

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

**ANA ELIZA AKASHI**

**Caracterização de um sistema renina-angiotensina  
local no tecido gengival de rato**

**BAURU  
2008**



**ANA ELIZA AKASHI**

**Caracterização de um sistema renina-angiotensina  
local no tecido gengival de rato**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, junto ao programa de pós-graduação em Estomatologia e Biologia Oral.

Área de concentração Biologia Oral.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**

**BAURU  
2008**

Akashi, Ana Eliza

Ak17c      Caracterização de um sistema renina-angiotensina local no tecido gengival de rato / Ana Eliza Akashi. – Bauru, 2008.  
109 p. : il. ; 30 cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo: projeto de pesquisa aprovado em 21 de outubro de 2004.

Número do protocolo: nº. 20/2004

# FOLHA DE APROVAÇÃO



## Dados Curriculares

---

### Ana Eliza Akashi

09 de abril de 1974

Nascimento: Bariri – SP

Filiação

Takao Akashi e  
Maria Aparecida Venturini Akashi

1993 -1996

Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

1998 -2000

Curso de Pós-Graduação em Odontologia em nível de Mestrado, Área de Implantologia, na Universidade do Sagrado Coração, Bauru.

2004 - Atual

Curso de Pós-Graduação em Odontologia em nível de Doutorado, Programa de Estomatologia e Biologia Oral, área de concentração Biologia Oral, na Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

---





Agradeço a *Deus* por me proporcionar saúde e força  
para superar obstáculos e iluminar meus passos  
nesta jornada, hoje e sempre...

---



*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.*

**Fernando Pessoa**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, **Takao e Maria Aparecida**, sempre presentes e apoiadores em momentos cruciais nas escolhas da vida. Pessoas tão diferentes, porém com qualidades suficientes para formar filhos com caráter, honestidade e humildade sem igual. Obrigada pelas chances a mim proporcionadas e por poderem compartilhar momentos tão especiais. Vocês são o meu porto seguro, a minha vida. As palavras são poucas para expressar meu amor por vocês!

Às minhas irmãs: **Ana Maria, Ana Paula e Ana Júlia**, pela constante convivência, pelo apoio nas horas difíceis e por fazerem parte da minha vida. Amo vocês e obrigada por tudo.

---



Ao meu sobrinho, **Pedro Henrique**, por me proporcionar momentos de muita alegria e prazer.

À minha tia, **Marina**, pelo carinho e cuidados ao longo dos anos. Obrigada por estar ao nosso lado.

A uma das melhores surpresas da minha vida: **Gervásio**. Obrigada por fazer parte do meu cotidiano, apoiando, amparando e muitas vezes se distanciando para que eu pudesse cumprir minhas obrigações. Amo você.

---



## **AO MEU QUERIDO MESTRE**

### **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**

Vivemos uma escassez de pessoas honestas, sensatas e humildes. Alie-se a isso, a falta de pessoas inteligentes e competentes, determinadas e ousadas, persistentes e discretas, acadêmicas e pesquisadoras, carinhosas e respeitadoras... Você, meu querido mestre e amigo, consegue conciliar todas estas qualidades em uma só pessoa. Como orientada, agradeço pela forma como conseguiu ampliar minha visão em relação à ciência e pesquisa e pela brilhante orientação. Como amiga, só posso dizer que hoje me sinto ainda mais privilegiada em poder fazer parte da sua vida. Meu muito obrigada, de coração.

## **AO MEU GRANDE EXEMPLO**

### **Thiago José Dionísio**

Seria muito fácil elogiá-lo, sem parecer ridícula ou piegas. Porém, prefiro deixar aqui minha gratidão pelos ensinamentos precisos, pela orientação em momentos de desespero, pelas palavras de conforto e amizade. Mesmo com tão pouca idade, você é um exemplo de integridade, seriedade e perseverança em tudo que faz. Desejo muita prosperidade e que seus caminhos sejam sempre permeados de pessoas como você. Obrigada por tudo.

---





## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À grande amiga **Thais Marchini de Oliveira**, por ter cruzado minha vida e mostrar-se tão disposta a sempre ajudar as pessoas ao seu redor. Você realmente é iluminada, cheia de energia positiva e com uma capacidade imensa de ser especial. Obrigada pela convivência e nos momentos mais distantes, pelo pensamento sempre elevado.

À amiga e companheira de doutorado **Sílvia Helena Salles Peres**, pela amizade e carinho com que você me trata. Obrigada por estar sempre disposta a me ajudar. Exemplo de competência e seriedade sem igual.

À amiga **Vivian Biella**, pelo breve contato, porém intenso, que promoveu uma grande admiração pelo seu jeito amigável e sincero de agir. Obrigada pelo auxílio nos momentos difíceis do curso.

À **Marinele Ribeiro de Campos**, pelos momentos agradáveis que passamos juntas, pela convivência e por sempre estar disposta a ajudar.

À **Carla Renata Sipert**, pela ajuda e colaboração durante as fases experimentais da pesquisa. Obrigada pela disposição e conhecimento, principalmente na cultura de células.

À **Vivien Thiemy Sakai**, pelo exemplo de pessoa e por estar sempre colaborando com o desenvolvimento das pesquisas.

À amiga **Daniela Rios**, pelo apoio constante e confiança em mim depositada.

À amiga **Linda Wang**, por ser mais que uma incentivadora, por poder passar todo seu conhecimento e toda a sua dedicação às pessoas que estão ao seu lado.

À amiga **Leda Francischone**, pela convivência constante, conselhos dados e principalmente pelo carinho demonstrado.

Aos **amigos de Graduação**, que estão sempre presentes no meu dia-a-dia, incentivando e dando forças para minha constante luta.

---



Aos colegas de pós-graduação, que freqüentam o laboratório de Farmacologia: **Bella Colombini, Karin Modena, Ana Carolina Morandini, Adriana Calvo, Caio Figueiredo, Marta Lima, Andréa Senes, Melissa Araújo e Lucimara Neves**, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela convivência e pela ajuda nos diversos momentos em que precisei.

Aos colegas de Doutorado: **Ariadne, Claudia, Esther, Flávia, Maria Heloísa e Renato**, pela amizade e pelos bons momentos vividos.

Aos amigos e funcionários da **Clínica Dr. Francischone**, por me apoiarem e ajudarem para que eu pudesse concluir este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone**, por sempre servir de exemplo de dedicação e amor à profissão. Obrigada por eu poder compartilhar de todo o seu ensinamento.

Ao **Dr. Lídio Bosi**, por acreditar no meu potencial e depositar toda a confiança em mim. Obrigada pela oportunidade.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Cardoso**, pela colaboração na pesquisa, principalmente no uso de animais de laboratório.

Ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, pelo apoio e pela colaboração na aquisição de amostras de gengivas para a pesquisa.

Às **alunas de pós-graduação do laboratório de Bioquímica**, por me auxiliarem e concederem amostras de gengivas, sempre mostrando espírito de equipe.

Ao **Dr. Andrew Seth Greene** e à **Daniela Didier**, por possibilitar a realização de trabalhos de análise imunohistoquímica de maneira segura e precisa.

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira**, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista, por realizar o cultivo de fibroblastos.

Aos **Profs. Drs. Maria Cristina de Oliveira Salgado e Eduardo Brandt de Oliveira**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela colaboração direta na elaboração deste trabalho, principalmente nas análises bioquímicas.

---



Ao pós-graduando **Hugo Pereira** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio e execução dos trabalhos de análise bioquímica por HPLC.

À pós-graduanda **Christiane Becari**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela colaboração nos experimentos de fluorimetria.

Ao **Rubens Kazuo Kato**, pelo auxílio na confecção de gráficos e figuras e pela extrema desenvoltura no que faz.

Ao **Departamento de Ciências Biológicas (Disciplinas de Farmacologia, Histologia e Anatomia) e Departamento de Estomatologia (Disciplina de Patologia)** por propiciarem e facilitarem a realização deste trabalho por meio da concessão de seus equipamentos. Agradeço aos professores, **Dr. Flávio Faria, Dr. Gérson Assis, Dr. Rumio Taga, Dr. Gustavo Garlet e Dr. Antonio de Castro** e a todos os funcionários.

À **Vera Rufino Rosa**, Secretária de Departamento de Ciências Biológicas, pelo incentivo, apoio e por ser sempre prestativa.

À **Tânia Mary Cestari**, do laboratório de Histologia e colega de Doutorado, pela ajuda durante as etapas desta pesquisa. Obrigada pela sua colaboração e competência.

À **Dr<sup>a</sup> Elza Torres**, pelo incentivo, apoio e pronta permissão na utilização dos equipamentos do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais.

Aos funcionários do biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB/USP), **Luiz, Erasmo, Elias e Richard**, sempre muito prestativos. Obrigada pela ajuda e incentivo.

Aos **funcionários da Biblioteca** da FOB/USP, pela atenção e serviços prestados.

Aos **pacientes** que muito contribuíram para o meu enriquecimento profissional.

E a todos que fizeram, fazem e farão parte da minha vida.

---



## **AGRADECIMENTOS ADMINISTRATIVOS**

À Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, na pessoa do senhor diretor, **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, e da senhora Presidente da Comissão de Pós-Graduação, **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste estudo (**processo 2004/13479-3**).

---





# ***RESUMO***



## RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante é um sistema endócrino que promove a produção de angiotensina (Ang) II, a qual exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos. O conceito clássico do SRA circulante está sendo modificado, pois tem sido demonstrada a existência de sistemas locais capazes de gerar angiotensinas de forma independente do SRA circulante em vários tecidos e órgãos. Trabalhos recentes sugerem a existência de alguns componentes do SRA em tecido gengival e fibroblastos gengivais de diferentes espécies. Porém, não são encontrados na literatura achados inequívocos sobre a presença de importantes componentes do SRA, tais como renina e angiotensinogênio, no tecido gengival de rato. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram: 1) estudar a expressão e localização de componentes do SRA no tecido gengival de rato e 2) estudar *in vitro* a funcionalidade do SRA local em homogenato de tecido gengival de rato quanto à formação de Ang II e outros peptídeos vasoativos a partir de precursores de Ang II. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi utilizada para avaliar a expressão de RNAm. Análise imunohistoquímica foi utilizada para detecção e localização de renina no tecido gengival de rato. Um método fluorimétrico padronizado com o tripeptídeo Hipuril-Histidina-Leucina (Hip-His-Leu) foi usado para medir a atividade da ECA em homogenatos de tecido gengival de rato. A técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) foi usada para analisar os produtos formados após a incubação de homogenatos de tecido gengival de rato com Ang I ou tetradecapeptídeo substrato de renina (TDP). RT-PCR revelou a expressão de RNAm para renina, angiotensinogênio, ECA e receptores de Ang II (AT1a, AT1b e AT2) em tecido gengival; em fibroblastos cultivados de tecido gengival foi observada expressão de RNAm para renina, angiotensinogênio e receptor AT1a. A técnica de imunohistoquímica demonstrou a existência de renina em vasos de tecido gengival de rato. Atividade da ECA foi detectada por meio do ensaio fluorimétrico ( $4,95 \pm 0,89$  nmol His-Leu/g.min). Quando Ang I foi usada como substrato, análises de HPLC mostraram a formação de Ang 1-9 ( $0,576 \pm 0,128$  nmol/mg.min), Ang II ( $0,066 \pm 0,008$  nmol/mg.min) e Ang 1-7

---



( $0,111 \pm 0,017$  nmol/mg.min), enquanto que os mesmos peptídeos ( $0,139 \pm 0,031$ ;  $0,206 \pm 0,046$  e  $0,039 \pm 0,007$  nmol/mg.min, respectivamente) e Ang I ( $0,973 \pm 0,139$  nmol/mg.min) foram formados quando TDP foi usado como substrato. Adicionalmente, análises de HPLC revelaram a ausência de enzimas que degradam Ang II em homogenatos de tecido gengival de rato. Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho mostram claramente a existência de um SRA local em tecido gengival de rato, que é capaz de gerar Ang II e outros peptídeos vasoativos *in vitro*. Estudos adicionais são necessários para elucidar o papel deste sistema local no tecido gengival de rato.

**Palavras-Chave:** Sistema renina-angiotensina. Angiotensina I. Angiotensina II. Angiotensinogênio. Renina. Receptores de angiotensina. Enzima conversora de angiotensina.

---



# ***ABSTRACT***





## ABSTRACT

### Characterization of a local renin-angiotensin system in the rat gingival tissue

Systemic renin-angiotensin system (RAS) promotes the plasmatic production of angiotensin (Ang) II, which acts through the interaction with specific receptors. The concept of this classic circulating RAS has been modified since there is growing evidence that local systems in various tissues and organs are capable of generating angiotensins independently of the circulating RAS. Recent works suggest the existence of some RAS components in the gingival tissue and cultured gingival fibroblasts of different species, but there is paucity of data in the literature regarding the unequivocal existence of crucial RAS components, such as renin and angiotensinogen, in the rat gingival tissue. Therefore, the aims of the present work were to: 1) study the expression and localization of RAS components in the rat gingival tissue and 2) evaluate the *in vitro* production of Ang II and other peptides catalyzed by rat gingival tissue homogenates incubated with different precursors of Ang II. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to assess mRNA expression. Immunohistochemical (IHC) analysis aimed to detect and localize renin in the rat gingival tissue. A standardized fluorimetric method with the tripeptide Hippuryl-Histidyl-Leucine (Hip-His-Leu) was used to measure tissue ACE activity in rat gingival tissue homogenates. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the products formed after the incubation of rat gingival tissue homogenates with Ang I or tetradecapeptide renin substrate (TDP). RT-PCR revealed the mRNA expression for renin, angiotensinogen, ACE and Ang II receptors (AT1a, AT1b and AT2) in the rat gingival tissue; cultured gingival fibroblasts expressed renin, angiotensinogen and AT1a receptor. IHC demonstrated the existence of renin in vessels of the rat gingival tissue. ACE activity was detected by the fluorimetric assay ( $4.95 \pm 0.89$  nmol His-Leu/g.min). When Ang I was used as the substrate, HPLC analyses showed the formation of Ang 1-9 ( $0.576 \pm 0.128$  nmol/mg.min), Ang II ( $0.066 \pm 0.008$  nmol/mg.min) and Ang 1-7 ( $0.111 \pm 0.017$  nmol/mg.min) whereas these same peptides ( $0.139 \pm 0.031$ ;  $0.206 \pm 0.046$  and  $0.039 \pm 0.007$

---



nmol/mg.min, respectively) and Ang I ( $0.973\pm 0.139$  nmol/mg.min) were formed when TDP was the substrate. Additionally, HPLC revealed absence of Ang II degrading enzymes in rat gingival tissue homogenates. In conclusion, the results presented here clearly show the existence of a local RAS in the rat gingival tissue, which is capable of generating Ang II and other vasoactive peptides *in vitro*. Further studies are required to elucidate the role of this system in the rat gingival tissue.

**Keywords:** Renin-angiotensin system. Angiotensin I. Angiotensin II. Angiotensinogen. Renin. Angiotensin receptors. Angiotensin-converting enzyme.

---



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

°C = graus Celsius

AGTN = angiotensinogênio

Ang 1-5 = angiotensina 1-5

Ang 1-7 = angiotensina 1-7

Ang 1-9 = angiotensina 1-9

Ang 3-8 = angiotensina 3-8

Ang I = angiotensina I

Ang II = angiotensina II

Ang IV = angiotensina IV

BSA = soroalbumina bovina

CATA = catepsina A

cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar

DAB = 3,3' - diaminobenzidina

DEPC = dietil pirocarbonato

DMEM = *Dulbeco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbeco)

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTPs = nucleotídeos ( A, T, C e G)

DTT = ditioneitol

ECA = enzima conversora de angiotensina

ECA-2 = enzima conversora de angiotensina-2

*et al.* = e colaboradores

FOB/USP = Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo

g = grama(s)

---



µg = micrograma(s)

Hip-His-Leu = Hipuril-Histidina-Leucina

HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho

IHC = imunohistoquímica

mg = miligrama(s)

µL = microlitro(s)

min = minuto(s)

mL = mililitro(s)

mm = milímetro(s)

NO-RT = reação em cadeia da polimerase utilizando-se RNA como molde para avaliação de possível contaminação por DNA genômico

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PCR = reação em cadeia da polimerase

PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>

RNA<sub>m</sub> = RNA mensageiro

RT = transcrição reversa

RT-PCR = transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SNC = Sistema Nervoso Central

SRA = sistema renina angiotensina

TBS = solução salina tamponada com Tris

TDP = tetradecapeptídeo substrato de renina

TFA = ácido trifluoroacético

---





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>43</b>
1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	45
1.1.1 Angiotensinogênio.....	46
1.1.2 Renina.....	46
1.1.3 Enzima conversora de angiotensina (ECA).....	46
1.1.4 Enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2).....	47
1.1.5 Angiotensina I.....	47
1.1.6 Angiotensina II.....	47
1.1.7 Angiotensina 1-7.....	49
1.1.8 Angiotensina 1-9.....	50
1.1.9 Receptores Da Angiotensina.....	50
1.2 EVIDÊNCIAS DE UM SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL EM TECIDOS BUCAIS.....	51
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
3.1 ANIMAIS.....	61
3.2 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES DE TECIDO GENGIVAL PARA OS DIFERENTES EXPERIMENTOS.....	61
3.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS DE TECIDO GENGIVAL DE RATO.....	62
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA.....	62
3.5 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM DNase.....	63
3.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	64
3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL.....	64
3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT- PCR).....	64
3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	66
3.10 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ECA.....	67
3.11 MEDIDA DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC).....	68

---



<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

---



# ***1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA***



## 1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante é um sistema endócrino que promove a liberação de angiotensina (Ang) II, a qual exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos (PEACH, 1977; LEUNG, 2004; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). A Ang II é gerada pela ação da renina (EC 3.4.23.15), uma enzima produzida pelos rins, sobre o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo Ang I ( $\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-His}^9\text{-Leu}^{10}$ ), que é clivado na ligação  $\text{Phe}^8\text{-His}^9$  pela enzima conversora de Ang I (ECA; EC 3.4.15.1), presente em abundância no endotélio pulmonar, liberando o octapeptídeo ativo Ang II ( $\text{Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8$ ). A Figura 1 ilustra o SRA com os componentes descritos acima, além de outros que serão apresentados a seguir.

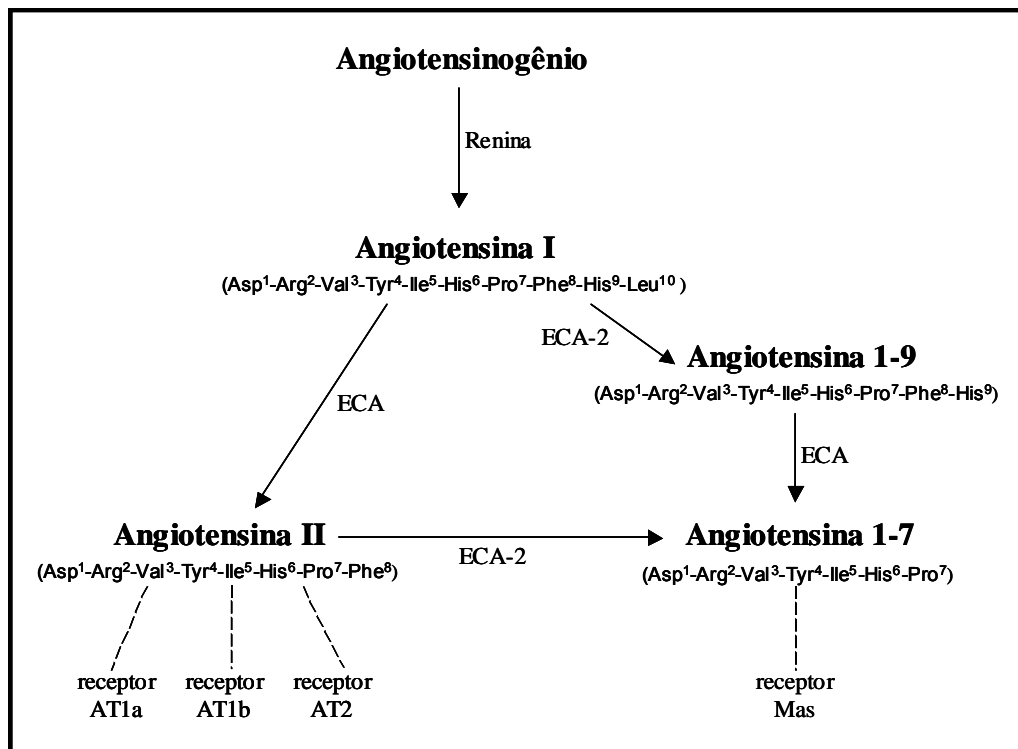


Figura 1 – Principais componentes do sistema renina-angiotensina.

### 1.1.1 Angiotensinogênio

O angiotensinogênio humano, uma proteína alfa 2 globulina de 452 aminoácidos, é sintetizado no fígado. O RNAm que codifica a proteína também é abundante no tecido gorduroso, determinadas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) e rins (CAMPBELL; HABENER, 1986; CASSIS; SAVE; PEACH, 1988). Vários hormônios como glicocorticóides, hormônio tireoidiano e a própria Ang II (BEM-ARI; GARRISON, 1988) estimulam a síntese de angiotensinogênio.

### 1.1.2 Renina

A enzima renina é uma glicoproteína de 340 aminoácidos, sendo sintetizada e armazenada sob a forma inativa, denominada pró-renina nas células justaglomerulares dos rins, que são células musculares lisas modificadas localizadas nas paredes das arteríolas aferentes (OLIVEIRA, M *et al.* 1999).

Com a queda de pressão arterial, reações intrínsecas nos próprios rins fazem com que muitas moléculas de pró-renina sejam clivadas e assim liberando a renina. A secreção da renina é controlada por 3 mecanismos: 2 agem predominantemente nos rins (mecanismo de mácula densa e mecanismo barorreceptor infra-renal) e o 3º que age por meio do SNC (mecanismo do receptor  $\beta$ -adrenérgico). O mecanismo denominado de *feedback* negativo de alça curta consiste no fato de que elevações da secreção de renina aumentam a formação de Ang II, que, interagindo com seus receptores renais, inibe a liberação de renina nas células justaglomerulares. O mecanismo de *feedback* negativo de alça longa consiste na inibição da liberação da renina devido a aumentos da pressão arterial induzidos pela Ang II (JACKSON; GARRISON, 1995).

### 1.1.3 Enzima Conversora De Angiotensina (Eca)

A enzima conversora de angiotensina humana, uma metaloprotease de ligação de membrana, contém 1.278 resíduos de aminoácidos e possui 2

---



domínios homólogos, cada um com um local catalítico e com uma região de ligação do zinco (SOUBRIER *et al.*, 1988; BERSTEIN *et al.*, 1989). A ECA é encontrada abundantemente no endotélio dos vasos pulmonares (RYAN *et al.*, 1975, 1976) e também no plasma e em diversos tecidos orgânicos como: endotélio vascular (CALDWELL *et al.*, 1976; RYAN *et al.*, 1976), cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (HALL *et al.*, 1976; ERDÖS; SKIDGEL, 1986; SCHULZ *et al.*, 1988).

#### 1.1.4 Enzima Conversora De Angiotensina-2 (Eca-2)

A ECA-2 tem sido descrita como uma metaloprotease dependente de zinco com atividade de carboxipeptidase. A ECA-2 está envolvida na geração de peptídeos de angiotensina alternativos, em particular pela conversão de Ang II em Ang 1-7, sendo esta considerada sua principal função, e Ang I em Ang 1-9. A expressão de genes da ECA-2 é descrita no sistema cardiovascular, no córtex renal e medula, em alguns tecidos do trato gastrointestinal e nos testículos (RAIZADA; FERREIRA, 2007). A ECA-2 está presente em macrófagos, células endoteliais e musculares lisas (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006) e tem sido sugerida como um importante regulador das funções cardíacas e do desenvolvimento (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

#### 1.1.5 Angiotensina I

A angiotensina I é um peptídeo de 10 aminoácidos (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>) desprovido de propriedades vasoconstritoras para produzir alterações funcionais significativas na função circulatória; serve como substrato para vias enzimáticas formadoras de Ang II (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

#### 1.1.6 Angiotensina II

Pela ação da ECA, há a liberação dos 2 últimos aminoácidos da Ang I (His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>), formando a Ang II, um octapeptídeo (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-

---

Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). A Ang II é considerada o principal peptídeo efetor do SRA (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Além do seu efeito vasoconstritor e estimulatório sobre a secreção de aldosterona, a Ang II tem uma ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (PEACH, 1977). Em adição aos seus efeitos no sistema cardiovascular, tem-se demonstrado que a Ang II está envolvida em outras funções, tais como mitogênese de fibroblastos da pele, síntese de DNA por células do ligamento periodontal, regulação da formação óssea, crescimento celular, apoptose, geração de espécies reativas ao oxigênio, secreção hormonal, ações pró-fibrogenéticas, tônus vascular e indução da liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) em fibroblastos gengivais humanos (NICKENIG *et al.*, 1997; LUNDERGAN *et al.*, 1999; HIRUMA *et al.*, 1997; HAGIWARA *et al.*, 1998; LAMPARTER *et al.*, 1998; LEUNG, 2004; SEGAWA *et al.*, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Vários estudos têm mostrado a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II. As primeiras descrições de uma via alternativa de formação da Ang II foram relatadas por Boucher, Asselin e Genest (1974) nas glândulas submandibulares de rato, por Cornish, Joyner e Gilmore (1979) na bochecha de hamster e por Trachte e Lefer (1979) no músculo papilar cardíaco de gato. Cornish, Joyner e Gilmore (1979) também observaram a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. Okunishi, Miyazaki e Toda (1984) identificaram uma enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina na artéria mesentérica de cão, a qual também é insensível a inibidores da ECA (como por exemplo o captopril). 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 somente por aproximadamente 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi posteriormente purificada e identificada como um novo membro da família quimase e, desde então, denominada de quimase do coração humano (URATA *et al.*, 1990b).

---

Embora várias enzimas, incluindo a tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), tonina, catepsina G (EC 3.4.21.20), calicreína (3.4.21.34) e quimase I de rato (EC 3.4.21.39), possam produzir Ang II *in vitro* por meio da clivagem da ligação Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> da Ang I (URATA; NISHIMURA; GANTEN, 1995; HOLLENBERG; FISHER; PRICE, 1998), a atividade fisiológica 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; NEURATH; WOODBURY, 1987), deixando em dúvida a função destas enzimas na formação deste hormônio. Interessante notar que, enquanto as quimases humana e de hamster clivam eficientemente Ang I, formando Ang II (TAKAI *et al.*, 1996; URATA *et al.*, 1990b), a quimase I de rato apresenta principalmente atividade de degradação da Ang II (LE TRONG; NEURATH; WOODBURY, 1987). Dados gerados a partir da suscetibilidade dessas diferentes enzimas a inibidores de proteases permitiram a classificação das enzimas formadoras de Ang II em três categorias (ARAKAWA, 1996). A primeira categoria corresponde à metalodipeptidil 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), quimase (URATA *et al.*, 1990b; TAKAI *et al.*, 1996), catepsina G (TONNESEN *et al.*, 1982) e elastase-2 (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS C *et al.*, 2002a; SANTOS C *et al.*, 2002b; SANTOS C *et al.*, 2003; SANTOS C *et al.*, 2004). A terceira categoria agrupa as serino-proteases sensíveis à aprotinina, destacando-se a calicreína (MARUTA; ARAKAWA, 1983), tripsina (ARAKAWA, 1996) e tonina (BOUCHER; ASSELIN; GENEST, 1974).

### 1.1.7 Angiotensina 1-7

A angiotensina 1-7 é um componente bioativo do SRA, sendo um heptapeptídeo (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>) amino-terminal formado a partir da Ang I por ação de endopeptidases neutras, ou seja, por uma via independente da ECA (SANTOS, R *et al.*, 1988; SANTOS; COMPAGNOLE-SANTOS, 1994). Algumas destas enzimas como a neprilisina estão envolvidas no metabolismo do fator natriurético atrial e bradicinina. A ECA também tem

sido envolvida no metabolismo e quebra da Ang 1-7, sugerindo uma interação entre diferentes sistemas de peptídeos cardiovasculares (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). A Ang 1-7 tem ações contra-regulatórias com a Ang II, como a proliferação celular da Ang II e ações anti-proliferativas da Ang 1-7. Enquanto a Ang II tem efeitos vasoconstritores, a Ang 1-7 tem efeitos vasodilatadores. A Ang 1-7 pode regular a pressão sanguínea, a função cardíaca e o crescimento celular, sendo talvez importante futuramente no tratamento de doenças cardíacas, câncer, doença renal e pré-eclampsia (TRASK; FERRARIO, 2007).

### 1.1.8 Angiotensina 1-9

A angiotensina 1-9 (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>) é conhecida como um peptídeo com pouca atividade biológica (KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006). Acredita-se que seja inativa até que a ECA a clive e libere Ang 1-7. Subseqüentemente, Ang 1-7 é inativada pela liberação do dipeptídeo C-terminal para formar Ang 1-5 (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>) (CHEN *et al.*, 2005). Por ser provavelmente o principal produto do metabolismo de Ang I em plaquetas, a Ang 1-9 pode estar envolvida na regulação da função plaquetária (KRAMKOWSKI, MOGIELNICKI, BUCZKO, 2006). Em concentrações micromolares, Ang 1-9 inibe a ECA (SNYDER; WINTROUB, 1986; MARCIC *et al.*, 1999) e potencializa a ação da bradicinina em seu receptor B<sub>2</sub> (MARCIC *et al.*, 1999). Em coração humano, a catepsina A (CATA) gera derivados Ang 1-9 e Ang 1-7 a partir de Ang I (JACKMAN *et al.*, 2002).

### 1.1.9 Receptores Da Angiotensina

A Ang II possui interações com diferentes tipos de receptores, conhecidos como AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. No músculo esquelético vascular, o receptor AT<sub>1</sub>, membro da família de receptores ligados à proteína G, possui 7 regiões transmembrânicas com 359 aminoácidos, é mediador da angiogênese e possui propriedades vasoconstritoras, enquanto que o receptor AT<sub>2</sub> tem 363 aminoácidos, possuindo propriedades vasodilatadoras e inibindo a angiogênese. Os subtipos de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> apresentam estruturas genômicas e localizações diferentes, e também expressão e regulação

---

específicas para cada tecido. Em quimiorreceptores do corpo da carótida, o receptor AT<sub>1</sub> pode mediar a liberação de cálcio intracelular. As funções da Ang II, tais como constrição vascular, proliferação celular e liberação da aldosterona são conhecidas por serem mediadas via receptores AT<sub>1</sub>. Em ratos e camundongos, dois subtipos de receptores AT<sub>1</sub> foram clonados e caracterizados: AT<sub>1a</sub> e AT<sub>1b</sub> (LINDERMAN; GREENE, 2001; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; LAM; LEUNG, 2002; HIRASAWA *et al.*, 2002; INAGAMI *et al.*, 1994; de GASPARO; SIRAGY, 1999; de GASPARO *et al.*, 2000; SPETH; THOMPSON; JOHNS, 1995; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

Há evidências de um receptor de angiotensina adicional denominado AT<sub>4</sub>, que interage com um peptídeo de Ang truncado, a Ang IV ou Ang 3-8 (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). AT<sub>4</sub> foi originalmente definido como específico com local de ligação de alta afinidade para Ang IV (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006) e parece estar relacionado à consolidação da memória, fluxo sanguíneo, reabsorção tubular renal e proliferação celular (WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008).

O protooncogene Mas é sugerido como um receptor funcional de angiotensinas (JACKSON, *et al.*, 1988). O Mas é caracterizado como um receptor acoplado à proteína G, originalmente descrito como um fator envolvido na tumorigênese. Os efeitos do receptor Mas podem ser mediados por Ang 1-7 ou outros peptídeos de angiotensina, o que sugere alguma relevância funcional *in vivo* (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

## 1.2 EVIDÊNCIAS DE UM SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL EM TECIDOS BUCAIS

O conceito clássico do SRA circulante está sendo modificado em função de evidências que mostram a participação de diferentes tecidos e órgãos na formação de Ang II. Um número crescente de estudos mostra a existência de sistemas locais capazes de gerar angiotensinas de forma independente do SRA circulante em vários tecidos, tais como cérebro, coração, rim, gônadas, ovários, osso, músculo esquelético, tecido adiposo, pâncreas, corpo da carótida, cordão umbilical e polpa dental (CAMPBELL, 1987; PHILLIPS;

SPEAKMAN; KIMURA, 1993; OBERMÜLLER *et al.*, 2004; LEUNG, 2004, GOKER *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007).

Artigos recentemente publicados têm demonstrado evidências acerca da existência de alguns componentes do SRA no tecido gengival e em fibroblastos gengivais de diferentes espécies (OHUCHI *et al.*, 2002; SEGAWA *et al.*, 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI *et al.*, 2004).

Ohuchi *et al.* (2002) sugeriram, por meio da utilização de drogas antagonistas de receptores de Ang II, que a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaio estimulada pela fenitoína e nifedipina é mediada indiretamente por receptores AT<sub>1</sub> presentes em fibroblastos gengivais em cultura. Os autores também sugeriram que Ang II é sintetizada localmente nestas células.

Segawa *et al.* (2003) investigaram o efeito da Ang II sobre a produção de PGE<sub>2</sub> em fibroblastos gengivais humanos. Um antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, mas não um antagonista de receptores AT<sub>2</sub>, foi capaz de inibir a produção de PGE<sub>2</sub> estimulada pela Ang II administrada exogenamente.

Berggreen e Heyeraas (2003) sugeriram, com a utilização de drogas antagonistas de receptores AT<sub>1</sub>, a existência destes receptores na polpa dentária e no tecido gengival de furão quando estudaram o efeito da Ang II sobre o fluxo sanguíneo em tecidos orais destes animais.

Ohuchi *et al.* (2004) demonstraram que a Ang II induziu a proliferação de fibroblastos gengivais de coelhos de maneira concentração-dependente. Esta proliferação foi inibida por um antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, porém não foi alterada por um antagonista de receptores AT<sub>2</sub>, sugerindo, portanto, que a proliferação de fibroblastos gengivais de coelho induzida pela Ang II nestas células cultivadas ocorre via receptores AT<sub>1</sub>. Adicionalmente, em complemento aos achados farmacológicos, os autores demonstraram a presença dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> nestas células com auxílio da técnica de Western blot.

Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> foram encontrados na polpa dental por Souza *et al.* (2007), demonstrando a participação destes receptores de Ang II na pulpite pelo envolvimento tanto no estabelecimento como na modulação das alterações pulpares.

Apesar destes relatos anteriormente citados, não são encontrados na literatura achados inequívocos sobre a presença de outros importantes

---

componentes do SRA no tecido gengival, tais como renina e angiotensinogênio. Portanto, justifica-se a realização de experimentos adicionais que possam elucidar esta questão.

---





## ***2 PROPOSIÇÃO***



## 2 PROPOSIÇÃO

Conforme descrito anteriormente, não são encontrados na literatura achados inequívocos sobre a presença de importantes componentes do SRA no tecido gengival de rato, o que poderia definitivamente caracterizar a existência de um SRA local neste tecido. Portanto, os objetivos desta tese foram:

- 1) estudar a expressão e localização de componentes do SRA no tecido gengival de rato;
  - 2) estudar *in vitro* a funcionalidade de um eventual SRA local em homogenato de tecido gengival de rato quanto à formação de Ang II e outros peptídeos vasoativos a partir de precursores de Ang II.
-



# ***3 MATERIAL E MÉTODOS***



---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, com peso entre 300 e 400 g (aproximadamente 120 dias), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB/USP) e alimentados com ração normal e água *ad libitum*.

#### 3.2 OBTENÇÃO DE ESPÉCIMES DE TECIDO GENGIVAL PARA OS DIFERENTES EXPERIMENTOS

Os animais foram mortos por meio de dose excessiva do anestésico tiopental (Thiopentax<sup>®</sup>, 60 mg/kg, via intraperitoneal), procedendo-se à obtenção de espécimes para os diferentes experimentos. Imediatamente após a morte dos animais, 5 amostras de tecidos gengivais ao redor dos primeiros e segundos molares inferiores, compatíveis com mucosa queratinizada, foram cuidadosamente removidos com auxílio de lâmina de bisturi 15C Med Blade (Med Goldman, Brasil) e descolador Molt (Quinelato, Brasil), sendo imediatamente acondicionados em tubos de microcentrifuga contendo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) (0,1 g de tecido/1,0 mL de TRIzol) e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio (descrição no item 3.4). Para os experimentos de imunohistoquímica, 2 espécimes gengivais foram fixados em formol 10% por um período de 48 horas, sendo posteriormente realizados os procedimentos descritos no item 3.9. Para os experimentos bioquímicos que objetivaram a determinação de atividade enzimática, 10 espécimes de tecidos gengivais foram lavados em solução salina, acondicionados em tubos de microcentrifuga e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos experimentos [itens 3.10 (n=5) e 3.11 (n=5)]. Para os experimentos de cultura de fibroblastos, foram utilizados 3 animais, conforme descrição a seguir (item 3.3).

---

### 3.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS DE TECIDO GENGIVAL DE RATO

Os experimentos de cultura de fibroblastos de tecido gengival de rato foram realizados no laboratório da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Penha de Oliveira, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Tecidos gengivais de 3 ratos foram picotados com lâmina de bisturi 15C Med Blade (Med Goldman, Brasil) em uma placa de Petri de 10 mm de altura e 200 mm de diâmetro em meio de cultura [*Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco); DMEM] suplementado com 15% de soro bovino fetal, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (DMEM completo 15%). Os fragmentos de gengiva foram recolhidos com uma pipeta de Pasteur adaptada e transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL de capacidade. Estes tubos foram centrifugados a 1.200 rpm, durante 5 minutos (min) em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado novo meio de cultura. Os fragmentos foram novamente recolhidos com auxílio de pipeta de Pasteur adaptada e transferidos para uma garrafa de 25 mm<sup>2</sup> em 1 mL de meio de cultura, sendo mantidos em estufa a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub> durante uma semana sem movimentar a cultura. A partir da segunda semana, o meio de cultura foi trocado a cada dois dias até os fibroblastos alcançarem confluência. Após confluência, os fibroblastos foram tripsinizados e utilizados após a quarta passagem. Para realizar a extração de RNA total das células, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com soro fisiológico estéril e à garrafa foi adicionado 1 mL de TRIzol, sendo este conteúdo congelado a -80°C para posteriormente serem realizados os procedimentos descritos nos itens 3.4 a 3.8.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a realização destes experimentos, seguimos as descrições feitas em recentes publicações do nosso grupo (SANTOS, C *et al.*, 2002b; SANTOS, C *et al.*, 2003; BECARI *et al.*, 2005; OLIVEIRA, T *et al.*, *in press*; RODINI *et al.*, *in press*). No momento oportuno, os tubos foram descongelados e os tecidos

---



---

homogenizados utilizando-se um homogenizador de tecidos (modelo T18, IKA, Brasil); os tubos contendo os fibroblastos foram agitados vigorosamente em vórtex para o rompimentos das células e exposição do material genético. Em seguida, os tubos foram incubados por 5 min a 4°C e então foi adicionado um volume de 20% de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso a 4°C por 5 min, sendo em seguida centrifugados a 7.500 g por 25 min (Biofuge 15R, Heraeus, Sepatech, Estados Unidos). A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 400 µL que foram colocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 400 µL de isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso a 4°C por 15 min. Após centrifugação a 14.000 rpm por 20 min a 4°C, foi descartado o sobrenadante e adicionado 1 mL de etanol 70% [em água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%], agitando-se vigorosamente. Foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se outra centrifugação com 1 mL de etanol 70% a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. Para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, os tubos de microcentrifuga receberam um volume de 50 µL de água tratada com DEPC 0,1% e foram incubados a 65°C por 15 a 30 min até a dissolução dos precipitados.

### 3.5 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM DNase

Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído de tecidos e células por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras de RNA total com DNase (Qiagen, Alemanha) durante 15 min em temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado seguindo-se as orientações do fabricante RNeasy mini kit (Qiagen, Alemanha), conforme documentamos em trabalhos de nosso grupo (SANTOS, C *et al.*, 2003; OLIVEIRA, T *et al.*, *in press*; RODINI *et al.*, *in press*). As amostras de RNA total tratadas com DNase foram mantidas a -80°C até o momento do uso.

---

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) 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:  $[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição conhecido}$ , sendo o resultado expresso em  $\mu\text{g/mL}$ . Vale ressaltar que essa metodologia foi utilizada em trabalhos já publicados por nosso grupo (SANTOS, C *et al.*, 2002b; SANTOS, C *et al.*, 2003; OLIVEIRA, T *et al.*, *in press*; RODINI *et al.*, *in press*).

### 3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada pela diluição do RNA (em Tris-HCl 10 mM, pH 7,8) 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 e proteínas na amostra.

### 3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA-REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Para a realização destes experimentos, também seguimos as descrições feitas em publicações do nosso laboratório (SANTOS, C *et al.*, 2002b; SANTOS, C *et al.*, 2003; BECARI *et al.*, 2005; OLIVEIRA, T *et al.*, *in press*; RODINI *et al.*, *in press*). O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada em um volume de reação de 33  $\mu\text{L}$  utilizando-se 5  $\mu\text{g}$  de RNA total (para o tecido gengival) ou 0,8  $\mu\text{g}$  (para fibroblastos cultivados), 0,2  $\mu\text{g}$  de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH8,3; KCl 68 mM e  $\text{MgCl}_2$  9 mM), soroalbumina bovina (BSA) 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). cDNA foi sintetizado durante um período de 1 hora de incubação a 37°C e a reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min. Os produtos da RT (3 µL) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas em um volume final de 50 µL em tubos Hot start com os seguintes reagentes: 20 pmol (0,4 µM) de cada primer (sense e anti-sense para cada alvo; Tabela 1), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, pH 8,4), dNTPs 0,2 mM e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos). O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 2 min a 94°C seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação, anelamento e extensão, sendo o tempo e a temperatura de cada fase padronizados de acordo com os primers utilizados (SANTOS, C *et al.*, 2002b; LINDERMAN; GREENE, 2001; AGOUEDEMOS; GREENE, 2005; LAM; LEUNG, 2003). Como controle positivo foram utilizados primers para a β-actina (SANTOS, C *et al.*, 2002b). As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo. 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 (NO-RT). Uma alíquota de 9 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 ultravioleta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados, sendo nesse momento realizada fotodocumentação (Sistema de Fotodocumentação, modelo DIGIDOC-IT, UVP, e software para análise de imagens, Fischer, Estados Unidos).

---

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

Alvo	Tamanho	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
<i>β-actina</i> *	351 pb	AACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTT	AGCAGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC
<i>AGTN</i> **	308 pb	TTCAGGCCAAGACCTCCC	CCAGCCGGGAGGTGCAGT
<i>Renina</i> **	551 pb	ATGCTCTCTGGGCACTCTT	GTCAAACCTGGCCAGCATGA
<i>AT<sub>1a</sub></i> ***	306 pb	CGTCATCCATGACTGTAAAATTC	GGGCATTACATTGCCAGTGTG
<i>AT<sub>1b</sub></i> ***	344 pb	CATTATCCGTGACTGTGAAATTG	GCTGCTTAGCCCAAATGGTCC
<i>AT<sub>2</sub></i> ***	445 pb	GGAGCGAGCACAGAATTGAAAGC	TGCCCAGAGAGGAAGGGTTGCC
<i>ECA</i> ****	406 pb	CAGCTTCATCATCCAGTTCC	CTAGGAAGAGCAGCACCCAC

\* SANTOS C *et al.*; 2002b; \*\*AGOUDEMOS; GREENE, 2005; \*\*\* LINDERMAN; GREENE, 2001; \*\*\*\* LAM; LEUNG, 2003; AGTN = angiotensinogênio; ECA = enzima conversora de angiotensina.

### 3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a análise imunohistoquímica, seguimos o protocolo estabelecido em trabalho recente de nosso grupo (OLIVEIRA, T *et al.*, *in press*). O material destinado à análise microscópica foi fixado em formol 10% durante 48 horas, sendo em seguida cortado em blocos de aproximadamente 8x10x6 mm. Os blocos foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo (Leica, Alemanha) com espessura de 5 µm. Os cortes foram aderidos sobre lâminas de vidro apropriadas e submetidos à técnica imunohistoquímica do tipo imunoperoxidase para a identificação de renina. Inicialmente, tais cortes foram desparafinizados e hidratados por meio de incubações em xilol, álcoois e solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescida de Triton X-100 1% (Merk, Brasil). Em seguida, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio 3% em PBS, por 40 min, para o bloqueio da peroxidase endógena; lavados em PBS com Triton X-100 1% e mergulhados em tampão citrato (pH=6,0) a 95°C, para exposição antigênica, por 20 min. Após serem incubadas com soro de leite na concentração de 3% em água destilada por 20 min, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário de cabra anti-renina (Santa Cruz, sc 27318, Estados Unidos), em câmara úmida, a 4°C por 1 hora.

Foi utilizado anticorpo anti-renina diluído na concentração de 1:200 em PBS-BSA 1%. Logo após, as lâminas foram incubadas, em temperatura ambiente por 1 hora, com o anticorpo secundário biotinilado (na concentração de 1:100 em PBS-BSA 1%) anti-IgG de cabra (produzido em cavalo, Vector Laboratories, BA-9500, Estados Unidos) por 30 min cada em temperatura ambiente. Em seguida cada lâmina recebeu o reagente ABC (Vector Laboratories, PK-6200, Estados Unidos) durante 30 min, seguindo-se as instruções do fabricante. Posteriormente, a revelação foi feita, por 3 min em temperatura ambiente e protegida da luz, utilizando-se o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, SK-4100, Estados Unidos). A reação foi interrompida por lavagem com água destilada e as lâminas contracoloradas com hematoxilina de Mayer, por 2 min em temperatura ambiente. O controle negativo das reações foi obtido pela eliminação do anticorpo primário. Estes experimentos foram realizados pelo orientador desta tese no laboratório do Dr. Andrew Seth Greene, no Medical College of Wisconsin, Estados Unidos da América.

### 3.10 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ECA

Para os experimentos de medida de atividade da ECA seguimos as descrições de trabalhos anteriores (LEITE; SALGADO, 1992; CUNHA; SALGADO; SALGADO, 2000; OLIVEIRA; SANTOS; KRIEGER, 2000; SIVIERI JR *et al.*, 2007). Amostras de tecido gengival foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em um aparelho Potter S (B. Braun Biotech Intern., Estados Unidos) a 2.500 rpm por 5 ciclos de 10 segundos e intervalos de 30 segundos entre os ciclos, utilizando solução tampão borato de sódio 0,05 M, pH 7,4 (ajustado com NaOH 0,5 M), contendo 0,32 M de sacarose, na proporção de 1:10 entre o peso do material biológico e o volume empregado da solução, no preparo do homogenato. Em seguida o material foi centrifugado durante 10 min, a 4°C em centrífuga refrigerada (Sorvall Legend RT, Estados Unidos) a 1.000 rpm e o sobrenadante retirado com pipeta Pasteur e conservado a 4°C até o momento da sua utilização para dosagem da atividade da ECA.

A atividade da ECA foi determinada, imediatamente após a coleta do sobrenadante descrita acima, utilizando o tripeptídeo Hipuril-His-Leu (Hip-His-

---

Leu) como substrato e medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu formado (YANG; NEFF, 1972). O volume de 20  $\mu$ L de homogenato foi incubado a 37°C com 200  $\mu$ L de solução de Hip-His-Leu (5 mM) em TBS. Após 15 min foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5 M para interromper a ação enzimática. O dipeptídeo His-Leu foi detectado pela adição de 0,1 mL de *o*-ftaldialdeído 1% (massa/volume, em etanol), seguido da adição de 0,2 mL de HCl 6 M após 4 min. A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-535, Japão) com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. Foi construída uma curva-padrão para o dipeptídeo His-Leu (0-20 nmol) com a finalidade de estabelecer os parâmetros da relação entre a concentração de His-Leu e a fluorescência medida pelo espectrofluorímetro. A atividade da ECA foi corrigida pelo peso em grama (g) de cada amostra de tecido gengival. Estes experimentos foram realizados nos laboratórios dos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado e Eduardo Brandt Oliveira, dos Departamentos de Farmacologia e Bioquímica e Imunologia, respectivamente, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

### 3.11 MEDIDA DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

Amostras de tecido gengival foram descongeladas, pesadas e cuidadosamente picotadas dentro de tubos de microcentrífuga com a utilização de tesoura curva (10,5 cm, Edlo delikat, código 060354, Brasil) em solução Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, para obtenção de homogenato de tecido gengival. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 min em temperatura de 4°C, sendo o sobrenadante (homogenato) transferido para um novo tubo de microcentrífuga, que foi congelado em temperatura de -20°C até o momento da realização das incubações com substratos. Todos os ensaios com homogenato de tecido gengival foram realizados, incubando-se isoladamente Ang I (30 nmol), Ang II (30 nmol) ou TDP (25 nmol) com 10  $\mu$ L do homogenato em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, em um volume final de 150  $\mu$ L, durante 20 min, a 37°C. As reações foram paralisadas

---

---

pela adição de 40  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA) 5% em glicerol 4% para cada tubo de reação. A clivagem de Ang I, Ang II ou TDP foi avaliada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em um equipamento Shimadzu SCL-6B (Japão) acoplado a uma coluna Shim-pak ODS (4 x 250 mm). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%, 30 min) em TFA 0,1%, em um fluxo de 1,0 mL/min e monitorados pela absorvância no comprimento de onda de 215 nm. As concentrações molares dos peptídeos foram calculadas por comparação com quantidades conhecidas dos peptídeos sintéticos cognatos. Estes experimentos seguiram padronizações de trabalho anterior do nosso grupo (SANTOS, C *et al.*, 2002a), tendo sido realizados nos laboratórios dos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado e Eduardo Brandt Oliveira, dos Departamentos de Farmacologia e de Bioquímica e Imunologia, respectivamente, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

---





## ***4 RESULTADOS***



## 4 RESULTADOS

A técnica de cultura de fibroblastos de tecido gengival foi reproduzida, conforme resultados mostrados na Figura 2.

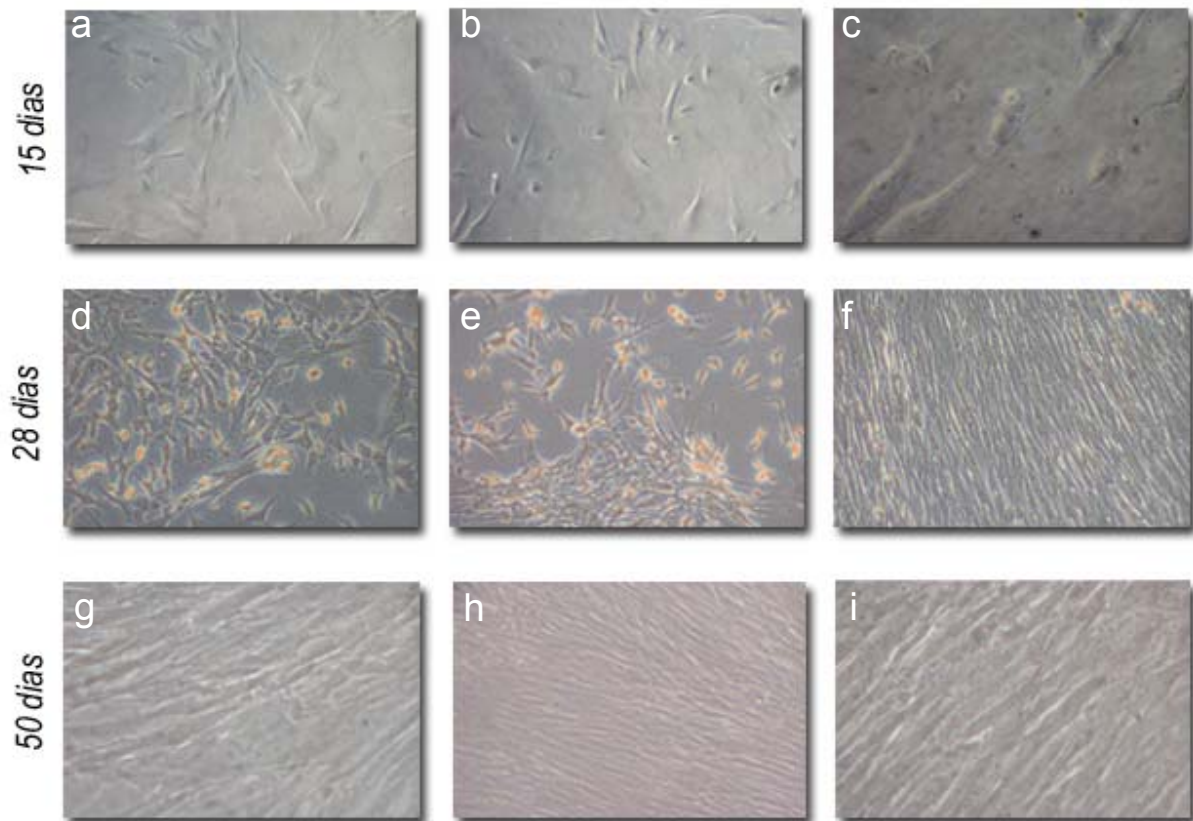


Figura 2 – Fibroblastos provenientes de tecido gengival de rato em diferentes períodos de cultivo visualizados em diferentes magnitudes de aumento (c, g e i: aumento de 320x; restante: 100x ; em f, g, h e i: confluência).

Após confirmação da qualidade e tratamento com DNase do RNA total extraído, foram realizados experimentos de RT-PCR para a detecção dos alvos descritos na Tabela 1. A Figura 3 ilustra a detecção de RNAm em uma amostra de tecido gengival (painel superior) e de fibroblastos cultivados de tecido gengival (painel inferior) dos seguintes alvos: receptor AT1a (306 pb), angiotensinogênio (309 pb), receptor AT1b (344 pb), ECA (407 pb), receptor AT2 (445 pb), renina (552 pb) e  $\beta$ -actina (351 pb).



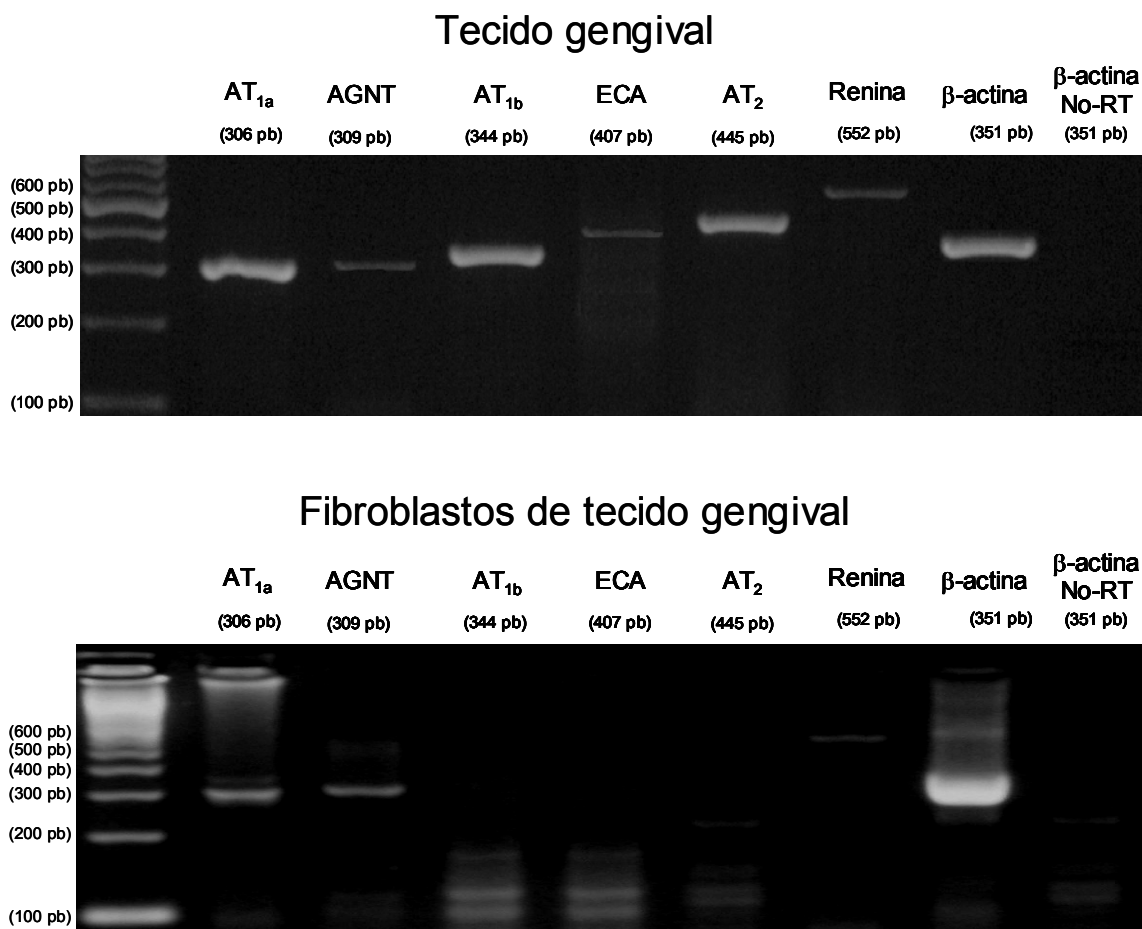


Figura 3 – Gel de agarose corado com brometo de etídio para detecção, por RT-PCR, da expressão do RNAm para receptor AT<sub>1a</sub> (306 pb), angiotensinogênio (AGNT, 309 pb), receptor AT<sub>1b</sub> (344 pb), enzima conversora de angiotensina (ECA, 407 pb), receptor AT<sub>2</sub> (445 pb), renina (552 pb) e β-actina (351 pb), a partir de 5 μg de RNA total de amostra de tecido gengival de rato (painel superior) e 0,8 μg de RNA total de fibroblastos cultivados de tecido gengival de rato. Os cDNAs foram amplificados por PCR com primers específicos.

A Figura 3 mostra que o tecido gengival de rato expressa todos os componentes investigados do SRA, enquanto os fibroblastos cultivados de tecido gengival de rato expressam angiotensinogênio, renina e receptor AT<sub>1a</sub>.



A Figura 4 mostra a expressão de RNAm para os diversos alvos investigados, em relação à  $\beta$ -actina, em diferentes amostras de tecido gengival de rato e de fibroblastos cultivados de tecido gengival de rato. É importante notar que existe expressão diferencial das diferentes proteínas em ambos os tipos de amostras.

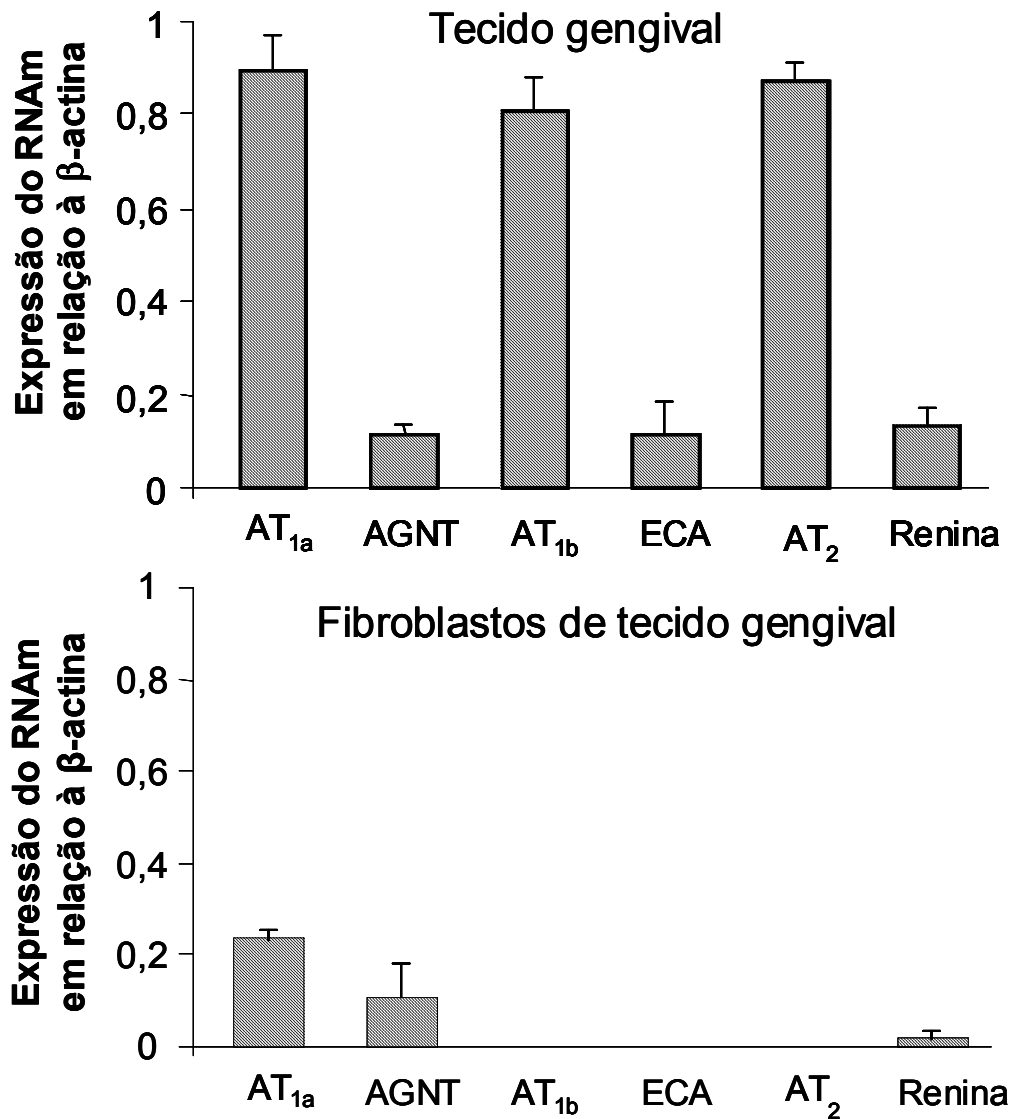


Figura 4 – Expressão de RNAm por RT-PCR para diferentes componentes do sistema renina-angiotensina, a partir de 5  $\mu$ g de RNA total de amostra de tecido gengival de rato (painel superior) e 0,8  $\mu$ g de RNA total de fibroblastos cultivados de tecido gengival de rato (painel inferior) em relação à  $\beta$ -actina (n=5). AGNTN = angiotensinogênio; ECA = enzima conversora de angiotensina.





A Figura 5 ilustra de maneira inequívoca a presença de renina predominantemente em vasos do tecido gengival de rato (setas). É importante ressaltar que o controle negativo (sem a incubação com o anticorpo primário) não mostrou qualquer sinal de positividade, o que dá respaldo à marcação positiva obtida. Vale ressaltar que este controle negativo é bastante confiável, pois se trata de um corte seriado do mesmo bloco de parafina do qual foi obtida a lâmina com marcação positiva para renina.

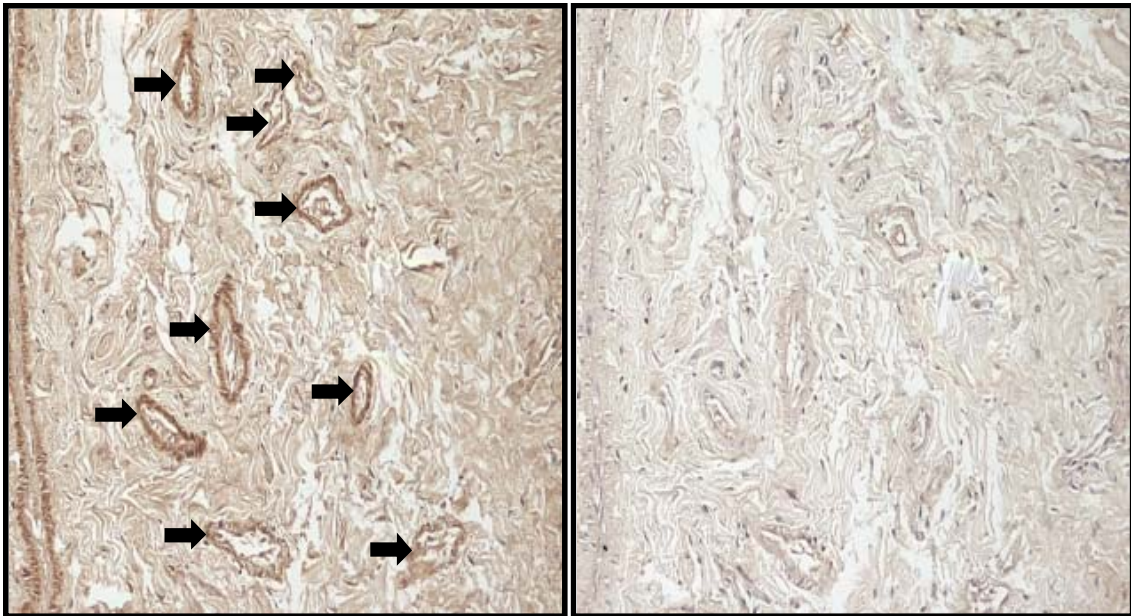


Figura 5 – Análise por imunohistoquímica da presença da proteína renina em amostra de tecido gengival de rato (aumento de 20 X). Painel esquerdo: resultado positivo (setas). Painel direito: controle negativo em um corte seriado do tecido mostrado no painel superior (sem a incubação com o anticorpo primário).

Experimentos foram realizados para testar *in vitro* a funcionalidade do sistema renina-angiotensina detectado por RT-PCR e IHC. Para tanto, foi realizado um experimento clássico e consagrado na literatura para a medida da atividade da ECA (YANG; NEFF, 1972; LEITE; SALGADO, 1992). Os resultados mostrados na Tabela 2, expressos em relação à curva-padrão para o dipeptídeo His-Leu, complementam aqueles da Figura 3, pois eles mostram de maneira inequívoca que o tecido gengival não apenas expressa RNAm para ECA, mas também produz esta enzima na sua forma ativa, a qual está presente no homogenato do tecido.



Tabela 2 – Valores de medida da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) em diferentes amostras de tecido gengival de rato (em nmol His-Leu/g.min)

Amostra	Atividade da ECA (nmol His-Leu/g.min)
1	5,71
2	2,20
3	5,11
4	4,16
5	7,59
Média ± EPM	4,95 ± 0,89

Para condições experimentais, consultar Material e Métodos.

A técnica de HPLC foi utilizada para detecção de atividades enzimáticas capazes de gerar Ang II e outros peptídeos a partir dos precursores Ang I e TDP. Além disso, HPLC também foi utilizada para investigar a existência de atividades enzimáticas capazes de degradar Ang II. Os produtos de hidrólise revelaram a formação de Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7 com ambos os precursores. Adicionalmente, Ang I foi formada quando TDP foi utilizado como substrato e não foi detectada atividade degradadora de Ang II, nas condições estudadas. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 3, os quais foram ilustrados nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Tabela 3 – Produtos de hidrólise formados pela ação de homogenatos de tecido gengival de rato (n=5) sobre os substratos angiotensina (Ang) I (30 nmol), tetradecapeptídeo substrato de renina (TDP, 25 nmol), e Ang II (30 nmol) durante 20 min a 37°C em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1.

Substrato	Produto formado (nmol/mg.min)			
	Ang I	Ang 1-9	Ang II	Ang 1-7
Ang I	-	0,576±0,128	0,066±0,008	0,111±0,017
TDP	0,973±0,139	0,139±0,031	0,206±0,046	0,039±0,007
Ang II	-	-	-	0

Para condições experimentais, consultar Material e Métodos. (-) indica a impossibilidade de formação do produto.

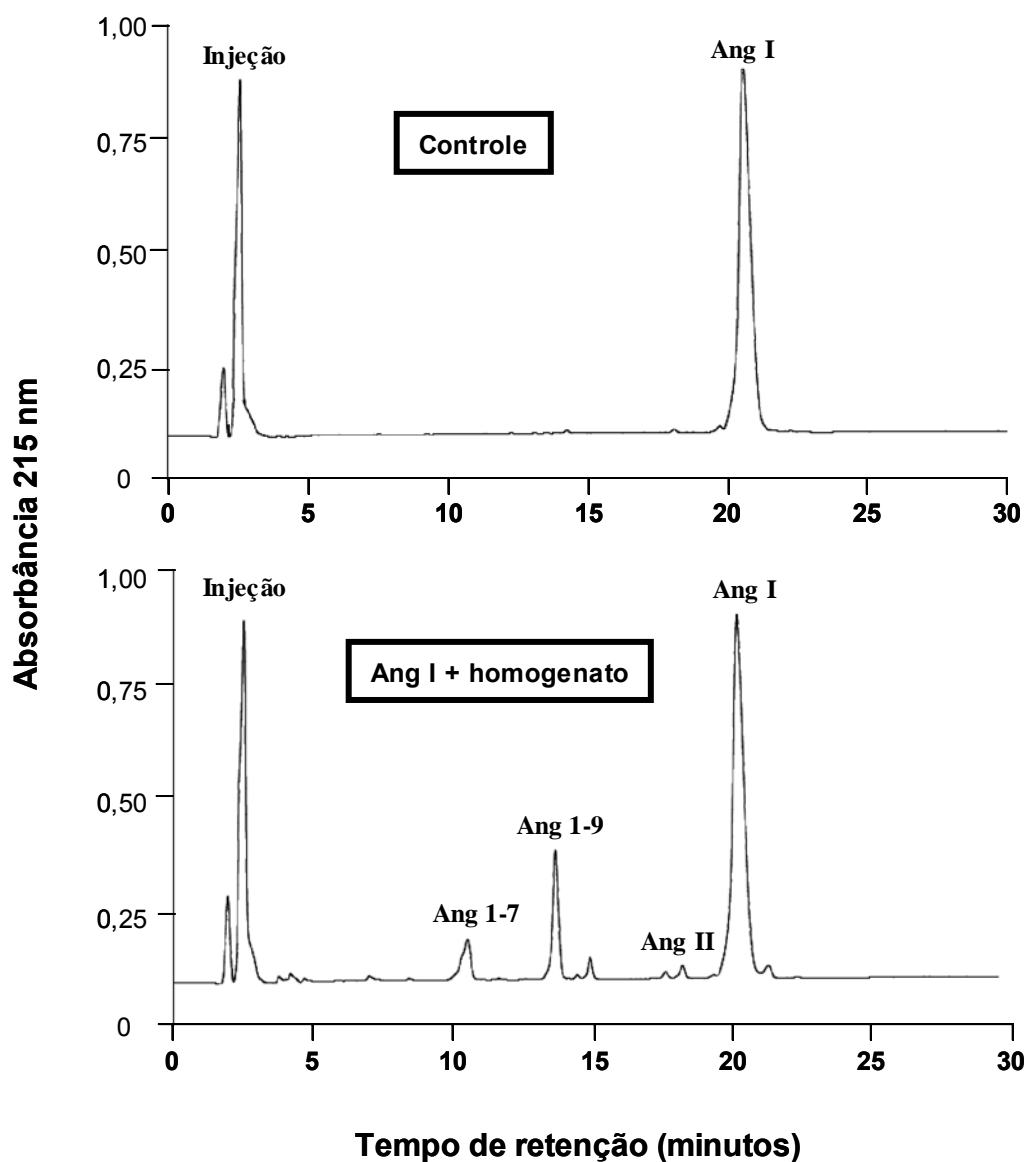


Figura 6 – Registro representativo de clivagem proteolítica de angiotensina (Ang) I catalisada por homogenato de tecido gengival de rato. Amostra de homogenato foi incubada com Ang I (30 nmol, 20 min), em um volume final de 150  $\mu$ L, em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, a 37°C. A reação foi paralisada com a adição de 40  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 5% em glicerol 4%. O painel superior mostra a Ang I sem incubação com o homogenato (controle), enquanto o painel inferior mostra os produtos de digestão de Ang I a partir da ação do homogenato. Os cromatogramas foram gerados em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em uma coluna C-18 (0,4 x 25 cm) desenvolvida em um fluxo constante de 1,0 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%) em ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos foram detectados por absorvância em 215 nm e caracterizados por comparação com quantidades conhecidas dos peptídeos sintéticos cognatos. As setas indicam os pontos de clivagem nas ligações peptídicas da Ang I.

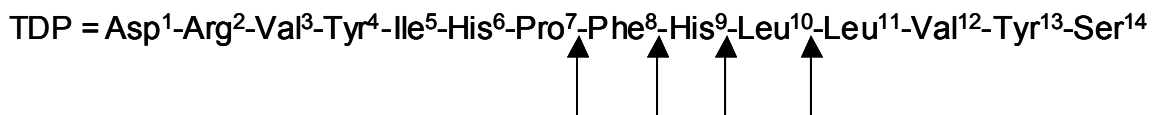
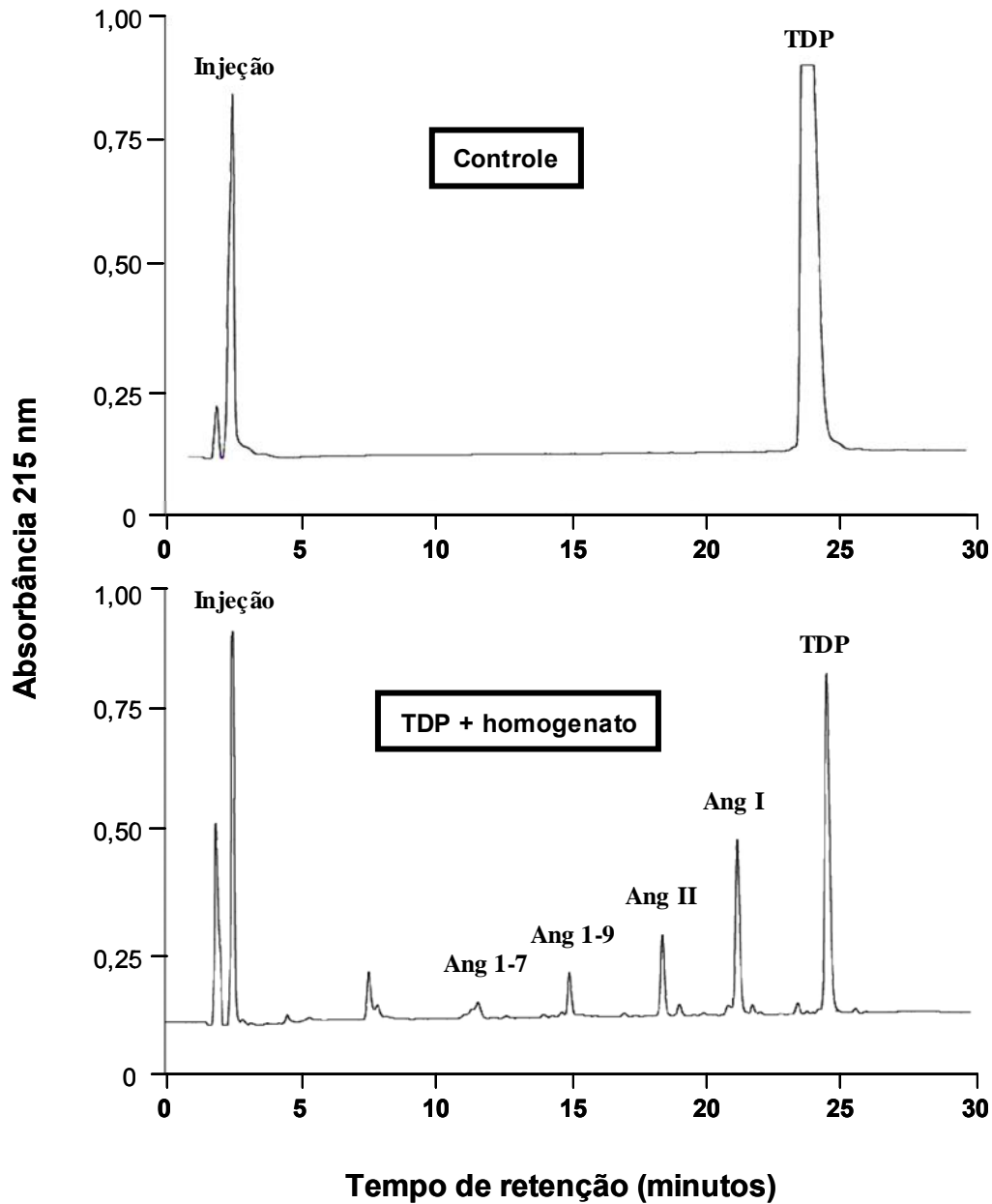


Figura 7 – Registro representativo de clivagem proteolítica de tetradecapeptídeo substrato de renina (TDP) catalisada por homogenato de tecido gengival de rato. Amostra de homogenato foi incubada com TDP (25 nmol, 20 min), em um volume final de 150  $\mu$ L, em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, a 37°C. A reação foi paralisada com a adição de 40  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 5% em glicerol 4%. O painel superior mostra o TDP sem incubação com o homogenato (controle), enquanto o painel inferior mostra os produtos de digestão de TDP a partir da ação do homogenato. Os cromatogramas foram gerados em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em uma coluna C-18 (0,4 x 25 cm) desenvolvida em um fluxo constante de 1,0 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%) em ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos foram detectados por absorvância em 215 nm e caracterizados por comparação com quantidades conhecidas dos peptídeos sintéticos cognatos (Ang = angiotensina). As setas indicam os pontos de clivagem nas ligações peptídicas do TDP.

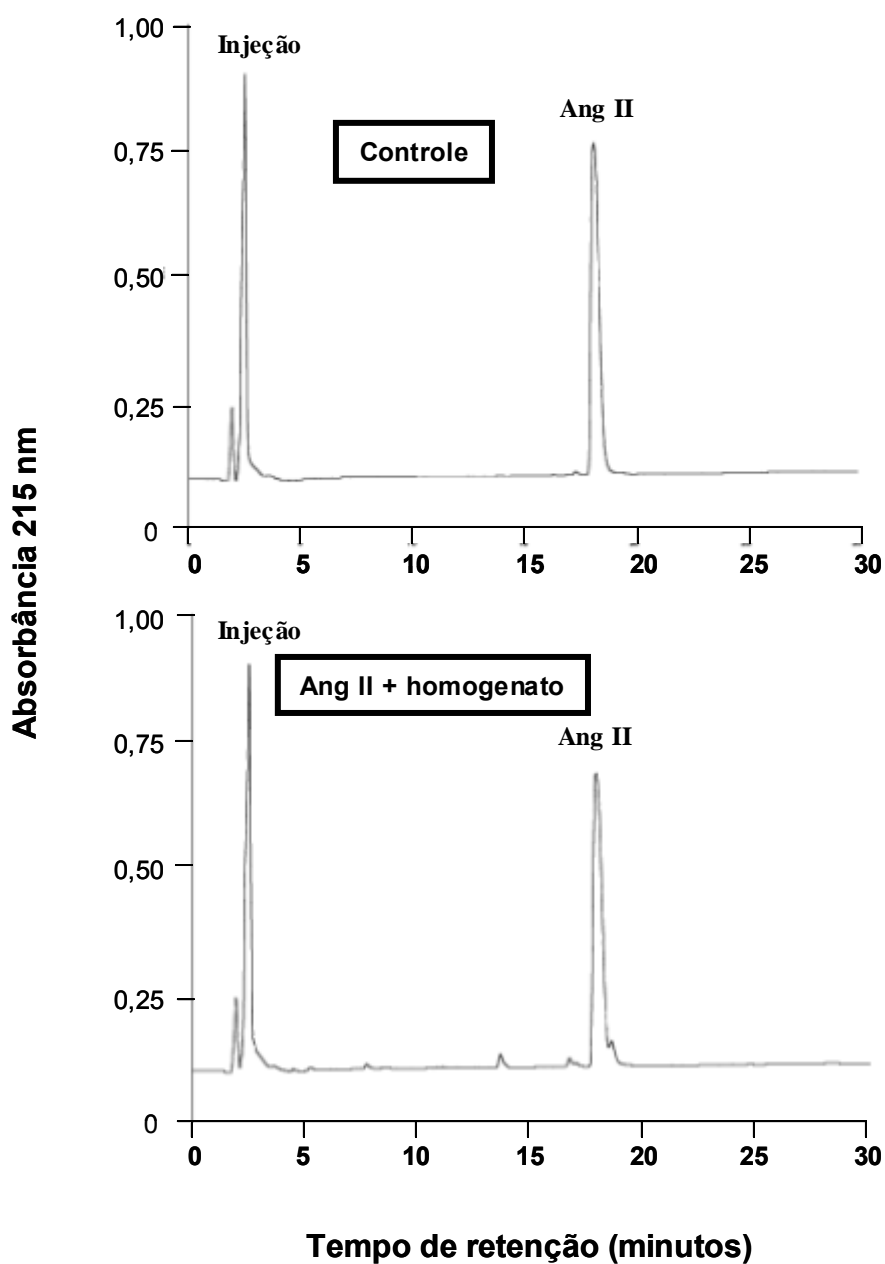


Figura 8 – Registro representativo de ausência de clivagem proteolítica de angiotensina (Ang) II por homogenato de tecido gengival de rato. Amostra de homogenato foi incubada com Ang II (30 nmol, 20 min), em um volume final de 150  $\mu$ L, em tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, a 37°C. A reação foi paralisada com a adição de 40  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 5% em glicerol 4%. O painel superior mostra a Ang II sem incubação com o homogenato (controle), enquanto o painel inferior mostra a ausência de digestão de Ang II a partir da ação do homogenato. Os cromatogramas foram gerados em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em uma coluna C-18 (0,4 x 25 cm) desenvolvida em um fluxo constante de 1,0 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%) em ácido trifluoroacético 0,1%. Os peptídeos foram detectados por absorbância em 215 nm e caracterizados por comparação com quantidades conhecidas dos peptídeos sintéticos cognatos.

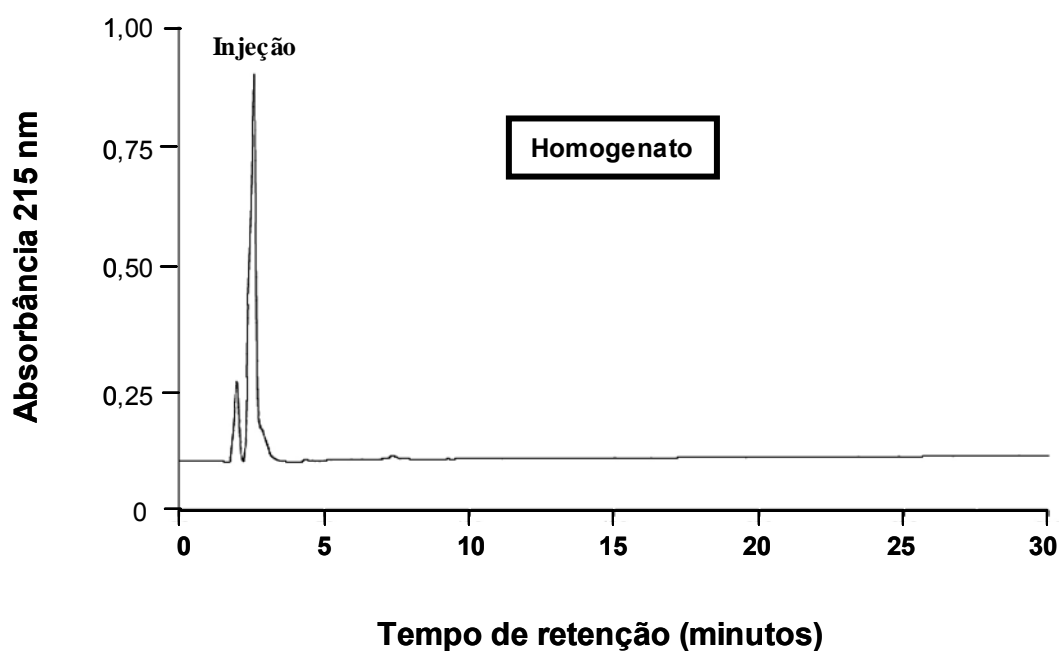


Figura 9 – Registro representativo da ausência de peptídeos pré-formados em amostra de homogenato de tecido gengival de rato. Amostra de homogenato foi misturada tampão Tris-HCl 30 mM em solução salina, pH 8,1, a 37°C, durante 20 min, em um volume final de 150  $\mu$ L. Em seguida, foram adicionados 40  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 5% em glicerol 4%. O cromatograma foi gerado em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em uma coluna C-18 (0,4 x 25 cm) desenvolvida em um fluxo constante de 1,0 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila (10-32%) em ácido trifluoroacético 0,1%.





# ***5 DISCUSSÃO***



## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho são apresentados resultados que documentam a existência de um SRA local no tecido gengival de rato. Na literatura há evidências acerca da existência de alguns componentes do SRA no tecido gengival e em fibroblastos gengivais de diferentes espécies, especialmente receptores para Ang II (OHUCHI *et al.*, 2002; SEGAWA *et al.*, 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI *et al.*, 2004). Apesar destes relatos, não são encontrados na literatura achados inequívocos sobre a presença de outros importantes componentes do SRA no tecido gengival, tais como renina e angiotensinogênio. Neste sentido, nosso trabalho contribui para o estudo do SRA localizado em tecidos específicos independentemente do SRA circulante.

A análise isolada do resultado positivo em experimentos de imunohistoquímica para renina (Figura 5) poderia deixar dúvidas quanto à origem desta enzima, uma vez que a marcação positiva poderia ter ocorrido em função de renina produzida na circulação e que chegou aos vasos do tecido gengival, sendo captada por células endoteliais. Por outro lado, os resultados obtidos por meio de RT-PCR (Figura 3) mostraram que o tecido gengival e fibroblastos cultivados de tecido gengival são capazes de expressar RNAm para esta proteína. Apesar de não podermos descartar completamente a primeira hipótese (renina circulante que chegou aos vasos da gengiva), a análise conjunta dos experimentos de imunohistoquímica e de RT-PCR sugere fortemente que a renina seja produzida localmente no tecido gengival de rato, por exemplo em células endoteliais (marcação por IHC, Figura 5) e fibroblastos (expressão de RNAm, Figura 3).

Os resultados de experimentos de RT-PCR também mostraram a capacidade do tecido gengival em expressar RNAm para a ECA. Para testarmos se realmente esta enzima é produzida localmente neste tecido, valemo-nos do método de medida da atividade desta peptidase sobre o substrato específico Hip-His-Leu, analisando a liberação do dipeptídeo His-Leu em ensaio fluorimétrico. Os resultados mostraram de maneira inequívoca a presença de atividade da ECA em todas as amostras de homogenato de tecido

gengival testadas (Tabela 2). Com relação à fonte celular da ECA, os dados obtidos nesta pesquisa sugerem que fibroblastos do tecido gengival não produzam esta enzima, uma vez que não foi detectada expressão de RNAm para ECA nestas células. Apesar de não termos realizado experimentos comprobatórios, a literatura documenta que células endoteliais são fontes da ECA (IGIĆ; BEHNIA, 2003; GRYGLEWSKI *et al.*, 2001).

Os experimentos de RT-PCR mostram diferença no nível de expressão de RNAm para os alvos estudados nesta pesquisa. O tecido gengival expressa as proteínas-alvo AGTN, renina, ECA e os receptores AT1a, AT1b e AT2 com diferentes intensidades em relação à  $\beta$ -actina. O tecido mostra elevada expressão de RNAm para os receptores AT1a, AT1b e AT2 e baixa expressão de RNAm para AGTN, renina e ECA. Já os fibroblastos cultivados de tecido gengival expressam apenas AGTN, renina e receptor AT1a. A expressão mais baixa de RNAm para renina e receptor AT1a pelos fibroblastos cultivados em comparação com o tecido gengival sugere que outros tipos celulares desse tecido expressem RNAm para essas proteínas; por exemplo, células epiteliais expressam receptores para Ang II (KÖNIGSHOFF *et al.*, 2007; YAHATA *et al.*, 2006). Com relação à renina, sabe-se que mastócitos são fontes abundantes desta enzima (SILVER *et al.*, 2004; VEERAPPAN *et al.*, 2008).

Nossos achados corroboram os de outros autores em relação à expressão de receptores AT1 em fibroblastos cultivados de tecido gengival de diferentes espécies, tais como cobaio, humano, furão e coelho (OHUCHI *et al.*, 2002; SEGAWA *et al.*, 2003; BERGGREEN; HEYERAAS, 2003; OHUCHI *et al.*, 2004). Porém, nossos dados contrastaram com os de Ohuchi *et al.* (2004), que detectaram a produção de receptor AT2 pela técnica de Western blot em fibroblastos cultivados de tecido gengival de coelho. Nossos dados também contrastam com os obtidos por Ohuchi *et al.* (2002), pois estes autores demonstraram que o tratamento com captopril diminuiu a proliferação de fibroblastos gengivais de cobaio estimulados por Ang II, ou seja, indiretamente esses autores demonstraram a presença da ECA nestas células. No nosso trabalho, nas condições estudadas, não foi observada a expressão de RNAm para a ECA em fibroblastos. Um fator que pode ser considerado é a possibilidade de que o tecido gengival ou fibroblastos cultivados de tecido gengival tenham aumento de expressão ou até mesmo passem a expressar

---

---

componentes do SRA quando submetidos a uma situação de desafio, como um evento inflamatório. Há relatos na literatura de aumento da expressão de componentes do SRA quando da presença de inflamação (HU *et al.*, in press; SOUZA *et al.*, 2007; STECKELINGS *et al.*, 2005). Vale ressaltar que a própria Ang II tem ações pró-inflamatórias (DOUILLETTE *et al.*, 2006), portanto pode-se sugerir que Ohuchi *et al.* (2002) induziram com Ang II exógena um estado inflamatório em fibroblastos cultivados, o que pode ter contribuído para um aumento da atividade da ECA. É importante destacar que o tecido gengival e os fibroblastos cultivados neste estudo apresentam condição muito próxima da homeostasia. Portanto, trabalhos futuros poderão ter como foco a investigação do efeito do processo inflamatório (por exemplo a doença periodontal) ou de substâncias que estimulam inflamação sobre a expressão dos diferentes componentes do SRA gengival.

Os experimentos bioquímicos cujos resultados foram revelados pela técnica de HPLC são bastante interessantes. Quando Ang I foi ofertada como substrato observou-se a formação de três produtos principais: Ang1-9, em maior quantidade, seguida de Ang 1-7 e Ang II, em menor quantidade. Por outro lado, quando TDP foi utilizado como substrato ocorreu a formação principal de Ang I, seguida de Ang II, Ang 1-9 e Ang 1-7 em ordem decrescente de formação de produto. Estes resultados sugerem que a Ang II possa ter sido formada pela clivagem seqüencial de Ang I por carboxipeptidase(s). Atualmente muita ênfase tem sido dada à ECA-2, uma carboxipeptidase capaz de clivar seqüencialmente a Ang I, levando à formação de Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7; porém é importante lembrar que esta enzima tem atividade catalítica muito superior sobre a Ang II do que sobre Ang I (RAIZADA; FERREIRA, 2007; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008; KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006). A ECA também seria uma candidata à formação de Ang II e Ang 1-7 no tecido gengival de rato, uma vez que a literatura documenta que esta enzima forma Ang II a partir de Ang I e Ang 1-7 a partir de Ang 1-9 (RAIZADA; FERREIRA, 2007; KRAMKOWSKI; MOGIELNICKI; BUCZKO, 2006; WRIGHT; YAMAMOTO; HARDING, 2008). A formação de Ang I a partir de TDP revela a existência de atividade da renina ou do tipo renina no homogenato de tecido gengival de rato, ressaltando-se que no presente

---

trabalho a renina foi detectada em tecido gengival de rato (por meio de RT-PCR e IHC) e em fibroblastos cultivados de tecido gengival de rato (RT-PCR).

Chama a atenção o fato da quantidade de Ang II formada a partir de TDP ser bem maior do que quando Ang I é ofertada como substrato ao homogenato de tecido gengival. Uma possível explicação para este resultado pode ser aventada a partir dos dados relatados por outros autores em que foi demonstrada a inibição da ECA pela Ang 1-9, quando esta se encontrava em concentração micromolar (SNYDER; WINTROUB, 1986; MARCIC *et al.*, 1999). Os números apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 6 permitem calcular que, nas condições utilizadas em nosso trabalho, Ang 1-9 foi formada em uma concentração de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  (3 nmol de Ang 1-9 gerada em 150  $\mu\text{L}$  de volume final de reação). Desta forma, a quantidade de Ang 1-9 formada nas incubações realizadas neste trabalho com Ang I foi suficiente para inibir a ECA e poderia justificar a baixa quantidade de Ang II.

Adicionalmente, os resultados deste trabalho que mostram maior quantidade de Ang II formada a partir de TDP em comparação com Ang I sugerem fortemente que endopeptidases presentes no homogenato de tecido gengival clivam diretamente a ligação Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> do TDP. Como candidata a esta hidrólise do TDP poderia ser incluída a elastase-2 de rato, uma enzima que tem esta capacidade hidrolítica bem documentada (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2004), a qual é semelhante à da tonina de rato (GUTKOWSKA *et al.*, 1984) e superior à da quimase do coração humano (URATA *et al.*, 1990b). No presente estudo, além da ECA, outras enzimas, tais como elastase-2 de rato e quimase I de rato podem ter contribuído para a formação de Ang II a partir da clivagem da ligação Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> da Ang I (PAULA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2002a). Porém, é importante considerar que a quimase I de rato apresenta principalmente atividade degradadora da Ang II (LE TRONG; NEURATH; WOODBURY, 1987), enquanto a elastase-2 de rato forma Ang II e não a hidrolisa (PAULA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002a). Desta forma, os achados deste trabalho de que a Ang II não é degradada pelo homogenato de tecido gengival de rato (Tabela 3 e Figura 8) certamente podem auxiliar na elucidação das vias enzimáticas formadoras e degradadoras de peptídeos gerados a partir de precursores de Ang I. Para que tal objetivo seja alcançado, outras abordagens terão de ser implementadas, tais como a realização de

---

experimentos com inibidores enzimáticos seletivos, substratos específicos ou, ainda, experimentos moleculares que evidenciem a presença de outras enzimas, além das investigadas neste trabalho, que reconhecidamente têm importância para a formação e degradação de peptídeos vasoativos no tecido gengival de rato. Também é de extrema importância a investigação da eventual presença de um SRA local no tecido gengival humano.

---





## ***6 CONCLUSÕES***



## 6 CONCLUSÕES

A análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho, com a utilização de diferentes técnicas, permite afirmar que:

- 1) existe um SRA local em tecido gengival de rato;
  - 2) este sistema local é capaz de gerar Ang II e outros peptídeos vasoativos *in vitro*.
-



# ***REFERÊNCIAS***



---

**REFERÊNCIAS**

Agoudemos MM, Greene AS. Localization of the renin-angiotensin system components to the skeletal muscle microcirculation. *Microcirculation*. 2005; 12(8):627-36.

Arakawa K. Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens Suppl*. 1996; 14(5):S3-7.

Becari C, Sivieri DO Jr, Santos CF, Moysés MK, Oliveira EB, Salgado MC. Role of elastase-2 as an angiotensin II-forming enzyme in rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 46(4):498-504.

Bem-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensin mRNA accumulation in rat hepatocytes. *Am J Physiol*. 1988; 255:E70-9.

Berggreen E, Heyeraas KJ. Role of K<sup>+</sup>ATP channels, endothelin A receptors, and effect of angiotensin II on blood flow in oral tissues. *J Dent Res*. 2003; 82(1):33-7.

Berstein KE, Martin BM, Edwards AS, Berstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem*. 1989; 264: 11945-51.

Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res*. 1974; 34-35(Suppl 1):203-9.

Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*. 1976; 191(4231):1050-1.

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1986; 78:31-9.

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

Cassis LA, Saye J, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension*. 1988; 11:591-6.

---

Chen Z, Tan F, Erdös EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension*. 2005; 46(6):1368-73.

Cornish KG, Joyner WL, Gilmore JP. Evidence for the conversion of angiotensin I to angiotensin II by the coronary microcirculation. *Blood Vessels*. 1979;16(5):241-6.

Cunha V, Salgado HC, Salgado MC. Enalapril prevents aortic hyperreactivity and remodelling in one-kidney, one-clip hypertensive rats without reducing arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(7):474-9.

de Gasparo M, Siragy HM. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept*. 1999; 81(1-3):11-24.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(3):415-72.

Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clément JF, Chénard V, Moreau P, *et al*. Servant MJ. The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem*. 2006; 281(19):13275-84.

Erdös EG, Skidgel RA. The unusual substrate specificity and the distribution of human angiotensin I converting enzyme. *Hypertension*. 1986; 8 (Suppl 1):34-7.

Goker H, Haznedaroglu IC, Beyazit Y, Aksu S, Tuncer S, Misirlioglu M, *et al*. Local umbilical cord blood renin-angiotensin system. *Ann Hematol*. 2005; 84:277-81.

Gryglewski RJ, Uracz W, Swies J, Chlopicki S, Marcinkiewicz E, Lomnicka M, *et al*. Comparison of endothelial pleiotropic actions of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 947:229-45.

Gutkowska J, Corvol P, Figueiredo AF, Inagami T, Bouhnik J, Genest J. Kinetic studies of rat renin and tonin on purified rat angiotensinogen. *Can J Biochem Cell Biol*. 1984; 62(2-3):137-42.

---



---

Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol.* 1998; 156(3):543-50.

Hall ER, Kato J, Erdös EG, Robinson CJG, Oshima G. Angiotensin I-converting enzyme in the nephron. *Life Sci.* 1976; 18:1299-303.

Hirasawa K, Sato Y, Hosoda Y, Yamamoto T, Hanai H. Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor and local rennin-angiotensin system in human colonic mucosa. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(2):275-82.

Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H. Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 230(1):176-8.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension.* 1998; 32(3):387-92.

Hu C, Dandapat A, Chen J, Liu Y, Hermonat PL, Carey RM, *et al.* Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agtr2) reduces atherogenesis and modulates LOX-1, endothelial nitric oxide synthase and heme-oxygenase-1 expression. *Atherosclerosis, in press.*

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

Inagami T, Iwai N, Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Chaki S *et al.* Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors. *Eur Heart J.* 1994; 15 Suppl D:104-7.

Jackman HL, Massad MG, Sekosan M, Tan F, Brovkovich V, Marcic BM, Erdös EG. Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension.* 2002; 39(5):976-81.

Jackson EK, Garrison JC. Renin and angiotensin. In: Molinoff PB, Ruddon, Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw-Hill, 1995. p. 733-58.

---

Jackson TR, Blair AC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*. 1988; 335: 437-40.

Königshoff M, Wilhelm A, Jahn A, Sedding D, Amarie OV, Eul B, *et al*. The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37(6):640-50.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. 2006; 57(4):529-39.

Lamparter S, Kling L, Schrader M, Ziegler R, Pfeilschifter J. Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1998; 175(1):89-98.

Lam SY, Leung OS. A locally generated angiotensin system in rat carotid body. *Regul Pept* 2002; 107: 97-103.

Lam SY, Leung OS. Chronic hypoxia activates a local angiotensin-generating system in rat carotid body. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 203(1-2):147-53.

Leite R, Salgado MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. *Hypertension*. 1992; 19(6 Pt 1):575-81.

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*. 1987; 84(2):364-7.

Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci* . 2004; 5(4):267-73.

Linderman JR, Greene AS. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. *Microcirculation*. 2001; 8(4):275-81.

Lundergan WP, Ferry D, Kobayashi H, Snowdowne KW. Angiotensin-II increases cytoplasmic calcium, cell number and total DNA for human periodontal ligamental cells in vitro. *J Periodontal Res*. 1999; 34(4):223-8.

Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdös EG. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension*. 1999; 33(3):835-43.

---

---

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

Nickenig G, Geisen G, Vetter H, Sachinidis A. Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts. *J Mol Med.* 1997; 75(3):217-22.

Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H, *et al.* Immunohistochemical and mRNA localization of the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(4):545-8.

Ohuchi N, Koike K, Sano M, Kusama T, Kizawa Y, Hayashi K, *et al.* Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002; 132(4):451-60.

Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, *et al.* Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2004; 137(3):281-9.

Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens.* 1984; 2(3):277-84.

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(3):1186-92.

Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(7):755-64.

Oliveira MA, Fortes ZB, Santos RA, Kosla MC, De Carvalho MH. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. *Peptides.* 1999; 20(10):1195-201.

Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM, Dionísio TJ, Cestari TM, Taga R, *et al.* COX-2 inhibition decreases VEGF expression and the alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol, in press.*

---

Paula CA, Sousa MV, Salgado MC, Oliveira EB. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1388(1):227-38.

Paul M, Mehr AP, Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006; 86:747-803.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1977; 57:313-70.

Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept*. 1993; 43(1-2):1-20.

Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 50(2):112-9.

Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol*, *in press*.

Ryan JW, Ryan US, Schultz DR, Whitaker C, Chung A, Dorer FE. Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem J*. 1975; 146:497-9.

Ryan JW, Day AR, Schultz DR, Ryan US, Chung A, Marlborough DI, *et al*. Localization of angiotensin-converting enzyme (kininase II). Preparation of antibody-hematoxylin conjugates. *Tissue Cell*. 1976; 8:111-24.

Santos CF, Paula CA, Salgado MCO, Oliveira EB. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002a; 80(1):42-7.

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. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002b; 39(5):628-35.

Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH, *et al*. Functional role, cellular source and tissue distribution of rat elastase-

---

---

2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(2):H775-83.

Santos CF, Greene AS, Salgado MCO, Oliveira EB. Conversion of renin substrate tetradecapeptide to angiotensin II by rat MAB elastase-2. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004; 82(11):1000-5.

Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero JL, Chernicky CL, Greene LJ, *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988; 11:153-7.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of Ang 1-7. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 1033- 47.

Schulz W W, Hagler HK , Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest.* 1988; 59(6):789-97.

Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. Angiotensin II induces prostaglandin E(2) release in human gingival fibroblasts. *Life Sci.* 2003; 72(7):795-803.

Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, Herzlinger D, Levi R. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(37):13607-12.

Sivieri DO Jr, Bispo-da-Silva LB, Oliveira EB, Resende AC, Salgado MC. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension.* 2007; 50(1):110-5.

Snyder RA, Wintroub BU. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu10-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 871(1):1-5.

Soubrier F, Alheng-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, *et al.* Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:9386-90.

---

Souza PPC, Fukada SY, Cunha FQ, Costa CAS, Costa-Neto CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regul Pept.* 2007; 140:27-31.

Speth RC, Thompson SM, Johns SJ. Angiotensin II receptors. Structural and functional considerations. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 377:169-92.

Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* 2005; 153(5):887-93.

Takai S, Shiota N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci.* 1996;58(7):591-7.

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 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(3):419-27.

Trask AJ, Ferrario CM. Angiotensin 1-7: Pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. *Cardio Vasc Reviews.* 2007; 25 (2):162-74.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res.* 1990a; 66(4):883-90.

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(36):22348-57.

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

Veerappan A, Reid AC, Estephan R, O'Connor N, Thadani-Mulero M, Salazar-Rodriguez M, *et al.* Mast cell renin and a local renin-angiotensin system in the airway: Role in bronchoconstriction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(4):1315-20.

---

Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol.* 2008; 84(2):157-81.

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Tohyama M, *et al.* A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem.* 2006; 281(19):13209-16.

Yang HYT, Neff NH. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J Neurochem.* 1972; 19:2443-50.

---