

AMANDA APARECIDA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO
RIM E CORAÇÃO DO CAMUNDONGO TRANSGÊNICO QUE
EXPRESSA TONINA DE RATO**

*Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.*

**SÃO PAULO, SP
2010**

Ribeiro, Amanda Aparecida. **Caracterização do sistema renina angiotensina no rim e coração do camundongo transgênico que expressa tonina de rato.** / Amanda Aparecida Ribeiro – São Paulo, SP: 2010, 75 páginas.

Orientadores: Prof^a. Dra. Dulce Elena Casarini, Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Dissertação (Mestrado) - Área de Nefrologia- Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

1. Sistema renina angiotensina local. 2. Tonina. 3. Camundongo transgênico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Escola Paulista de Medicina

AMANDA APARECIDA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO
RIM E CORAÇÃO DO CAMUNDONGO TRANSGÊNICO QUE
EXPRESSA TONINA DE RATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Dulce Elena Casarini

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Coordenador: Prof^a. Dra. Mirian Aparecida Boim

SÃO PAULO, SP

2010

*Este trabalho foi realizado na Disciplina de Nefrologia,
Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina
da Universidade Federal de São Paulo, sob a orientação
da Prof^a. Dra. Dulce Elena Casarini.*

APOIO FINANCEIRO:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Processo número: 2009/03261-04.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Agostinho e Francisca**, que investiram nos meus sonhos, abdicando dos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus, e, sobretudo, por compreenderem minha ausência durante estes anos, senti muitas saudades... Agradeço por me mostrarem que é preciso buscar toda paciência, determinação e coragem para ultrapassar barreiras, e principalmente, que nunca devemos perder as esperanças na vida! Sinto um imenso orgulho e admiração pelo que são e por tudo que construíram, sempre com muita luta e amor! Obrigada pela confiança, apoio e orientação em todas as minhas escolhas, espero que um dia eu possa recompensá-los pelo que fizeram e fazem por mim. Saibam que são responsáveis por tudo que conquistei e pelo que sou hoje!

Ao meu irmão, **Fábio**, pelos momentos felizes e, simplesmente, por ser o melhor irmão do mundo!

Amores da minha vida, vocês são o meu porto seguro! Sem vocês nada teria sentido...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Dulce Elena Casarini**, um exemplo de dedicação, por quem sinto respeito e admiração. Agradeço pela orientação, por me mostrar que ciência se faz com paciência, e, sobretudo, com muito amor! Tenho certeza que cresci profissionalmente e pessoalmente durante estes anos, muito obrigada!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero**, uma pessoa maravilhosa e um excelente profissional, que tive o prazer de conhecer durante a minha iniciação científica, período em que foi o meu orientador, me guiando nos primeiros passos dessa longa caminhada. Devo muito a você minha conquista, pois, se não fosse à confiança depositada em mim, com certeza não chegaria aonde cheguei! Muito obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos e por me acolher em Belo Horizonte sempre com muito carinho.

À minha amiga, **Zaira**, por todo carinho, por entender as minhas limitações e ter me ajudado a superá-las. Por estar comigo em todos os momentos, dividindo decepções, angústias, vibrando com cada resultado, me aconselhando sempre, e, claro, pelas boas risadas! Obrigada por torcer por mim e por me fazer acreditar que era capaz e que tudo daria certo, por tudo isso, divido esta vitória com você!

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”. Charles Chaplin

À **Prof^a. Dr^a. Mércia Paula de Lima**, pela ajuda indispensável nos experimentos, pela paciência, pelas dosagens realizadas com tanta dedicação e, principalmente, pela amizade, além da hospitalidade e carinho em todas as vezes que estive em Belo Horizonte.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Irigoyen**, por abrir as portas do seu laboratório, pelo carinho e pelas sugestões preciosas na função de banca examinadora.

À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein**, pelas correções realizadas na versão preliminar da dissertação e também por aceitar compor a banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo** por disponibilizar seu laboratório sempre que precisei.

Ao **Prof. Dr. Ruy Campos** e a **Prof^a. Dra. Cássia Bergamaschi** pela disponibilização dos aparelhos, pela atenção e pelo carinho.

Ao **Prof. Milton Rocha** e a **Prof^a. Débora Ayame** por me ajudarem a transportar os animais.

À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Ronchi**, uma amiga com o coração enorme, que fui conhecendo aos poucos e que hoje admiro cada dia mais! E por ter aceito gentilmente ser banca desta dissertação. Torço muito por você!

À **Prof^a. Dr^a. Adriana Carmona** por aceitar ser banca e pelas dicas dadas para que pudesse melhorar este trabalho.

As “coleguinhas do bandeirão”, amigas queridas, **Danielle Aragão**, **Maísa** e **Zaira**, que sempre estavam prontas a escutar me e a dar me conselhos valiosos. Saibam que sinto enorme admiração por todas vocês!

Ao **Anderson**, por toda ajuda com os animais, pelo carinho e pela paciência em me escutar sempre e, principalmente, pela amizade sincera que construímos e pelos momentos felizes.

À **Marie Doki**, pela detalhada e cuidadosa correção gramatical da tese.

A todos os amigos do laboratório: **Adriana, Andréia, Claudina, Cléber, Danielle Arita, Fernanda Barrinha, Juliana Colluci, Juliana Perez, Ingrid, Rodrigo, Roseli e Tatiana**, muito obrigada pelo convívio prazeroso e pelas dúvidas esclarecidas.

Aos colegas da secretaria: **Luís, Michael, Pablo e Priscila**, pela prontidão nos serviços prestados.

Ao técnico do Incor, **Leandro**, responsável pelas cirurgias, etapa fundamental para o desenvolvimento do projeto, ao **Christiano** pela ajuda e dúvidas esclarecidas e a todos os colegas do laboratório.

Aos amigos do laboratório de Cardiologia: **Adilson, Érika, Gisele, Juliana P, Juliana A., Neuly, Núbia e Thaís** pela ajuda e carinho.

Aos funcionários dos biotérios: **Douglas, Mauro, Emanuel, Toninho e Airton**, pela amizade, pelo cuidado e pela manutenção dos animais.

A todos os professores e funcionários da disciplina de nefrologia, pelo auxílio, dedicação e eficiência nos serviços prestados.

A toda minha família e aos amigos pelo apoio, incentivo, pessoas estas que são os alicerces da minha vida!

À **FAPESP** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, que foram solidárias e que torceram por mim, o meu muito obrigada!!

RECOMEÇAR

“Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou...
 O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.
 Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... É renovar as esperanças na vida
 e o mais importante... Acreditar em você de novo.
 Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado...
 Chorou muito? Foi limpeza da alma...
 Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...
 Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos...
 Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora...
 Pois é... Agora é hora de reiniciar... De pensar na luz...
 De encontrar prazer nas coisas simples de novo.
 Que tal um corte de cabelo arrojado... Diferente?
 Um novo curso... Ou aquele velho desejo de aprender a pintar... Desenhar...
 Dominar o computador... Ou qualquer outra coisa...
 Olha quanto desafio... Quanta coisa nova nesse mundão de meu Deus te esperando.
 Tá se sentindo sozinho? Besteira...
 Tem tanta gente que você afastou com o seu período de isolamento...
 Tem tanta gente esperando apenas um sorriso teu para chegar perto de você.
 Quando nos trancamos na tristeza... Nem nós mesmos nos suportamos... Ficamos
 horríveis... O mau humor vai comendo nosso fígado... Até a boca ficar amarga.
 Recomeçar...
 Hoje é um bom dia para começar novos desafios.
 Onde você quer chegar? Ir alto... Sonhe alto... Queira o melhor do melhor...
 Queira coisas boas para a vida... Pensando assim trazemos prá nós aquilo que
 desejamos... Se pensamos pequeno... Coisas pequenas teremos...
 Já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor...
 o melhor vai se instalar na nossa vida.
 E é hoje o dia da faxina mental... Joga fora tudo que te prende ao passado... Ao
 mundinho de coisas tristes... Fotos... Peças de roupa, papel de bala... Ingressos de
 cinema, bilhetes de viagens... E toda aquela tranqueira que guardamos quando nos
 julgamos apaixonados...
 Jogue tudo fora... Mas, principalmente esvazie seu coração... Fique pronto para a
 vida... Para um novo amor... Lembre-se somos apaixonáveis... Somos sempre capazes de
 amar muitas e muitas vezes... afinal de contas... Nós somos o **Amor**.
 Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A angiotensina II (Ang II), um dos mais relevantes peptídeos angiotensinérgicos, tem um importante papel na fisiologia e na fisiopatologia dos tecidos renal e cardíaco. Existem diversas enzimas capazes de gerar Ang II. Uma delas é a tonina, capaz de formar a Ang II a partir da angiotensina I (Ang I) ou diretamente do AGT. Nosso objetivo foi caracterizar o RAS no rim e no coração do camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)). Foram utilizados camundongos machos C57bl/6 (grupo controle, CT) e camundongos transgênicos [TGM(rTon)]. Vinte e quatro horas após o implante de cânulas, animais acordados, com 12 semanas de idade, foram submetidos a procedimentos de avaliação hemodinâmica. Os dados mostraram que não existem diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos parâmetros hemodinâmicos. Após determinação da pressão arterial, os camundongos foram sacrificados por decapitação e os órgãos (rim e coração) foram retirados. O coração foi dividido em átrios (AT) [direito + esquerdo], ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Usando o tetradecapeptídeo sintético como substrato, a atividade tonina foi avaliada nos rins e nas estruturas cardíacas. A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada usando os substratos ZPhe-His-Leu (específico para o domínio N da ECA) e Hip-His-Leu (específico para o domínio C). Tanto a atividade da tonina, quanto da ECA nos rins e no AT foram significativamente maiores no grupo TGM(rTon) quando comparado ao dos camundongos CT. Já entre as estruturas cardíacas o AT mostrou atividade significativamente maior em ambos os grupos, quando comparados aos ventrículos. A expressão da isoforma de 65 kDa da ECA foi significativamente maior no grupo TGM(rTon) nos rins e no AT. Apenas no rim foi analisada a expressão de ECA e não foi observada diferença estatística entre os grupos. As concentrações da angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)] e da Ang I foram significativamente diminuídas no grupo TGM(rTon) quando comparadas ao CT. Entretanto, não foi observada diferença estatística nos níveis da Ang II entre os grupos. Sugerimos que o ambiente com abundância em tonina pode aumentar a atividade N-domínio da ECA por meio de uma secretase, explicando os baixos níveis da Ang-(1-7) encontrados no grupo transgênico. Pela primeira vez foi mostrado um importante papel fisiológico da tonina como modulador do SRA renal e cardíaco.

Palavras-chave: angiotensina, SRA cardíaco, SRA renal, animais transgênicos, tonina.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II), one of the most relevant angiotensinergic peptides, has an important role in the renal and cardiac physiology. There are many enzymes that generate Ang II. One of them is tonin, that is able to liberate Ang II from angiotensin I (Ang I) or directly from angiotensinogen (AGT). Our goal was to characterize the RAS in the kidney and heart of transgenic mouse that express rat tonin [TGM(rTon)]. Twenty-four hours after implantation of cannulas, 12 weeks old awake animals were subjected to hemodynamic evaluation. Data showed no statistical differences for the hemodynamic parameters analyzed between transgenic and the wild-type (control, CT). After that mice were sacrificed by decapitation and their organs (kidney and heart) removed. Heart was separated into atria [right plus left (AT)], right ventricle (RV), and left ventricle (LV)]. Using the synthetic tetradecapeptide renin substrate, tonin activity was evaluated in the kidney and cardiac structures. The angiotensin converting enzyme (ACE) activity was determined using the substrates Z-Phe-His-Leu (specific for N-domain ACE active site) and Hip-His-Leu (specific for C-domain active site). Both the activity of tonin and the ACE, in the kidneys and AT were significantly higher in TGM(rTon) when compared with CT mice. Among the cardiac structures AT showed significantly greater activity in both groups when compared to the ventricles. The expression of the 65 kDa ACE isoform was significantly higher in TGM(rTon) in the kidney and AT when compared with CT. ACE2 expression was determined only in the kidney and there was not statistic differences between groups. The levels of angiotensin 1-7 [Ang-(1-7)] and Ang I was significantly decreased in TGM(rTon) when compared with CT. However, the levels of Ang II were not statistically different between groups. We suggest that the environment of tonin abundance may increase N-domain ACE activity by a secretase activity, which could explain the low levels of Ang-(1-7) in the transgenic animal. Our data show, for the first time, the physiologic role of tonin as an important modulator of renal and cardiac RAS.

Keywords: angiotensin, SRA cardiac, SRA renal, transgenic animals, tonin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Visão atual do SRA ilustrando as principais vias para a formação da Ang II e Ang-(1-7). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; AT ₁ , receptor do tipo 1 da angiotensina II; AT ₂ , receptor do tipo 2 da angiotensina II; APN, aminopeptidase N; APA, aminopeptidase A; Mas, receptor de angiotensina-(1-7). Esquema adaptado de Velez, 2008	24
FIGURA 2	Curva padrão do radioimunoensaio.....	40
FIGURA 3	Géis de agarose (1%) mostrando os produtos da PCR de amostras provenientes de animais considerados transgênicos e selvagens. M, marcador de massa molecular. O produto correspondente ao fragmento do gene da tonina apresentou 215 pb. Os números na parte superior da figura correspondem aos animais estudados. As linhas: 1, 4, 6, 7 e 10 correspondem aos animais selvagens. As linhas: 2, 3, 5, 8, 9, 11 e 12 indicam os animais geneticamente modificados.....	45
FIGURA 4	Valores da pressão arterial nos grupo controle (CT) e no grupo transgênico (TGM(rTon)).....	46
FIGURA 5	Valores da frequência cardíaca no grupo controle (CT) e no grupo transgênico (TGM(rTon)).....	46
FIGURA 6	Atividade da ECA (mU/mg de proteína) no rim, utilizando o ZPhe-HL e HHL como substratos. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)).....	48
FIGURA 7	Atividade da ECA (mU/mg de proteína) no VD, VE e AT, utilizando o ZPhe-HL e o HHL como substratos. *Estatisticamente diferente do grupo controle, na mesma estrutura cardíaca. # Estatisticamente diferente do VE e VD, no mesmo grupo. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)).....	49
FIGURA 8	Quantificação das angiotensinas (pmol/g de tecido) no rim. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média ± erro padrão da média.....	51
FIGURA 9	A: Imunoreatividade à tonina de amostras provenientes do homogenato renal utilizando-se anticorpo anti-tonina. B: Densidade relativa (DR) tonin/ β -actina, utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular).....	52

-
- FIGURA 10** A: Imunoreatividade à ECA de amostras provenientes do homogenato renal utilizando-se anticorpo monoclonal 9B9. B: Densidade relativa ECA/ β -actina, utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular)..... **53**
- FIGURA 11** A: Imunoreatividade à ECA2 de amostras de proteínas de homogenato renal determinada utilizando-se de anticorpo recombinante para ECA2. B: Densidade relativa ECA2/ β -actina utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular)..... **54**
- FIGURA 12** A: Imunoreatividade à ECA determinada utilizando-se de anticorpo monoclonal 9B9. Amostras provenientes do homogenato do VD. B: amostras provenientes do VE. Ambas as isoformas da ECA (190 kDa e 65 kDa) foram detectadas em ambos os grupos no VD e VE. C: Densidade relativa ECA/ β -actina, utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular)..... **55**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Componentes utilizados para construção da curva-padrão do radioimunoensaio.....	40
TABELA 2	Atividade específica (Ae) da tonina em moles de Ang II formada/min/mg de proteína. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)).....	47
TABELA 3	Razão ZPhe-HL/HHL para enzima conversora de angiotensina nos tecidos renal cardíaco.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II	Angiotensina II
AcSDKP	Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro
AGT	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang-(1-5)	Angiotensina 1-5
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang-(1-9)	Angiotensina 1-9
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AT	Átrios (direito + esquerdo)
AT ₁	Receptor de angiotensina tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina tipo 2
BCIP	4-bromo-3-cloro-inylil fosfato
BK	Bradicinina
BSA	Soroalbumina bovina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CT	Controle
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
ECA2	Enzima conversora de angiotensina II
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
Gsm	Glândula submandibular
HCl	Ácido clorídrico
HHL	Hipuril-His-Leu
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
kDa	Quilidalton
LH-RH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
LNE	Ligação não específica
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitroblue cloreto de tetrazólio
NEP	Endopeptidase neutra
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
ng	Nanograma
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	Salina tamponada com fosfato contendo <i>tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Prolil-endopeptidase
pmol	Picomolar
RIE	Radioimunoensaio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ZnSO ₄	Sulfato de zinco anidro
SRA	Sistema renina angiotensina
TDP	Tetradecapeptídeo – substrato sintético da renina
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TGM(rTon)	Camundongo transgênico que expressa tonina de rato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
ZPhe-HL	Z-Phe-His-Leu
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO.....	20
1. Sistema renina angiotensina circulatório.....	20
2. Sistema renina angiotensina local.....	24
2.1 Sistema renina angiotensina cardíaco e vascular.....	25
2.2 Sistema renina angiotensina renal.....	28
3. Sistema tonina angiotensina.....	29
4. Animais transgênicos para o gene da tonina.....	30
II OBJETIVOS.....	33
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1. Animais.....	35
2. Genotipagem de camundongos.....	35
2.1 Extração de DNA.....	35
2.2 Reação em cadeia da polimerase.....	36
2.3 Eletroforese em agarose.....	36
3. Avaliação da hemodinâmica cardiovascular.....	36
4. Atividade tonina-símile.....	37
4.1 Incubação.....	37
4.2 Radiomarcagem da angiotensina II.....	38
4.3 Radioimunoensaio para angiotensina II.....	38
5. Atividade da ECA.....	40
6. Quantificação das angiotensinas.....	41
7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	42
8. <i>Western blotting</i>	42
9. Dosagem de proteína.....	42
10. Análise dos dados.....	43
IV RESULTADOS.....	44
1. Genotipagem.....	45
2. Avaliação da hemodinâmica cardiovascular.....	46
3. Atividade da tonina.....	47
4. Atividade da ECA.....	48
5. Quantificação das angiotensinas.....	51

6. <i>Western blotting</i>	52
6.1 Expressão protéica da tonina no rim.....	52
6.2 Expressão protéica da eca no rim.....	53
6.3 Expressão protéica da eca no rim.....	54
6.4 Expressão protéica da eca no VD e VE rim.....	55
V DISCUSSÃO	57
VI CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO	75

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Sistema renina angiotensina circulatório

O sistema renina angiotensina (SRA) é formado por uma complexa cascata enzimática que tem como função principal o controle da pressão arterial sistêmica. Este exerce papel fundamental no equilíbrio eletrolítico, no controle do volume extracelular e no tônus vascular. Inicialmente, a renina liberada pelas células justaglomerulares da arteríola aferente dos glomérulos, hidrolisa a ligação entre os resíduos amino-terminais Leu¹⁰ e Val¹¹ do angiotensinogênio (AGT), levando à formação do decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Posteriormente, a Ang I é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) entre a ligação Phe⁸-His⁹ levando à formação da angiotensina II (Ang II) e liberação do dipeptídeo His-Leu (SKEGGS *et al.*, 1954; SKEGGS *et al.*, 1956).

O AGT é uma glicoproteína sintetizada primariamente no fígado, mas outros tecidos também são capazes de sintetizá-lo, incluindo o cérebro, tecido adiposo, glândulas adrenais, gônadas e pâncreas (VELEZ, 2008). RNAm do AGT foi encontrado em pulmão, rim, mesentério, átrio, estômago, intestino e baço (CAMPBELL, 1986).

A liberação da renina pelas células justaglomerulares é regulada por três mecanismos principais: a) ação dos barorreceptores, localizados na arteríola aferente, que detectam alterações na quantidade de sódio na mácula densa; b) influência do sistema nervoso simpático na arteríola do aparelho justaglomerular e c) atuação da Ang II por meio de *feedback* negativo (HARRISON-BERNARD, 2009). Recentemente, dois receptores da renina foram identificados e clonados. Estudos têm mostrado que estes receptores são expressos principalmente no coração, cérebro e placenta e em níveis de expressão menores nos rins e fígado (FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008).

Há duas isoformas clássicas da ECA: somática e testicular. A forma somática ou endotelial (130-190 kDa) possui dois sítios catalíticos, N e C-terminais, sendo encontrada no endotélio vascular dos tecidos epiteliais e neuronais, intestino, rins, placenta, coração, fígado, pulmão e pâncreas. A ECA somática é ancorada à membrana celular por um peptídeo hidrofóbico de 17

aminoácidos localizado na porção C-terminal da mesma, o que separa uma região intracelular C-terminal (30 aminoácidos) de um segmento N-terminal extracelular, o qual possui 1230 aminoácidos. A ECA testicular ou germinal (90-110 kDa) é idêntica à porção C-terminal da ECA endotelial e encontra-se restritamente nos testículos, nos quais é expressa durante a espermatogênese (WEI *et al.*, 1991). Também foi descrita a ECA solúvel que é resultante provavelmente de um mecanismo de solubilização da enzima ligada à membrana *in vivo* sendo encontrada no plasma, na urina, nos fluidos ileal e seminal e amniótico (ERDÖS, 1990; HOOPER, 1991; CASARINI *et al.*, 1992; DEDDISH *et al.*, 1994; CASARINI *et al.*, 1995; CASARINI *et al.*, 2001). Em especial na urina de pacientes hipertensos, foram descritas duas isoformas com massas moleculares 90 e 65 kDa, sugerindo que a de 90 kDa, encontrada apenas nos pacientes hipertensos, poderia ter relevante papel fisiológico na hipertensão, atuando como importante biomarcador no diagnóstico precoce da doença (CASARINI *et al.*; 1995, CASARINI *et al.*, 2001). Tanto o domínio N- quanto o C- da ECA são capazes de hidrolisar outros substratos tais como a substância P, hormônio LH-RH, AcSDKP e a Ang(1-7), sendo que estes dois últimos peptídeos são específicos para o domínio N (DEDDISH *et al.*, 1998; CASARINI *et al.*; 2001; RONCHI *et al.*, 2007).

A Ang II é um potente peptídeo vasoconstritor responsável por modular as funções renais e cardiovasculares, principalmente, por meio da ligação em dois receptores seletivos e com ações antagônicas, o AT₁ e o AT₂ (CAZAUBON *et al.*, 1993; CAREY, 2004; ELASED *et al.*, 2006). Quando a Ang II se liga ao receptor AT₁ promove liberação de aldosterona e estimulação de receptores adrenérgicos resultando em respostas cronotrópicas positivas no coração (DANILCZYK & PENNINGER, 2006). Este receptor ligado a este peptídeo também induz a constrição das células do músculo liso, aumenta a contractilidade do miocárdio, estimula a liberação de catecolaminas da medula adrenal e aumenta a atividade do sistema nervoso central, estimulando a sede e o apetite ao sal (KOBORI *et al.*, 2007).

Por outro lado, a Ang II quando ligada ao receptor AT₂ apresenta efeito benéfico, potencializando a vasodilatação e os efeitos antiproliferativos, contrapondo-se aos efeitos do receptor AT₁ (PROBSTFIEL & BRIEN, 2010). Este receptor é altamente expresso durante o desenvolvimento fetal em

humanos e roedores. Entretanto, com poucos dias após o nascimento a expressão deste receptor começa a diminuir rapidamente. Na idade adulta a expressão ocorre na medula adrenal, útero, ovário, endotélio vascular e em algumas áreas do cérebro (HADDAD *et al.*, 1997; CAREY, 2004).

Há ainda outros receptores que mediam as ações do SRA. O receptor AT₃ que apresenta funções ainda desconhecidas e o receptor AT₄, que modula a liberação do inibidor do ativador do plasminogênio, principal mediador fisiológico da fibrinogênese (PROBSTFIEL & BRIEN, 2010). No cérebro a localização do receptor AT₄ está diretamente ligada aos receptores colinérgicos, sendo encontrado particularmente nas áreas ligadas ao processo de aprendizagem e memória (FLOOD & CHERKIN, 1986; DICKSON & VANDERWOLF, 1990; PATEL & TARIOT, 1991).

Em 2000, uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), foi clonada por dois grupos de pesquisadores, Donogue *et al.* e Tipnins *et al.*, conferindo uma nova visão ao SRA (TIKELLIS *et al.*, 2003). A ECA2, uma carboxipeptidase de 120 kDa, cliva um único resíduo da porção C-terminal da Ang I convertendo-a em Ang-(1-9), que posteriormente é hidrolisada pela ECA em Ang-(1-7). Entretanto, o papel fundamental da ECA2 é a produção da Ang-(1-7) a partir da Ang II. A ECA2 também pode hidrolisar metabólitos das cininas, a des-Arg¹⁰-calidina e a des-Arg⁹-bradicinina, os quais são gerados pela ação da arginina carboxipeptidase sobre a bradicinina (BK) e a lys-bradicinina (calidina), respectivamente (OUDIT *et al.*, 2003).

In vivo, a ECA2 é predominantemente expressa no coração, rins e testículos, sendo também encontrada em baixas concentrações no cólon do útero e nos pulmões (LAMBERT *et al.*, 2008). A ECA2 pode atuar no sistema cardiovascular e renal pela via do SRA ou modulando peptídeos regulatórios (OUDIT *et al.*, 2003). A ECA2 mostra ser um inibidor funcional na produção de Ang II pela ECA, pois estimula a degradação da Ang I e facilita a produção de Ang-(1-7) (CAREY, 2004).

A Ang-(1-7) foi descrita pela primeira vez como um peptídeo ativo em 1988, sendo formada a partir da hidrólise da Ang I por ação da endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP) ou a partir, da Ang II pela PEP ou ECA2 (CAREY & SIRAGY, 2003). Esse peptídeo antagoniza as ações da Ang II promovendo o aumento de prostaglandinas vasodilatadoras no endotélio

vascular e células do músculo liso ou pela liberação de óxido nítrico (NO) promovendo vasodilatação, e assim, atenuando a vasoconstrição induzida pela Ang II (CAREY & SIRAGY, 2003). ROKS *et al.* (1999) mostraram pela primeira vez que a Ang-(1-7) pode modular o SRA não somente pelo antagonismo à ação da Ang II, mas também através da inibição da ECA, ligando-se a um dos sítios da ECA somática. Portanto, estudos mostram a importância de se conhecer os componentes e os mecanismos de ação do SRA. Estes novos conhecimentos serão de grande valia para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem, principalmente, nos sistemas cardiovascular e renal. Os anti-hipertensivos como os inibidores da ECA e antagonistas dos receptores apontam novas direções para a medicina terapêutica, aumentando a sobrevida de pacientes e melhorando a saúde pública (ROSENTHAL *et al.*, 1990; SAYE *et al.*, 1993; BALTATU *et al.*, 2000; TRIPATHI, *et al.*, 2006). A figura 1 mostra uma visão atual do SRA ilustrando as principais vias para a formação da Ang II e Ang-(1-7).

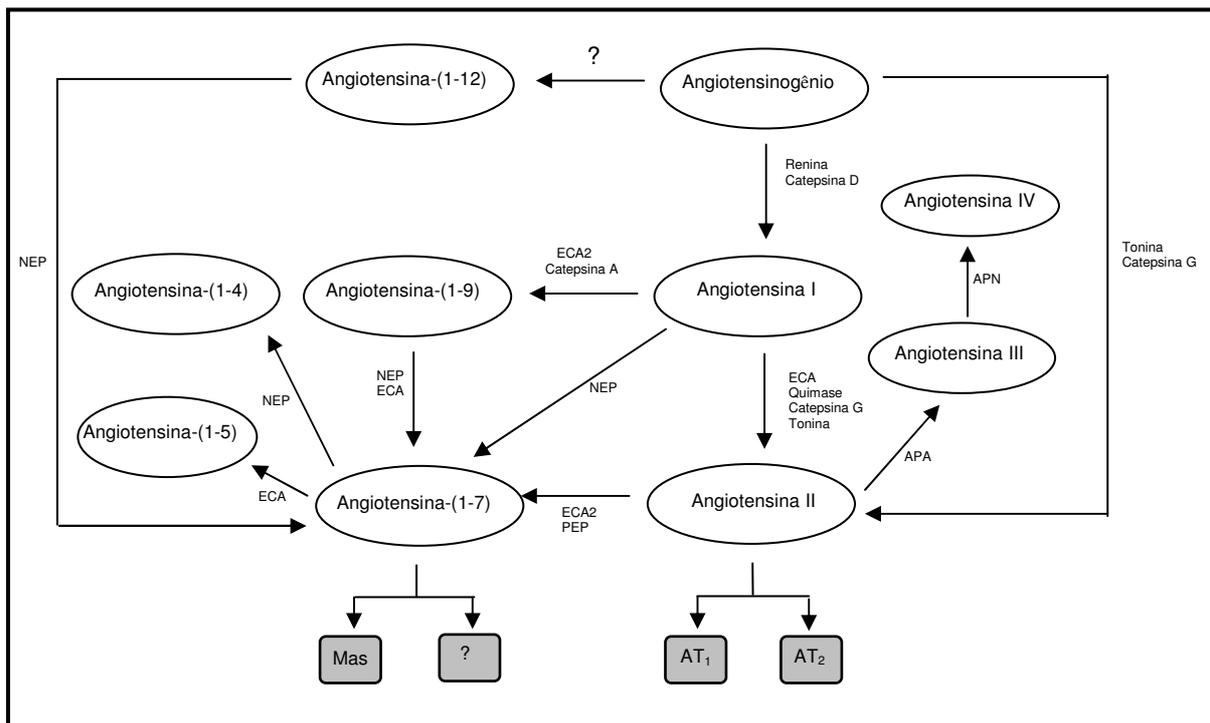


Figura 1. Visão atual do SRA ilustrando as principais vias para a formação da Ang II e Ang-(1-7). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; AT₁, receptor do tipo 1 da Ang II; AT₂, receptor do tipo 2 da Ang II; APN, aminopeptidase N; APA, aminopeptidase A; Mas, receptor de angiotensina-(1-7). Esquema adaptado de Velez (2008).

2. Sistema renina angiotensina local

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e celular, tem-se melhorado o entendimento do papel do SRA em condições fisiológicas e patológicas. O conceito tradicional do SRA como um sistema exclusivamente circulante foi alterado pela detecção e quantificação do RNAm para renina e AGT em vários tecidos além do rim e do fígado (IRIGOYEN *et al.*, 2001). Estes achados aumentaram as evidências da existência de um sistema mais complexo do que se imaginava e dinâmico no cérebro, glândulas adrenais, testículos, parede arterial e principalmente no coração (VARAGIC *et al.*, 2008).

A identificação de novos peptídeos, novas interações receptor-receptor, novas enzimas com novas funções e um sistema local capaz de gerar peptídeos ativos, tem conferido a este sistema um novo conceito. O SRA não é apenas um sistema com ações endócrinas, mas exerce um papel controlador

intácrino, autócrino e parácrino (IRIGOYEN *et al.*, 2001; CAREY & SIRAGY, 2003).

O SRA local tem múltiplas funções, por exemplo, a regulação do crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose celular, além de gerar espécies reativas de oxigênio (LEUNG, 2004). Alguns órgãos como a glândula adrenal e cérebro operam suas ações independentemente do SRA circulatório. Já no coração e no rim a ação ocorre com a interação de ambos os sistemas circulatório e local (KEIDAR *et al.*, 2007). O SRA local pode assumir um papel fundamental no controle da homeostasia corporal sem mudanças no SRA circulatório (CAMPBELL, 1986).

O SRA tecidual ainda está em estágios iniciais de estudo se o compararmos com o circulante. Um modelo de estudo para melhor entender a interação de ambos os sistemas seria de grande valia para o desenvolvimento de novas terapias para diversas patologias (CAMPBELL, 1986).

2.1. Sistema renina angiotensina cardíaco e vascular

Evidências demonstram a presença dos componentes do SRA no coração, comprovado, a partir da síntese local de renina e AGT, o que sugere a presença de um SRA cardíaco. Dessa forma, os efeitos locais da Ang II seriam decorrentes não só do grau de ativação do SRA endócrino, mas também do sistema tecidual (URATA *et al.*, 1993). Dados recentes sugerem fortemente que o SRA local, e não o circulante, participa criticamente na hipertrofia cardíaca induzida pela pressão alta (KOMURO, 2001).

A fim de responder questões sobre o papel do SRA no desenvolvimento de patologias tem-se utilizado modelos transgênicos de animais, entre eles, camundongos e ratos são os mais utilizados. Em estudos realizados por BADER & GANTEN (2008) foi mostrado que animais que superexpressam ECA, AGT não apresentaram hipertrofia e nem se tornaram hipertensos, apesar dos níveis de Ang II estarem aumentados. No entanto, estes animais apresentaram fibrose cardíaca, evidenciando que a Ang II pode promover danos ao tecido cardíaco sem exercer seus efeitos clássicos de elevação na pressão arterial sistêmica.

Há quatro tipos diferentes de células capazes de expressar a ECA no coração: endoteliais, macrófagos, miofibroblastos e epiteliais. Há concordância

na literatura de que o endotélio vascular é o principal responsável pela atividade da ECA no coração normal. Entretanto, experimentos de radioimunoensaio demonstram também uma forte marcação da enzima em tecidos fibrosos, como os folhetos valvulares e o pericárdio, indicando que o tecido fibroso cardíaco, mesmo no coração normal, seria fonte importante de geração de Ang II (MILL *et al.*, 1997).

Em coração de humano, a maior concentração da ECA foi encontrada no átrio direito quando comparado com as outras câmaras cardíacas. Esses dados também foram observados em coração do rato normal e se alteram no órgão infartado, uma vez que a cicatriz passa a ser a região com maior poder gerador de Ang II (MILL *et al.*, 1997).

No tecido cardíaco, a Ang II apresenta efeitos opostos à Ang-(1-7). Estimula o crescimento de células musculares lisas em cultura de células, aumenta a proliferação do fibroblasto e promove a hipertrofia dos miócitos. A Ang II também possui efeito inotrópico positivo por aumentar o influxo de cálcio durante a excitação cardíaca, atuando diretamente em receptores AT₁ nos cardiomiócitos (MILL *et al.*, 1997; AVERILL *et al.*, 2003).

No infarto do miocárdio, há uma superexpressão do receptor AT₂ resultando na preservação do ventrículo esquerdo, indicando um papel benéfico no controle de volume. Na pré-isquemia, age como um fator de proteção contra os prejuízos isquêmicos. Este receptor é encontrado nas células do músculo liso e artéria coronária. Promove vasodilatação, liberação de NO e inibição do crescimento e proliferação celular (CAREY & SIRAGI, 2003; VELEZ, 2008).

Outra enzima de grande importância na atuação do SRA é a ECA2, localizada inicialmente nas células endoteliais cardíacas e, mais recentemente nos miócitos cardíacos (GALLAGHER *et al.*, 2008). A importância da ECA2 na regulação da função cardíaca foi evidenciada em estudo com camundongos nocaute para o gene da ECA2, o qual mostrou dilatação no ventrículo esquerdo e aumento acentuado da expressão da ECA2 na zona do infarto, embora não apresentasse alteração na pressão arterial (ZISMAN, 2005). O papel da ECA2 na função cardíaca está sendo investigado pela manipulação genética ou via interferência farmacológica (KEIDAR *et al.*, 2007).

Por outro lado, estudos mostram que a Ang-(1-7) previne o surgimento de fibrose cardíaca sem alteração dos níveis pressóricos sistêmicos de ratos hipertensos. Sendo assim, o coração tem sido considerado um dos principais alvos de estudo das ações da Ang-(1-7). Animais transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) apresentaram níveis plasmáticos deste peptídeo aumentados em 2,5 vezes, o que seria responsável pela melhora significativa de todos os parâmetros da função cardíaca após a isquemia aguda do miocárdio. Os poucos estudos da literatura sugerem que este peptídeo tem função cardioprotetora (AVERILL *et al.*, 2003; GALLAGHER *et al.*, 2008). Estudos indicam uma resposta compensatória na falência cardíaca para manter os níveis da Ang-(1-7) elevados nos miócitos, prevenindo acúmulo excessivo de colágeno em diferentes modelos de hipertensão experimental (VARAGIC *et al.*, 2008). Além destas ações, a Ang-(1-7) ao ligar-se ao receptor *Mas* acoplado a proteína G, tem efeitos anti-hipertrófico e anti-fibrótico no coração. Estudos recentes nos quais foi utilizado modelo de camundongo nocaute para o receptor *Mas* mostraram baixa reatividade da Ang-(1-7) em fatias do ventrículo esquerdo destes animais (FERRARIO *et al.*, 2005; DANILCZYK & PENNINGER, 2006).

Mais recentemente, uma serino-proteinase, também capaz de converter Ang I em Ang II, denominada quimase, tem recebido atenção pela sua grande importância como via alternativa de geração de Ang II. Acredita-se que a quimase seja responsável por mais de 80% da geração da Ang II tecidual cardíaca e mais de 60% nas artérias (FLEMING, 2006). Tem sido demonstrado que a via da quimase é a mais importante do coração, para a geração da Ang II, não sendo encontrada no plasma (RESENDE & MILL, 2008; VELEZ, 2008). A sua atividade e expressão são reguladas por mecanismos ativadas principalmente sob condições fisiopatológicas ou na presença de inibidores da ECA (CRISTOVAM *et al.*, 2008). Estudos mostraram que bloqueadores crônicos de quimase podem exercer ação cardioprotetora favorável na diminuição da fibrose cardíaca. Outro dado interessante é que sua atividade tecidual aumenta no infarto do miocárdio (KANEMITSU *et al.*, 2008). Os processos inflamatórios também estimulam a liberação de quimases e estas agem como mediadores na inflamação (PALANIYANDI *et al.*, 2007). Assim, a geração das angiotensinas teciduais, pode exercer papel importante na

regulação da hipertrofia vascular e cardíaca (YAMADA *et al.*, 1991). Além disso, o uso de bloqueadores da ECA também previne a fibrose do miocárdio e melhora a remodelagem ventricular esquerda (CAREY, 2004).

2.2. Sistema renina angiotensina renal

O SRA renal foi o primeiro sistema local a ser descrito. As primeiras observações foram realizadas em estudos *in vivo*, nos quais o bloqueio do receptor AT₁ intrarrenal resultou em aumento do fluxo plasmático, do nível de filtração glomerular e da excreção de sódio e água (CAREY & SIRAGY, 2003).

Nos rins, os componentes do SRA estão presentes no aparelho justaglomerular, interstício e em vários segmentos do néfron. Todos os componentes do SRA também foram descritos nos podócitos (ROSIVALL, 2009) e nas células mesangiais (VIDOTTI *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2006).

O RNAm para o gene do AGT é encontrado principalmente nos túbulos proximais reto e convoluto e em pequenas quantidades expressas no glomérulo (TERADA *et al.*, 2003). A renina, enzima proteolítica de 40-50 kDa, é expressa principalmente no aparelho justaglomerular, no túbulo distal e proximal e no glomérulo. Dados recentes mostraram RNAm desta enzima também na urina, sugerindo a sua formação tubular (ANDRADE *et al.*, 2002; LEITE *et al.*, 2003; ROSIVALL, 2009).

A ECA é abundante nos rins, sendo localizada principalmente nos túbulos proximais, nas células mesangiais, nas células apicais e basolaterais do ducto coletor (HASHIMOTO *et al.*, 2004, BURRELL *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2006; QUINTO *et al.*, 2008). No rim o principal papel da Ang II é regular a hemodinâmica renal e a excreção de sódio, sendo capaz de exibir ações diuréticas em ratos com expansão de volume e estimular a reabsorção de sódio no túbulo renal em animais normotensos (DANILCZYK & PENNINGER, 2006). Esta regulação se dá através de alterações diretas na reabsorção de sódio no túbulo proximal e vasoconstrição arteriolar (ROSIVALL, 2009).

Em pacientes com doenças renais ou hipertensão, os níveis de Ang II plasmático apresentaram-se elevados (LAMBERT *et al.*, 2008; DANILCZYK & PENNINGER, 2006). Estudos mostraram que a hipertensão dependente de Ang II é caracterizada pelo aumento intrarrenal deste peptídeo e está

associada à redução da função renal (GONZALES-VILLA LOBOS *et al.*, 2009). Os níveis de Ang II no fluido intersticial renal é cerca de 1000 vezes maior do que os níveis plasmáticos (DANILCZYK & PENNINGER, 2006; BADER, 2010).

O receptor AT₁ é amplamente distribuído no rim, incluído as células da arteríola aferente e eferente, células mesangiais, células do túbulo proximal, membrana basolateral, túbulo distal, ductos coletores, podócitos glomerulares e células da mácula densa (CAREY & SIRAGY, 2003). No rim, a ativação do receptor AT₁ está associada com vasoconstrição renal e antidiurese (OUDIT, 2003; DANTAS & SANDBERG, 2005). No entanto, o receptor AT₂ é expresso nas células epiteliais, túbulo cortical e células do interstício (CAREY & SIRAGY, 2003). Na literatura, foram descritas apenas em roedores a existência de dois subtipos do receptor AT₁, o AT_{1A} e o AT_{1B}, ambos presentes nos rins, porém não apresentaram funções farmacológicas distintas (HADDAD *et al.*, 1997).

A ECA2 é predominantemente expressa na superfície apical das células epiteliais em contraste com a ECA que é distribuída na superfície apical e basolateral (LAMBERT *et al.*, 2008). A expressão de ECA2 está aumentada em ratos jovens diabéticos, exercendo papel renoprotetor por favorecer o aumento dos níveis de Ang-(1-7) intrarrenal (FLEMING *et al.*, 2005). A Ang-(1-7), nos rins, reduz a absorção de fluidos, induzindo natriurese e diurese pela inibição da Na⁺-K⁺-ATPase, além de potencializar o efeito vasodilatador da BK (DANILCZYK & PENNINGER, 2006; FERRARIO *et al.*, 2005; VARAGIC *et al.*, 2008).

3. Sistema tonina angiotensina

Existem vias alternativas na geração da Ang II independentes da renina e da ECA. Por exemplo, a Ang I pode ser formada pela ação da catepsina D e posteriormente convertida a Ang II por enzimas como tripsina, catepsina G, quimase e tonina. A catepsina G age em duas vias distintas, gerando All, a partir do substrato AGT ou agindo sobre a Ang I (BOUCHER *et al.*, 1972; SAYE *et al.*, 1993, VELEZ, 2008). A tonina é uma serino proteinase que libera Ang II não só a partir da Ang I, mas, diretamente do AGT e do tetradecapeptídeo (substrato sintético da renina) agindo assim em duas distintas vias do SRA (BOUCHER *et al.*, 1972; ARAÚJO *et al.*, 1991; SAYE *et al.*, 1993).

Tonina da glândula submandibular (Gsm) de rato foi descrita por Boucher *et al.* (1972). Foi denominada inicialmente β -enzima conversora, mais tarde, verificou-se que a tonina é diferente da ECA, quanto à especificidade pelos substratos e sua atividade catalítica. Esta enzima também mostrou ser diferente da renina ou isoreninas teciduais, sendo por isso, denominada tonina. Tonina é um polipeptídeo de cadeia simples, composto por 272 aminoácidos, formada por dez resíduos de cisteína, contendo isoleucina e prolina nas posições N e C-terminais, respectivamente (SEIDAH *et al.*, 1978; CHRÉTIEN *et al.*, 1980), apresentando 75% de similaridade na seqüência de aminoácidos com a calicreína (LOPES *et al.*, 1997).

Segundo GARCIA *et al.* (1977), tonina é capaz de promover a liberação de aldosterona, corticosterona, hormônio sexual e somatotropina. Tonina está presente na glândula pituitária e no cérebro e é capaz de hidrolisar beta-lipotropina, adrenocorticotropina e também está envolvida na degradação da substância P, agindo no tônus vascular, sendo capaz de gerar peptídeos vasoconstritores (Ang II) ou degradar agentes vasodilatadores (substância P) (CHRÉTIEN *et al.*, 1980). A injeção de tonina intracerebroventricular em rato, estimulou o apetite ao sal e ingestão de água, produzindo elevações na pressão arterial e frequência cardíaca. Tais efeitos foram bloqueados por administração prévia de losartan, indicando a formação de Ang II *in vivo* pela tonina (ARAÚJO *et al.* 2002).

Em rato tonina está presente em diversos tecidos como cérebro, rins, coração, próstata e principalmente na Gsm. Dados recentes mostram que tanto atividade tonina como seu RNAm estão presentes no coração, sendo os maiores níveis encontrados no átrio e que esta enzima pode estar envolvida com a hipertrofia desse órgão (BORGES *et al.*, 2003).

4. Animais transgênicos para o gene da tonina

A fim de estudar as vias alternativas na formação de angiotensinas e melhor compreender o papel fisiológico da tonina *in vivo*, nosso grupo gerou um camundongo que expressa tonina de glândula submandibular de rato, denominado TGM(rTon). Para a geração deste animal foi utilizado um promotor específico, o promotor da Gfap, para a expressão em astrócitos, que é uma proteína codificada pelo gene *gfa* (*glial fibrillary acidic*), sendo este, um

filamento intermediário encontrado abundantemente e quase que exclusivamente nos astrócitos. No entanto, a expressão do transgene não foi observada apenas no encéfalo como esperado, mas também, em estruturas extracerebrais (CARDOSO, 2002).

Alguns parâmetros fisiológicos já foram determinados para estes animais. Em experimentos nos quais foi induzida hipertrofia cardíaca pela injeção de isoproterenol, verificou-se que o TGM(rTon) apresentou resistência ao processo de hipertrofia sugerindo que tonina apresenta papel cardioprotetor. Portanto, nosso intuito é estudar e caracterizar o SRA renal e cardíaco nos animais TGM(rTon), a fim de compreendermos o papel fisiológico da tonina, sua participação na formação de Ang II e as possíveis modulações do sistema nesse modelo.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Caracterizar o sistema renina angiotensina nos rins e coração do camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)) e seu controle (C57BL/6), a fim de compreendermos o papel fisiológico da tonina e sua participação na formação de Ang II e as possíveis modulações do sistema nesse modelo.

A fim de obter os objetivos propostos acima, realizamos, em ambos os grupos, os seguintes procedimentos:

- avaliação da hemodinâmica cardíaca, medindo a pressão arterial e a frequência cardíaca;
- determinação da atividade específica da ECA e da tonina no rim e coração dissecados;
- quantificação das angiotensinas (Ang I, Ang II e Ang-(1-7)) no rim e coração dissecados;
- verificação de possíveis alterações na expressão da ECA nos ventrículos e rim, além da expressão da tonina e da ECA2 no rim.

Materiais e métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos transgênicos que expressam tonina de rato (TGM(rTon)) e seu controle (C57BL/6). Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Biofísica-UNIFESP, em sala climatizada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 h, recebendo durante todo o período água e ração à vontade. Os animais foram genotipados 4 semanas após o nascimento para a confirmação do transgene da tonina de rato. Ao completarem 12 semanas de idade, a pressão arterial e frequência cardíaca foram analisadas no período da manhã, e em seguida, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram os rins e o coração imediatamente removidos e lavados em solução salina (NaCl 0,9%). Os rins foram cortados em pedaços iguais e o coração separado em átrios [direto + esquerdo (AT)], ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina - UNIFESP (CEP- protocolo 0241/08).

2. Genotipagem dos camundongos

2.1. Extração de DNA

Um fragmento da cauda, de aproximadamente 0,5 cm, foi retirado para obtenção do DNA genômico e confirmação da presença do transgene nos animais. Cada fragmento foi colocado em tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 80 μL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,2% e 8 μL de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram incubadas a 55°C , sob agitação de 550 rpm, por aproximadamente 14 horas. Em seguida, foram incubadas a 95°C durante 10 minutos. Em cada amostra foram adicionados 700 μL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo EDTA 1 mM pH 8,0) e 8 μL de RNase (4 mg/mL). Em seguida as amostras foram incubadas novamente por 10 minutos a 37°C e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.2. Reação em cadeia da polimerase

Para a PCR foi utilizado 1 µL (~0,8 ng de DNA) de amostra proveniente do incubado (37°C), 2,0 µL de tampão de PCR (10x), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,8 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de iniciadores específicos para o gene da tonina: *AGGTGGTGTGAAGGTTATCG* e *CCTCCTTCCATCTCTCCTGC* (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL). O volume da reação foi completado com H₂O Milli-Q esterilizada para um volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas a 36 ciclos de amplificação, nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos para a desnaturação do DNA, 56°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C por 1 minuto para extensão da cadeia de DNA. No final do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 7 minutos a fim de garantir a extensão completa do produto amplificado. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (50 µg/mL) e visualizados por luz ultravioleta.

2.3. Eletroforese em gel de agarose

Na preparação do gel foram utilizados 40 mL de uma solução de agarose 1% e 16 µL de brometo de etídio 50 µg/mL. Esta mistura foi colocada em cubas horizontais de eletroforese para polimerização, contendo tampão TAE (Tris-acetato de sódio 0,04 M contendo EDTA 1 mM, pH ajustado para 7,2). Foram aplicados 10 µL do produto amplificado e 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 10% em glicerol 30%) em cada poço do gel. A corrida foi realizada em aproximadamente 30 minutos a uma voltagem constante de 100 V.

3. Avaliação da hemodinâmica cardiovascular

Para o registro direto das pressões arteriais (PA): sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC), foram implantados na artéria carótida esquerda, tubos de polietileno (PE-08 conectada ao PE-50, Clay Adams) preenchidos com soro fisiológico. Durante este procedimento os animais permaneceram anestesiados (halotano 0,1%). O tubo foi fixado com

fio de algodão à artéria e suas extremidades mais calibrosas exteriorizadas no dorso da região cervical. Após 48 horas da implantação dos tubos os animais foram submetidos aos procedimentos para avaliação hemodinâmica. Durante a realização dos registros, os animais estavam acordados e se movimentavam livremente pela gaiola individual. O tubo foi conectado a um transdutor eletromagnético (Narco Bio-Systems Miniature Pressure Transducer RP 1500) e os sinais de pressão arterial basal, foram gravados durante um período de 30 minutos. A FC e a PA foram analisadas batimento a batimento no programa AT/CODAS, numa frequência de amostragem de 1000 Hz por canal, com o objetivo de quantificar as mudanças relacionadas aos dois parâmetros. A FC foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos.

4. Atividade tonina-símile

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida com o auxílio da Prof^a. Dr^a. Mércia de Paula Lima, do Departamento de Enfermagem Básica da Escola de Enfermagem da UFMG. O anticorpo anti-Ang II utilizado no radioimunoensaio (RIE), apresentando título de 1/4000 foi produzido no laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, conforme o método proposto por Lemos (1991). O anticorpo anti-tonina de rato também foi produzido neste laboratório, utilizando-se tonina isolada de glândula submandibular de rato conforme método proposto por Araujo *et al.* (1991).

4.1. Incubação

O coração dissecado e os rins, foram lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e homogeneizados na proporção de 1 g de tecido para 4 mL de tampão, constituído de solução de sacarose 250 mM contendo os seguintes inibidores a 10 mM (o-fenantrolina, EDTA, tetracionato de sódio e 2,2-dipiridil) e pH ajustado para 7,0. Alíquotas do sobrenadante do homogenato de cada estrutura do coração, contendo 2 µg de proteína, foram incubadas com 5 µg do substrato tetradecapeptídico sintético, correspondente à porção N-terminal do AGT, para a determinação da atividade da tonina. O volume final foi ajustado para 180 µL com adição de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 contendo os inibidores

descritos acima. A Ang II liberada no meio de incubação foi determinada através de radioimunoensaio (GUALBERTO *et al.*, 1992).

4.2. Radiomarcção da angiotensina II

O método proposto por Nielsen *et al.* (1971) foi utilizado para a radiomarcção da Ang II, no qual se emprega a cloramina T como agente oxidante. Para cada 50 µg de Ang II, dissolvida em 10 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,4, foram adicionados 1,0 mCi de ¹²⁵I e 50 µg de cloramina T dissolvidas em 500 µL de tampão fosfato 0,5 M pH 7,4. Após um minuto de incubação com agitação em vórtex, a reação foi interrompida pela adição de 150 µL de uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). A purificação da Ang II monoiodada foi realizada utilizando-se de coluna de fase reversa (MinoRPC) em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. A coluna foi eluída com uma solução de acetonitrila 25% (v/v) em TFA 0,1% (v/v) num fluxo de 1,0 mL por minuto. A radioatividade das frações coletadas foi mensurada por meio de um cintilador gama. Em seguida foi determinada a capacidade de ligação das frações obtidas na cromatografia, incubando-as com o anticorpo anti-Ang II por um período de 18 horas à temperatura de 4 °C. A capacidade de ligação antígeno-anticorpo, foi determinada pela relação Bo/T, sendo Bo a radioatividade ligada ao anticorpo na ausência de antígeno frio (padrão) e T a radioatividade total utilizada na incubação. As frações que apresentaram capacidade de ligação entre 25 e 50% foram estocadas a -20 °C e utilizadas para a realização dos ensaios para verificação de atividade tonina símile.

4.3. Radioimunoensaio para angiotensina II

Utilizamos solução padrão estoque de Ang II, em torno de 10⁻³ M, que foi diluída seriadamente até uma faixa de concentração de 10⁻⁹ a 10⁻¹¹ M, como mostra a tabela 1, em tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo gelatina 0,1% (p/v), azida sódica 0,1% (p/v), NaCl 150 mM e EDTA 1 mM e pH ajustado para 7,4 (tampão RIE), para a construção da curva padrão mostrada na figura 2. As amostras foram ensaiadas em triplicata e os padrões de angiotensina em duplicata. O volume de angiotensina padrão foi pipetado em cada tubo da curva, variando de 40 a 240 µL. A angiotensina marcada (¹²⁵I-Ang II) foi inicialmente diluída em tampão RIE de modo a ser obtido aproximadamente

7000 cpm em 100 μ L de solução. Desta solução foram pipetados 100 μ L em cada tubo do ensaio. A seguir, 50 μ L das amostras (diluídas 50 vezes) provenientes das incubações prévias, como descrito anteriormente, foram pipetadas em triplicata. Após esta etapa, foram pipetados 100 μ L de anticorpo anti-Ang II (diluído 1/4000) em todos os tubos do ensaio, exceto nos referentes à ligação não específica (LNE) e total. O volume de cada tubo foi ajustado para 500 μ L com tampão RIE. Após agitação dos tubos, estes foram incubados a 4°C por 20 horas. Transcorrido este período, foi feita a separação da angiotensina radioativa livre daquela ligada ao anticorpo por adsorção em carvão em suspensão contendo 0,625 g de carvão e 0,0625 g de dextran T-70 para cada 100 mL de tampão RIE. Esta suspensão foi mantida em banho de gelo e dela foi pipetado um 1,0 mL para cada tubo de ensaio, exceto nos tubos referentes ao controle do total, nos quais foram pipetados 1,0 mL de tampão RIE. Após agitação os tubos foram mantidos em repouso por 15 minutos em banho de gelo e então submetidos a centrifugação a 4°C, por 15 minutos, a 2.000 *xg*. O sobrenadante foi decantado e submetido a contagem em contador gama, sendo os cálculos baseados na dependência do logito B/Bo e em função do logaritmo da concentração do padrão (RODBARD *et al.*, 1969), sendo B e Bo, as contagens obtidas referentes a Ang II marcada, ligada ao anticorpo, na presença e na ausência da Ang II padrão, respectivamente.

A reação cruzada entre o substrato e o anticorpo anti-Ang II também foi descontada através de curva padrão obtida somente para a interação entre o substrato e o anticorpo. No ensaio incluímos ainda, outros três tubos contendo somente a Ang II marcada para a determinação da ligação não específica, representada pela contagem registrada na ausência do anticorpo anti-Ang II.

TABELA 1

Curva-padrão do radioimunoensaio

Ang II padrão (M)	*Ang II-I ¹²⁵	**Anticorpo	Tampão	Volume final
5,0x10 ⁻⁹	100 µL	100 µL	180 µL	500 µL
2,5 x 10 ⁻⁹	100 µL	100 µL	60 µL	500 µL
1,0 x 10 ⁻⁹	100 µL	100 µL	252 µL	500 µL
6,0x 10 ⁻¹⁰	100 µL	100 µL	220 µL	500 µL
3,0 x 10 ⁻¹⁰	100 µL	100 µL	100 µL	500 µL
1,5 x 10 ⁻¹⁰	100 µL	100 µL	260 µL	500 µL
7,5 x 10 ⁻¹¹	100 µL	100 µL	220 µL	500 µL
3,75 x 10 ⁻¹¹	100 µL	100 µL	100 µL	500 µL
Bo	100 µL	100 µL	300 µL	500 µL
LNE	100 µL	-	400 µL	500 µL
TOTAL	100 µL	-	400 µL	500 µL

*7.000 cpm/100 µL; **Anticorpo diluído 800 vezes.

Os resultados foram projetados em papel log-logit (figura 2) para extrapolação dos valores referentes às amostras.

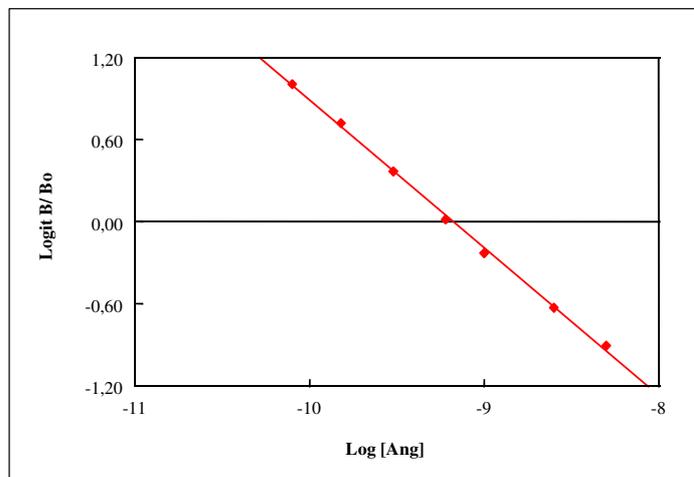


Figura 2. Curva padrão do radioimunoensaio.

5. Atividade da ECA

O tecido renal e as estruturas cardíacas foram homogeneizados como descrito por Oliveira *et al.* (2000), em tampão borato 400 mM, pH 7,2, contendo sacarose 340 mM e NaCl 900 mM, na presença de PMSF 0,1 mM, inibidor de serinil proteinases. Os tecidos foram homogeneizados na proporção de 1 g de

tecido para 10 mL de tampão. O homogenato foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante armazenado a -80° C. O sobrenadante proveniente do homogenato foi utilizado tanto para determinação da atividade da ECA quanto para o Western *blotting* (ver itens 7 e 8).

A atividade da ECA foi medida fluorimetricamente, utilizando-se como substrato Hipuril-His-Leu (HHL) (FRIEDLAND & SILVERSTEIN, 1976) 5 mM e Z-Phe-His-Leu (ZPhe-HL) 1 mM (PIQUILLOUD *et al.*, 1970) (Bachem Co, EUA). O tampão padrão utilizado para diluir os substratos foi o borato de sódio 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 300 mM e ZnSO₄ 0,1 mM. Alíquotas de homogenato renal (10 µL, diluídas 10 vezes) e das estruturas cardíacas (10 µL), preparadas como descrito acima (item 6), foram incubadas a 37°C com 200 µL dos substratos HHL e ZPhe-HL, separadamente, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com adição de 1,5 mL de NaOH 280 mM e o dipeptídeo His-Leu liberado foi acoplado a 100 µL de *orto*-ftaldialdeído (20 mg/mL em metanol), marcador fluorescente da reação. A reação com *orto*ftaldialdeído foi interrompida após 10 minutos com adição de 200 µL de HCl 3 M. A seguir foi feita a leitura em espectrofluorímetro (Hitachi F 200, Japão) (excitação 360 nm e emissão 500 nm). Para o cálculo da atividade da ECA, foi feita uma curva padrão do dipeptídeo His-Leu (Sigma Co, EUA) nas concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 10 nmol sendo determinado um fator para ser utilizado como base de cálculo. O resultado foi expresso em mU/mg de proteína.

6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi desenvolvida segundo o método descrito por Laemmli (1970). Amostras dos sobrenadantes previamente preparados foram dialisadas contra água em centricon (Millipore, USA), liofilizadas e redissolvidas em 30 µL de tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,8 contendo glicerol e sódio dodecil sulfato 10%, β-mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,05%. As amostras (40 µg de proteína) foram aquecidas em banho seco, a 95 °C, por 4 min. O mesmo procedimento foi empregado com a solução padrão (BioRad, USA). As amostras depois de preparadas, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. Após a corrida eletroforética, sob tensão de 120 V e

corrente de 60 mA, as massas moleculares das enzimas foram determinadas por comparação com as proteínas padrão (BioRad, EUA).

7. Western blotting

Após a realização da eletroforese, foi realizada a transferência eletroforética (40 V, 45 minutos) das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare, Suécia). A membrana foi incubada com solução bloqueadora 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) em tampão Tris 200 mM, pH 7,5, contendo NaCl 500 mM, durante 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal 9B9 anti-ECA (1:2000) (Chemicon International, USA) *overnight*. Após esse período foi realizada a incubação com o anticorpo secundário biotilado (1:2000) (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) por 2 horas. A revelação colorimétrica foi feita utilizando Nitroblue cloreto de tatrazólio (NBT) 4-bromo-3-cloro-inlylil fosfato e (BCIP) (BioRad, EUA) diluídos em N-N'dimetilformamida e tampão Tris 100 mM, pH 9.5, contendo NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM. O mesmo procedimento descrito acima, foi realizado para quantificar a expressão protéica da ECA2, utilizando anticorpo recombinante anti-ECA2 (R&D Systems, USA) e da tonina, utilizando anticorpo anti-tonina produzido conforme método proposto por Araújo *et al.* (1991). Como normalizador da reação, foi utilizado anticorpo β -actina (Sigma, Co, EUA) (RONCHI *et al.*, 2007).

8. Quantificação das angiotensinas

A partir do homogenato do tecido renal e das estruturas cardíacas separadas (VD, VE e AT), foi feita a extração de angiotensinas. O tecido foi pesado e homogeneizado com tampão fosfato de sódio 100 mM contendo sacarose 340 mM, NaCl 300 mM, pH 7,2. As amostras foram concentradas em colunas Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Irlanda), ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a aplicação das amostras e lavagem das colunas com água (10 mL), os peptídeos de interesse foram eluídos com uma mistura contendo etanol, ácido acético e água (90:4:6). Os eluatos foram liofilizados, redissolvidos em 500 μ L de fase móvel A (acetonitrila 5% em ácido ortofosfórico 0,1%) e filtrados

utilizando membrana millex 0,22 μm (Millipore, USA) antes de serem submetidos à HPLC. O peptídeo foi separado em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm, 7 μ), (Perkin Elmer's Brownlee Columns, EUA), utilizando gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (acetonitrila 95% em ácido ortofosfórico 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 min. A coluna foi calibrada utilizando padrões sintéticos e a detecção do peptídeo foi realizada em absorvância de 214 nm. Os resultados foram expressos em pmol/g e corrigidos pelo peso do tecido. Os cálculos foram efetuados a partir de uma curva-padrão de concentração conhecida (RONCHI *et al.*, 2007).

9. Dosagem de proteína

A concentração de proteína das amostras provenientes dos homogenatos foi estimada através do método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão (Bio-Rad Protein Assay, USA). A mistura foi colocada em microplaca e após um período de repouso de 5 minutos foi realizada a leitura em 590 nm usando um leitor de placas (Multiskan EX, Labsystems, USA).

10. Análise dos dados

As análises dos dados de todos os grupos foram feitas por test "t" de *Student* não pareado e ANOVA bifatorial seguido pelo teste Tukey. Foi adotado para todos os experimentos um valor de $p \leq 0,05$, como nível de significância e os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Genotipagem

Após a corrida eletroforética foi observado no gel o fragmento esperado de 215 pb, correspondente ao gene da tonina, definindo-se assim o genótipo dos animais. A figura 3 ilustra alguns animais genotipados utilizados no presente estudo.

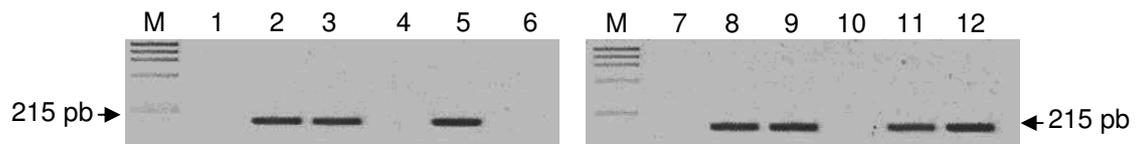


Figura 3. Géis de agarose (1%) mostrando os produtos da PCR de amostras provenientes de animais considerados transgênicos e selvagens. M, marcador de massa molecular. O produto correspondente ao fragmento do gene da tonina apresentou 215 pb. Os números na parte superior da figura correspondem aos animais estudados. As linhas: 1, 4, 6, 7 e 10 correspondem aos animais selvagens. As linhas: 2, 3, 5, 8, 9, 11 e 12 indicam os animais geneticamente modificados.

2. Hemodinâmica cardiovascular

Não houve diferença significativa para os parâmetros avaliados: PAD ($103,7 \pm 4,75$ vs. $104,6 \pm 6,08$ mmHg), PAS ($140,3 \pm 6,63$ vs. $135,4 \pm 4,65$ mmHg), PAM ($120,0 \pm 3,62$ vs. $118,5 \pm 6,30$ mmHg) (figura 4) e frequência cardíaca ($560,2 \pm 26,63$ vs. $521,76 \pm 27,21$ bpm) (figura 5) nos animais transgênicos e seu controle, respectivamente.

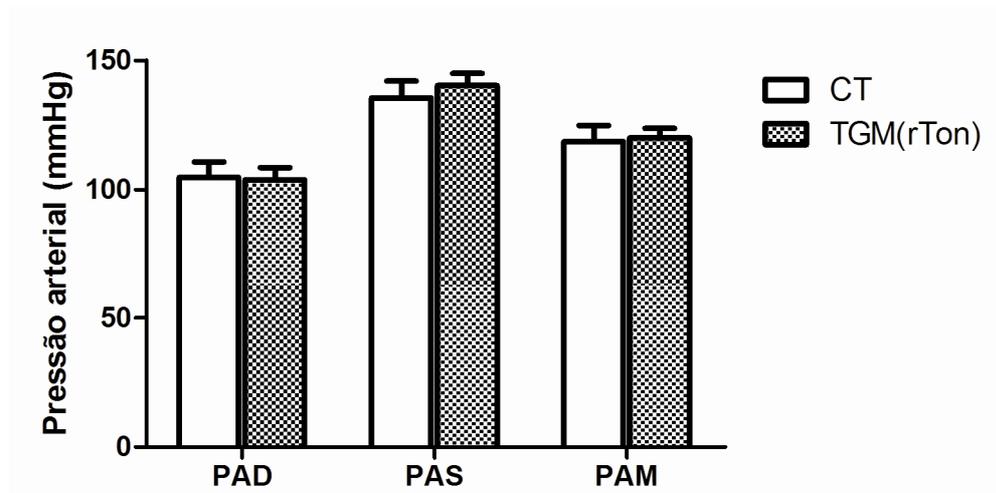


Figura 4. Valores da pressão arterial nos grupo controle (CT) e no grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média (N = 7 - 8).

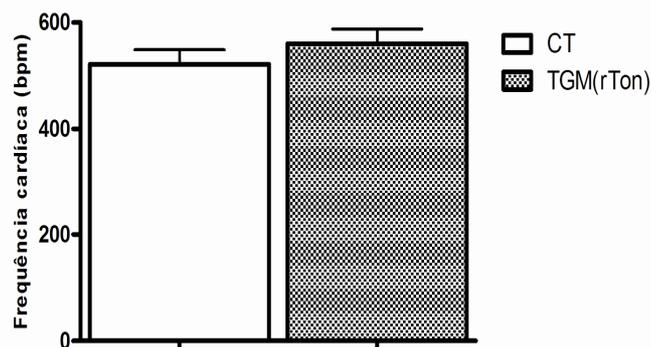


Figura 5. Valores da frequência cardíaca no grupo controle (CT) e no grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média (N = 7 - 8).

3. Atividade da tonina

Na tabela 2 estão apresentados os valores da atividade específica tonina nos tecido renal, VD, VE e AT. Os dados mostram um aumento significativo da atividade da tonina renal no grupo TGM(rTon) ($18,7 \pm 1,2$ mol de Ang II formada/min/mg de proteína) quando comparado ao grupo CT ($6,75 \pm 1,20$ mol de Ang II formada/mim/mg de proteína, $p < 0,001$). Também houve aumento significativo da atividade da tonina no AT no grupo TGM(rTon) quando comparado ao grupo CT.

TABELA 2

Atividade específica da tonina expressa em mol de Ang II formada/min/mg de proteína dos grupos controle (CT) e transgênico (TGM(rTon)).

Estrutura	CT	TGM(rTon)
rim	$6,75 \pm 1,20$	$18,7 \pm 1,2$
VD	$1,08 \pm 0,19$	$0,58 \pm 0,14^*$
VE	$0,16 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,04$
AT	$1,13 \pm 0,24^{##}$	$3,54 \pm 0,15^{*#}$

Os dados foram expressos como a média \pm epm. (** $p < 0,0001$, test t de *Student*, não pareado). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CT. #Estatisticamente diferente em relação às estruturas cardíacas no mesmo grupo. ## Estatisticamente diferente em relação ao VE no respectivo grupo (* $p < 0,05$, test t de *Student*, não pareado *One way ANOVA + tukey*, # $p < 0,05$).

Por outro lado, observou-se diminuição da atividade da tonina no VD do grupo TGM(rTon) em relação ao grupo CT ($p < 0,05$), sem diferença significativa no VE. A atividade foi significativamente maior nos átrios no grupo TGM(rTon) em relação às outras estruturas cardíacas ($p < 0,05$). No grupo CT a atividade do AT foi significativamente maior em relação ao VE ($p < 0,05$).

4. Atividade da ECA

Os dados apresentados na figura 6 mostram a atividade ECA no rim utilizando-se os substratos ZPhe-HL e HHL, específicos para a porção N e C-domínio respectivamente. A atividade da ECA foi estatisticamente maior no grupo TGM(rTon) ($23,01 \pm 1,39$ mU/mg de proteína) comparada ao grupo CT ($11,61 \pm 1,49$ mU/mg; $p < 0,0001$) para o substrato ZPhe-HL. Em relação ao substrato HHL, a atividade também foi maior no grupo TGM(rTon) ($12,14 \pm 0,70$ vs. $8,66 \pm 1,04$ mU/mg de proteína; $p < 0,05$, respectivamente).

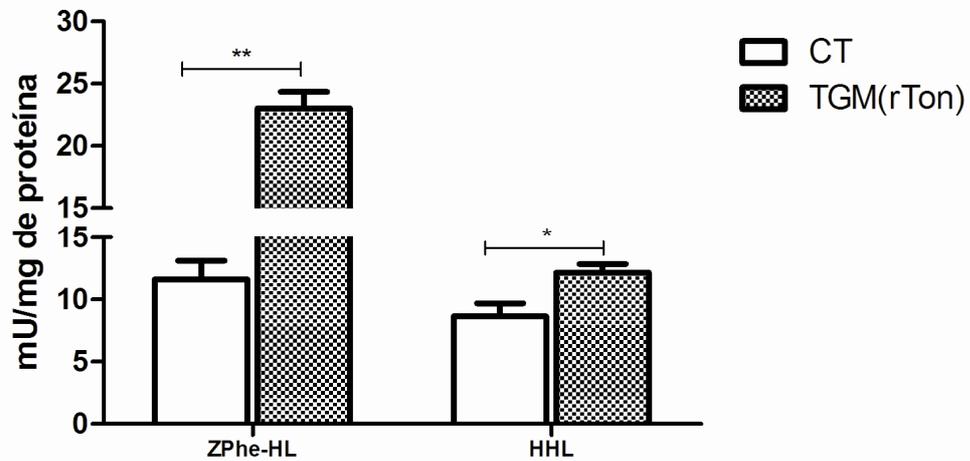


Figura 6. Atividade da ECA (mU/mg de proteína) no rim, utilizando o ZPhe-HL e HHL como substratos. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média ($*p < 0,05$ e $**p < 0,0001$, test t de *Student*, não pareado), (N = 8 - 10).

No coração, utilizando-se o substrato ZPhe-HL, a análise estatística mostrou interação dos fatores grupo (CT x TGM(rTon)) e local analisado (VD x VE x AT). Em ambos os grupos, a atividade da ECA foi maior nos átrios do que no VD e VE. Porém, foi observada maior atividade da ECA no grupo TGM(rTon) ($31,01 \pm 2,13$) em relação ao grupo CT ($16,58 \pm 5,63$ mU/mg; $p < 0,05$, Figura 7) nos átrios, sem diferença entre os grupos no VD (TGM(rTon) = $5,34 \pm 0,56$, CT = $6,36 \pm 0,49$ mU/mg, $p > 0,05$) ou no VE (TGM(rTon) = $5,30 \pm 0,31$, CT = $6,68 \pm 1,11$ mU/mg, Figura 7).

Utilizando-se como substrato o HHL, a análise de variância bifatorial indicou efeito significativo somente do local analisado, sem diferença significativa entre os grupos CT e TGM(rTon). Em ambos os grupos, a atividade da ECA foi maior nos átrios (TGM(rTon) = $18,72 \pm 1,54$, CT = $21,76 \pm 5,82$ mU/mg) em relação ao VD (TGM(rTon) = $1,84 \pm 0,10$, CT = $1,84 \pm 0,10$ mU/mg) e VE (TGM(rTon) = $1,69 \pm 0,07$, CT = $2,50 \pm 0,53$ mU/mg; $p < 0,05$; Figura 7).

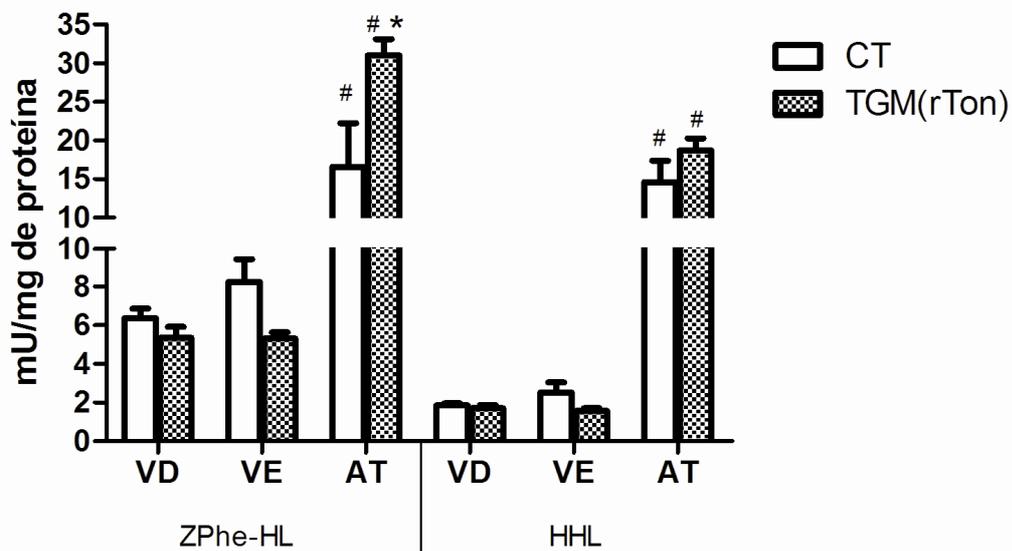


Figura 7. Atividade da ECA (mU/mg de proteína) no VD, VE e AT utilizando o ZPhe-HL e HHL como substratos. *Estatisticamente diferente do grupo controle, na mesma estrutura cardíaca. # Estatisticamente diferente do VE e VD, no mesmo grupo. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média ($p < 0,05$, ANOVA bifatorial + Tukey), (N = 6 - 6).

As razões ZPhe-HL/HHL nos tecidos renal e cardíaco estão apresentadas na tabela 3.

TABELA 3

Razão ZPhe-HL/HHL para a atividade ECA nos tecido renal e cardíaco.

TECIDO	GRUPO	
	CT	TGM(rTon)
RIM	1,34	1,89
VD	3,45	2,9
VE	2,67	3,13
AT	1,13	1,65

As amostras foram incubadas com os substratos ZPhe-HL e HHL, como descrito nos materiais e métodos.

5. Quantificação das angiotensinas

Os níveis renais de Ang-(1-7) do grupo TGM(rTon) ($91,16 \pm 12,59$ pmol/g; figura 8) mostrou-se bastante diminuído em comparação ao grupo CT ($1027,0 \pm 57,33$ pmol/g, $p < 0,0001$). Também os níveis de Ang I ($63,03,0 \pm 9,11$ pmol/g) apresentaram-se diminuídos no grupo TGM(rTon) em relação ao grupo CT ($149,03 \pm 19,92$ pmol/g, $p < 0,05$; figura 8). Não houve diferença estatística para os níveis de Ang II (TGM(rTon) = $101,6 \pm 14,80$, CT = $95,17 \pm 18,72$ pmol/g).

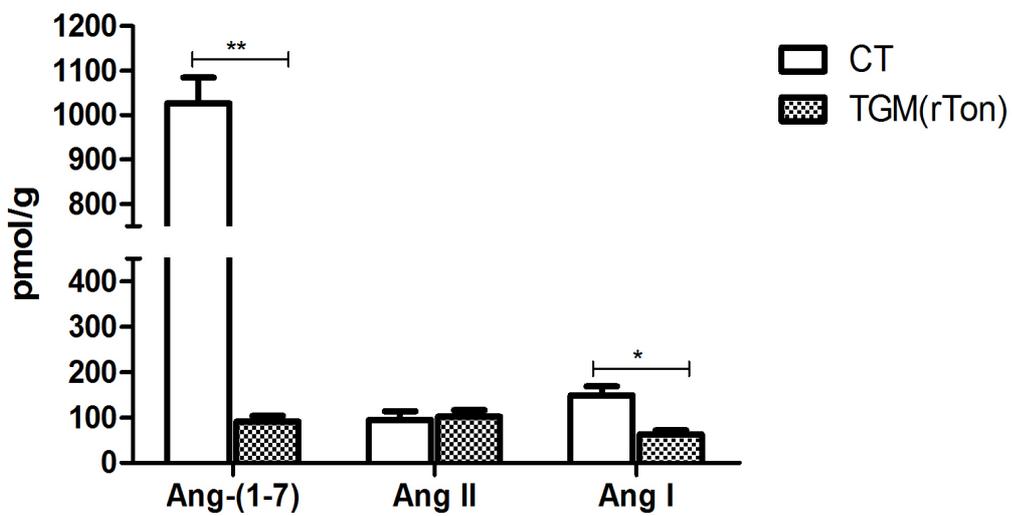


Figura 8. Níveis das angiotensinas (pmol/g de tecido) no rim. Grupo controle (CT) e grupo transgênico (TGM(rTon)). Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$, test t de *Student*, não pareado), (N = 6 - 7).

6. Western blotting

6.1. Níveis de expressão de tonina no rim

Utilizando anticorpo específico para tonina da glândula submandibular de rato, analisamos a expressão desta enzima no homogenato renal do grupo CT e TGM(rTon). A figura 9A mostra uma banda de aproximadamente 25 kDa, correspondente à tonina, que se apresenta mais intensa no grupo TGM(rTon) quando comparada ao grupo CT. A figura 9B apresenta a densidade relativa tonin/ β -actina, confirmando que houve um aumento significativo da expressão da tonina no grupo TGM(rTon) ($5,54 \pm 0,08$) quando comparada ao seu controle ($3,74 \pm 0,4$, $p < 0,05$).

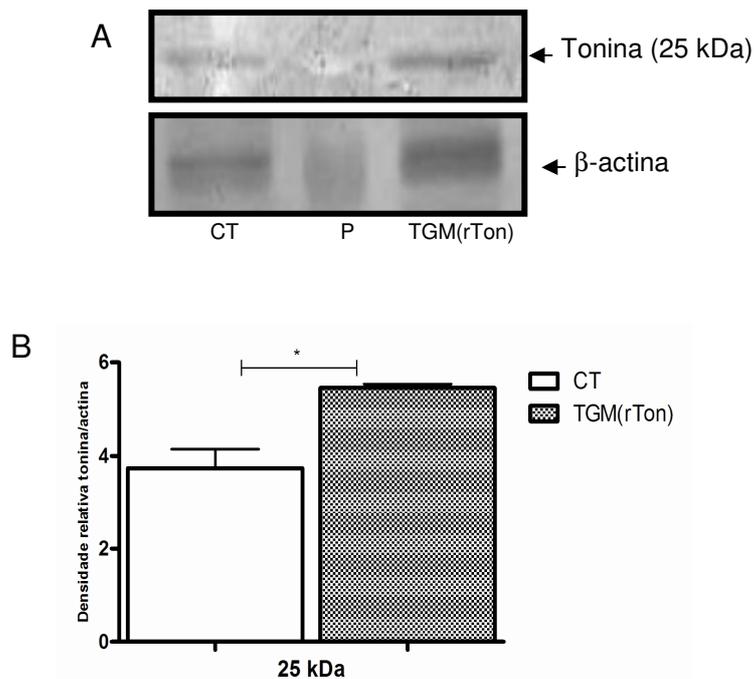


Figura 9. A: Imunoreatividade à tonina de amostras provenientes do homogenato renal utilizando-se anticorpo anti-tonina. **B:** Densidade relativa (DR) tonina/ β -actina utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. (* $p < 0,05$, test t de *Student*, não pareado), (N = 4 - 4).

6.2. Níveis de expressão de ECA no rim

Além da atividade da ECA verificamos também os níveis de expressão protéica das isoformas da ECA por meio da técnica de *Western blotting*. Após a revelação da membrana, observou-se uma banda de 190 kDa (ECA somática) e outra de 65 kDa correspondente a isoforma N-domínio da ECA em ambos os grupos (figura 10A). De acordo com a densidade relativa (ECA/ β -actina) houve um aumento significativo nos níveis de expressão da isoforma de 65 kDa no grupo TGM(rTon) ($0,99 \pm 0,01$) quando comparado ao seu controle ($0,82 \pm 0,03$; figura 10; $p < 0,05$). Não houve diferença estatística para a isoforma de 190 kDa ao compararmos os grupos (CT e TGM(rTon)) (Figura 10).

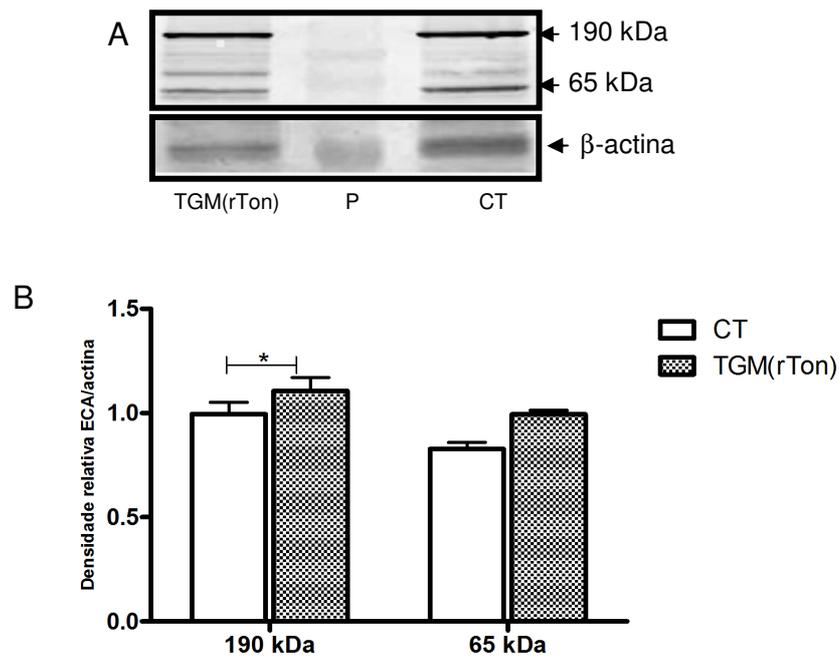


Figura 10. A: Imunoreatividade à ECA de amostras provenientes do homogenato renal utilizando-se anticorpo monoclonal 9B9. **B:** Densidade relativa ECA/ β -actina, utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. (* $p < 0,05$, test t de *Student*, não pareado), (N=8 - 8).

6.3. Níveis de expressão de ECA2 no rim

Com relação a expressão da ECA2, foi detectada uma banda imunoreativa de 90 kDa, sem diferença estatística em ambos os grupos (figura 11A).

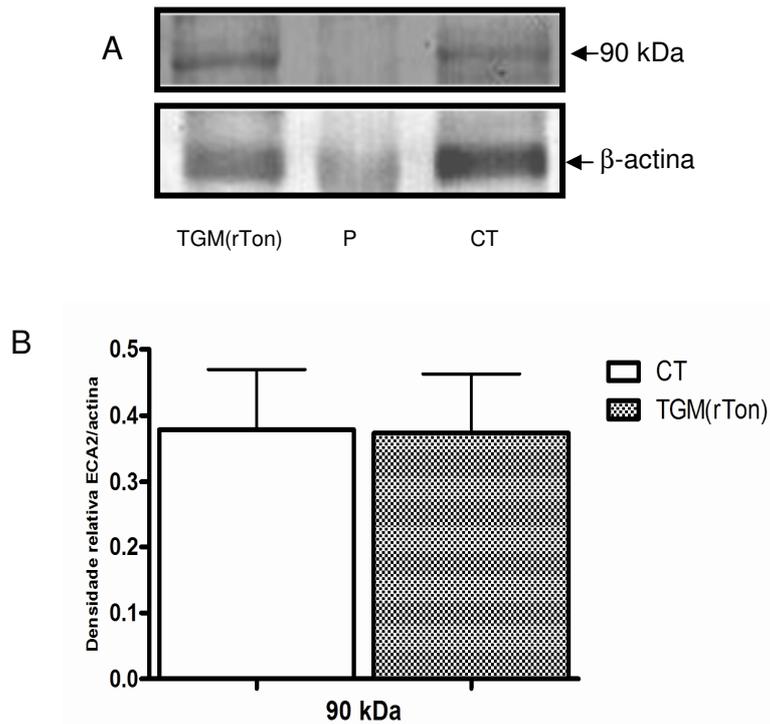


Figura 11. A: Imunoreatividade à ECA2 de amostras de proteínas de homogenato renal determinada utilizando-se de anticorpo recombinante para ECA2. **B:** Densidade relativa ECA2/ β -actina utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. ($p > 0,05$, test t de *Student*, não pareado), (N = 4 - 4).

6.4. Níveis de expressão de ECA nas estruturas cardíacas

A expressão protéica da ECA tecidual no VD e VE, mostrou a expressão da ECA somática (190 kDa) e da isoforma N-domínio (65 kDa) nos dois grupos (figuras 12A e 12B). A densidade relativa (ECA/ β -actina) no VD indicou um aumento significativo nos níveis de expressão da isoforma de 65 kDa para o grupo TGM(rTon) ($0,75 \pm 0,03$) quando comparado ao grupo CT ($0,43 \pm 0,06$, $p < 0,05$) (figura 12C), sem diferença no VE. Não houve diferença na expressão da ECA 65 kDa entre os ventrículos em cada grupo estudado. Os níveis de expressão da ECA somática (190 kDa) foi maior no VD do que no VE, em ambos grupos. Porém não houve diferença significativa nos níveis de expressão desta isoforma entre os grupos tonina e controle.

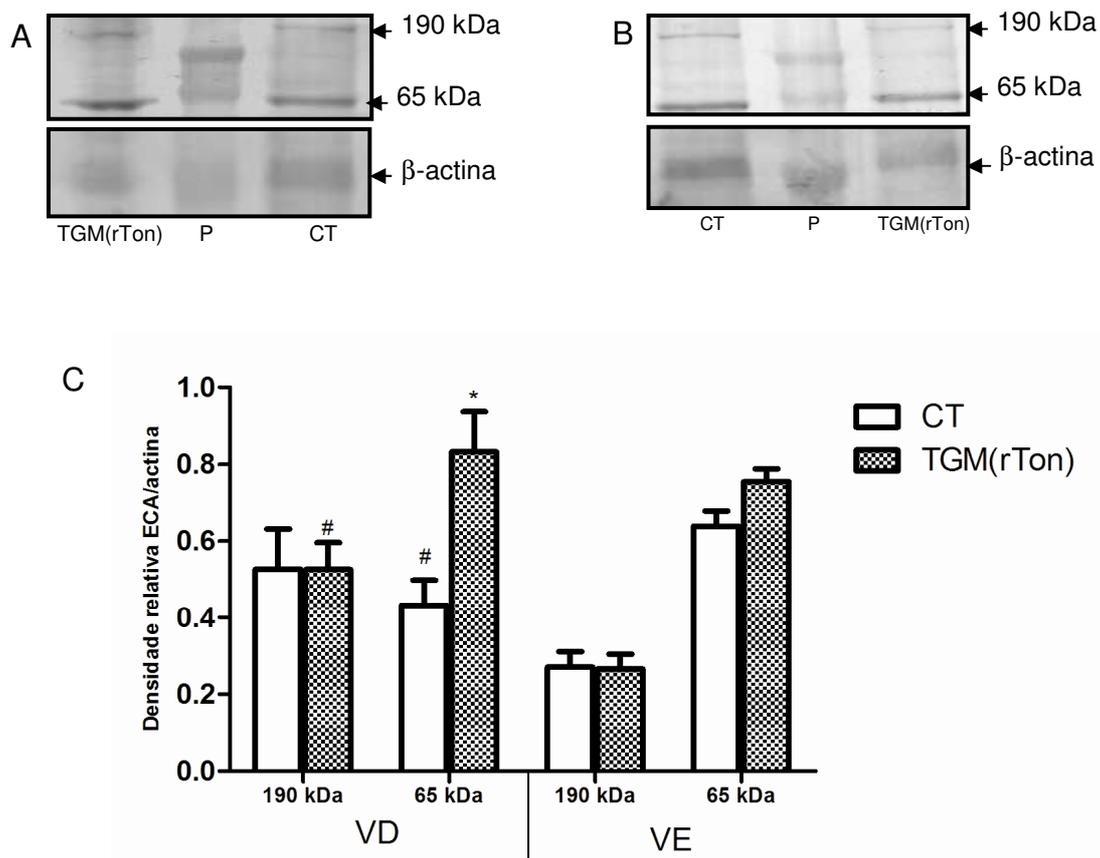


Figura 12. A: Imunoreatividade à ECA determinada utilizando-se de anticorpo monoclonal 9B9. Amostras provenientes do homogenato do VD. **B:** Amostras provenientes do VE. Ambas as isoformas da ECA (190 kDa e 65 kDa) foram detectadas nos grupos VD e VE. **C:** Densidade relativa ECA/ β -actina, utilizando o anticorpo anti- β -actina como normalizador da reação. Grupo controle (CT), grupo transgênico (TGM(rTon)) e P (marcador de massa molecular). *Estatisticamente diferente do grupo controle, na mesma estrutura cardíaca. # Estatisticamente diferente do VE, no mesmo grupo. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. ($p < 0,05$, ANOVA bifatorial + Tukey), (N = 4 - 4).

Discussão

V. DISCUSSÃO

Os SRA teciduais são regulados autonomicamente e exercem relevante papel dentro do respectivo órgão, além de participar do desenvolvimento de diversas patologias (PAUL *et al.*, 2006; BADER & GANTEN, 2008). O principal motivo para o estudo dos componentes do SRA tecidual, sobretudo nos rins e no coração, está relacionado à importância destes órgãos no controle cardiovascular (LEUNG, 2004).

A proposta deste trabalho visa evidenciar o papel fisiológico da tonina na modulação do SRA tecidual no modelo de camundongo transgênico que expressa tonina de rato, o TGM(rTon), uma vez que o papel fisiológico desta enzima ainda não está esclarecido. Cabe lembrar que a tonina é uma serino proteinase, da família da calicreína, que age diretamente sobre o AGT, gerando Ang II. Este estudo foi focado no tecido renal e cardíaco. Especificamente, verificamos os parâmetros hemodinâmicos cardiovasculares, as possíveis alterações na expressão protéica das formas da ECA e ECA2, a quantificação dos níveis das angiotensinas e as atividades da ECA e da tonina símile.

Para tanto, os animais foram divididos em dois grupos: transgênico e controle. Os resultados indicam que tonina, apesar da capacidade de gerar Ang II não alterou a pressão arterial e a frequência cardíaca dos animais TGM(rTon) em relação ao grupo controle. Esses dados diferem dos resultados de Cardoso *et al.* (2010), que encontraram aumento na pressão arterial média, mensurada por telemetria e por canulação nos animais TGM(rTon). Este resultado intrigante pode ser explicado pela diferença na linhagem utilizada. A linhagem controle do TGM(rTon) objeto de nosso estudo é a C57bl6, enquanto, que a linhagem controle do animal objeto do estudo de Cardoso *et al.* (2010) foi a 129/SvEv. A influência da linhagem já foi demonstrada por outros autores, por exemplo por Gurley *et al.* (2006) que mostraram que a inativação do ECA2 em camundongos C57bl/6 resultou em um moderado aumento da pressão arterial, enquanto que, nos camundongos 129/SvEv, que também tiveram a ECA2 inativada, não houve diferença na pressão arterial quando comparado ao grupo controle. Os autores atribuíram a diferença nos resultados à variação genética, ou seja, aos diferentes linhagens dos animais.

Por outro lado, Bader & Ganten (2008) descreveram que animais transgênicos que superexpressam AGT, ECA ou alguma enzima que libera Ang II, não apresentaram hipertrofia cardíaca e permaneceram normotensos, apesar do aumento da expressão de Ang II no coração. Logo os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os resultados destes autores, mostrando dados conflitantes no que diz respeito a ação da tonina sobre a pressão arterial. Assim, são necessários novos estudos para elucidar o papel da tonina no controle de parâmetros cardiovasculares.

De acordo com Cardoso *et al.* (2010), o maior nível de expressão da tonina detectada nos animais TGM(rTon) foi no encéfalo. Apesar da constatação da expressão do transgene em diferentes órgãos e tecidos, postularam que talvez a tonina pudesse estar na sua forma não ativa. Encontraram maior atividade tonina no encéfalo, seguido da glândula submandibular, próstata, adrenal, tecido adiposo e aorta. Nossos resultados referentes à atividade mostram que a tonina está na sua forma ativa nos rins e nas estruturas cardíacas.

Borges *et al.* (2003) relataram, pela primeira vez, a atividade tonina no coração de rato, bem como, a presença do mRNA para a enzima neste tecido. Neste mesmo estudo, também foi determinada a atividade tonina-símile nas estruturas cardíacas de ratos tratados com isoproterenol ou salina. O que se observou foi aumento significativo da atividade da tonina nos átrios dos animais que desenvolveram hipertrofia, devido ao tratamento com isoproterenol, sugerindo possível participação da tonina no processo de hipertrofia cardíaca. Os nossos dados corroboram parcialmente estes resultados, já que detectamos maiores níveis da atividade tonina nos AT dos animais do grupo TGM(rTon) quando comparamos com os ventrículos (VE e VD). Além disso a atividade encontrada no AT do grupo transgênico foi significativamente maior em relação ao grupo controle. Pelo fato de termos encontrado no AT, grande quantidade de tonina, podemos sugerir que o interstício é provavelmente o caminho pelo qual a tonina deixaria o AT para atingir os ventrículos.

Nos rins observamos aumento da atividade tonina e da ECA, acompanhado de redução da Ang-(1-7) e Ang I, sem diferença na Ang II, em relação aos animais controles. Considerando que Malhotra (1999) mostrou, em estudos realizados com ratos, que a tonina é capaz de hidrolisar peptídeos

sintéticos que reproduzem a seqüência do pró-ANP, podendo estar envolvida na ativação do ANP *in vivo*, podemos supor que o ANP esteja contrabalançando a diminuição da Ang-(1-7) observada nos rins dos animais transgênicos no presente estudo, o que explicaria a não alteração da pressão arterial. Nos rins o ANP exerce papel fundamental no balanço hidroeletrólítico, exercendo juntamente com a Ang II possuem efeitos opostos no controle cardiovascular, em especial, no coração. A Ang II pode aumentar a secreção de ANP pelos miócitos cardíacos, o qual inibe o crescimento dos miócitos, a proliferação de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular no coração (BOOZ & BAKER 1996; DOSTAL & BAKER, 1999). Os dados da literatura mostram que o ANP tem efeito endócrino direto na homeostase de fluidos e pressão sanguínea, por meio de dois receptores localizados na membrana plasmática de miócitos e fibroblastos cardíacos (COA & GARDEN, 1995; NEYSES & VETTER, 1989).

A presença da ECA no coração é conhecida, entretanto, a sua localização ainda não foi bem estudada. Segundo Falkenhahn *et al.* (1995), a ECA apresenta distribuição diferente nos diferentes compartimentos do coração. Yamada *et al.* (1991), encontraram em ratos, maiores níveis da ECA nos átrios quando comparados com os ventrículos, sendo que, o átrio direito apresentou maiores níveis em relação ao átrio esquerdo. Outro fato interessante, os maiores níveis de Ang II também foram encontrados no átrio direito de macacos (LINDPAINTNER *et al.*, 1987). A ECA também está presente na artéria coronária, aorta, veia pulmonar, endocárdio e epicárdio. Estes achados foram similares aos nossos, no que concerne à atividade da ECA nas diferentes estruturas cardíacas, onde a atividade foi maior no AT para ambos os grupos. Os níveis aumentados de tonina e ECA no AT podem colaborar para regulação autócrina e parácrina das funções cardíacas.

Além de verificarmos aumento da atividade da ECA total, é importante saber qual o sítio está mais ativo nas amostras. Assim, Willians *et al.* (1996), mostraram que razão maior que 1 nas velocidades de hidrólise dos substratos ZPhe-HL e HHL indica maior atividade do sítio N-domínio em relação ao C-domínio. Logo, os resultados obtidos no presente estudo mostram maior atividade da isoforma N-domínio, em ambos os grupos, no tecido renal e cardíaco. Estes dados foram confirmados quando consideramos os níveis de

expressão protéica no homogenato renal, pois verificamos aumento nos níveis de expressão da banda N-domínio com 65 kDa no grupo transgênico. Os dados sugerem que no animal TGM(rTon) talvez ocorra a modulação da isoforma N-domínio, provavelmente, por meio da ativação da produção de uma proteinase capaz de liberá-la, classicamente chamada de secretase. As proteinases (secretases, shedases ou convertases) são responsáveis pela hidrólise de algumas proteínas ancoradas a membrana, liberando a forma solúvel da proteína que geralmente possui propriedade idêntica ou, sutilmente diferente da forma ligada à membrana (PARVATHY *et al.*, 1997). As secretases da ECA descritas no passado são metaloproteinases que se localizam em diversos tecidos, incluindo os rins, os pulmões e os testículos de porco, bem como, na placenta e nos rins de humanos (OPPONG & HOOPER, 1993). Nosso grupo vem trabalhando na identificação das secretases envolvidas na liberação da isoforma N-domínio da ECA de 65 kDa desde 2006.

Embora nos rins a atividade da tonina e ECA estejam aumentadas nos animais transgênicos, a quantidade de Ang II não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. Uma hipótese para explicar nossos resultados é que outras vias do SRA estejam ativas, por exemplo, as aminopeptidases A que podem hidrolisar a Ang II formando Ang III (VELEZ, 2008). Estes dados mostram a complexidade do SRA tecidual e indica que mais estudos são necessários para melhor compreendermos a ação deste sistema.

A quantidade de Ang I renal detectados no grupo transgênico foi estatisticamente menor em relação ao grupo CT, indicando que possivelmente o peptídeo foi degradado mais intensamente, podendo ser pela via da ECA e/ou pela tonina.

O papel fisiológico da Ang-(1-7) não está completamente determinado, mas tem sido proposto que este peptídeo esteja envolvido no balanço de eletrólitos e na regulação da pressão arterial (HANDA *et al.*, 1996; KUCHARWICZ *et al.*, 2002). Além disso, o rim parece se o maior órgão alvo da Ang-(1-7) (CHAPPELL *et al.*, 1998). Uma hipótese para a diminuição dos níveis da Ang-(1-7) nos animais transgênicos seria a modulação da isoforma N-domínio no animal transgênico cuja atividade e expressão está aumentada. Esta enzima apresenta alta afinidade catalítica pela Ang-(1-7) considerada um

substrato específico para o sítio N-domínio da ECA ou ainda para ECA N-domínio do fluido ileal (DEDDISH *et al.*, 1998). Yamada *et al.* (1998) mostraram que a hidrólise da Ang-(1-7) pela ECA formando a Ang-(1-5), parece ser uma importante via de inativação deste peptídeo circulante e possivelmente também da forma tecidual, sugerindo a participação da ECA na degradação da Ang-(1-7) em Ang-(1-5). Outra hipótese seria decorrente da baixa atividade da ECA2 nos rins, no entanto, nos faltam dados sobre a atividade desta enzima uma vez que não a quantificamos neste estudo. Entretanto quando verificamos a expressão da ECA2 constatamos que a mesma estava ligeiramente diminuída, apesar de não ter significância estatística.

Ao avaliarmos todos os resultados apresentados, podemos sugerir a modulação do SRA no animal que expressa tonina. Embora os níveis de Ang-(1-7) estejam diminuídos e a Ang II ligeiramente aumentada, estes não apresentaram alteração na hemodinâmica cardiovascular. Podemos sugerir que o ambiente com excesso da tonina, possa ativar outras vias metabólicas, ativar processos de sinalização celular ou alterar a expressão gênica de diferentes peptídeos/enzimas, a fim de manter a homeostase corporal.

Portanto, os resultados indicam regulação dos peptídeos, em especial a diminuição da Ang-(1-7) nos tecidos renal e nos átrios. Assim, pela primeira vez, podemos sugerir que a tonina exerça um papel fisiológico importante no SRA renal e cardíaco no modelo animal estudado.

Conclusão

VI. CONCLUSÃO

Embora a tonina seja capaz de hidrolisar a porção N-terminal do AGT e gerar diretamente a Ang II, os animais transgênicos não se tornaram hipertensos. Concluindo, a tonina exerce uma ação tecidual mais relevante em relação à ação sistêmica.

Nossos dados mostram, pela primeira vez, a ação fisiológica da tonina como um importante modulador dos peptídeos e enzimas no SRA tecidual, principalmente nos rins e nos átrios.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE A. Q., CASARINI D. E., SCHOR N., BOIM M. A. Characterization of renin mRNA expression and enzyme activity in rat and mouse mesangial cells. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 35, p. 17–24, 2002.

ANDRADE, M. C. C., DI MARCO, G. S., TEIXEIRA, V. P. C., MORTARA, R. A., SABATINI, R. A., PESQUERO, J. B., BOIM, M. A., CARMONA, A. K., SCHOR, N., CASARINI, D. E. Expression and localization of N-domain ANG I-converting enzymes in mesangial cells in culture from spontaneously hypertensive rats. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 290, p. F364-F375, 2006.

ARAUJO, G. W., PESQUERO, J. B., LINDSEY, C. J., PAIVA, A. C. M., PESQUERO, J. L. **Identification of serine proteinases with tonin-like activity in the rat submandibular and prostate glands.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1074, p. 167-171, 1991.

ARAUJO, R. C., LIMA, M. P., LOMEZ, E. S. L., BADER, M.; PESQUERO, J. B., SUMITAMI, M., PESQUERO, J. L. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. **Physiology & Behavior**, v. 76, p. 327-333, 2002.

AVERILL, D. B., ISHIYAMA, Y., CHAPPELL, M. C., FERRARIO, C. M. Cardiac Angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 108, p. 2141-2146 2003.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterona systems:targets for pharmacological therapy. **Annual Review Phamacology and Toxicology**, v. 50, p. 439-464, 2010.

BADER, M., GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 615-621, 2008.

BALTATU, O., SILVA Jr, J. A., GANTEN, D., BADER, M. The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II–induced hypertension and cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 35, p. 409-412, 2000.

BOOZ, G. W., BAKER, K. M. The role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiac remodeling. **Blood Press Supplements**, v. 2; 10-8, 1996.

BORGES, J. C., SILVA Jr. J., GOMES, M. A., LOMEZ, E. S. L., ARAÚJO, R. C., BADER, M., PESQUERO, J. L. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, v. 284, p. 2263-2268, 2003.

BOUCHER, R., SAIDI, M., GENEST, J. A new angiotensin I converting enzyme system. **Hypertension**, v. 37, p. 512-523, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURRELL, L. M., JOHNSTON, C.I., TIKELLIS, C., COOPER, M.E. ACE2, a new regulator of the rennin-angiotensin system. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, p. 166-169, 2004.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **Journal Clinical Investigation**, v. 79, p. 1-6, 1986.

CARDOSO; Cibele, Campos. Geração e caracterização de rato e camundongo transgênico apresentando superexpressão de tonina de rato. **TESE (Doutorado)**. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFMG, 2002.

CARDOSO, C. C., ALENINA, N., FERREIRA, A. J., QADRI, F., LIMA, M. P., GROSS, V., TODIRAS, M., PESQUERO, J. B., PESQUERO, J. L., BADER, M. **Biological Chemistry**, v.391, p. 435-441, 2010.

CAREY, R. M. Angiotensin type-1 receptor blockade increases ACE2 expression in the heart. **Hypertension**, v. 43, p. 943-944, 2004.

CAREY, R. M., SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine**, v. 24, p. 261-271, 2003.

CASARINI, D. E., ALVES, K. B., ARAUJO, M. S., STELLA, R. C. Endopeptidase and carboxypeptidase activities in human urine which hydrolyze bradykinin. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 25, p. 219–229, 1992.

CASARINI, D. E., CARMONA, A. K., PLAVNIK, F. L., ZANELLA, M. T., JULIANO, L., RIBEIRO, A. B. Calcium channel blockers as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. **Hypertension**, v. 26, p. 1145-1148, 1995.

CASARINI, D. E., PLAVNIK, F. L., ZANELLA, M. T., MARSON, O., KRIEGER, J. E., HIRATA, I. Y., STELLA, R. C. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. **International Journal Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 75-85, 2001.

CAZAUBON, C., GOUGAT, J., BOUSQUET, F., GUIRAUDOU, P., GAYRAUD, R., LACOUR, R., ROCCON, A., GALINDO, G., BARTHELEMY, G., GAUTERT, B. Pharmacological characterization of SR 47436, a nonpeptide AT1 subtype angiotensin II receptor antagonist. **Journal Pharmacology**, v. 265, p. 826-834, 1993.

CHAPPELL, M. C., PIRRO, N. T., SYKES, A., FERRARIO, C. M. Metabolism of angiotensin (1–7) by angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 31, p. 362–367, 1998.

CHRÉTIEN, M., LEE, C. M., SANDBERG, B. E. B., IVERSEN, L. L., BOUCHER, R., SEIDAH, N. G., GENEST, J. Substrate specificit of the enzyme tonin: cleavage of substance P. **North-Holland Biomedical Press**, v. 113, p. 173-176,1980.

CAO, L., GARDNER, D. G. Natriuretc peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. **Hypertension**, v. 25, p. 227-234, 1995.

CRISTOVAM, P. C., ARNONI, C. P., ANDRADE, M. C. C., CASARINI, D. E., PEREIRA, L. G., SCHOR, N., BOIM, M. A. ACE-Dependent and Chymase-Dependent Angiotensin II Generation in Normal and Glucose-Stimulated Human Mesangial Cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 1035–1043, 2008.

DANILCZYK, U., PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the Kidney. **Circulation Research**, v. 98, p. 463-71, 2006.

DANTAS, A. P. V., SANDBERG, K. Regulation of ACE2 and ANG-(1-7) in the aorta: new insights into the renin-angiotensin system in the control of vascular function. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p. 980-981, 2005.

DEDDISH P. A., WANG J., MICHEL B., MORRIS P. W., DAVIDSON N. O., SKIDGEL R. A., ERDÖS E. G. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. **Proceeding of the National Academy Sciences**, v. 91; p. 7807–7811, 1994.

DEDDISH, P. A., MARCIC, B., JACKMAN, H. L., WANG, H., SKIDGEL, R. A., ERDÖS, E. G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, p. 912-917, 1998.

DICKSON, C. T., VANDERWOLF, C. H. Animal models of human amnesia and dementia: hippocampal and amygdala ablation compared with serotonergic and cholinergic blockade in the rat. **Behavior Brain Research**, v. 41, p. 215–227, 1990.

DONOGHUE, M., HSIEH, F., BARONAS, E., GODBOUT, K., GOSSELIN, M., STAGLIANO, N., DONOVAN, M., WOOLF, B., ROBISON, K., JEYASEELAN, R., BREITBART, R. E. ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, p. E1-E9, 2000.

DOSTAL, D. E., BAKER, K. M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? **Circulation Research**, v. 85; p. 643-50, 1999.

ELASED, K. M., CUNHA, T. S., GURLEY, S. B., COFFMAN, T. M., MORRIS, M. New mass spectrometric assay for angiotensin-converting enzyme 2 activity. **Hypertension**, v. 47, p. 1010-1017, 2006.

ERDÖS, E. G. Angiotensin I-converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v. 16, p. 363–370, 1990.

FALKENHAHN, M., FRANKE, F., BOHLE, R. M., ZHU, Y. C., STAUSS, H. M., BACHMANN, S., DANILOV, S., UNGER, T. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. **Hypertension**, v. 25, p. 219-226, 1995.

FERRARIO, C. M., TRASK, A. J., JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **American Journal of Physiological and Heart Circulation Physiological**, v. 289, p. H2281-H2290, 2005.

FLEMING, I., KOHLSTEDT, K., BUSSE, R. New faces to renin-angiotensin system. **Physiology**, v. 20, p. 91-95, 2005.

FLEMING, I. Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme. **Circulation Research**, v. 98, p. 887-896, 2006.

FLOOD, J. F., CHERKIN, A. Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia. *Behavioral and Neural Biology*, v. 45, p. 169-184, 1986.

FRIEDLAND J., SILVERSTEIN E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 66, p. 416-24, 1976.

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

GALLAGHER, P. E., FERRARIO, C. M., TALLANT, E. A. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. **American Journal Physiology Heart and Circulation Physiology**, v. 295, p. 2373-2379, 2008.

GARCIA, R., KONDO, K., SCHOLKENS, B., BOUCHER, R., GENEST, J. Effect in vivo of beta-adrenergic stimulation, angiotensin II, dibutyryl cyclic AMP, and theophylline on tonin concentration in rat saliva and submaxillary gland. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 55, p. 983-989, 1977.

GONZALEZ-VILLA LOBOS, R. A., SATOU R., SETH, D. M., SEMPRUN-PRIETO, L. C., KATSURADA, A., KOBORI, H., NAVAR G. L. Angiotensin-converting enzyme–derived angiotensin II formation during angiotensin II–induced hypertension. **Hypertension**, v. 53, p. 351-355, 2009.

GUALBERTO, M. P., NUNES, R. L., PESQUERO, J. L. Tonin-like activity present in the human submandibular gland. **Agents and Actions Supplement**, v. 38, p. 392-400, 1992.

GURLEY, S. B., ALLRED, A., LE, T. H., GRIFFITHS, R., MAO, L., PHILIP, N., HAYSTEAD, T. A., DONOGHUE, M., BREITBART, R. E., ACTON, S. L., ROCKMAN, H. A., COFFMAN, T. M. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. **Journal Clinical Investion**, v. 116, p. 2218-2225, 2006.

HADDAD, G., AMIRI, F., GARCIA, R. Modulation of renal glomerular angiotensin II receptors by ACE inhibition and AT1 receptor antagonism. **Regulatory Peptides**, v. 68, p. 111-117, 1997.

HANDA, R. K. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1–7) receptor ligands for angiotensin receptors. **Journal of the American Society Nephrology**, v. 11, p. 1377-1386, 2000.

HASHIMOTO, S., ADAMS, J. W., BERNSTEIN, K. E., SCHNERMANN, J. micropuncture determination of nephronfunction in mice tissue angiotensin-converting enzyme. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 288, p. F445-452, 2005.

HARRISON-BERNARD, L. M. The renal renin-angiotensin system. **Advances in Physiology Education**, v. 33, p. 270-274, 2009.

HOOPER, N. M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. **International Journal Biochemistry**, v. 23, p. 641-647, 1991.

IRIGOYEN, M. C., CONSOLIM-COLOMBO, F. M., KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 55-62, 2001.

KANEMITSU, H., TAKAI, S., TSUNEYOSHI, H., YOSHIKAWA, E., NISHINA, T., MIYAZAKI, M., IKEDA, T., KOMEDA, M. Chronic chymase inhibition preserves cardiac function after left ventricular repair in rats. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 33, p. 25-31, 2008.

KEIDAR, S., KAPLAN, M., GAMLIEL-LAZAROVICH, A. ACE2 of the heart: grom angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 463-469, 2007.

KOBORI H., NANGAKU M., NAVAR L. G., NISHIYAMA A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacological Reviews**, v. 59, p. 251-87, 2007.

KOMURO, I. Molecular Mechanism of Cardiac Hypertrophy and Development. **Japanese Circulation Journal**, v. 65, p. 353-358, 2001.

KUCHAREWICZ, I., PAWLAK, R., MATYS, T., CHABIELSKA, E., BUCZKO, W. Angiotensin-(1–7): an active member of the renin–angiotensin system J. **Physiology Pharmacology**, v. 53, p. 533–540, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITE, C. A., CRISTOVAM, P. C., LEITAO, A. A., MIRANDA, A., ANDRADE, M. C., DI MARKO, G., CASARINI, D. E., BOIM, M. A. Renin similar to the submaxillary gland form is expressed in mouse mesangial cells: subcellular localization and All generation under control and glucose-stimulated conditions. **Cellular Physiology Biochemistry**, v. 13, p. 357–366, 2003.

LAMBERT, D. W., HOOPER, N. M., TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 781-786, 2008.

LEMOS, L. H. S. D. Modulação iônica da atividade tonina. **TESE (Mestrado)**. Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil, 1991.

LERMAN, L. O., CHADE, A. R., SICA, V., NAPOLI, C. **Animal models of hypertension: an overview**. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 146, p. 160-173, 2005.

LEUNG, P. S. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. **Current Protein and Peptide Science**, v. 5, p. 267-273, 2004.

LINDPAINNER, K., WILHELM, M. J. H., JIN, M; UNGER, T., LANG, R. E., SCHOELKENS, B. A., GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin system: Focus on the heart. **Journal Hypertension**, v. 5, p. S33-S38, 1987.

LOPES, E. S., SUMITANI, M., JULIANO, L., BERALDO, W. T., PESQUERO, J. L. Distribution of tonin- and kallikrein-like activities in the rat brain. **Brain Research**, v. 769, p. 152-157, 1997.

MALHOTRA, R., SADOSHIMA, J., BROSIUS, F. C., IZUMO, S. Mechanical Stretch and Angiotensin II Differentially Upregulate the Renin-Angiotensin System in Cardiac Myocytes in Vitro. **Circulation Research**. v, 85, p. 137-146, 1999.

MILL, J. G., MILANEZ, M. C., BUSATTO, V. C. W., ANDRÉA, C. M., GOMES, M. G. S. Ativação da enzima conversora de angiotensina no coração após Infarto do miocárdio e suas repercussões no remodelamento ventricular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, p. 101-110, 1997.

NIELSEN, M. D., JORGENSEN M, GIESE J. ¹²⁵I-Labeling of angiotensin I and II. **Acta Endocrinologica**, v. 67, p. 104-116, 1971.

NEYSES, L., VETTER, H. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 163, p. 1435-1443, 1989.

OLIVEIRA, E. M., SANTOS, R. A., KRIEGER, J. E. Standardization of a fluorimetric enzyme activity in rats. **Brazilian Journal Medicine Biological Research**, v.33, p. 755-764, 2000.

OPPONG, S. Y., HOOPER, N. M. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. **Biochemical Journal**, v. 292, p. 597-603, 1993.

OUDIT, G. Y., CRACKOWER, M. A., BACKX, P. H., PENNINGER, J. M. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, p. 93-101, 2003.

PALANIYANDI, S. S., NAGAI, Y., WATANABE, K., MA, M., VEERAVEEDU, P. T., PRAKASH, P., KAMAL, F. A., ABE, Y., YAMAGUCHI, K., TACHIKAWA, H., KOMADA, M., AIZAWA, Y. Chymase inhibition reduces the progression to heart failure after autoimmune myocarditis in rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 1213-1221, 2007.

PATEL, S., TARIOT, P. N. Pharmacologic models of Alzheimer's disease. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 14, p. 287-308, 1991.

PAUL, M., POYAN, M. A., KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, 86:747-803, 2006.

PARVATHY, S., OPPONG, S. Y., KARRAN, E. H., BUCKLE, D. R., TURNER, A. J., HOOPER, N. M. Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. **Biochemical Journal**, v. 327, 37-43, 1997.

PIQUILLOUD, Y., REINHARZ, A., ROTH. M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.206, p. 136-142, 1970.

PROBSTFIEL, J. L., O' BRIEN, K. D. Progression of cardiovascular damage: the role of renin-angiotensin system blockade. **The American Journal of Cardiology**, v. 105, p. 10A-20A, 2010.

QUINTO, B. M. R., ANDRADE, M. C. C., RONCHI F. A., SANTOS, E. L., CORREA, S. A. A., SHIMUTA, S. I., PESQUERO, J. B., MORTARA, R. A., CASARINI, D. E. Expression of angiotensin I-converting enzymes and bradykinin B2 receptors in mouse inner medullary-collecting duct cells. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 254-260, 2008.

RESENDE, M. M., MILL, J. G. Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, p. 425-431, 2002.

RONCHI, F., IRIGOYEN, M. C., CASARINI, D.E. Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 8, p. 34-42, 2007.

RODBARD D., BRIDSON W., RAYFORD P. L. Rapid calculation of radioimmunoassay results. **Journal of Laboratory and Clinical**, v. 74, p. 770-777, 1969.

ROKS, A. J. M., GEEL, P. P., PINTO, Y. M., BUIKEMA, H., HENNING, R. H., ZEEUW, D., GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) Is a Modulator of the Human Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, v. 34, p. 296-301, 1999.

ROSENTHAL, J., THURNREITER, M., PLASCHE, M., GEYER, M., REITER, W., DAHLHEIM, H. Angiotensin I-forming angiotensinogenases in extrarenal vasculature and in the kidney. **Hypertension**, v. 15, p. 848-853, 1990.

ROSIVALL, L. Intrarenal renin-angiotensin system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 302, p.185-192, 2009.

SAYE, J. A., RAGSDALE, N. V., CAREY, R. M., PEACH, M. J. Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3- F442A adipocytes. **American Journal Physiology**, v. 264, p. 1570-1576, 1993.

SEIDAH, N. G., ROUTHIER, R., CARON, M., CARÉTIEN, M. N-Terminal amino acid sequence of rat tonin: homology with serino proteases. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 56, p. 920-925, 1978.

SKEGGS, L. T., MARSH, W. H., KAHN, J. R., SCHUMWAY, N. P. The existence of two forms of hypertensin. **Journal Experimental Medicine**, v. 99, p. 275-282, 1954.

SKEGGS, L. T., KAHN, J. R., SCHUMWAY, N. P. Preparation and function of the hypertension converting enzyme. **Journal Experimental Medicine**, v. 103, p. 195-199, 1956.

TERADA Y., TOMITA K., NONOGUCHI H., MARUMO F. PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. **Kidney Internacional**, v. 43, p.1251-1259,1993.

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

TRIPATHI, G., DHARMANI, P., KHAN, F., SHARMA, R. K., PANDIRIKKAL, V., AGRAWAL, S. High prevalence ACE DD genotype among north Indian and stage renal disease patients. **Nephrology**, v. 7, p. 1-7, 2006.

TIKELLIS, C., JOHNSTON, C. I., FORBES, J. M., BURNS, W. C., BURRELL, L. M., RISVANIS, J., COOPER, M. E. Characterization of Renal Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Diabetic Nephropathy. **Hypertension**, v. 41, p. 392-397, 2003.

URATA, H., BOEHM, K. D., PHILIP, A., KINOSHITA, A., GABROVSEK, J., BUMPUS, F. M., HUSAIN, A. Cellular Localization and Regional Distribution of an Angiotensin II-forming Chymase in the Heart. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 1269-1281, 1993.

YAMADA, H., FABRIS, B., ALLE, A. M., JACKSON, B., JOHNSTON, C. I., MENDELSON, A. O. Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. **Circulation Research**, v. 68, p. 141-149, 1991.

YAMADA, K., IYER, S. N., CHAPPELL, M. C., GANTEN, D., FERRARIO, C. M. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 32, p. 496-502, 1998.

VARAGIC, J., TRASK, A. J., JESSUP, J. A., CHAPPELL, M. C., FERRARIO, C. M. New angiotensins. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 663-671, 2008.

VELEZ, J. C. Q. The importance of the intrarenal renin-angiotensin system. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2 p. 89-100, 2008.

VIDOTTI, D. B., CASARINI, D. E., CRISTOVAM, P. C., LEITE, C. A., SCHOR, N., BOIM, M. A. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v.286, p.F1039–F1045, 2004.

WEI, L., ALHENC-GELAS, F., SOUBRIER, F., MICHAUD, A., CORVOL, P., CLAUSER, E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. **Journal Biological Chemistry**, v. 266, p. 5540–5546, 1991.

WILLIAMS, T. A., CORVOL, P., SOUBRI, F. Identification of Two Active Site Residues in Human Angiotensin I-converting Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29430-29434, 1994.

ZISMAN, L. S. ACE and ACE2: a tale of two enzymes. **European Heart Journal**, v. 26, p. 322-324, 2005.

Anexo



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de fevereiro de 2009.
CEP 0241/08
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) AMANDA APARECIDA RIBEIRO
Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Estudo da modulação fisiopatológica de enzimas liberadoras de angiotensina em camundongo transgênico hipertenso e que expressa tonina de rato”**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU Emenda ao projeto (versão 1 de 03/fev/2009)** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 0241/08

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."