

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

**Caracterização funcional de vias
formadoras de angiotensina II em
carótidas de ratos**

Christiane Becari

Ribeirão Preto, 2004

Christiane Becari

Caracterização funcional de vias formadoras de
angiotensina II em carótidas de ratos

Tese apresentada Curso de Pós-
Graduação da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de concentração
Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Cristina de Oliveira Salgado

Ribeirão Preto, 2004

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”
Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu
Pai e a minha Mãe que
possibilitaram a minha caminhada
até aqui. **À vocês Meu Muito
Obrigada!**

AGRADECIMIENTOS

À Deus, meu guardião fiel que em todos os momentos da minha vida sempre me acompanha e dá forças para superar obstáculos.

À minha querida orientadora Prof^ª Dr^ª Maria Cristina de Oliveira Salgado, exemplo de orientadora, mestre e mulher, quero deixar aqui minha imensa admiração e meu muito obrigada pela orientação e acolhimento desde a minha chegada.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, ou melhor, ao querido mestre e amigo Chico, obrigada pelas discussões científicas, bate papos, dicas, pelo maravilhoso curso de música e principalmente pela amizade. Chico, quero registrar aqui minha grande admiração por você!

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, exemplo cientista e orientador, muito obrigada pelas nossas conversas e pela contribuição na minha formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, docente da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, que contribuiu e ajudou imensamente para a minha formação e para a realização deste trabalho. Carlos gostaria de expressar toda a minha gratidão pela confiança, incentivo e pela sua amizade. Muito obrigada!

Aos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado, José Eduardo Tanus dos Santos, Emer Suavinho Ferro pela disponibilidade em fazer parte da comissão julgadora desse trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha aprendi a admirar e respeitar-te, obrigada pela sempre preocupação com o bem estar dos pós-graduandos.

À Prof^ª Dr^ª Lusiane Maria Bendhack, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo assessoramento durante a realização deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Maria Helena Goldman e a pós-doutoranda Jeanne, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que possibilitaram a realização dos experimentos de biologia molecular.

Aos técnicos do laboratório Osmar Vettore e Orlando Mesquita pela atenção e paciência em ensinar técnicas e solucionar problemas. E claro, pelas divertidíssimas risadas na hora "do café". À vocês, "Vettore- mi amore" e "Orlando- muito mais que técnico", Muito Obrigada.

Aos companheiros do laboratório de farmacologia Disney, Regina, Luiz, Marcos Caprio, José Vitor e Ricardo (Batata) e do laboratório de bioquímica Laura e Milene pela amizade, convívio, discussões científicas, conversas e risadas na hora "do café".

A Mani, Djane, Vanessa e Sâmia pela amizade, constante apoio e ajuda nos momentos difíceis, em especial na qualificação. Muito obrigada, vocês me ajudaram muito.

Aos meus amigos Sâmia, Léo, Vanessa, Claudia, Danielle, Malina, Dani Sachs, Mani, Samira, Luisinho, Dorothy, Raquel e Sandra Helena que de alguma forma contribuíram para minha formação tanto científica quanto como pessoa.

Ao Prof. Dr. Hélio Salgado, Luisinho e Samira pela agradável companhia e inestimável auxílio em San Antonio.

À Susana Moreno que me apoiou e acolheu quando decidi vir para Ribeirão Preto.

Ao José Waldik Ramon, secretário do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, exemplo de seriedade e profissionalismo, obrigada pelas nossas conversas, valiosas dicas e auxílio ao computador.

A Sônia Andrade e Fátima Petean, secretárias do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo trabalho responsável e incansável, tão importante para o bom funcionamento e sucesso da Pós-graduação. Soninha, apesar dos nossos desentendimentos, gosto muito de você!

À todos os docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus irmãos Wesley, Willy e ao meu sobrinho Leonardo. Pai, Mãe, Willy, Wesley, Léo, Vó e Vô, Amo vocês.

À Capes pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	VI
1- Introdução	1
2- Objetivos	11
3- Materiais e Métodos	13
4- Resultados	22
5- Discussão	39
6- Conclusão	48
7- Resumo	50
8- Abstract	53
9- Referências bibliográficas	56

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

(Pro ¹¹ -D-Ala ¹²) AngI	(Pro ¹¹ -D-Ala ¹²) Angiotensina I
Ac-AAPL-CK.	Acetil-Ala-Ala-Pro-Leu-dorometicetona
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
cDNA	DNA complementar
CH5450	Z-Ile-Glu-Pro-Phe-CO ₂ Me
ECA	Enzima conversora de angiotensina
Pb	Pares de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
SRA	Sistema renina angiotensina
TDP	Substrato tetradecapeptídeo da renina

1-INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

A primeira referência aos componentes do *sistema renina angiotensina* (SRA) data de 1898, quando Tigerstedt e Bergman mostraram que extrato de tecido renal, quando injetado em coelhos, produzia elevação da pressão arterial; sendo denominado de "renina" o componente ativo desse extrato. Em 1934, Goldblatt *et al.* mostraram que era possível provocar hipertensão arterial em cães por meio da constrição da artéria renal. Esse fato foi posteriormente confirmado por vários pesquisadores, sendo detectada atividade pressora no sangue venoso renal, conseqüente à constrição da artéria renal, atribuindo-se esse efeito à renina. Mais tarde, em estudos realizados simultaneamente, Braun-Menendez *et al.* (1939) e Page & Helmer (1939) mostraram que a renina não apresentava por si só atividade pressora, mas sim uma atividade enzimática capaz de formar, a partir de substrato protéico presente no plasma, um agente fisiologicamente ativo, denominado "hipertensina" e "angiotonina" pelo primeiro e segundo grupo de pesquisadores, respectivamente. Somente mais tarde foi adotado o termo "angiotensina" (Braun-Menendez & Page, 1958). Em 1954, Skeggs *et al.* demonstraram que a angiotensina, produto da incubação de renina com seu substrato (angiotensinogênio), era na realidade uma mistura de dois peptídeos, que foram posteriormente denominados de angiotensina I (Ang I) e angiotensina II (Ang II). Assim, o decapeptídeo denominado Ang I ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-His}^9\text{-Leu}^{10}$), produto da ação da renina (EC 3.4.23.15) sobre o angiotensinogênio plasmático, é dividido na ligação $\text{Phe}^8\text{-His}^9$ pela enzima conversora de angiotensina (ECA; EC 3.4.15.1) liberando o octapeptídeo ativo Ang II ($\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6$ -

Pro⁷-Phe⁸), conforme ilustrado no esquema 1. A ECA, descrita inicialmente no plasma (Skeggs *et al.*, 1956), está amplamente distribuída em diferentes tecidos e leitos vasculares (Padmanabhan *et al.*, 1999).

Vários trabalhos publicados na década de 70 (Yang *et al.*, 1970; Yang *et al.*, 1971; Igic *et al.*, 1972) demonstraram que a ECA era idêntica à cininase II, enzima que degradava bradikinina (Yang & Erdos, 1967); demonstrando uma dupla ação pressora desta enzima: a formação de uma substância vasopressora (Ang II) e a degradação de uma substância endógena vasodilatadora (bradikinina).

A ECA, ou cininase II, exerce um papel importante na geração da Ang II. Ang II atua sistemicamente, uma vez que a renina, produzida no aparelho justaglomerular, é lançada no sangue para aí atuar sob seu substrato específico, o angiotensinogênio. A partir dessa reação enzimática, forma-se a Ang I. A conversão da Ang I em Ang II é feita tanto pela ECA, situada no endotélio vascular, como também pela enzima solúvel no plasma, que se desprende da membrana plasmática das células endoteliais (Igic & Behnia, 2003).

O papel do SRA na fisiopatologia da hipertensão vem sendo investigado desde os experimentos clássicos de Goldblatt e colaboradores que demonstraram a importância do rim na gênese da hipertensão experimental. Ang II apresenta um importante papel na homeostasia vascular e cardíaca, não somente como um hormônio circulante, mas também como fator autócrino e/ou parácrino com ações importantes em diferentes tecidos; além do seu efeito

vasoconstritor, a Ang II está envolvida nos processos de remodelação cardíaca e vascular em diferentes condições patológicas (Perazella & Setaro, 2003).

Os efeitos da Ang II estão relacionados com a ativação de diferentes tipos de receptores (Chiu *et al.*, 1989) designados AT₁, AT₂, AT₃, AT₄ (Unger *et al.*, 1996). O receptor AT₁ pode ser dividido em dois subtipos – AT_{1A} e AT_{1B} (Hein *et al.*, 1998). Os receptores de Ang II pertencem a família de receptores acoplados a proteína G, cuja atividade desencadeia uma cascata de ativação de proteínas intracelulares (Clauser *et al.*, 1998).

Os receptores AT₁ e AT₂ apresentam diferentes vias na transdução de sinais intracelulares de membrana. Os receptores AT₁ interagem com proteínas G, através das quais inibem a atividade da adenilato ciclase, estimulam fosfolipases e provavelmente a abertura de canais de cálcio. Essa modulação via proteínas G diminui os níveis celulares de AMP cíclico, estimula as fosfolipases C, A₂ e D, aumenta a geração de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e diacilglicerol, aumenta a concentração de cálcio intracelular e estimula a atividade da proteína quinase C. Vários efeitos biológicos induzidos pela Ang II são mediados pelos receptores AT₁, como a contração do músculo liso vascular, secreção de aldosterona, liberação de catecolaminas, reabsorção renal de sódio, hipertrofia vascular e cardíaca e regulação da renina (Levens *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992). Ainda não está totalmente esclarecido como os receptores AT₂ mediam a resposta a Ang II, mas há algumas evidências de que estes receptores possam operar canais de potássio em células neuronais (Kang *et al.*, 1992), alterar a condutância de canais de cálcio (Buisson *et al.*, 1992), inibir a guanilato ciclase, bem como estimular a fosfatase de

fosfotirosina (Bottari *et al.*, 1992). Dados da literatura sugerem que os receptores AT_2 estejam envolvidos em mecanismos de regulação de crescimento e diferenciação celular, como demonstrado em tecidos fetais de ratos; além disso, há evidências que receptores AT_2 estariam envolvidos em processos de reparo em resposta a danos vasculares (Janick *et al.*, 1992).

A importância de estudos sobre o envolvimento do SRA na hipertensão pode ser avaliada pelo valor terapêutico de drogas como os inibidores da ECA, dos antagonistas dos receptores da Ang II e dos bloqueadores da renina (Di Bianco, 2003; Swamy *et al.*, 2003).

O efeito cardioprotetor verificado durante o tratamento da hipertensão arterial humana com inibidores da ECA tem sido atribuído tanto à inibição da atividade cinínica da ECA, como a uma redistribuição regional da formação de Ang II (Linz *et al.*, 1989; Umeta *et al.*, 1996; Blais *et al.*, 1997; Dendorfer *et al.*, 1997). A expressão celular e regional diferenciada de sistemas proteolíticos capazes de gerar Ang II ou de inativar bradinaína tem sido considerada fundamental para a interpretação dos dados clínicos referentes à cardioproteção estimulada por inibidores da ECA. É interessante notar que tem sido demonstrado o retorno da concentração plasmática de Ang II a níveis normais durante o tratamento crônico com inibidores da ECA (Juillerat *et al.*, 1990, Abe *et al.*, 1999), sugerindo o envolvimento de vias alternativas à ECA na geração de Ang II.

De fato, vários estudos têm mostrado a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II (Campbell *et al.*, 1987; Balcells *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 2001). As primeiras descrições de uma via alternativa de formação

da Ang II foram relatadas por Boucher *et al.* (1974) nas glândulas submandibulares de rato, por Cornish *et al.* (1979) na bochecha de hamster, e por Trachte e Lefer (1979) no músculo papilar cardíaco de gato. Cornish *et al.* (1979) também observaram a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. Okunishi *et al.* (1984) identificaram uma enzima geradora de Ang II sensível a quimostatina na artéria mesentérica de cão, a qual também é insensível a inibidores da ECA. Urata *et al.* (1990a) demonstraram *in vitro* um duplo caminho para a formação de Ang II em homogenatos de coração humano. Esses autores observaram que aproximadamente 80% da formação total de Ang II associava-se à presença de uma serino-protease até então desconhecida, enquanto a atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA era responsável, aproximadamente, por 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi posteriormente purificada e identificada como um novo membro da família das quimases e, desde então, denominada de *quimase do coração humano* (Urata *et al.*, 1990b).

Embora várias enzimas, incluindo tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), tonina, catepsina G (EC 3.4.21.20), calicreína (EC 3.4.21.34) possam produzir Ang II *in vitro*, por meio da divagem da ligação Phe⁸-His⁹ da Ang I (Urata *et al.*, 1995; Hollenberg *et al.*, 1998), a atividade das mesmas no sistema cardiovascular *in vivo* não está esclarecida. Além disso, algumas destas enzimas como, por exemplo, tripsina e quimotripsina, também degradam a Ang II (Le Trong *et al.*, 1987), deixando em dúvida a função destas enzimas como formadoras deste hormônio. Interessante notar que, enquanto as quimases

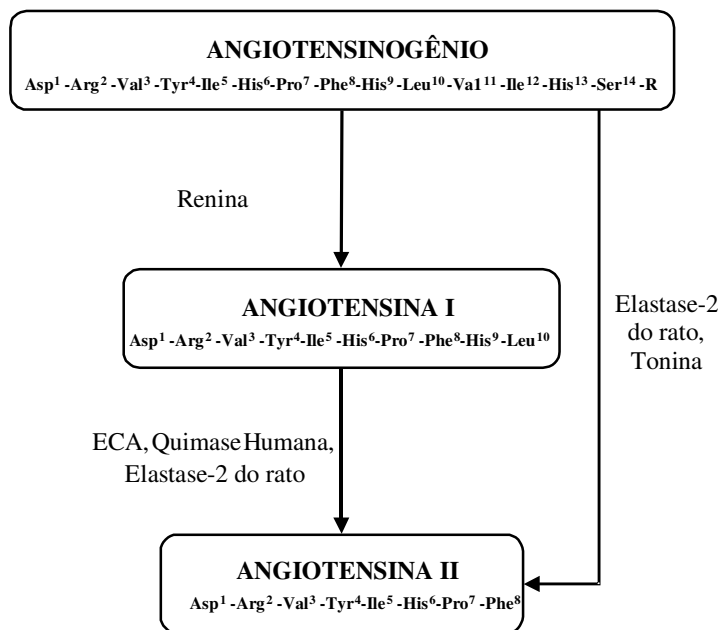
humana e de hamster dividem eficientemente a Ang I, formando Ang II (Urata *et al.*, 1990b; Takai *et al.*, 1996), a quimase I de ratos apresenta principalmente atividade de degradação da Ang II (Le Trong *et al.*, 1987). Dados gerados a partir da susceptibilidade dessas diferentes enzimas a inibidores de proteases permitiram a classificação das enzimas formadoras de Ang II em três categorias (Arkawa, 1996). A primeira categoria corresponde à metilodipeptil carboxipeptidase conhecida como ECA. A segunda categoria inclui um grupo de serino-proteases sensíveis à quimostatina, tais como a enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina da artéria mesentérica de cão (Okunishi *et al.*, 1987), a quimase humana (Urata *et al.*, 1990b; Takai *et al.*, 1996) e catépsina G (Tonnesen *et al.*, 1982). A terceira categoria agrupa as serino-proteases sensíveis a aprotinina, destacando-se a calicreína (Maruta e Arkawa, 1983), a tripsina (Arkawa, 1996) e a tonina (Boucher *et al.*, 1974).

A despeito das diferenças de características entre quimases de diferentes espécies, essas enzimas têm sido implicadas em vias fundamentalmente relevantes de formação de Ang II independente da ECA (Okunishi *et al.*, 1987; Urata *et al.*, 1996; Waldock *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2001). A determinação de atividades funcionais distintas para a ECA e para as quimases tem sido possível, em alguns casos, pela utilização de inibidores (Cushman *et al.*, 1977; Bastos *et al.*, 1995) e substratos seletivos (Hoit *et al.*, 1995). O desenvolvimento do composto Z-Ile-Glu-Pro-Phe-CO₂Me (CH 5450), um inibidor peptídico da quimase do coração humano (Bastos *et al.*, 1995), forneceu uma ferramenta farmacológica importante para a investigação das enzimas responsáveis pela formação tecidual de Ang II (Waldock *et al.*, 1997),

principalmente por ser um inibidor seletivo de quimases em concentrações nanomolares. Evidências de que vias enzimáticas independentes da ECA sejam funcionais na conversão de precursores circulantes de Ang II foram fornecidas por experimentos *in vivo* (Mangiapane *et al.*, 1994; Hoyt *et al.*, 1995; Garrison *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1999) utilizando o peptídeo sintético (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I, um precursor biologicamente inativo que seletivamente libera Ang II após incubação com quimases, mas não com ECA ou carboxipeptidases (Hoyt *et al.*, 1995). Esse substrato tem sido utilizado como ferramenta para demonstrar a participação de quimases na formação de Ang II em preparações derivadas de tecidos de humanos (Waldenk *et al.*, 1997; Wolny *et al.*, 1997; Richard *et al.*, 2001), primatas (Mangiapane *et al.*, 1994; Hoyt *et al.*, 1995), hamster (Nishimura *et al.*, 1998), cães (Murakami *et al.*, 1997), gatos (Garrison *et al.*, 1997) e ratos (Inoue *et al.*, 1999).

Nosso grupo (Oliveira *et al.*, 1991) demonstrou a existência de algumas peptidases no perfusato do leito mesentérico isolado de rato, preparado conforme descrição de McGregor (1965). Observou-se que a solução de perfusão recirculante acumulava endo e exo-peptidases solúveis, entre as quais foi identificada uma serino-protease insensível ao captopril capaz de formar Ang II tanto a partir de Ang I quanto do substrato tetradecapeptídeo da renina (TDP). Posteriormente, essa serino-protease formadora de Ang II do perfusato do leito arterial mesentérico de rato foi isolada e purificada, numa forma altamente homogênea por uma combinação de cromatografias de filtração e afinidade (Paula *et al.*, 1998). A enzima mostrou-se sensível a quimostatina e foi identificada como uma glicoproteína de massa molecular igual a 28.5 kDa. A

seqüência amino-terminal dos dez primeiros resíduos desta enzima mostrou-se idêntica à da elastase-2 pancreática de rato (EC 3.4.21.71), sendo a enzima denominada elastase-2 formadora de Ang II do perfusato do leito arterial mesentérico isolado de rato. O sequenciamento do cDNA para a elastase-2 do pâncreas e do leito arterial mesentérico de rato forneceu seqüências idênticas (Santos *et al.*, 2002b). As seqüências também foram idênticas àquela previamente publicada por MacDonald *et al.* (1982) para a elastase-2 do pâncreas de rato. Ao que sabemos, a elastase-2 é o único representante dessa família de proteases secretada fora do trato digestivo e implicada na geração de Ang II; além disso, a clonagem e o sequenciamento do RNAm desta enzima revelou que provavelmente seja produzida localmente. O RNAm para a elastase-2 também foi encontrado em outros tecidos além de pâncreas e leito mesentérico; a expressão foi encontrada em pulmão, coração, rim, fígado e baço. O fato de ter sido encontrado o RNAm para a elastase-2 no coração (Santos *et al.*, 2003) tem respaldo de achados do nosso laboratório, uma vez que a elastase-2 foi identificada no perfusato de coração isolado de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (Stuckert-Seixas, 2001). Esses resultados sugerem que elastase-2 possa ter uma participação funcional na geração local de Ang II em vários órgãos importantes no sistema cardiovascular (Esquema 1).



Esquema 1. Vias dependentes e independentes da ECA na geração de Ang II. Observa-se que a ECA, a quimase humana e elastase-2 de rato podem atuar no mesmo substrato (Ang I) para gerar Ang II. Esta também pode ser formada diretamente a partir do angiotensinogênio pela via elastase-2 e tonina.

As propriedades enzimológicas da elastase-2 de rato claramente indicam diferenças entre esta peptidase e a ECA em vários aspectos, porém mostra similaridades com a enzima sensível a quimostatina da artéria renal isolada do cão (Okamura *et al.*, 1990) e quimase do coração humano (Arckawa, 1996). Uma característica notável da elastase-2 como uma enzima conversora de angiotensina é que ela não destrói o produto Ang II, a despeito de sua ampla especificidade proteolítica sobre a somatostatina, melitina e cadeia β oxidada da insulina (Paula *et al.*, 1998). Essa característica é compartilhada com algumas quimases, tais como humana, de babuíno e de cão, mas não com a maioria das quimases de roedores, como a do rato. Além disso, a interação até então desconhecida da elastase-2 com (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I e CH5450, ambos considerados como reagentes seletivos para quimases, sugere que as

evidências para a formação de Ang II *in vivo* por quimases, particularmente no rato, podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre vias geradoras de Ang II (Santos *et al.*, 2002a).

Uma atividade funcional para uma via alternativa envolvida na geração de Ang II, como da elastase-2, foi sugerida em estudos realizados em nosso laboratório utilizando leitos vasculares perfundíveis como leito arterial mesentérico isolado de rato (Faria e Salgado, 1992; Leite e Salgado, 1992; Leite *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2003) e o coração isolado de ratos normotensos e SHR (Stuckert-Seixas 2001).

A utilização de leitos vasculares perfundíveis a fluxos altos (4 a 10 mL/min) implica na utilização de grande quantidade de drogas, o que limita o uso de alguns substratos e, principalmente, de inibidores de proteases. Assim, o intuito deste trabalho foi caracterizar farmacologicamente as vias de formação de Ang II em um segmento de artéria de grande calibre, mantida em uma cuba de pequeno volume.

2- Objetivos

2- Objetivos

Com base no exposto, este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

- I) Caracterizar, com uso de substratos e inibidores seletivos, as vias de geração de Ang II em artéria carótida isolada de ratos.

- II) Determinar se há RNAm de elastase-2 em carótida de ratos.

3-Materiais e Métodos

3-Materiais e Métodos

3.1 Material

Animais: Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 220-280 g, provenientes do biotério central do campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21°C) e iluminação, com livre acesso à água e alimentação.

Drogas: Fenilefrina, acetilcolina, angiotensina I, angiotensina II, tetradecapeptídeo, captopril, quimostatina, foram obtidas da Sigma e losartan da Merck, Brasil. (Pro¹¹-D-Ala¹²) angiotensina I e Acetil-Ala-Ala-Pro-Leu-darometilcetona (Ac-AAPL-CK) foram sintetizadas por encomenda na Anspec Inc (San Jose, CA, Estados Unidos). Éter foi adquirido da Synth, Brasil.

Reagentes e produtos para análise de expressão do RNA: Trizol (Gibco BRL Life Technologies, Frederick, MD, Estados Unidos), água destilada livre de RNA e DNA (Gibco Invitrogen Corporation, NY, Estados Unidos), darofórmio (Sigma), etanol absoluto (Merck), isopropanol (Acros), removedor de RNase (USBiological), DNase e RNase out (Amersham Pharmacia), agarose livre de DNase e RNase (Sigma), EGTA 20 mM (Sigma), tampão MOPS (concentrado 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M e EGTA 0,01M), brometo de etídio (10mg/ml; Sigma), formaldeído (Sigma), formamida (Sigma), kit para síntese de cDNA (First-strand cDNA synthesis kit; Amersham Pharmacia), kit para PCR (Platinum PCR Supermix- Gibco BRL Life Technologies), primers sense e anti-sense (Research Genetics, Huntsville, AL, Estados Unidos- Tabela 1), Platinum Taq DNA polimerase (Gibco BRL Life Technologies), marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia).

TABELA 1 – Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação.

Alvo	Tamanho antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
<i>β-actina</i>	351 pb	AACCGCGAGAAGAT GACCCAGAT CAT GT TT	AGCAGCCGT GEGCAT CT CT T GCT CGA AGT C
<i>Elastase-2</i>	675 pb	GT AGT T GGGGGT CAAGAGGCC	GT GCGT T CCCAAGGT GAC

Aparelhos: Sistema de eletroforese horizontal (Mini protean-3, Bio rad) e gerador de corrente elétrica (Life Technologies model 4001P, Sigma), contador térmico (Biometra, T3 Thermocycler), aparelho detector de luz ultravioleta (Vilber Lourmat), balança analítica (Denver Instrument company AA-250), espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf), transdutor (Statham, USA), polígrafo (Hewlett-Packard 7758B).

3.2 Métodos

3.2.1- Vias geradoras de angiotensina II em carótidas isoladas de ratos.

Isolamento da artéria carótida:

Os animais foram anestesiados com éter, exsanguinados e sacrificados. Através de uma incisão na linha média do pescoço a artéria carótida foi exposta, nervos, tecidos conjuntivo e adiposo removidos e as artérias foram isoladas e retiradas do animal. Para o estudo de reatividade vascular foram utilizados anéis de artéria carótida de aproximadamente 3 mm de comprimento. Dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen da artéria com cuidado para não danificar o endotélio. Os anéis foram inseridos em cuba (13 ml) para estudo de órgão isolado contendo solução de Krebs, cuja composição é: NaCl 118mM; KCl 4,7mM; CaCl₂+2H₂O

2,5mM; $MgSO_4+6H_2O$ 1,64mM; KH_2PO_4 1,18mM; $NaHCO_3$ 24,9mM; glicose 11,1mM). Os anéis foram mantidos a temperatura constante de 37°C com pH 7,4 e aerados com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo na base da cuba para órgão isolado e o outro foi conectado a um transdutor (Statham, USA) para registro isométrico de tensão em polígrafo Hewlett-Packard 7758B.

Após período de estabilização das preparações por 30 minutos, sob tensão basal passiva de 1.0 g, a resposta ao vasoconstritor fenilefrina ($10^{-7}M$) foi testada repetidas vezes, até que a mesma se estabilizasse. Em seguida, acetilcolina ($10^{-3}M$) foi adicionada a preparação pré-contráida com fenilefrina para averiguar a integridade do endotélio; somente preparações que apresentavam relaxamento em resposta à acetilcolina foram utilizadas.

Foram constituídas curvas concentração-efeito para os peptídeos Ang II, Ang I (substrato para ECA e elastase-2), TDP (substrato para renina e elastase-2) e $(Pro^{11}-D-ALA^{12})$ Ang I (substrato para elastase 2 e resistente a ECA) na ausência (controle) e presença de inibidor numa mesma preparação, desta forma todo experimento tinha seu próprio controle. Para evitar taquifilaxia foi aguardado um intervalo de 50 minutos entre uma curva cumulativa e outra sendo que os inibidores eram colocados nos últimos trinta minutos. Cada preparação foi utilizada para testar um único peptídeo. Para verificar se a resposta contrátil de determinado peptídeo (Ang II, Ang I, TDP, $(Pro^{11}-D-Ala^{12})$ Ang I) era influenciada pela administração prévia do mesmo, foram obtidas curvas concentração-efeito consecutivas, com intervalos de 50 min entre elas, numa mesma preparação.

Em uma primeira série de experimentos, foram realizadas curvas concentração-resposta para Ang II, Ang I, TDP, $(Pro^{11}-D-Ala^{12})$ -Ang I (10^{-10} a 10^{-6} M para todos

os peptídeos), na ausência e presença de inibidor da ECA (captopril, 10^{-6} M), inibidor de serino-protease (quimostatina, 100^{-6} M) e associação dos inibidores captopril (10^{-6} M) e quimostatina (100^{-6} M).

Também foi feita curva concentração-resposta nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-6} M para Ang II e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I na ausência e presença do inibidor da elastase-2 (Ac-AAPL-CK, 200^{-6} M).

Para verificarmos se os efeitos induzidos por Ang II e seus precursores eram mediados por ativação de receptores AT₁, em uma outra série de experimentos, o efeito a uma única concentração de Ang II (10^{-8} M), Ang I (10^{-8} M), TDP (10^{-6} M) e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I (10^{-6} M) era testada antes e após a adição de losartan (1^{-6} M). Nesta série de experimentos foram utilizadas concentrações dos peptídeos que apresentavam a resposta contrátil máxima.

Todas as drogas foram diluídas com água destilada e aliquotadas, a solução de Krebs era preparada no dia do experimento. As concentrações dos peptídeos relacionados foram determinadas pela análise de aminoácidos. Durante todo experimento as soluções dos peptídeos e inibidores em uso permaneciam em gelo.

Análise Estatística

Para a análise dos efeitos dos inibidores de proteases sobre as respostas dos peptídeos as curvas concentração-efeito na ausência e presença dos inibidores foram comparadas utilizando ANOVA de duas vias. Quando possível também foram calculados os valores de PD₂ para cada peptídeo nas diferentes situações experimentais e utilizou-se teste t-Student pareado para comparação. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

3.2.2- Expressão de RNAm da Elastase-2, em diferentes tecidos .

Isolamento dos tecidos: O isolamento e retirada das carótidas foram realizados como descrito anteriormente. A carótida depois de retirada do animal foi lavada com solução salina em seguida colocada em tubo contendo trizol. Para a retirada do coração, rim e fígado, os animais foram decapitados, a caixa torácica e a cavidade abdominal abertas, expondo os órgãos e retirando-os; os órgãos foram imersos em solução salina (para retirar o sangue) em seguida colocados em tubos contendo trizol. A retirada do leito arterial mesentérico foi feita conforme descrito por McGregor (1965).

Extração do RNA total: Para as diferentes amostras (coração, rim, fígado, leito arterial mesentérico e carótida) foram utilizadas a extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. Logo após a remoção dos animais, os tecidos foram colocados em tubos de centrifuga de 50 mL contendo trizol (0,1 g de tecido/1,0 mL trizol) e cortados com tesoura (livre de RNase e DNase). Todas amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 min e armazenadas a -80°C . No dia seguinte, as amostras foram descongeladas e então foi adicionado um volume de 20% de clorofórmio. Os tubos foram agitados rigorosamente e, em seguida, centrifugados a 13.000 g a 4°C por 15 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 550 μl que foram colocadas em outro tubo contendo 0,5 mL de isopropanol e incubadas por 15 min a -20°C . Após centrifugação a 13.000 g a 4°C por 15 min, descartouse o sobrenadante e adicionou 0,5 mL de etanol absoluto para dissolver o pellet. Realizou-se centrifugação a 13.000 g a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos sobre um papel de filtro, deixando secar em

temperatura ambiente por 10 min. Para redissolver o RNA total, os tubos receberam um volume de 10 μ l de água de Milli-Q. As amostras de RNA total foram mantidas a -80° C até o momento do uso.

Quantificação do RNA total: A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) em água livre de RNase e DNase e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: (RNA) = $A_{260} \times 40 \times$ fator de diluição conhecido, sendo o resultado expresso em μ g/mL.

Avaliação da qualidade do RNA total: A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada de duas formas. A primeira consistiu de diluição do RNA (em água livre de DNase e RNase) e leitura da absorbância em cubetas de quartzo em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260} e A_{280}). Foi calculada a relação A_{260}/A_{280} , a qual foi considerada aceitável se estivesse entre 1,9 e 2,1, pois valores nesse intervalo indicam ausência de DNA na amostra, e quando não apresentavam os valores desse intervalo as amostras foram tratadas com DNase. A segunda forma de avaliação da qualidade do RNA total foi a verificação de possível degradação em gel de agarose 1%, com observação da integridade das subunidades 28S e 18S. Inicialmente, foi adicionado 1 g de agarose a 85 mL de água tratada com DEPC (0,1%), aquecendo-se em forno de microondas até completa dissolução. Após a mistura atingir aproximadamente 60° C, foi adicionado 10 mL de MOPS concentrado 10X, 5,5 mL de formol 37% e 6,4 μ L da solução de brometo de etídio 10 mg/mL. Foi preparado um gel de 0,65 cm de espessura no sistema de eletroforese horizontal, aguardando-se a polimerização por 1,5 h. Às amostras de RNA (3,5 μ g) foram adicionados 3,5 μ L de

formaldeído 37% , 10 μ L de formamida e 1 μ L de MOPS concentrado 10X (MOPS 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M e EDTA 0,01 M), completando-se para um volume final de 20 μ L com água tratada com DEPC (0,1%); essa mistura foi realizada em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL. Os tubos foram incubados a 65°C por 15 min e em seguida, os tubos foram colocados num frasco com gelo, e adicionados 2 μ L de brometo de etídio, procedendo-se o carregamento do gel com todas as amostras. A eletroforese foi realizada com tampão MOPS concentrado 1X com aplicação de corrente de 100V por 1,5 h. O gel foi lavado com água tratada com DEPC (0,1%) e a seguir o gel foi colocado em aparelho detector de luz ultravioleta para visualização das unidades 28S e 18S.

Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR): O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada num volume de reação de 33 μ L utilizando-se 5 μ g de RNA total, 0,2 μ g de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM e MgCl₂ 9 mM), sorodbumina bovina 0,08 mg/mL, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 U de transcriptase reversa. Todos os reagentes citados fazem parte do "First-strand cDNA synthesis kit" (Amersham Pharmacia, Estados Unidos). O cDNA foi sintetizado durante um período de 60 min de incubação a 37°C e a reação foi parada pelo aquecimento a 90°C por 5 min. Os produtos da RT (4,25 μ L) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume de 50 μ L em tubos com os seguintes reagentes: 20 pmol (0,4 μ M) de cada primer (sense e anti-sense para elastase-2 e para α -Actina; Tabela 1), tampão para PCR (Platinum PCR Supermix), dNTPs 0,2 mM e 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). O processo de cicagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 2 min a 94°C seguida de 30-40 ciclos

de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 45 s a 94° C, anelamento por 30 s a 58° C e extensão por 1 min 30 s a 72° C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72° C (extensão final) após o término do último ciclo. O primer para *α-Actina* foi utilizado como controle. Para cada par de primers realizou-se PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação dos primers e para cada amostra de tecido a PCR também foi realizada utilizando-se RNA como molde para avaliação de possível contaminação por DNA genômico. Uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb. cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados, sendo nesse momento realizada fotodocumentação.

Os experimentos referentes à expressão da elastase-2 foram realizados em colaboração com a Prof^a Dr^a Maria Helena Goldman, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4- Resultados

4.1- Vias de geração da angiotensina II.

4.1.1- Efeito da Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para os peptídeos Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas isolados de ratos. A curva concentração-efeito produzida por estes peptídeos tem como característica a forma de sino, isto é, apresentam um efeito contrátil em determinada concentração e, em seguida, aumentando-se a concentração observamos uma inversão do efeito contrátil. Na figura 1 mostramos este comportamento para Ang I e Ang II. Diante do exposto, todos os resultados a seguir foram apresentados utilizando somente a faixa de concentração de cada peptídeo que induz efeito contrátil.

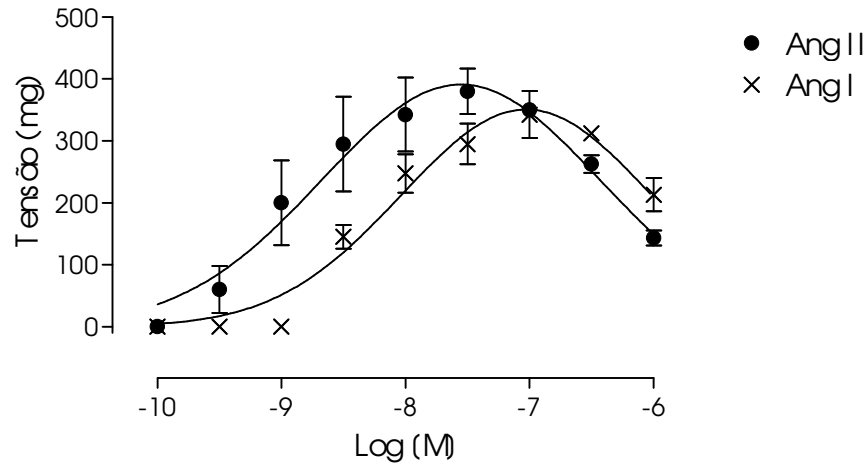


Figura 1. Curvas concentração-efeito a administração de forma cumulativa de Ang II e Ang I, mostrando efeito contrátil inicial, seguido de relaxamento em carótidas de ratos (n=4).

As curvas cumulativas dos peptídeos (Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I) apresentam resposta contrátil máxima similar; porém, possuem potências diferentes, sendo a potência de Ang II ($PD_2 = 9,01 \pm 0,33$) > Ang I ($PD_2 = 8,39 \pm 0,09$) > TDP ($PD_2 = 7,29 \pm 0,07$) > (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I ($PD_2 = 6,82 \pm 0,18$) conforme mostrado na figura 2.

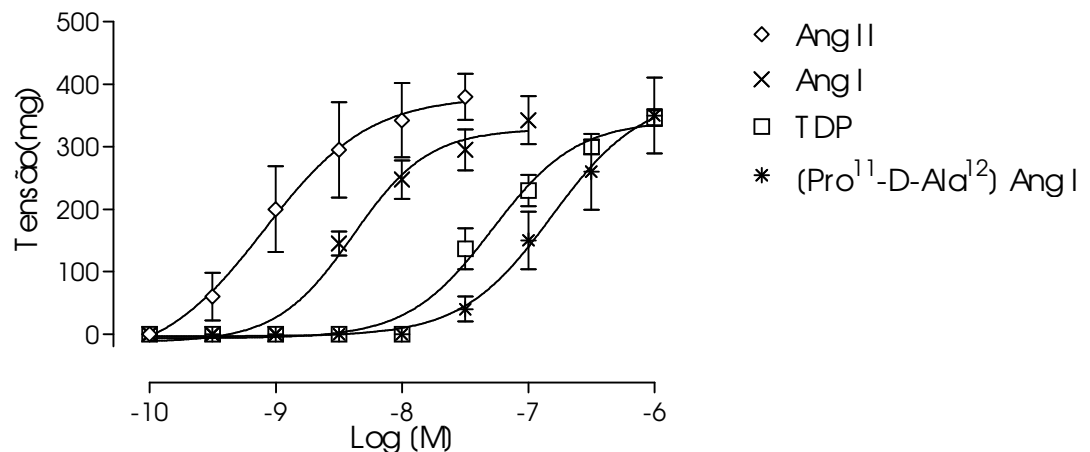


Figura 2. Curvas concentração-resposta a Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos (n=4). Todas as curvas diferem entre si $p < 0,05$ (ANOVA).

Não foram observadas nenhuma alteração nas curvas concentração-resposta da Ang II e seus precursores Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I quando realizadas consecutivas, com intervalos de 50 min entre elas, numa mesma preparação. Na figura 3 ilustramos duas curvas concentração-resposta a Ang I obtidas com intervalo de 50 min entre elas.

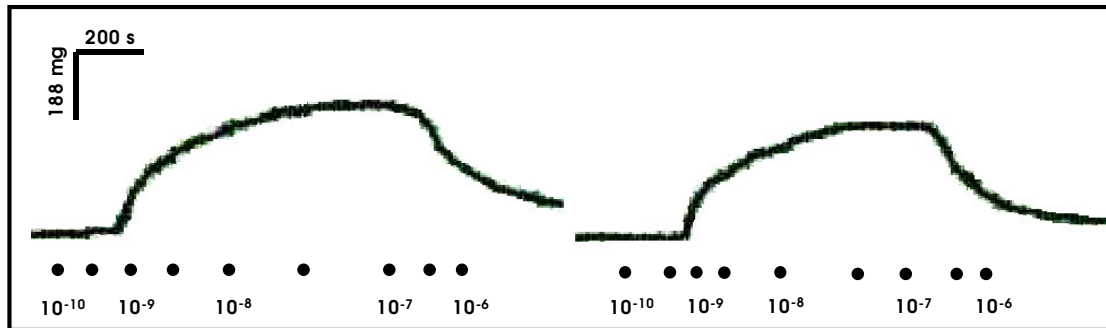


Figura 3. Registro típico das contrações induzidas pela administração de forma cumulativa (10^{-10} a 10^{-6} M) de Ang I em anéis de carótidas de ratos. As curvas foram obtidas com intervalo de 50 min entre elas.

4.1.2- Efeito do losartan sobre as repostas de Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

As repostas vasoconstritoras produzidas por Ang II, Ang I, TDP, (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I foram completamente bloqueadas pelo antagonista de receptores AT₁ (losartan), como pode ser visto na figura 4.

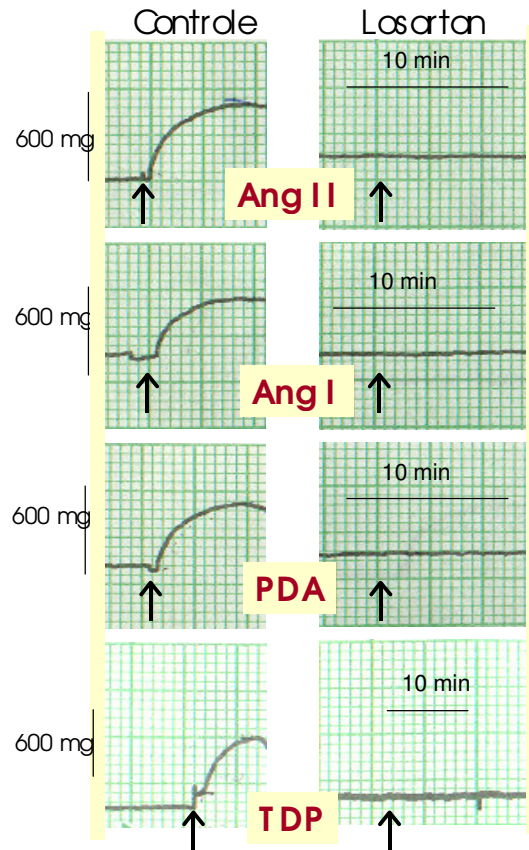


Figura 4. Registro típico das contrações induzidas por Ang II (10^{-8} M) e aos substratos Ang I (10^{-8} M), TDP (10^{-6} M) e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I (PDA, 10^{-6} M), na ausência (Controle) e presença de losartan ($1 \mu\text{M}$), em anéis de carótidas de ratos.

4.1.3- Efeito do captopril sobre as respostas de Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

Em carótidas de ratos as curvas concentração-efeito para Ang II na ausência e presença de captopril estão ilustrada na figura 5. Na presença de captopril, inibidor da ECA, observamos que a resposta contrátil induzida pela Ang II não foi alterada.

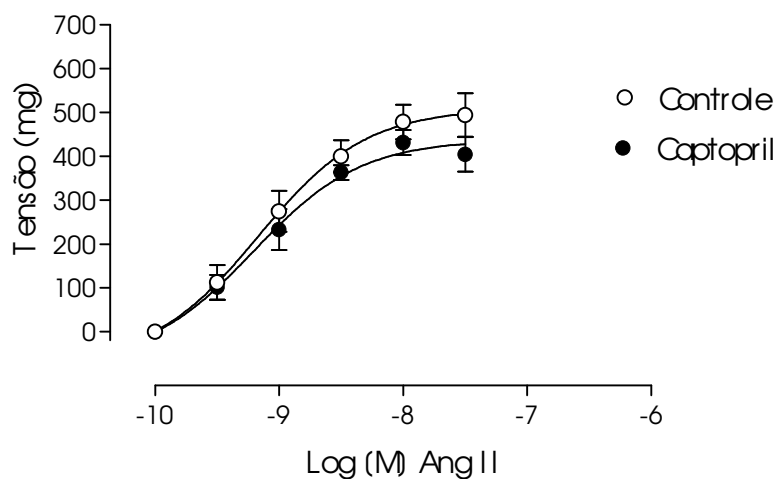


Figura 5. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de Ang II na ausência (Controle) e presença de captopril (10 μ M), em carótidas de ratos (n=7). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas $p= 0,85$.

As curvas concentração-efeito para Ang I na ausência e presença de captopril estão ilustrada na figura 6. Na presença de captopril, inibidor da ECA, observa-se que a resposta contrátil induzida pelo substrato Ang I foi significativamente deslocada para direita ($PD_2= 8,59\pm 0,20$ vs. $6,83\pm 0,09$).

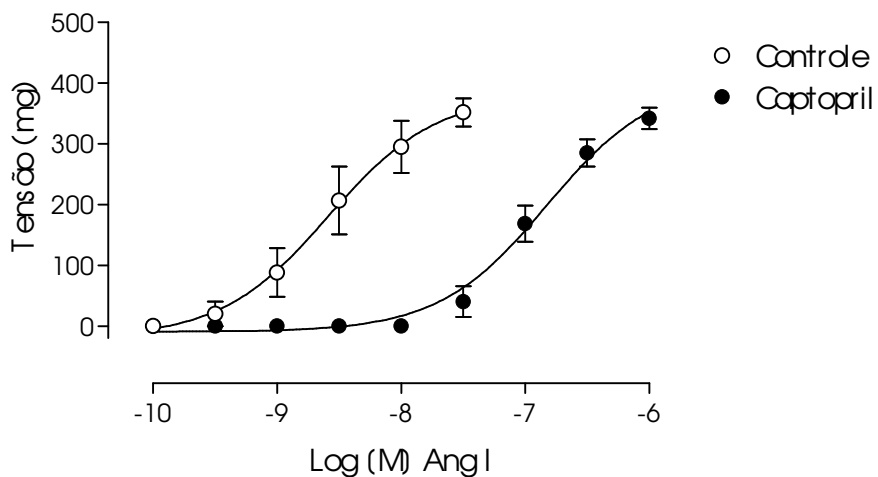


Figura 6. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de Ang I na ausência (Controle) e presença de captopril (10 μ M), em carótidas de ratos (n=6). Diferença significativa entre as curvas $p< 0,0001$ (ANOVA).

A figura 7 mostra a curva concentração-resposta a TDP na ausência (controle) e presença de captopril em anéis de artéria carótida de ratos. A resposta vasoconstritora induzida pelo TDP não foi alterada na presença do inibidor da ECA (captopril) ($PD_2 = 7,42 \pm 0,09$ vs. $7,59 \pm 0,11$).

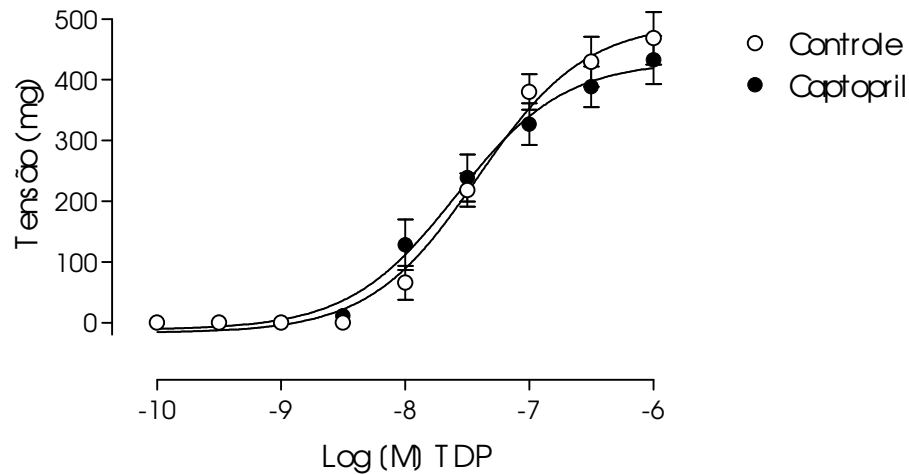


Figura 7. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de TDP na e ausência (Controle) e presença de captopril ($10 \mu\text{M}$), em carótidas de ratos ($n=7$). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas $p= 0,76$.

Redizamos curva concentração-efeito de forma cumulativa de $(\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12})$ Ang I na ausência e presença de captopril, conforme representada na figura 8. A resposta vasoconstritora de $(\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12})$ Ang I não foi alterada na presença do inibidor da ECA ($PD_2 = 7,01 \pm 0,15$ vs. $6,86 \pm 0,11$).

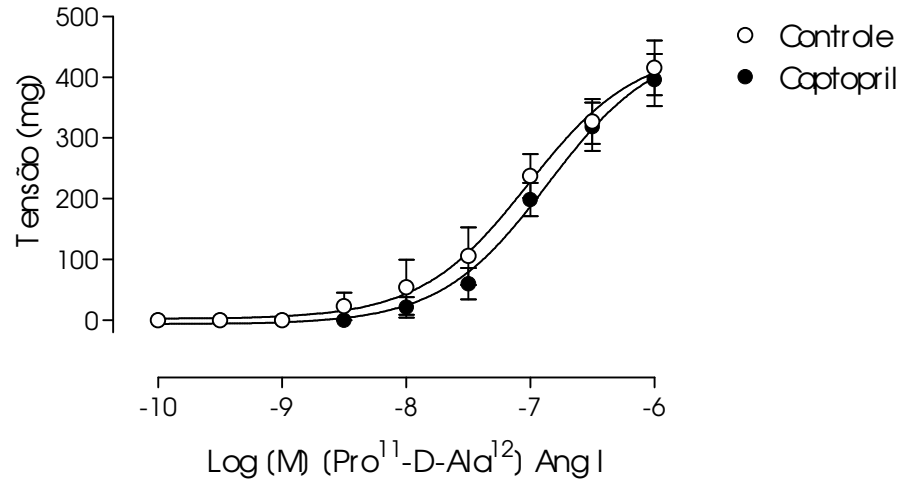


Figura 8. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I na ausência (Controle) e presença de captopril (10 μ M), em carótidas de ratos (n=7). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas p= 0,99.

4.1.4- Efeito da quimostatina sobre as repostas de Ang II, Ang I, TDP, (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para Ang II na ausência e presença de quimostatina, conforme mostrado na figura 9. A resposta vasoconstritora produzida pela Ang II não foi alterada na presença de quimostatina ($PD_2= 8,75\pm 0,09$ vs. $8,68\pm 0,13$).

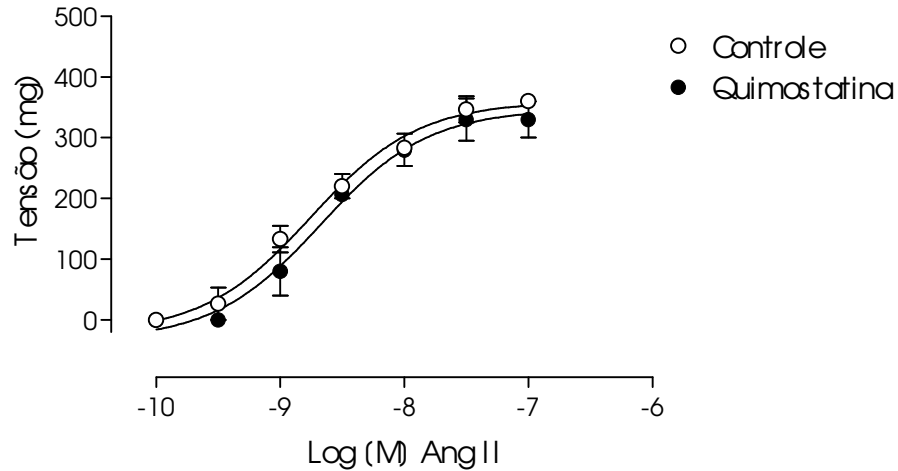


Figura 9. Curvas concentração-efeito a Ang II ausência (Controle) e presença de quimostatina (100 μ M), em anéis de carótidas de ratos (n=3). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas $p=0,90$.

A curva concentração-efeito para Ang I na ausência e presença de quimostatina está representada na figura 10. Na presença deste inibidor de serino-protease observamos que a resposta contrátil induzida pelo substrato Ang I foi deslocada para a direita da curva ($PD_2=8,39\pm 0,07$ vs. $7,95\pm 0,04$).

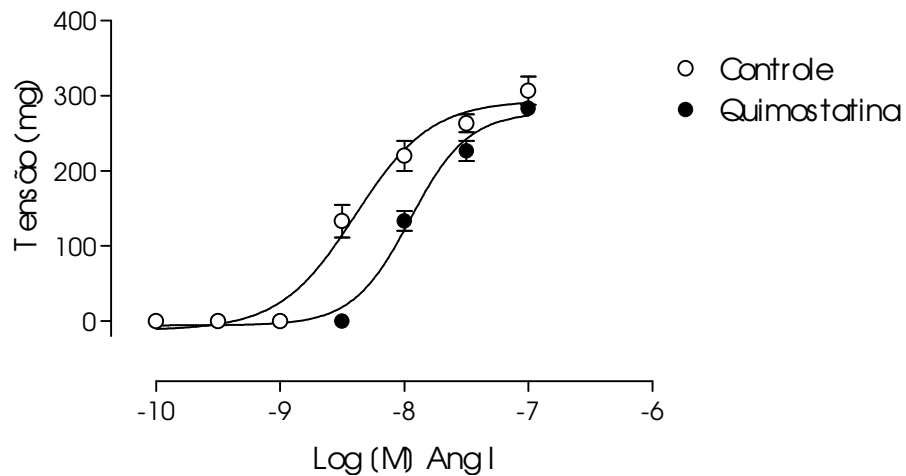


Figura 10. Curvas concentração-resposta a Ang I na ausência (Controle) e presença de quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). Diferença significativa entre as curvas $p<0,0001$ (ANOVA).

A figura 11 mostra a curva concentração resposta de forma cumulativa do TDP na ausência e presença de quimostatina em anéis de artéria carótida de ratos. Este inibidor deprimiu a resposta vasoconstritora do TDP de forma importante, o que não havia sido observado na presença de captopril. Embora nas condições utilizadas não seja possível o cálculo do PD_{2} , verificou-se que este deslocamento foi mais que uma casa logarítmica da concentração deste peptídeo.

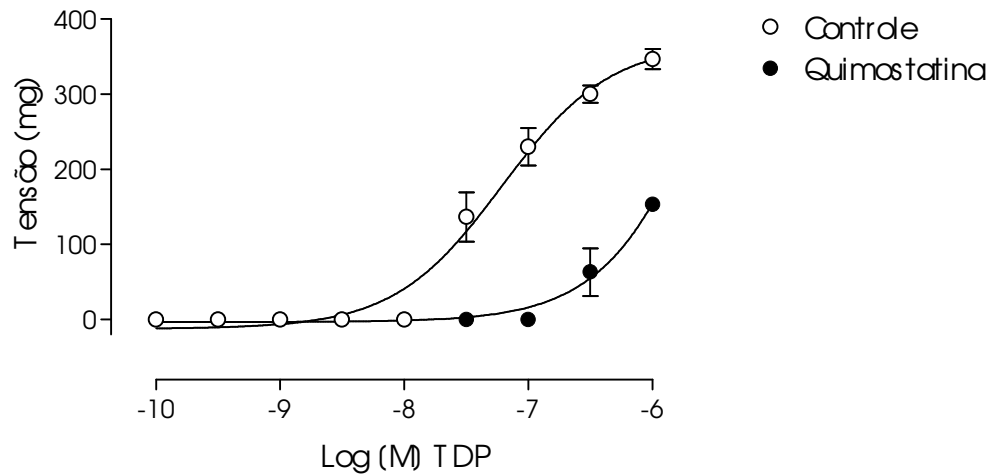


Figura 11. Curvas concentração-resposta a TDP na ausência (Controle) e presença de quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). Diferença significativa entre as curvas $p < 0,0001$ (ANOVA).

A curva cumulativa para (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I na ausência e presença de quimostatina está representada na figura 12. Na presença de quimostatina, a resposta vasoconstritora produzida por (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I foi completamente abolida.

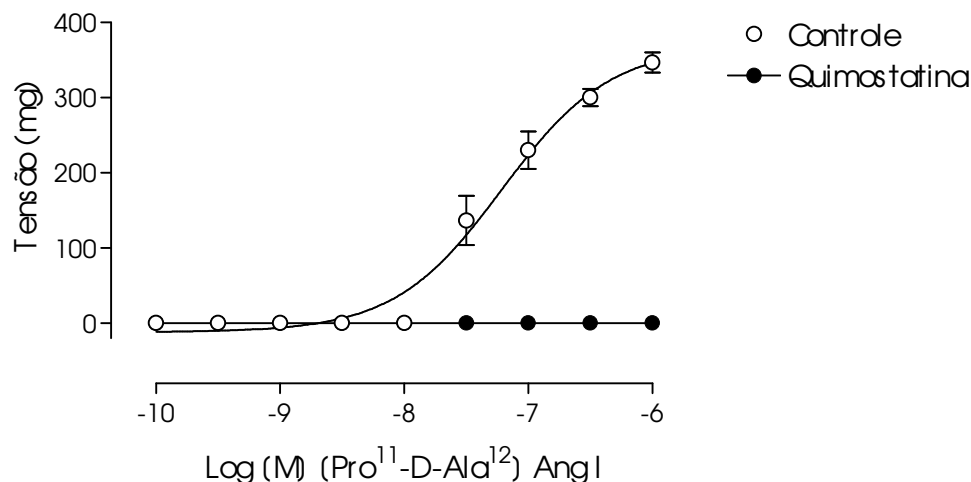


Figura 12. Curvas concentração-resposta a (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I na ausência (Controle) e presença de quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). Diferença significativa entre as curvas $p < 0,0001$ (ANOVA).

4.1.5- Efeito do captopril e quimostatina sobre as repostas de Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

Em carótida de ratos a resposta vasoconstritora produzida por Ang II não foi afetada pela combinação dos inibidores da ECA (captopril) e de serino proteases (quimostatina) ($PD_2 = 8,9 \pm 0,12$ vs. $8,63 \pm 0,18$), conforme ilustrado na figura 13.

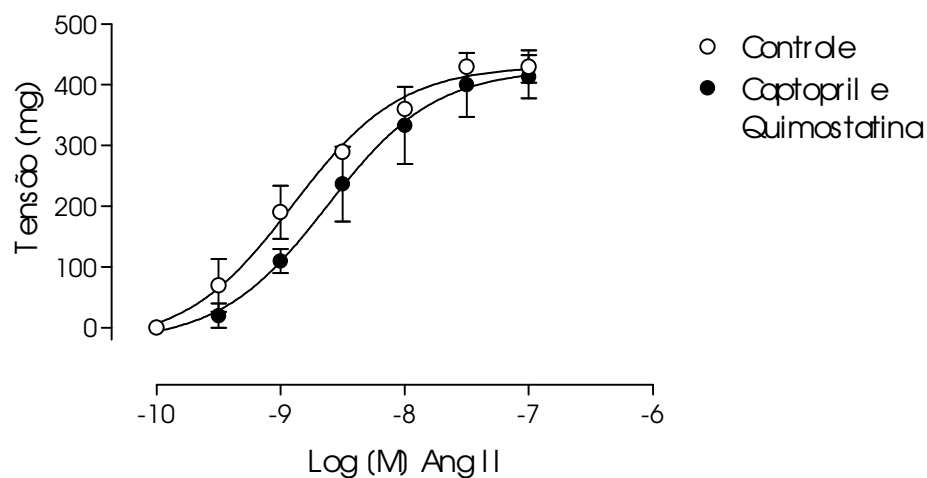


Figura 13. Curvas concentração-resposta a Ang II na ausência (Controle) e presença de captopril (10 μ M) e quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas $p = 0,94$.

A curva cumulativa para Ang I na ausência e presença da associação dos inibidores, captopril e quimostatina, está representada na figura 14. Na presença destes inibidores observamos que a resposta vasoconstritora induzida pelo substrato Ang I foi significativamente deslocada para a direita. O deslocamento observado da curva concentração-resposta de Ang I na presença de ambos os inibidores, captopril e quimostatina, foi equivalente a soma do deslocamento da curva concentração-efeito na presença dos inibidores separadamente (figura 6 e figura 10).

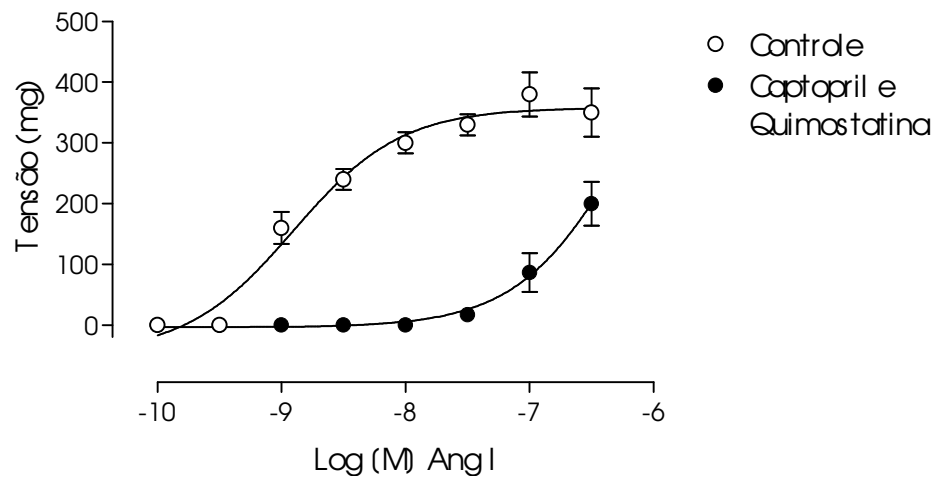


Figura 14. Curvas concentração-resposta a Ang I na ausência (controle) e presença de captopril (10 μ M) e quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). Diferença significativa entre as curvas $p < 0,0001$ (ANOVA).

A figura 15 mostra a curva concentração-efeito a TDP na ausência (controle) e presença de captopril e quimostatina em anéis de artéria carótida de ratos. Estes inibidores modificaram a resposta vasoconstritora do TDP de forma significativa

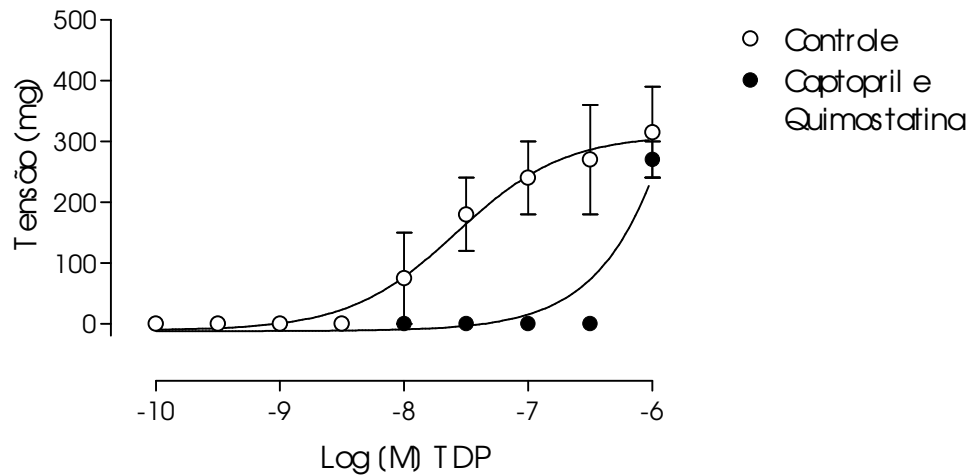


Figura 15. Curvas concentração-resposta a TDP na ausência (controle) e presença de captopril (10 μM) e quimostatina (100 μM), em carótidas de ratos ($n=2$). Diferença significativa entre as curvas $p < 0,0001$ (ANOVA).

A curva cumulativa para $(\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12})$ Ang I na ausência e presença da associação de inibidores, captopril e quimostatina, está ilustrada na figura 16. Na presença dos inibidores da ECA (captopril) e de serino-protease (quimostatina) observamos que a resposta contrátil induzida pelo $(\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12})$ Ang I foi totalmente abolida.

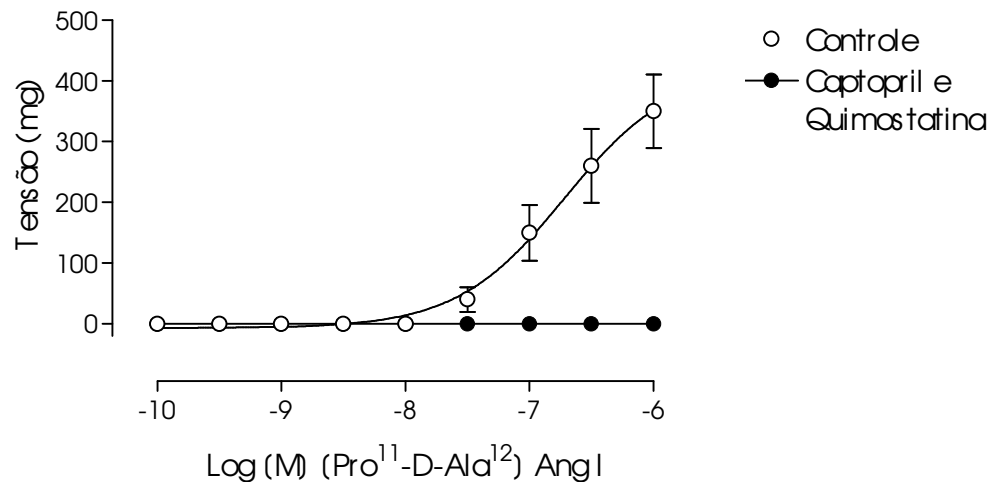


Figura 16. Curvas concentração-resposta a PDA na ausência (Controle) e presença de captopril (10 μ M) e quimostatina (100 μ M), em carótidas de ratos (n=3). Diferença significativa entre as curvas $p < 0,0001$ (ANOVA).

4.1.6- Efeito do Ac-AAPL-CK sobre as repostas de Ang II e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em anéis de carótidas de ratos.

A curva concentração-efeito para Ang II na ausência e presença do inibidor da elastase-2 (Ac-AAPL-CK, 200 μ M), está representada na figura 17. Na presença deste inibidor observamos que a resposta vasoconstritora induzida pela Ang II não foi alterada.

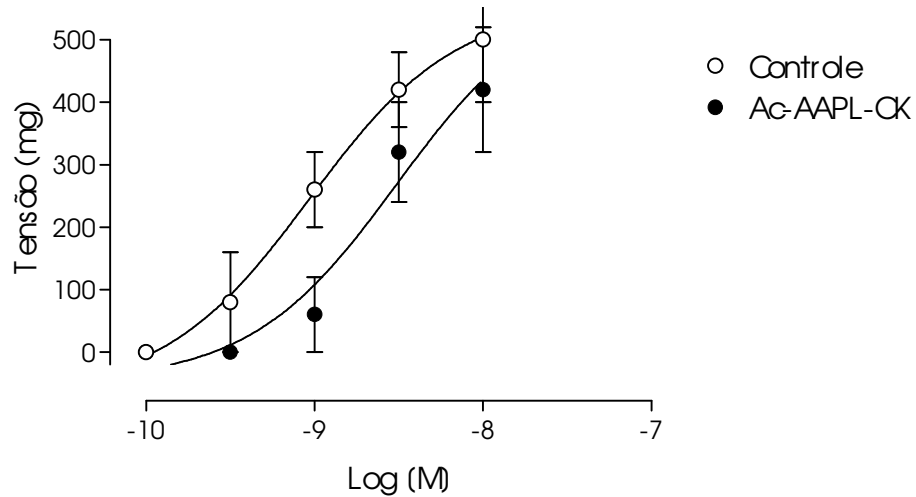


Figura 17. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de Ang II na ausência (Controle) e presença de Ac-AAPL-CK (200 μ M), em carótidas de ratos (n=2). ANOVA não mostrou diferenças entre as curvas p= 0,68.

Foram feitas curvas concentração-efeito para (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I na ausência e presença do inibidor da elastase-2 (Ac-AAPL-CK, 200 μ M) conforme mostrado na figura 18. Na presença deste inibidor observamos que a resposta contrátil induzida pelo (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I foi completamente abolida.

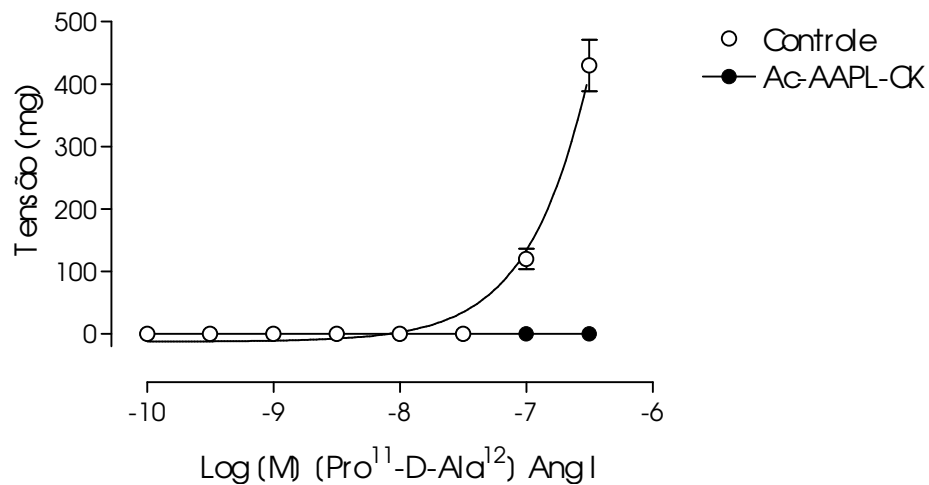


Figura 18. Curvas concentração-resposta a administração de forma cumulativa de PDA na ausência (Controle) e presença de Ac-AAPL-CK (200 μ M), em carótidas de ratos (n=4). Diferença significativa entre as curvas p < 0,0001 (ANOVA).

4.2- Expressão de RNAm da Elastase-2 em diferentes tecidos isolados de ratos

4.2.1- Avaliação da qualidade e quantificação do RNA total das amostras.

Utilizamos duas maneiras distintas para avaliação da qualidade de RNA total, pela avaliação por espectrofotômetro (tabela II) e pela verificação de possível degradação em gel de agarose 1%, ambas as formas de avaliação mostraram que o RNA não apresentava degradação e nem contaminação por DNA genômico. Ainda assim, todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase e RNase previamente a síntese do cDNA. Na tabela II, além da qualidade do RNA total, mostramos a quantidade de RNA total que foi obtida para as diferentes amostras.

TABELA II – Resultados da avaliação da qualidade e quantificação do RNA total nas diferentes amostras.

Amostra	Qualidade de RNA total	Quantidade de RNA total
	Relação A260/A280	Concentração (μ g/ μ L)
RNA – Carótida de rato	1,84	1,122
RNA – Coração de rato	1,7	7,682
RNA – Mesentério de rato	2,07	8,01
RNA – Fígado de rato	1,78	9,597
RNA – Rim de rato	1,86	31,604

4.2.2- Localização do RNAm para elastase-2 em diferentes tecidos.

Foram realizados PCR com os cDNA das amostras com primers de elastase 2 e primers de α -actina (controle). A expressão de RNAm para elastase-2, uma enzima formadora de Ang II, foi encontrado no coração, fígado, rim, leito arterial

mesentérico e artéria carótida de ratos (Figura 19). A expressão de RNAm para α -actina, o controle positivo, também foi encontrado em todas estas amostras.

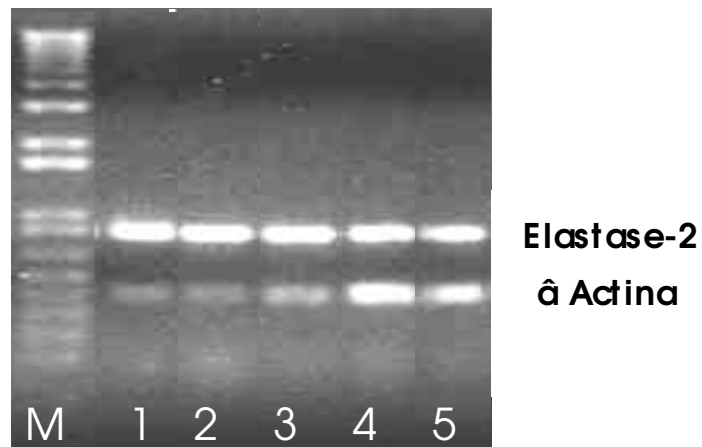


Figura 19. Gel de agarose corado com brometo de etídio para detecção, por RT-PCR, da expressão do RNAm para elastase-2 e α Actina em diferentes tecidos de rato. O cDNA foram amplificadas por PCR com primers específicos para elastase-2 (675 pb) e α Actina (351 pb). M, marcador de peso molecular de 100 pb; 1= carótida; 2= coração; 3= leito arterial mesentérico; 4= rim; 5= fígado.

5- Discussão

5- Discussão

O papel do SRA vascular tem sido assunto de grande interesse nos últimos anos, tendo em vista o grande número de evidências de que tecidos vasculares podem sintetizar e liberar Ang II, exercendo, portanto, influências autócrinas-parácrinas sobre a função vascular (Dzau, 1984).

Várias enzimas, além da renina e da ECA, são capazes de gerar Ang I e /ou Ang II a partir de precursores diversos tais como angiotensinogênio, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I, sendo descritas como vias alternativas de geração de angiotensina II (Mangiapane *et al.*, 1994; Hait *et al.*, 1995; Garrison *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1997; Wlodek *et al.*, 1997; Wolny *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2003).

Os peptídeos Ang II, Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I apresentam respostas vasoconstritoras de maneira dependente da concentração, em anéis de carótida isolados de ratos. Estes peptídeos apresentam uma resposta em forma de sino, isto é, apresentam um efeito contrátil máximo em uma determinada concentração, em seguida, mesmo aumentando a concentração observamos queda da resposta vasoconstritora. Esse é um fenômeno conhecido em relação a Ang II e pode ocorrer dessensibilização ("down regulation") de receptores e/ou ativação de outros receptores, além dos receptores AT₁ responsável pela resposta contrátil. Os mecanismos envolvidos no processo de dessensibilização de receptores do tipo AT₁ podem incluir: mudança para um estado de baixa afinidade, internalização e redução da expressão do próprio RNA_m. Além disso, o efeito de relaxamento observado em altas concentrações de Ang II e seus precursores pode estar ocorrendo pela ativação de receptores AT₂ (Widdop *et al.*, 2002). Os receptores AT₂ parecem estar relacionados a resposta de relaxamento da musculatura lisa

vascular (Dimitropoulou *et al.*, 2001). Em animais com depleção de receptores AT_2 observa-se um aumento da resposta vasoconstritora de Ang II (Hein *et al.*, 1995). Em nosso protocolo experimental para não ocorrer taquifilaxia esperava-se um intervalo de 50 minutos entre uma curva concentração-efeito de um peptídeo e outra.

A Ang II tem um importante papel na homeostase vascular, não somente no sistema circulante, mas também em nível tecidual; além disso, este peptídeo está relacionado com vários processos fisiológicos e patológicos (Brewster *et al.*, 2003; Perazella & Setaro, 2003). Ang II é um peptídeo que produz resposta contrátil, sendo que não precisa ser dividido para produzir seu efeito, é o produto final que ativa receptores e desencadeia os eventos intracelulares.

Em anéis isolados de carótida de ratos a Ang II e seus substratos induziram uma resposta vasoconstritora que foi inibida na presença de antagonista de receptor AT_1 (figura 3), evidenciando que a resposta contrátil induzida pelos substratos Ang I, TDP, $(Pro^{11}-D-Ala^{12})$ Ang I são precedidas pela conversão em Ang II e ativação de receptores AT_1 .

A Ang I é um decapeptídeo que precisa ser dividido no octapeptídeo Ang II para produzir seu efeito biológico. Para possibilitar o estudo da contribuição de diferentes enzimas na conversão do substrato Ang I em Ang II, foram realizadas curvas concentração-efeito na ausência e presença de diferentes inibidores de proteases. A curva concentração-efeito produzida pela Ang I em artéria carótida de ratos na presença do inibidor da ECA foi deslocada cerca de 100 vezes para a direita em relação à curva cumulativa na ausência do inibidor, isto significa que foi necessária uma concentração de Ang I em torno de 100 vezes maior para verificarmos a mesma resposta contrátil da Ang I na ausência do inibidor da

enzima conversora. A inibição da resposta contrátil de Ang I na presença de captopril também foi demonstrada em carótida de hamster e aorta de rato (Inoue *et al.*, 1999). Na presença de quimostatina, um inibidor de serino proteases, observou-se um deslocamento da curva cumulativa a Ang I para a direita, de menor magnitude que a observada com captopril. Esses dados sugerem que a ECA é a principal via de geração de Ang II a partir de Ang I em carótidas de ratos, embora enzimas sensíveis a quimostatina também participem do metabolismo de Ang I em Ang II nesta preparação. A importância de enzimas diferentes da ECA, como a elastase-2, na conversão de Ang I em Ang II parece depender do território vascular ou das condições do ensaio, já que em leito mesentérico profundo isolado de ratos, a presença de uma via sensível a quimostatina só pode ser detectada após inibição da ECA (Santos *et al.*, 2003).

Com associação dos inibidores da enzima conversora e de serino-proteases, captopril e quimostatina, respectivamente, observou-se uma significativa alteração na resposta contrátil produzida pela Ang I; na presença desses dois inibidores a curva concentração-efeito a Ang I foi deslocada para a direita, esse deslocamento foi equivalente a soma dos deslocamentos das curvas concentração-efeito a Ang I produzidos na presença dos inibidores separadamente. Esses dados demonstram que a geração de Ang I pela via independente da ECA participa sinergicamente com a via da ECA para geração Ang II em carótidas de ratos. Corrobora com nossos achados dados da literatura que relatam o efeito sinérgico da inibição da Ang I na presença de captopril e quimostatina em trem posterior de ratos (Ideishi *et al.*, 1990) e em aorta de ratos (Inoue *et al.*, 1999).

A predominância da via dependente ou independente da ECA parece depender da concentração da Ang I utilizada. Muitos investigadores usaram

somente concentrações extremamente altas ($10^{-6}M$) de Ang I para mostrar a importância da via alternativa de formação de Ang II, como por exemplo, em artérias de humanas (Walny *et al.*, 1997), artérias de cães (Mangiapane *et al.*, 1994) e em músculo detrusor de humanas (Lindberg *et al.*, 1994). Entretanto, nossos dados mostraram que nas mesmas concentrações que observamos alteração da resposta contrátil de Ang I na presença de captopril, também verificamos alteração da resposta vasoconstritora a Ang I na presença de quimostatina. Esses dados nos levam a sugerir que ambas as vias, dependentes e independentes da ECA, são importantes para formar Ang II a partir da Ang I em mamíferos, sendo a via dependente da ECA a predominante. É importante salientar que os inibidores utilizados, captopril e quimostatina, não afetavam a resposta induzida por Ang II, indicando que nas concentrações utilizadas não apresentam efeitos inespecíficos.

O peptídeo TDP (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Val¹²-Tyr¹³-Ser¹⁴) é um substrato sintético que apresenta 14 aminoácidos primários do angiotensinogênio e efeito vasopressor. Embora este peptídeo seja considerado como substrato de renina, estudos *in vitro* sugerem que TDP também seja dividido pela ECA (Dorer *et al.*, 1975; Sybertz *et al.*, 1984) liberando Ang I e Ang II, assim como por outras proteases como tonina (Boucher *et al.*, 1974) e elastase-2 que convertem este peptídeo diretamente em Ang II (Paula *et al.*, 1998).

Em nossos experimentos a resposta vasoconstritora induzida pelo TDP em carótidas de ratos não foi alterada na presença do inibidor da ECA (captopril), demonstrando que a ECA não participa de maneira importante da divagem deste peptídeo nesta preparação. Estes achados estão de acordo com dados demonstrados por Juul *et al.* (1987) que a resposta vasoconstritora induzida pelo

TDP em veia femoral não era inibida pelo captopril. Estes dados, no entanto, contrastam com os recentemente publicados utilizando vasos de resistência (leito arterial mesentérico de rato), no qual o TDP é dividido em Ang II parcialmente pela ECA, pois na presença de captopril sua resposta é parcialmente bloqueada (Santos *et al.*, 2003).

A curva concentração-efeito de TDP na presença do inibidor de serino protease (quimostatina) foi significativamente deslocada para a direita em relação a curva de TDP na ausência do inibidor, evidenciando que o peptídeo TDP é dividido por proteases sensíveis a quimostatina. Além disso, confirma a existência de via alternativa de geração de Ang II em carótida de ratos. A inibição da resposta contrátil produzida pelo TDP na presença de inibidores da ECA e serino-protease, captopril e quimostatina, respectivamente, foi equivalente a alteração da resposta vasoconstritora do peptídeo na presença da quimostatina apenas, corroborando com a hipótese que o TDP é convertido em Ang II por proteases sensíveis à quimostatina, e que a ECA não participa da geração de Ang II na carótida.

Na presença dos inibidores captopril e quimostatina a curva cumulativa de TDP apresenta uma contração na qual observamos uma resposta "tudo ou nada", isto é, em baixas concentrações não observamos contração e quando aumentamos a concentração a resposta apresenta um salto induzindo seu efeito contrátil máximo. Para verificarmos qual (is) protease (s) poderiam converter TDP em Ang II e produzir esta resposta "tudo-ou-nada" foi feito um experimento piloto no qual a curva cumulativa de TDP foi realizada na ausência e presença da associação de inibidores da ECA, de serino protease e de carboxipeptidase (captopril, quimostatina e inibidor de carboxipeptidase de batata- PCI), respectivamente, no qual constatamos um deslocamento para a direita da curva cumulativa de TDP em

relação a curva na presença da combinação de captopril e quimostatina, sugerindo que além da via alternativa de geração de Ang II sensível à quimostatina pode haver outra via alternativa dependente de carboxipeptidases capazes de dividir TDP em Ang II; já estão programados experimentos futuros para verificar a possível participação de carboxipeptidases na geração de Ang II em carótidas de ratos.

Um outro peptídeo utilizado para verificar a presença de via geradora de Ang II, independente da ECA, em carótidas de ratos foi o (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I. O (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I é um peptídeo sintético composto por 12 aminoácidos (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰-Pro¹¹-Ala¹²), sendo que apresenta os 10 aminoácidos da Ang I mais Prolina na posição 11 e D-Alanina na posição 12, o que confere ao peptídeo uma conformação estrutural que impede a ação da ECA (Kinoshita *et al.*, 1991).

O (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I é um substrato sintético que vem sendo utilizado para identificar a presença de via alternativa de geração de Ang II dependente de quimase em humanos (Kinoshita *et al.*, 1991), babuínos (Hoit *et al.*, 1995), hamster (Nishimura *et al.*, 1998) e cães (Murakami *et al.*, 1997). Dados de nosso laboratório (Santos *et al.*, 2003) demonstraram que o (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I não é um substrato específico para quimases, sendo este peptídeo dividido também pela elastase-2 de rato liberando Ang II.

Em carótidas de ratos o (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I induziu um efeito contrátil que não foi alterado na presença de captopril, confirmando dados da literatura que a ECA não divide (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I liberando Ang II (Hoit *et al.*, 1995). A resposta vasoconstritora produzida pelo (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I foi completamente abolida na presença de quimostatina, demonstrando que toda a conversão do (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em Ang II é feita por enzima(s) sensível (is) a quimostatina. Embora

quimases sejam possíveis candidatas a geração de Ang II a partir de (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I, dados da literatura indicam que quimases de ratos degradam Ang II (Le Trong *et al.*, 1987). Desta forma, excluindo a possibilidade de ser quimases as enzimas responsáveis pela via alternativa, sendo a elastase-2 de ratos a possível candidata. Esta hipótese toma como base a demonstração que a elastase-2 de rato purificada é capaz de converter (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I em Ang II por uma única divagem por mecanismos sensíveis a quimostatina (Santos *et al.*, 2002a; Santos *et al.*, 2003).

Uma característica notável da elastase-2, como uma enzima conversora de angiotensina, é que ela não destrói o produto final Ang II. Essa característica é compartilhada com algumas quimases, tais como humana, de babuíno e de cão, mas não com a maioria das quimases de roedores, como a do rato. Além disso, a interação até então desconhecida da elastase-2 com (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I (Santos *et al.*, 2002a), considerado anteriormente como substrato seletivo para quimases, sugere que as evidências para a formação de Ang II *in vivo* por quimases, particularmente no rato, podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre as vias geradoras de Ang II (Resende & Mill, 2002).

É interessante observar que na presença de inibidor da elastase-2 (Ac-AAPL-CK) as respostas vasoconstritoras produzida pelo (Pro¹¹-D-Ala¹²) Ang I foram completamente abolidas. O inibidor Ac-AAPL-CK foi descrito como seletivo para elastase-2 humana (Largman *et al.*, 1980), porém dados não publicados do nosso laboratório demonstram que este inibidor também inibe quimase da pele humana obtida comercialmente (Sigma). Mas, como dito anteriormente, as quimases de ratos degradam Ang II tornando bastante improvável que as quimases sejam responsáveis pela geração de Ang II em carótidas de ratos.

A hipótese do envolvimento da elastase-2 na formação de Ang II é reforçada pela detecção da expressão de RNAm de elastase-2 em diferentes tecidos, incluindo a artéria carótida de ratos. Nossos dados confirmam achados do nosso laboratório (Santos *et al.*, 2003) que demonstraram expressão do RNAm da elastase-2 em coração e leito arterial mesentérico de ratos normotensos. O fato de termos encontrado o RNAm para a elastase-2 no coração tem respaldo de achados do nosso laboratório, uma vez que a elastase-2 foi identificada no perfusado de coração isolado de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (Stuckert-Seixas, 2001). Esses resultados sugerem que elastase-2 possa ter uma participação funcional na geração local de Ang II em vários órgãos importantes no sistema cardiovascular.

Em interpretação conjunta dos resultados apresentados, aqui podemos dizer que em anéis de carótidas isolados de ratos normotensos há fortes evidências da existência de uma via geradora de Ang II sensível à quimostatina e Ac-AAPI-CK, de forma independente da ECA. Dentre os possíveis candidatos a elastase-2, uma enzima presente no leito arterial mesentérico isolado de ratos (Oliveira *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003), insensível ao captopril, sensível à quimostatina (Paula *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2002) e ao inibidor Ac-AAPI-CK, é uma forte candidata.

6-*Conclusão*

6- Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho mostraram a existência de via geradora de Ang II independente da ECA, a qual é sensível a quimostatina e Ac-AAPL-CK, em carótidas de ratos. Dentre os possíveis candidatos que podem fazer parte dessa(s) via(s) aparece a elastase-2, uma enzima presente na artéria carótida, insensível ao captopril, sensível a quimostatina e sensível ao inibidor Ac-AAPL-CK. Outras possíveis candidatas a fazer parte da(s) via(s) alternativa para geração de Ang II na carótida de ratos seriam as quimases, enzimas também sensíveis à quimostatina. Porém, a quimase I de rato apresenta atividade predominante de degradação de Ang II, sugerindo novamente uma possível função da elastase-2, e não de quimases, como uma via alternativa à ECA para a geração vascular de Ang II em carótida de ratos.

O RNA_m da elastase-2 aparece expresso em coração, fígado, rim, leito arterial mesentérico e artéria carótida de ratos. A presença da elastase-2 em diferentes tecidos sugere que esta enzima possa desempenhar um papel importante no sistema cardiovascular de ratos como um agente formador de Ang II.

7-Resumo

Uma atividade funcional para uma via alternativa de geração de angiotensina II, como a elastase-2 foi sugerida em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório no leito arterial mesentérico isolado de rato. No presente estudo, caracterizamos com o uso de substratos e inibidores seletivos a presença de via alternativa de geração de Ang II, independente da ECA, em carótida de ratos. Determinamos ainda a expressão do RNA_m da elastase-2 nesta preparação arterial. Em anéis isolados de carótida de ratos analisamos o efeito vasoconstritor dos peptídeos Ang II, Ang I, TDP, (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I (um substrato resistente a ECA) na ausência e presença de inibidores de proteases. Ang II e seus precursores produziram efeito vasoconstritor dependente da concentração em carótidas de ratos, de forma sensível ao losartan (1 μM). Na presença de captopril (10 μM) a resposta vasoconstritora produzida pela Ang I foi inibida, mas a resposta contrátil induzida pelo TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I não foi alterada. Na presença de quimostatina (100 μM) o efeito produzido pelo TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I foi abolido enquanto que a curva cumulativa de Ang I foi significativamente deslocada para a direita. Inibidor Ac-AAPL-CK (seletivo para elastase-2) aboliu completamente a resposta contrátil induzida pelo PDA e não alterou o efeito vasoconstritor da Ang II. Na presença de captopril e quimostatina a resposta vasoconstritora dos peptídeos Ang I, TDP e (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I foram inibidas, enquanto a resposta contrátil da Ang II não foi alterada em artéria carótida. A presença de RNA_m da elastase-2 na carótida, juntamente com os dados funcionais apresentados aqui sugerem a participação desta enzima na via alternativa de geração de Ang II em carótidas de ratos. Embora a formação de Ang II a partir Ang I seja descrita como essencialmente dependente da ECA, nossos resultados sugerem a existência de

vias alternativas de geração de Ang II sensível a quimostatina e Ac-AAPL-CK em artéria carótida de ratos. Muito provavelmente a elastase-2 seja a enzima responsável pela geração de Ang II nessa preparação.

8- Abstract

We have recently described a chymostatin-sensitive elastase-2 as the major angiotensin (Ang) II-forming enzyme in the perfusate of rat mesenteric arterial bed (MAB). In the present study we investigated the role of this enzyme in generating Ang II in the isolated rat carotid artery rings by analyzing the vasoconstrictor effect of Ang II, Ang I, tetradecapeptide renin-substrate (TDP), (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I (an ACE-resistant substrate) in the absence and presence of proteases inhibitors. Ang II and its precursors produced a dose-dependent vasoconstrictor effect in vascular preparation that was blocked by losartan (1 μ M). In carotid rings, captopril (10 μ M) abolished the responses induced by Ang I but did not affect those induced by TDP and (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I. In the presence of chymostatin (100 μ M) alone, the effects induced by (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I and TDP were abolished while the concentration-response curve to Ang I was shifted to the right. Ac-AAPL-CK (selective elastase-2 inhibitor) inhibited the responses induced by (Pro¹¹-D-Ala¹²)-Ang I but did not affect Ang II-induced effects. In the presence of captopril and chymostatin, the vasoconstrictor effects of Ang I, TDP, and PDA were completely blocked while those induced by Ang II were not affected in rat artery carotid. Although Ang II formation from Ang I is essentially dependent on ACE in carotid artery, our results suggest the existence of an alternative chymostatin-sensitive pathway in rat arteries, most probably involving elastase-2.

9- Referências Bibliográficas

9- Referências Bibliográficas.

Abe F, Omata K, Yamada M, Tsunoda K, Sato T, Shimizu T, Ito S, Abe K, Nakazima M, Morimoto T, Takashi N. Specific direct radioimmunoassay of angiotensin II (AT II) in human plasma and the effect of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *Immunopharmacol.* 1999; 44:199-204.

Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K. Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension.* 1998; 32:514-520.

Arakawa K, Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens Suppl.* 1996; 14:S3-7.

Balcells E, Meng GC, Johnson WH Jr, Oparil S, Dell'Italia LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol.* 1997; 273:H1769-1774.

Bastos M, Moeji NJ, Abeles RH. Inhibitors of human heart chymase based on a peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:6738.

Blais C Jr, Drapeau G, Raymond P, Lamontagne D, Gervais N, Venneman I & Adam A. Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. *Am J Physiol.* 1997; 273:H2263-H2271.

Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, de Gasparo M. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 183:206-211.

Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of Angiotensin II. *Circ Res.* 1974; 34-35:203-209.

Braun-Menéndez E, Fasciolo JC, Acción vasoconstrictora e hipertensora de la sangre venosa del riñón en isquemia incompleta aguda. *Rev Soc Arg Biol.* 1939; 15: 161-172.

Braun-Menéndez E, Page IH. Suggested revision of nomenclature: angiotensin. *Science.* 1958; 127:242.

Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorend effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *Am J Med Sci.* 2003; 326:15-24.

Buisson B, Bottari SP, de Gasparo M, Gallo-Payet N, Payet MD. The angiotensin AT2 receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *FEBS Lett.* 1992; 309:161-164.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest.* 1987; 79:1-6.

Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Dundia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165:196-203.

Clauser E. Molecular structure and function of angiotensin ii receptors. *Nephrologie.* 1998; 19:403-410.

Cornish KG, Joyner WL, Gilmore JP. Evidence for the conversion of angiotensin I to angiotensin II by the coronary microcirculation. *Blood Vessels.* 1979; 16:241-246.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxydkanoyl and mercaptodkanoyl amino acids. *Biochem.* 1980; 19:468-472.

Dendorfer A, Wolfrum S, Wellhoner P, Korsman K & Dominick P. Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol*. 1997; 122:1179-1187.

DiBianco R. Update on therapy for heart failure. *Am J Med*. 2003; 115: 480-488.

Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, Zhang H, Cottravos JD, Carrier GO. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension*. 2001; 37:301-307.

Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, Skeggs LT. Formation of angiotensin II from tetradecapeptide renin substrate by angiotensin-converting enzyme. *Biochem Pharmacol*. 1975; 24:1137-1139.

Dzau VJ: Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984; 6:S377-S382.

Faria FA, Salgado MCO. Facilitation of noradrenergic transmission by angiotensin in hypertension rats. *Hypertension*. 1992; 19:1130-35.

Garrison EA, Champion HC, Kadowitz PJ. (Pro¹¹,D-Ala¹²)angiotensin I has rapid onset vasoconstrictor activity in the cat. *Am J Physiol*. 1997; 273:E1059-1064.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934; 59:347-379.

Hein L. Genetic deletion and overexpression of angiotensin II receptors. *J Mol Med*. 1998; 76:756-763.

Hoit BD, Shao Y, Kinoshita A, Gabel M, Husain A, Walsh RA. Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J Clin Invest*. 1995; 95:1519-1527.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of renin system. *Hypertension*. 1998; 32:387-392.

Ideishi M, Sasaguri M, Ikeda M, Arakawa K. Substrate-dependent angiotensin II formation in the peripheral circulation. *Life Sci*. 1990; 46:335-341.

Igic R, Erdos EG, Yeh HS, Sorrells K, Nakajima T. Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ Res*. 1972; 31:Suppl 2:51-61.

Igic R, Behnia R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. *Curr Pharm Des*. 2003; 9: 697-706.

Inoue K, Nishimura H, Kubota J, Kawamura K. Alternative angiotensin II formation in rat arteries occurs only at very high concentration of angiotensin I. *Hypertension*. 1999; 34:525-530.

Janick P, Pillon A, Prost JF, Vilaine JP. Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension*. 1992; 20:737-745.

Juillerat L, Nussberger J, Menard J, Mooser V, Christen Y, Waerber B, Graf P, Brunner HR. Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 1990; 16:564-572.

Juul B, Adkjaer C, Mulvany MJ. Contractile effects of tetradecapeptide renin substrate on rat femoral resistance vessels. *J Hypertens Suppl*. 1987; 5:S7-10.

Kang J, Summers C, Posner P. Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II: involvement of AT1 and AT2 receptors. *Brain Res*. 1992; 580:317-324.

Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem*. 1991; 266:19192-19197.

Largman C, Brodrick JW, Geokas MC, Johnson JH, Fassett M. Demonstration of a pancreatic proelastase 2-alpha 1-protease inhibitor complex in normal human plasma. *Am J Physiol*. 1980; 238:G177-182.

Le Trong H, Neurath H, Woodbury RG. Substrate specificity of the chymotrypsin-like protease in secretory granules isolated from rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:364-367.

Leite R, Esteves R, Resende AC, Saldado MCO. Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. *Braz J med Biol Res*. 1997; 30:649-656.

Leite R, Saldado MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one-dip hypertension. *Hypertension*. 1992; 19:575-581.

Levens NR, de Gasparo M, Wood JM, Bottari SP. Could the pharmacological differences observed between angiotensin II antagonists and inhibitors of angiotensin converting enzyme be clinically beneficial? *Pharmacol Toxicol*. 1992; 71:241-249.

Lindberg BF, Nilsson LG, Hedlund H, Stahl M, Andersson KE. Angiotensin I is converted to angiotensin II by a serine protease in human detrusor smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994; 266:R1861-1867.

Linz W, Scholkens BA & Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin and Exper Hyper - Theory and Practice*. 1989; A11:1325-1350.

Mac Donald RJ, Swift GH, Quinto C, Swain W, Pictet RL, Nikovits W, Rutter WJ. Primary structure of two distinct rat pancreatic preproelastases determined by sequence analysis of the complete cloned messenger ribonucleic acid sequences. *Biochemistry*. 1982; 21:1453-1463.

Mangiapane ML, Rauch AI, MacAndrew JT, Ellery SS, Hoover KW, Knight FR, Johnson HA, Magee WP, Cushing DJ, Buchholz RA. Vasoconstrictor action of angiotensin I-convertingase and the synthetic substrate (Pro¹¹,D-Ala¹²)angiotensin I. *Hypertension*. 1994; 23:857-860.

Maruta H, Arakawa K. Confirmation of direct angiotensin formation by Kdikrein. *Biochem J*. 1983; 213:193-200.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels in rat. *J Physiol (London)* 1965; 177:21-30.

Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T. Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl*. 1997; 63:S132-135.

Nishimura H, Buikema H, Battatu O, Ganten D, Urata H. Functional evidence for alternative AngII-forming pathways in hamster cardiovascular system. *Am J Physiol*. 1998; 275:H1307-1312.

Okamura T, Okunishi H, Aoyagi K, Toda N. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery: role of two different angiotensin II-generating enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990; 15:353-359.

Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 149:1186-1192.

Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens*. 1984; 2:277-284.

Oliveira EB, Salgado MCO, Turner AJ. A survey of vasoactive peptide metabolizing enzymes in the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochem pharmacol.* 1991; 42:1897-1904.

Padmanabhan N, Jardine AG, McGrath JC, Connell JM. Angiotensin-converting enzyme-independent contraction to angiotensin I in human resistance arteries. *Circulation.* 1999; 99:2914-2920.

Page IH, Helmer CM. A crystalline pressor substance: angiotonin. *Proc Center Soc Clin Invest.* 1939; 12:17.

Paula CA, Sousa MV, Salgado MCO, Oliveira EB. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1388:227-238.

Perazella MA, Setaro JF. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nud Cardiol.* 2003; 10:184-196.

Richard V, Hurel-Merle S, Scobert E, Ferry G, Lallemand F, Bessou JP, Thuillez C. Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation.* 2001; 104:750-752.

Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH, Greene AS. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H775-783.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MCO, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Cardiovasc Pharmacol.* 2002b; 39:628-635.

Santos CF, Paula AC, Salgado MCO, Oliveira EB. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, angiotensin I-converting serine protease. *Can J.Physiol. Pharmacol.* 2002a; 80:42-47.

Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956; 103:295-299.

Skeggs LT Jr, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertension. *J Exp Med.* 1954; 99:275-282.

Smith DE, Guillard S, Rodriguez CA. Effect of angiotensin II-induced changes in perfusion flow rate on chlorothiazide transport in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacokinetics Biopharm.* 1992; 20:195-207.

Stuckert-Seixas SR. Identificação e purificação de uma enzima formadora de angiotensina II no perfusato cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2001.

Swamy KM, Lin MJ, Sun CM. Advances in angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin receptor blockers (ARBs). *Mini Rev Med Chem.* 2003; 3:621-631.

Sybertz EJ, Ahn HS, Baum T, Eynon E, Nelson S, Washington P, Czarniecki M. Mechanism of the pressor response to tetradecapeptide renin substrate in the rat. *Clin Exp Hypertens A.* 1984; 6:2143-2159.

Takai S, Sakaguchi M, Jin D, Yamada M, Kirimura K, Miyazaki M. Different angiotensin II-forming pathways in human and rat vascular tissues. *Clin Chim Acta* 2001; 305:191-195.

Takai S, Shaita N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M. Purification and characterization of angiotensin II generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci* 1996; 58:591-597

Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol*. 1898; 8: 223-271.

Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. 1982; 69:25-30.

Trachte Lefer GJ, Lefer AM. Inotropic and vasoactive effects of the naturally occurring angiotensins in isolated cat cardiac muscle and coronary arteries. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1979; 25:419-427.

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gollinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*. 1996; 14:S95-103.

Urata H, Hedy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res*. 1990a; 66:883-890.

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 1990b; 265:22348-22357.

Urata H, Nishimura H, Ganten D & Arakawa K. Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. *Blood Press Suppl*. 1996; 2:22-28.

Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J*. 1995; 16:79-85.

Waldeck k, Lindberg BF, Persson K, Andersson KE. Characterization of angiotensin II formation in human isolated bladder by selective inhibitors of ACE and

human chymase : a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol*. 1997; 121:1081-1086.

Widdop RE, Matrougui K, Levy BI, Henrion D. AT2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT1 receptor blockade. *Hypertension*. 2002; 40:516-520.

Walny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, Fischli W. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res*. 1997; 80:219-227.

Yang HY, Erdos EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1970; 214:374-376.

Yang HY, Erdos EG, Levin Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther*. 1971; 177:291-300.

Yang HY, Erdos EG. Second kininase in human blood plasma. *Nature*. 1967; 215:1402-1403.