Ang II. Existen evidencias de que el sistema renina-angiotensina regula varias de sus funciones por un mecanismo de retroalimentación negativo. (20, 21) Los efectos contrastantes de la Ang II y la Ang-(1-7) confirmarían la hipótesis que sugiere que el sistema renina-angiotensina limita los efectos de la Ang II a través de la generación de Ang-(1-7). (10) En concordancia con esta teoría, los resultados presentes muestran que la Ang-(1-7) se opone al efecto facilitador de la Ang II sobre la neurotransmisión noradrenérgica en aurículas de rata. (6)

A pesar de que la Ang-(1-7) disminuyó la liberación de NA de las terminales presinápticas simpáticas, no modificó la captación neuronal de dicha amina ni la actividad enzimática de la MAO, enzima responsable del metabolismo de la NA recaptada neuronalmente, ni la actividad enzimática de la COMT, enzima responsable del metabolismo de la NA recaptada extraneuronalmente. Estos resultados se oponen a los descriptos para la Ang II a nivel central, ya que se ha demostrado que dicho péptido activa la MAO (22, 23) y presenta un efecto bifásico sobre la captación neuronal de NA en el hipotálamo de rata. (24, 25)

El residuo de Phe presente en la posición 8 de la

secuencia de aminoácidos de la Ang II parecería que es esencial para estimular la neurotransmisión noradrenérgica central. La Ang III, un fragmento C-terminal de la Ang II formado por la acción de una aminopeptidasa, es equipotente a la Ang II para aumentar la liberación de <sup>3</sup>H-NA inducida por K<sup>+</sup> e inhibir la captación neuronal de aquella amina en el hipotálamo de rata. (24, 26) Similarmente, se ha demostrado que inyecciones intracerebroventriculares de Ang III producen respuestas presoras y dipsogénicas equipotentes a las producidas por la Ang II pero no producidas por la Ang-(1-7), que carece de la Phe del extremo C-terminal. (1)

La disminución de la liberación de NA provocada por Ang-(1-7) fue bloqueada por el antagonista de receptores AT<sub>2</sub> y no por el antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, sugiriendo que los receptores AT<sub>2</sub> estarían involucrados en ese efecto. De hecho, los efectos centrales de la Ang-(1-7) parecen ser más sensibles a la inhibición por antagonistas de receptores AT<sub>2</sub>. Por ejemplo, el aumento de la síntesis de prostaglandinas en astrocitos humanos (27) y la liberación de sustancia P en el hipotálamo de rata, (28) así como la excitación neuronal en el núcleo paraventricular, (5) causados por la Ang-(1-7), fueron bloqueados por antagonistas de receptores AT<sub>2</sub>.

Es interesante destacar que parecería que ambos tipos de receptores, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, tienen papeles antagónicos en la neurotransmisión noradrenérgica central, ya que el aumento de la liberación de NA que produce la Ang II está mediado por receptores AT<sub>1</sub>, (29) mientras que el efecto inhibitorio que presenta la Ang-(1-7) sobre ese mecanismo está acoplado a los receptores AT<sub>2</sub>. Diversos trabajos sugieren que estos receptores mediarían efectos fisiológicos opuestos. (30)

Debido a que la Ang II aumenta la liberación de NA a través de la activación de receptores AT<sub>1</sub> y no de receptores AT<sub>2</sub>, la respuesta opuesta que provoca el losartán podría resultar del bloqueo de la unión de la Ang II endógena a los receptores AT<sub>1</sub>, como fue previamente sugerido. (31, 32) En nuestro caso esto no estaría ocurriendo, ya que la liberación de NA no se modificó por la adición conjunta de losartán y PD 123319, por lo que es posible que el losartán enmascare la unión de la Ang-(1-7) endógena a los sitios AT<sub>2</sub>.

Podemos concluir que la Ang-(1-7) inhibe la neurotransmisión noradrenérgica en el sistema nervioso central, disminuyendo la liberación de NA a nivel presináptico sin modificar la captación y el metabolismo del neurotransmisor. Estos efectos mediados por receptores AT<sub>2</sub> provocarían la disminución de la actividad simpática central y podrían contrarrestar la actividad de la Ang II como un sistema de retroalimentación negativa.

## SUMMARY

### AT<sub>2</sub> RECEPTORS ARE COUPLED TO THE INHIBITORY EFFECT OF ANGIOTENSIN-(1-7) ON CENTRAL NORADRENERGIC NEUROTRANSMISSION

Angiotensin [(Ang)-(1-7)] elicits a facilitatory presynaptic effect on peripheral noradrenergic neurotransmission. Since biological responses to the abovementioned heptapeptide are tissue specific, present investigation was undertaken to study Ang-(1-7) actions on noradrenergic neurotransmission at central nervous system level. In rat hypothalamus labeled with [<sup>3</sup>H]-noradrenaline (NA), 100 to 600 nM Ang-(1-7) diminished NA released by 25 mM KCl. This effect was blocked by the selective angiotensin type 2 receptor antagonist PD 123319 (0.1-1 μmol/L) but not by losartan (10 nmol/L to 1 μmol/L), a selective angiotensin type 1 receptor antagonist. On the other hand, hypothalamus incubated with [<sup>3</sup>H]NA in the presence of 0.1-10 μM Ang-(1-7) showed no modification in the [<sup>3</sup>H]NA content with respect to the control group, suggesting that the heptapeptide did not modify [<sup>3</sup>H]NA neuronal uptake. To study the effect of the heptapeptide on NA catabolism, monoamine-oxidase (MAO) and catechol-O-methyl transferase (COMT) activities were measured. No significant changes with respect to the control group were observed in either hypothalamic MAO or COMT activities in the presence of Ang-(1-7) (0.1-1.0 μM). Our results indicate that Ang-(1-7) has a tissue-specific neuromodulatory effect on noradrenergic neurotransmission, being inhibitory at the central nervous system, and mediated by angiotensin type 2 receptors activation. Ang-(1-7) exerts such effect by inhibiting NA release, without affecting either the neurotransmitter neuronal uptake or catabolism.

*Key words* Angiotensin - Norepinephrine - Nitric oxide - Angiotensin antagonists - Bradykinin - Prostaglandin

#### Agradecimientos

Agradecemos los subsidios otorgados por la Universidad de Buenos Aires y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas para la realización de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Ardaillou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney Int* 1998; 52: 1458-1468.
2. Ferrario CM, Barnes KL, Block CH y col. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension* 1990; 15 (Suppl I): I-13-I-19.
3. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI y col. Angiotensin-(1-7): A new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 1991; 18 (Suppl III): III-126-III-133.
4. Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB y col. Release of

- vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4095-4098.
5. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian J Med Biol Res* 1994; 27: 1033-1047.
  6. Gironacci MM, Adler-Graschinsky E, Peña C y col. Effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on the release of [<sup>3</sup>H]-norepinephrine from rat atria. *Hypertension* 1994; 24: 457-460.
  7. DelliPizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic action of angiotensin-(1-7). *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1-3.
  8. Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW. Renal actions of angiotensin-(1-7): In vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 1996; 270: F141-F147.
  9. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM y col. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996; 28: 104-108.
  10. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA y col. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1997; 30 (Part 2): 535-541.
  11. López Ordieres MG, Gironacci MM, Rodríguez de Lores Arnaiz G y col. Effect of angiotensin-(1-7) on ATPase activities in several tissues. *Regul Peptides* 1998; 77: 135-139.
  12. Osei SY, Ahima RS, Minkes RK y col. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 1993; 234: 35-42.
  13. Trachte GJ, Meixner K, Ferrario CM y col. Prostaglandin production in response to angiotensin-(1-7) in rabbit isolated vasa differentia. *Prostaglandins* 1990; 39: 385-394.
  14. Holt A, Sharman DF, Baker GB y col. A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1997; 244: 384-392.
  15. Jarrott B. Occurrence and properties of catechol-O-methyl transferase in adrenergic neurons. *J Neurochem* 1971; 18: 17-27.
  16. Diz DI, Pirro NT. Differential actions of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on transmitter release. *Hypertension* 1992; 19 (Suppl II): II-41-II-48.
  17. Pörsti I, Bara AT, Busse R y col. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: Implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 652-654.
  18. Bronsnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996; 27 (Part 2): 523-528.
  19. Siragy HM, Inagami T, Ichiki T y col. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 6506-6510.
  20. Schunker H, Ingelfinger JR, Jacob H y col. Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expression by angiotensin II. *Am J Physiol* 1992; 263: E863-E869.
  21. Timmermans PBMWM, Benfield P, Chiu AT y col. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens* 1992; 5: 221S-235S.
  22. Fernández BE, Domínguez AE. Angiotensin II increases MAO activity in rat central nervous system. *Rev Esp Fisiol* 1991; 47: 37-40.
  23. Sumners C, Shalit SL, Kalberg CJ y col. Norepinephrine metabolism in neuronal cultures is increased by angiotensin II. *Am J Physiol* 1987; 252: C650-C656.
  24. Vatta MS, Bianciotti LG, Papouchado ML y col. Modulation of noradrenergic neurotransmission by angiotensin II and angiotensin III. *Pharmacodynamics & Therapeutics (Life Sci Adv)* 1990; 9: 177-185.
  25. Sumners C, Raizada MK. Angiotensin II stimulates norepinephrine uptake in hypothalamus-brain stem neuronal cultures. *Am J Physiol* 1986; 250: C236-C244.
  26. Papouchado ML, Vatta MS, Escalada A y col. Angiotensin III modulates noradrenaline uptake and release in the rat hypothalamus. *J Auton Pharmacol* 1995; 15: 1-8.
  27. Jaiswal N, Tallant EA, Diz DI y col. Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* 1991; 17: 1115-1120.
  28. Diz DI, Bosch SM, Westwood B. Identification of angiotensin receptor subtypes mediating substance P release in brain slices of hypothalamus and medulla. *Hypertension* 1998; 32: 594 (abstract).
  29. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT y col. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonist. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205-251.
  30. Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: An overview. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S2-S7.
  31. Kumagai K, Reid IA. Losartan inhibits sympathetic and cardiovascular responses to carotid occlusion. *Hypertension* 1994; 23 (Part 2): 827-831.
  32. Suzuki Y, Matsumura Y, Egi Y y col. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist on norepinephrine overflow and antidiuresis induced by stimulation of renal nerves in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 956-963.