

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

**Regiane Cristina Duarte**

**Análise da atividade de peptidases em tecido renal e cardíaco de  
animais SHR. Efeito do Captopril**

**São José dos Campos – SP  
2006**

**Regiane Cristina Duarte**

**Análise da atividade de peptidases em tecido renal e cardíaco de  
animais SHR. Efeito do Captopril**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Maricilia Silva Costa**

**São José dos Campos – SP**

**2006**

D874a

Duarte, Regiane Cristina

Análise da atividade de peptidases em tecido renal e cardíaco de animais SHR. Efeito do Captopril/ Regiane Cristina Duarte.  
São José dos Campos: UniVap, 2006.  
65f.: il.; 30cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Hipertensão 2. Peptídeo Hidrolases 3. Insuficiência cardíaca congestiva  
Costa, Marcília Silva, Orient. II. Título

CDU: 616.12-008.331.1

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 05/12/2006

**“ANÁLISE DA ATIVIDADE DE PEPTIDASES EM TECIDO RENAL E CARDÍACO DE ANIMAIS SHR. EFEITO DO CAPTOPRIL”**

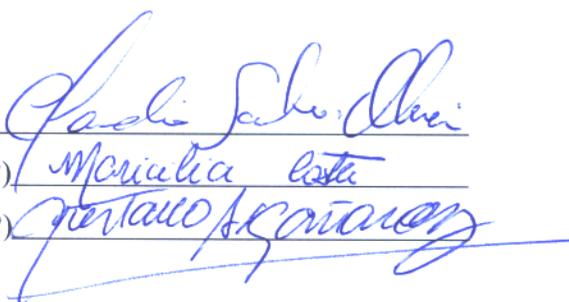
Regiane Cristina Duarte

Banca Examinadora:

Profª Dra **CLAUDIA SANTOS OLIVEIRA** (UNIVAP)

Profª DrA **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **GUSTAVO A. ARGANARAZ** (UNIFESP)



Handwritten signatures in blue ink for Claudia Santos Oliveira, Maricília Silva Costa, and Gustavo A. Argañaraz.

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap

**Dedico a minha mãe pela compreensão, incentivo e carinho.**

**Aos amigos pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.**

**E a Deus que esteve, está e estará presente em todos os passos de minha vida.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a DEUS que sempre me iluminou o meu caminho e me deu forças para superar dificuldades “O Senhor é meu pastor nada me faltará” (Salmo 23).

À professora Dra. Maricília Silva Costa pela oportunidade especial nesta dissertação, possibilitando assim o meu acesso à pesquisa científica.

Ao biólogo Enildo Broetto Pimentel pela imprescindível contribuição e assistência técnica na realização desta dissertação.

Aos amigos: Mara Lúcia Bergami, Carlos Augusto Brandão, Regina Sandra Marchesi, Alexandre Oxley pela disponibilidade em ajudar, sobretudo pela solidariedade. E a todos os demais colegas da Pós-Graduação pelos bons momentos de convívio.

A todos os professores da Pós-Graduação, pela atenção apoio e a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

# **Análise da atividade de peptidases em tecido renal e cardíaco de animais SHR. Efeito do Captopril**

## **Resumo**

No Brasil, a hipertensão é um dos problemas de Saúde Pública de maior prevalência na população, com grande incidência de morte por doenças cardiovasculares. Desta maneira, a hipertensão arterial tem sido estudada nas mais diversas áreas, a fim de determinar a melhor estratégia terapêutica e a busca do seu controle, no intuito de reduzir o risco aos diversos órgãos e sistemas. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da hipertensão arterial sobre a maquinaria proteolítica intracelular, localizada no citosol e representada pela calpaína e proteasome. Também foi determinado o efeito do Captopril sobre a atividade destas duas proteases. Os animais utilizados foram ratos machos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar (*ratus norvegicus albinus*) com 4 meses de vida. Os ratos foram subdivididos em diferentes grupos experimentais e a dose de Captopril diária foi estimada em 35 mg/Kg/dia durante 20 dias. Após o sacrifício dos animais, os tecidos renal e cardíacos foram retirados e submetidos às dosagens enzimáticas (proteasome e Calpaína) e protéicas. O captopril reduziu a pressão arterial sistólica (PAS), porém não diminuiu a hipertrofia cardíaca. A atividade da Calpaína foi diminuída no ventrículo esquerdo do grupo de SHR, mas não no grupo controle Wistar. O tratamento com Captopril durante 5 semanas não foi eficaz na modificação da atividade da peptidase. Estes resultados indicam que a hipertrofia cardíaca associada à hipertensão pode estar relacionada à diminuição na atividade da Calpaína. Assim, é possível que o tratamento com Captopril durante 5 semanas não reduziu a hipertrofia, pois não pode restaurar a atividade da peptidase no SHR.

Palavras Chaves: SHR; Calpaína; Proteasome; Captopril; Hipertensão.

## **Analyze of peptidase activities in both renal and cardiac tissues from SHR animals. Effect of Captopril**

### **Abstract**

In Brazil, the hypertension is one of the problems of Public Health of bigger prevalence in the population, with great incidence of death for cardiovascular illnesses. In this way, the arterial hypertension has been studied in the most diverse areas, in order to determine the best therapeutically strategy and the search of its control, in intention to reduce the risk to the diverse systems. Thus being, the objective of this study was to evaluate the effect of the arterial hypertension on the proteolytic machinery intracellular, located in citosol and represented for calpain and proteasome. Also the effect of the Captopril on the activity of these proteases was determined. The experimental animals used had been spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar (*ratus norvegicus albinus*) with 4 months of life. The rats had been subdivided in different experimental groups and the dose of daily Captopril was esteem in 35mg/Kg/dia, during 20 days. After the sacrifice of the cardiac and renal tissues were removed and submitted to the enzymatic dosages (proteasome and Calpain). Captopril reduced the systolic arterial pressure (PAS), however cannot diminish the cardiac hypertrophy. The activity of Calpain was diminished in the left ventricle of the SHR group, but not in the Wistar. The treatment of Captopril during 5 weeks was not efficient to modify the activity of peptidase. These results indicate that the cardiac hypertrophy associated the hypertension can be related to the reduction in the activity of the Calpain. Thus, it is possible that the treatment of Captopril during 5 weeks cannot reduce the hypertrophy, since cannot restore the activity of peptidase in the SHR.

Key Words: SHR, Hypertrophy, Calpain, Captopril, Peptidase Activity

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 01:</b> Classificação da pressão arterial para maiores de 18 anos segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.....	04
<b>Tabela 02.</b> Peso úmido e conteúdo protéico dos tecidos de ratos Wistar e SHR.....	27
<b>Tabela 03:</b> Classificação das peptidases que hidrolisam o peptídeo Cbz-Leu-Leu-Glu-2NA.....	28
<b>Tabela 04.</b> Classificação das proteases que hidrolisam azocazeína com base no efeito de inibidores enzimáticos no rato Wistar e SHR.....	30
<b>Tabela 05.</b> Efeito do tratamento de 5 semanas com captopril sobre Peso úmido dos tecidos de ratos Wistar e SHR.dos ratos Wistar e SHR .....	32
<b>Tabela 06.</b> Efeito do tratamento de 5 semanas com captopril sobre o peso corporal dos ratos Wistar e SHR.....	36

## Listas de Figuras

- Figura 01:** Representação esquemática da interação entre os principais fatores envolvidos nos mecanismos de controle de pressão arterial.....03
- Figura 02:** Papel dos sistemas proteolíticos na degradação de proteína celular e as varias classes.....07
- Figura 03:** Degradação de proteína via proteosome conjugado a ubiquitina.....09
- Figura 04:** Organização dos domínios das subunidades das calpaínas.....11
- Figura 05:** Estrutura de inibidores da ECA (Captopril).....14
- Figura 06:** Efeito de tratamento de 5 semanas com captopril sobre a pressão arterial sistêmica dos ratos Wistar e SHR.....31
- Figura 07:** Efeito do tratamento com captopril sobre a atividade de proteasômica no tecido renal e câmara ventricular esquerda.....34
- Figura 08:** Efeito do tratamento com captopril sobre a atividade da calpaína no tecido renal e câmara ventricular esquerda.....35

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANG I- Angiotensina I	NaCl- Cloreto de Sódio
Ang II- Angiotensina II	g- Grama
CMFSF – ácido p-cloromercuriofenilsulfônico	h- Hora
PMC – Proteinase multicatalítica	KDa- Kilodalton
NaOH- Hidróxido de Sódio	Kg- Kilograma
PGI <sub>2</sub> - Prostaciclina	mg- Miligrama
CVE- Câmara Ventricular Esquerda	min- Minutos
CaCl <sub>2</sub> - Cloreto de Cálcio	mmHg- Milímetro de mercúrio
Da- Daltons	μM – Micro molar
mmHg – milímetros de mercúrio	μl – Micro litros
DTT - dithio- -treitol	s- Segundo
PAD – pressão artéria diastólica	p- Probabilidade Estatística
EG – ratos da linhagem New Zeland	pH- log [íon hidrogênio]
E-64- (trans-epoxisuccinil-L-leucilamido)	rpm- Rotações por minuto
ECA- Enzima Conversora de Angiotensina	PE- tudo de polietileno
EDTA- etileno diamino tetra acetato de sódio	TCA – Ácido tricloracético
EGTA- Etileno Glicol - bis (β-aminoetil éter)	HCl- Ácido Clorídrico
DS – Linhagem de ratos Dahl sensível ao sal	EPM- Erro padrão da Média
DR - Linhagem de ratos Dahl resistente ao sal	TGFβ <sub>3</sub> – transforming growth factor
PAM- Pressão Arterial Média	DG – Linhagem de ratos Dahl
PAS- Pressão Arterial Sistólica	26 S- proteasome
SRA – Sistema Renina Angiotensina	FINEP -Financiadora de Estudos de Projetos e Programas
SHR – Ratos da linhagem espontaneamente hipertensos	Wistar - ratus norvegicus albinus

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Grupos Experimentais	17
3.3 Tratamento com Captopril	18
3.4 Medidas Hemodinâmicas	19
3.5 Obtenção de Órgãos e determinação dos pesos úmidos e seco	20
3.6 Homogeneização dos tecidos	20
3.7 Determinação das atividades proteolítica e peptidásica	21
3.8 Efeito dos inibidores e ativadores	23
3.9. Equipamentos	24
3.10. Reagentes	25
3.11 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

## 1. Introdução

Os estudos sistemáticos sobre os níveis de Pressão Arterial Sistêmica (PAS) na população brasileira e a prevalência de hipertensão nesta população, ainda são escassos, a despeito de ser a hipertensão arterial um sério problema de Saúde Pública (CHAKRABORTY et al, 1977). A hipertensão arterial, devido à sua elevada prevalência (15% a 20% na população adulta e mais de 50% em idosos) representa um importante problema de Saúde Pública<sup>1</sup>. No Brasil, a hipertensão é um dos problemas de Saúde Pública de maior prevalência na população, com grande incidência de morte por doenças cardiovasculares<sup>2</sup>. Desta maneira, a hipertensão arterial tem sido estudada nas mais diversas áreas, a fim de determinar a melhor estratégia terapêutica e a busca do seu controle, no intuito de reduzir o risco aos diversos órgãos e sistemas.

Segundo Gusmão et. al (2005) a hipertensão arterial é uma doença crônica e, devido ao seu aspecto multifatorial, requer uma avaliação com abordagem complexa, na qual a interação entre as suas características e o seu desenvolvimento seja contemplada. Segundo Amondeo, Lima e Vazquez (1997), (apud RIBEIRO, 1997) além de ser multifatorial, no momento de sua detecção, pode ou não estar acompanhada de lesões em seus órgãos-alvo, tais como: vasos, coração, retina, rins, etc.

Muitos mecanismos estão envolvidos na regulação da pressão arterial, alguns destes relacionados ao controle em curto prazo, enquanto que outros o fazem a longo prazo. Os mecanismos de controle em curto prazo são de natureza reflexa e envolvem, primariamente, o sistema nervoso simpático (ABBOUD, 1974). O controle a longo prazo

(1). IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Hipertensão*, v. 5, p. 126–163, 2002.

(2). Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, Rev. *Hipertensão*, v. 4, p. 40, 2002.

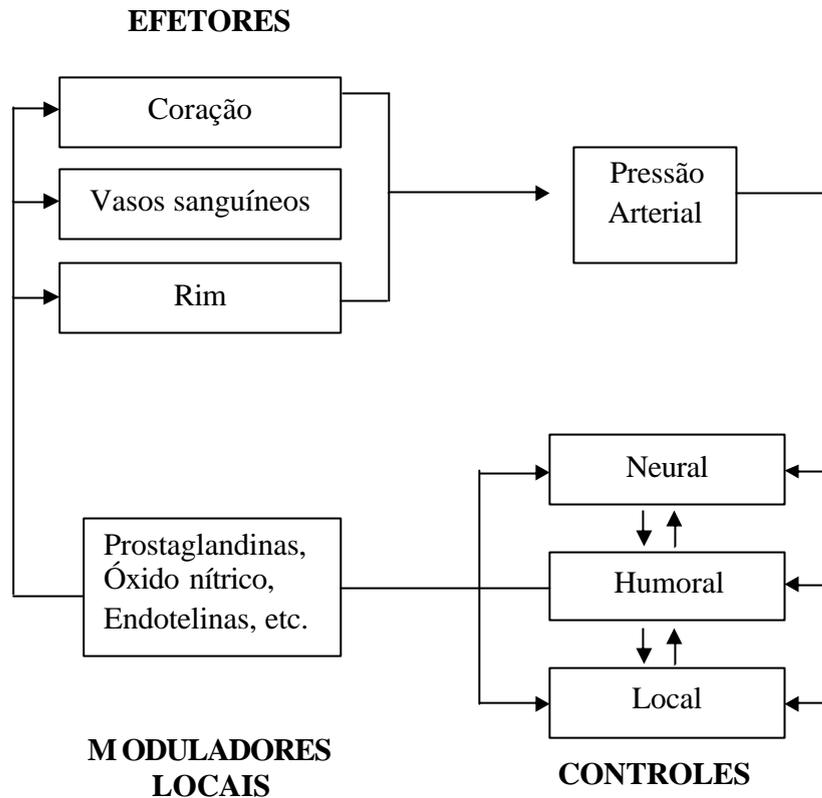
pode ser realizado pelos rins e, também, através de fatores humorais, que são de grande importância na homeostase da pressão arterial.

A manutenção, bem como a variação da Pressão Arterial (PA) depende de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados da frequência e da contratilidade cardíacas; do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância, e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos, fundamentais para corrigir prontamente os desvios dos níveis basais de pressão, sejam os indivíduos normotensos, hipertensos ou mesmo hipotensos.

Com base nos conhecimentos sobre o controle pressórico e os mecanismos de controle, destacamos a interação entre os principais fatores envolvidos, tais como: órgãos efetores, moduladores locais e as formas de controle (figura 01).

A hipertensão arterial pode ser classificada pela sua etiologia ou pelo valor mais da pressão arterial sistólica ou diastólica (tabela 1). Etiologicamente acredita-se que 95 e 99% dos casos são de hipertensão primária ou essencial, para a qual não existe causa orgânica evidente<sup>3</sup>, a gênese está na importância relativa da hereditariedade e dos fatores ambientais, para os demais casos, a hipertensão é secundária.

(3). WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1978



**Figura 01.** Representação esquemática da interação entre os principais fatores envolvidos nos mecanismos de controle da Pressão Arterial.

A Hipertensão Arterial secundária se expressa de várias formas, tais como: a hipertensão nefrôgena (renovascular), a hipertensão arterial por excesso de mineralocorticóides (hiperaldosterismo), por excesso de glicocorticóides (síndrome de Cushing), hipertensão por excesso de catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (feocromocitoma), genética, etc. Para tanto, o aumento persistente e inadequado da pressão arterial e suas várias formas, levou os cientistas a estudarem a patologia hipertensão em animais experimentais, principalmente o rato. Simpson e Phelan (1984) destacaram o reconhecimento desde a década de cinquenta de que a patogênese da hipertensão humana poderia ser adequadamente investigada em modelos animais.

Tabela 1. Classificação da pressão arterial para maiores de 18 anos segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão<sup>4</sup>.

<b>Classificação</b>	<b>PAS (mmHg)</b>	<b>PAD (mmHg)</b>
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130 -139	85 -89
Hipertensão Estágio I	140-159	90-99
Hipertensão Estágio II	160-179	100-109
Hipertensão Estágio III	= 180	= 110
Hipertensão Sistólica Isolada	= 140	< 90

O valor mais alto de sistólica ou diastólica estabelece o estágio do quadro hipertensivo. Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação do estágio

Atualmente, seis linhagens de ratos geneticamente hipertensos, derivadas independentemente são oficialmente reconhecidas pela Sociedade Internacional de Hipertensão.

A linhagem New Zeland (EG) foi a primeira demonstração experimental, mostrando a possibilidade de transmissão da hipertensão de pais para filhos por mecanismos hereditários (SMIRK ; HALL, 1994). Dahl, Heine e Tassinari (1962) desenvolveram o modelo de hipertensão genética Dahl, sensível ao Sal (DS) e resistente ao sal (DR). Em 1968 um programa de cruzamento seletivo foi iniciado para obter as linhagens Sal-sensível e Sal-resistente ao tratamento com deoxicorticosterona + NaCl (DOCA-sal), oferecido por 3 a 4 semanas seguindo a nefrectomia unilateral (BEM-ISHAY et al, 1972). Todos os modelos de hipertensão apresentam algum tipo de alteração fisiológica e/ou farmacológica.

(4) Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2006)

Dentre os diferentes modelos de hipertensão genética, o modelo SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) parece ser o mais estudado. O desenvolvimento da hipertensão arterial nestes animais não requer quaisquer intervenções fisiológicas, farmacológicas ou cirúrgicas, razão pela qual o termo “hipertensão espontânea” tem sido utilizado para caracterizar esta linhagem de ratos. A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos Aoki-Okamoto (SHR) foi desenvolvida no Japão, a partir de ratos Wistar-Kioto, por cruzamento metódico entre os irmãos com pressão arterial elevada, resultando em 100% de progênie com hipertensão espontânea (OKAMOTO; AOKI, 1963). Embora existam modelos de hipertensão genética em outras espécies de animais, estes não têm sido muito explorados, em vista de razões práticas, financeiras ou outras (TRIPPODO ; FROLHLICH, 1981). O SHR representa um modelo confiável de desenvolvimento da elevação de pressão sanguínea, sendo semelhante em vários aspectos à hipertensão em humanos (id).

Na hipertensão, a compreensão de mecanismos fisiopatológicos envolve o conhecimento das alterações cardiovasculares, interpretadas como fenômenos de adaptação, além de estarem envolvidas na regulação da pressão arterial. Dentre estas, destacamos a hipertrofia cardíaca que, em geral, acompanha a hipertensão arterial, acentuando o aumento da morbidade e mortalidade (SOKOLOW ; PERLOFF, 1961; ISLES et. al; KANNEL; ABBOTT, 1986).

A hipertrofia cardíaca envolve o aumento no tamanho das células miocárdicas, a proliferação dos tecidos de suporte e o aumento na vascularização coronária (BROWN, 1971). Associadas a estas mudanças estruturais, também ocorrem alterações bioquímicas que, provavelmente, envolvem o aumento da síntese protéica (MEERSON,

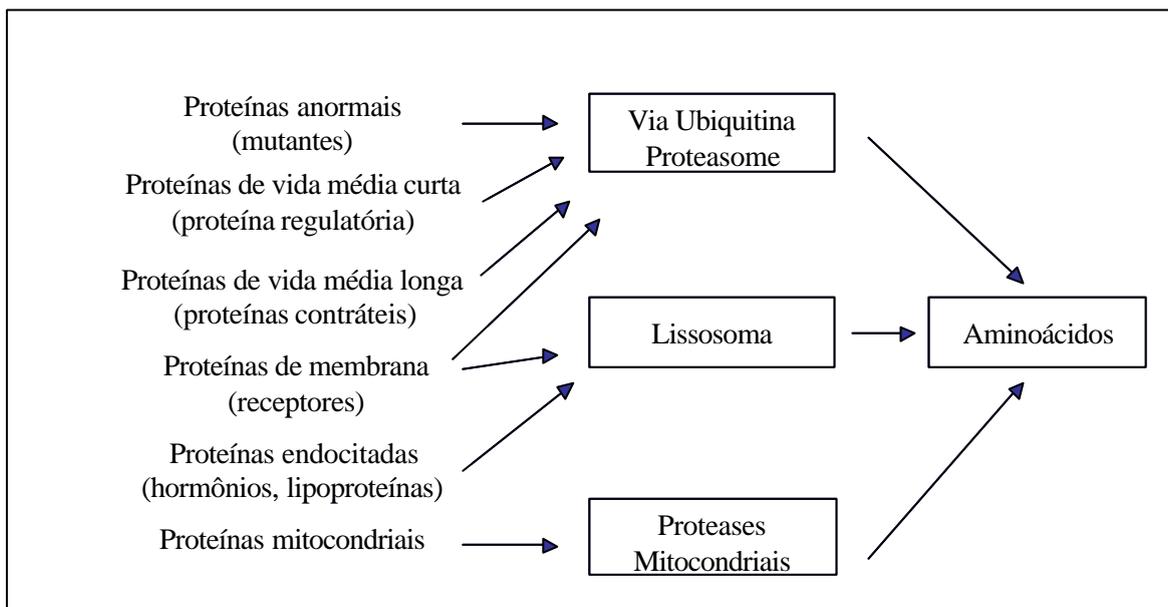
1962). Parmacek et. al (1986) demonstraram que o animal SHR apresenta uma forma acelerada de desenvolvimento do coração, mediada por aumento de expressão prematura de vários genes, tais como: para o colágeno tipo I e o TGF $\beta_3$ , associados às diferentes fases de crescimento e remodelação ventricular.

Ainda, outras variações têm sido observadas durante o desenvolvimento do SHR, como anormalidades no metabolismo de cálcio (McCARRON, 1989). É possível que alterações no metabolismo protéico também estejam envolvidas, influenciando tanto a síntese como a degradação protéica, visto que, foi encontrada uma deficiência genética nos níveis do inibidor de Calpaína, uma enzima proteolítica, no rim (PONTREMOLI et. al., 1987) e nos eritrócitos (*id.*, 1986) de ratos geneticamente hipertensos da linhagem Milan.

Alguns estudos revelam que os processos de síntese protéica estão aumentados durante a fase pré-hipertensiva no SHR, contribuindo para o desenvolvimento da hipertrofia e da hipertensão nestes animais (SEN et. al., 1976). Entretanto, os mecanismos de degradação protéica, também poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento da hipertrofia e da hipertensão. Assim, são necessários novos estudos bioquímicos envolvendo dosagem de proteína e enzimática pretendendo fornecer novas ferramentas que apoiem o papel patogénico da hipertensão no SHR.

A renovação de cada proteína é um parâmetro constante e específico, podendo ser alterado por fatores que influenciam a velocidade da síntese e/ou da degradação. A quantidade de proteína intracelular renovada a cada dia é muito grande. Em indivíduos adultos normais (70 Kg), são sintetizados e degradados 280g de proteínas a cada dia, sendo a maioria destas intracelulares (COHN et al., 1983). A estimativa de vida média,

indica que esta varia de proteína para proteína e de tecido para tecido (GOLDBERG; JOHN, 1976, GARLICK, 1969, WATERLOW ; STEPHEN, 1968). As células dos mamíferos apresentam diversos sistemas proteolíticos e proteases que se localizam em diversos compartimentos celulares (lisossoma, mitocôndria, núcleo e citosol) (figura 02). A função primária destas proteases (endoproteases e exoproteases) parece ser a regulação do conteúdo protéico intracelular. Entretanto, também está a cargo das proteases a ativação e a inativação das proteínas regulatórias de enzimas proteolíticas; a manutenção, o controle e a quantidade das proteínas celulares e a degradação de proteínas extracelulares (MITCH ; GOLDBERG, 1996).



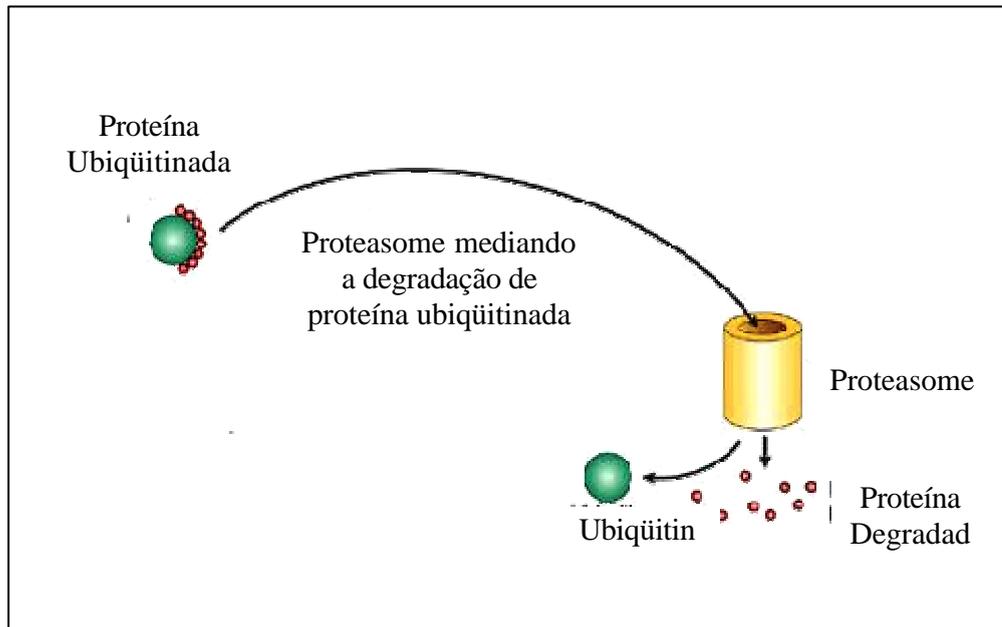
**Figura. 02.** Papel dos sistemas proteolíticos na degradação de proteínas celulares de várias classes.

Fonte: Goldberg e Mitch.,(1996)

Dentro do sistema proteolítico se encontra a Proteinase Multicatalítica (PMC), um complexo enzimático com um papel central na proteólise dependente e independente de ubiquitina (GOLDBERG ; ROCK, 1992). O termo multicatalítico tem sido aplicado

devido à sua ampla especificidade, atribuída a presença de sítios catalíticos distintos (RIVETT et. al., 1994). Portanto, apresenta atividade que pode ser responsável pela clivagem da região C terminal de proteínas sobre aminoácidos básicos (usualmente Arg), correspondendo à atividade tripsina-símile; sobre aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Try, Phe), correspondendo à atividade quimiotripsina-símile, sobre resíduos ácidos (Glu) (WILK ; ORLOWSKI, 1980) e sobre aminoácidos de cadeia ramificada (ORLOWSKI et al, 1993), correspondendo à atividade quimiotripsina-símile ácida (FIGUEREDO-PEREIRA et. al., 1995). A distinção entre as diferentes atividades está baseada no uso de diferentes substratos de peptídeos sintéticos e vários inibidores da proteinase.

A Proteinase Multicatalítica é considerada o principal sistema proteolítico extralisossomal (CUERVO et. al., 1994). É uma via proteolítica de fundamental importância celular, uma vez que seu sistema proteolítico é dependente de ATP e ubiquitina (fig. 03). Formada por uma protease de peso molecular entre 1.000 a 1.500 kDa e subunidade de 34-110 kDa, seu coeficiente de sedimentação é de 26 S (Goldberg ; Rock, 1992). Coeficiente este, que sugere sua denominação mais aceita atualmente: Proteasome 26 S.



**Figura. 03.** Degradação de proteína via Proteasome conjugado a ubiquitina.

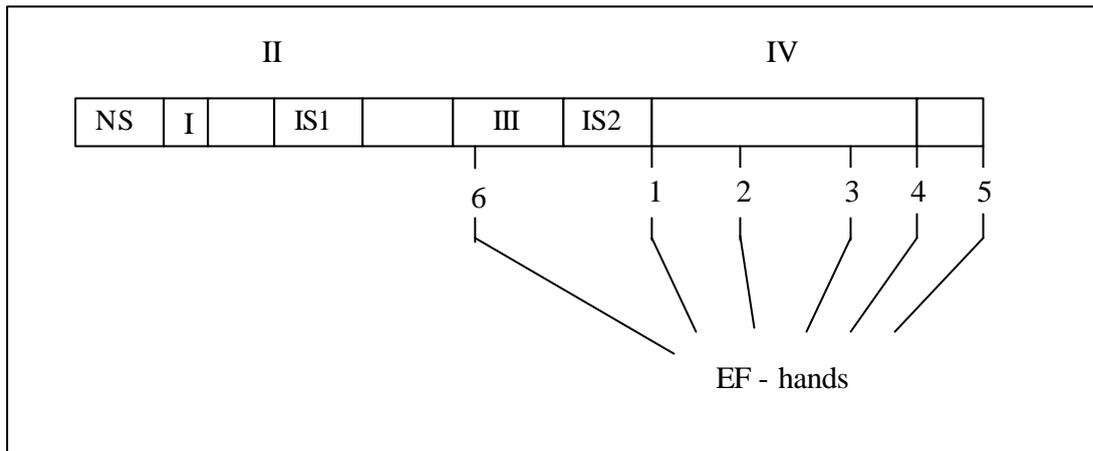
Fonte: Nature, 1999.

A PMC pode ser encontrada tanto no núcleo como no citoplasma, sugerindo que o tempo de vida das proteínas citosólicas e nucleares seja controlado, principalmente, por este sistema proteolítico (PETERS et. al., 1994). Dados indicam que a PMC também participa da degradação protéica de proteínas reguladoras de vida-curta e proteínas anormais ou danificadas sob condições de estresse (ADAMS, 2003).

Outra proteinase que se encontra distribuída no citosol de células eucariontes é a protease dependente de cálcio, Calpaína (DESHPANDE et. al., 1995). Esta é uma cisteíno-protease existente nos diferentes tecidos, sendo encontrada em duas formas que diferem quanto à necessidade de cálcio para a sua atividade:

Esta família de cisteíno-proteases dependentes de cálcio (SORIMACHI et al, 1993) ou endopeptidases neutras dependentes de cálcio (SUSUKI, 1987) está

amplamente distribuída no reino animal; de mamíferos a invertebrados e, também é encontrada em fungos. Curiosamente, não foi descrita a presença desta família em plantas e bactérias (MURACHI et al, 1989). As Calpaínas são proteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade catalítica de 80 kDa, da qual foram identificadas várias isoformas, e uma subunidade de 30 kDa (subunidade regulatória da sensibilidade frente ao cálcio), cuja porção amino-terminal interage com os fosfolipídios de membrana (SASAKI et al., 1983). O papel desta interação ainda não está completamente elucidado (ELCE et al, 1997). A subunidade maior desta protease está organizada em 4 domínios (I-IV); sendo o domínio II a porção cisteíno-protease, enquanto que o domínio IV representa a porção ligante de cálcio. Ainda não está clara a função dos outros dois domínios. A subunidade menor da protease está organizada em 2 domínios (II e VI) como mostra a figura 04.



**Figura 04.** Organização dos domínios das subunidades das Calpaínas

Fonte: Carafoli E, Molinari, 1998

Por apresentar diversas isoformas, a ativação destas proteases também necessita de diferentes concentrações de cálcio. A ativação da Calpaína I se dá em concentrações de cálcio a partir de  $10\mu\text{M}$ , enquanto que a Calpaína II é ativada a partir de  $0,7\ \mu\text{M}$  de cálcio. Uma terceira isoforma, a n-Calpaína foi descrita no músculo esquelético, sendo ativada por concentrações de cálcio entre  $0,010$  e  $10\mu\text{M}$ , correspondendo à concentração fisiológica do mesmo. Nesta concentração de cálcio, as Calpaínas agem na interface da membrana e do citoesqueleto, influenciando importantes vias dos sinais de transdução, assim controlando diversos comportamentos de proteínas intracelulares e organelas. Com o aumento anormal nos níveis de cálcio, estas proteases apresentam uma pronunciada força destrutiva, capaz de clivar mais do que a metade das proteínas celulares em uma hora (NIXON, 1989).

As Calpaínas estão, ainda, envolvidas na renovação proteolítica miofibrilar participando da degradação de uma ampla variedade de proteínas específicas do músculo, incluindo a titina, a nebulina e as troponinas, proteínas fundamentais na

estrutura miofibrilar (SPECK et. al., 1993).

O tecido cardíaco contém concentração de cálcio suficiente para estimular as cisteíno-proteases, sendo que a Calpaína apresenta uma função específica quando se tratando da degradação de proteínas musculares. Recentemente, foi demonstrado que a hipertrofia muscular do ventrículo esquerdo pode estar relacionada à atividade da Calpaína. Foi demonstrado o aumento na atividade da Calpaína em homogenado de tecido cardíaco logo após a indução da hipertrofia por medicamento  $\beta$ -agonista. Outro dado importante foi que o inibidor de cisteína protease (E64c) reduz a extensão da hipertrofia significativamente em ratos tratados com  $\beta$ -agonista (Arthur ; Belcastro, 1997). Entretanto, Stella et al. (1997) demonstraram em humanos portadores de hipertensão, uma relação inversa entre a atividade da Calpaína e a hipertrofia ventricular esquerda, sugerindo que o aumento da degradação de proteína pela Calpaína poderia prevenir o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda. Cicilini et al (1995) demonstraram uma diminuição na atividade da Calpaína em homogenado de músculo cardíaco obtido de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR). Pollack et al (2003), utilizando miócitos de ventrículo esquerdo de ratos neonatos demonstraram um aumento na extensão da hipertrofia induzida por fenilefrina usando E64c, sugerindo assim que o mecanismo da hipertrofia poderia estar relacionado com a atividade da Calpaína . Entretanto, os mecanismos específicos pelo quais a hipertrofia em animais SHR está relacionada à atividade da Calpaína, ainda não estão completamente esclarecidos.

Assim, as células possuem diversas vias proteolíticas que podem ser ativadas ou inibidas, de acordo com as necessidades, em diferentes estados nutricionais e

patológicos. A existência de diversas fases temporais, desde o estabelecimento de determinada condição é um indicativo de que as diferentes vias proteolíticas podem atuar em mecanismos mediados por ação hormonal, portanto permitindo dizer que a degradação de proteína intracelular seja um processo vital, extremamente bem regulado por diversos fatores internos e externos.

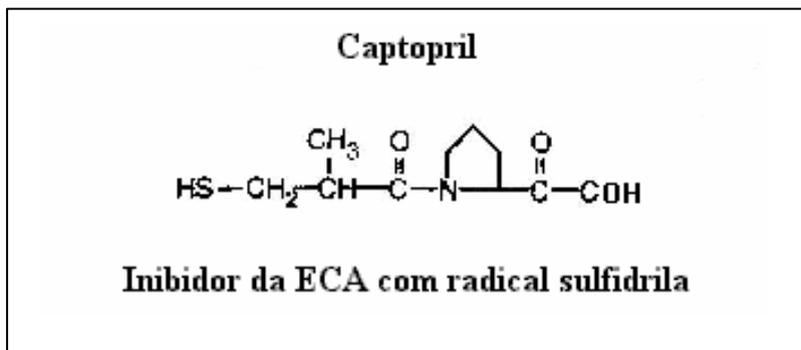
Na hipertensão há a necessidade de redução dos valores tensionais, inclusive para a conservação da integridade de órgãos; para tanto, a eficácia só pode ser conseguida com o uso de fármacos (medicamentos). O tratamento adequado da hipertensão arterial reduz significativamente a mortalidade e a morbidade cardiovascular (LIMA-COSTA et al, 2004).

Em uma análise de 109 estudos realizados até 1990, Dahlöf et al. (1992), investigando os quatro medicamentos anti-hipertensivos mais utilizados na clínica diária (diuréticos, bloqueadores beta-adrenérgicos, antagonista de canais de cálcio e os inibidores de ECA) verificam diferentes graus de regressão nos valores tensionais. Também foi observado que os inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) se apresentam mais efetivos sobre a regressão dos valores tensionais da PA (FERREIRA ; POVOA. 1997).

Os inibidores da ECA apresentam grandes aplicações na atualidade, tendo sido iniciado o seu uso em 1965, quando Ferreira et al. (1965) isolaram do veneno da cobra *Bothrops Jararaca* um fator potencializador da bradicinina que, curiosamente, também apresentava efeito bloqueador da ECA. Estes resultados levaram, mais tarde à conclusão de que a ECA e a Cininase II eram idênticas (YANG et al., 1970). A ação destes inibidores se dá devido à interação com o átomo de zinco da molécula da ECA

interferindo, assim, com o sítio catalítico da enzima. A análise a partir de estudos de cinética enzimática, envolvendo Captopril, Enalapril e Ramipril indicou que estas drogas inibem a ECA de forma competitiva. O grau de ligação dos inibidores da ECA ao zinco, no local ativo da enzima conversora, e a sua lipossolubilidade parecem ser responsáveis pelas diferentes observações quanto à potência e a duração dos efeitos dos diferentes inibidores da ECA (GUIMARÃES et al., 1997).

Um dos inibidores da ECA, classificado de acordo com sua estrutura química e natureza do radical químico que se liga ao íon zinco da enzima (ECA), contendo o radical sulfidril é o Captopril (figura 05).



**Figura 05.** Estrutura do inibidor da ECA (Captopril).

Os inibidores da ECA previnem ou revertem os remodelamentos adversos do tecido cardíaco, reduzindo a hipertrofia ventricular esquerda em hipertensos, bem como a densidade do colágeno. Estes efeitos resultam tanto da redução da sobrecarga ventricular esquerda e do estresse parietal sistólico, como da inibição das propriedades estimulantes do crescimento da angiotensina II em miócitos cardíacos e em

fibroblastos. De acordo com Cruickshank (1992) e Dahlof (1994), estes fármacos diminuem a massa ventricular esquerda, predominantemente devido à redução da espessura da parede posterior e do septo interventricular e, em menor grau, pelo encurtamento do diâmetro ventricular.

## 2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da hipertensão arterial sobre a maquinaria proteolítica intracelular, localizada no citosol e representada pela Calpaína e Proteasome. Também foi determinado o efeito do Captopril sobre a atividade destas duas proteases.

### 3. Material e Métodos

Este trabalho é uma pesquisa classificada como experimental (KERLINGER, 1979) por ser considerado o melhor exemplo de pesquisa científica, pois há um alto nível de controle da situação, podem-se isolar todas as estruturas de qualquer interferência do meio exterior, gerando maior confiabilidade em seus resultados. Sua parte experimental foi executada no Laboratório de Bioquímica Cardiovascular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

#### 3.1 Animais

No presente trabalho, foram utilizados ratos machos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar (*ratus norvegicus albinus*) com 4 meses de vida. Os animais foram provenientes do Biotério do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram mantidos com acesso livre a água e a ração, em ambiente com temperatura controlada (20° - 25°C) e iluminação artificial (8 – 18h), respeitando-se as normas para biotério de pesquisa (FINEP).

#### 3.2 Grupos experimentais

Os estudos foram realizados, utilizando 4 grupos experimentais, conforme a linhagem dos animais e o tratamento.

GRUPO I (SHR) - Ratos machos da linhagem espontaneamente hipertenso (n=10).

GRUPO II (WISTAR) - Ratos machos da linhagem Wistar (n=10).

GRUPO III (SHR-Cap) - Ratos machos da linhagem espontaneamente hipertenso (n=10) tratados com Captopril adicionado à água de beber.

GRUPO IV (WISTAR -Cap) - Ratos machos da linhagem Wistar (n=10) tratados com Captopril, adicionando à água de beber.

A dose de Captopril diária foi estimada em 35 mg/Kg/dia durante 20 dias.

Durante o tratamento, os seguintes parâmetros foram monitorados:

1. Dose diária de captopril (média de 35 mg/Kg/dia).
2. Volume de água diária (média de 37 ml/dia).
3. Ingestão diária de ração (ad Libitum).
4. Acompanhamento de valores de Pressão sistólica medida no pletismógrafo.
5. Ao término do período de tratamento, fez-se a mensuração da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) através de cateterismo.
6. Peso úmido e peso seco do ventrículo e rim esquerdos.

### 3.3 Tratamento com Captopril

Durante o período de tratamento, o volume diário de água consumida foi registrado em todos os grupos e a média da ingestão diária de água por rato foi estimada. As medidas foram feitas sempre no mesmo horário, mantendo o cálculo de dose diária da droga ingerida por animal.

### 3.4 Medidas hemodinâmicas

Antes e durante o tratamento com Captopril foi realizado o registro dos parâmetros hemodinâmicos nos animais dos diferentes grupos experimentais. O método de pletismografia de cauda foi utilizado semanalmente, para melhor acompanhamento dos grupos. Antes do registro, os animais ficaram em média 15 minutos em gaiolas sob a luz, objetivando aquecer e obter uma adequada vasodilatação, possibilitando desta forma, o pulso na cauda. Os animais foram submetidos ao anel de registro do pletismografo (II TC Life Science, USA Mod 29 Pulse Amplifier) durante 10 minutos para adaptação e, somente após, foi realizado o registro basal de Pressão Arterial Sistólica (PAS).

Ao término do período de tratamento de 20 dias, os registros de pressão arterial média e pressão arterial sistólica foram obtidos através de um cateter implantado na aorta abdominal, via artéria femoral esquerda. Os cateteres usados foram confeccionados utilizando-se um tubo de polietileno PE – 50 (Clay Adams, USA) de 15cm de comprimento e um PE – 10 de 5cm, unidos por meio de aquecimento sobre mandril.

Os animais foram anestesiados com Zoletil (40 mg/Kg; Intraperitoneal) e as manobras cirúrgicas consistiram de uma incisão na região inguinal, em direção a aorta abdominal. Após o isolamento da artéria foi introduzido o cateter previamente preenchido com uma solução 1:50 de heparina em salina (NaCl 0,9%). A extremidade livre do cateter de polietileno foi dirigida através do trocater, sob a pele do dorso do animal, até a posição mediocervical posterior onde, por meio de uma nova incisão, foi exteriorizada e fixada por um fio de sutura.

As medidas basais de PAS e Pressão Arterial Média (PAM) foram feitas nos animais acordados, seis horas após a implantação do cateter, através de um transdutor de pressão (1280 C Hewlett Packard) acoplado ao sistema de aquisição de dados (BIOPAC System Mod MPI 00 A, Santa Barbara Califórnia), conectado a um computador para obtenção dos dados. Após as medidas hemodinâmicas, os animais foram sacrificados, e em seguida foram realizados todos os procedimentos para a posterior dosagem protéica e a determinação das atividades enzimáticas.

### 3.5 Obtenção dos órgãos e determinação dos pesos úmido e seco

Os animais foram pesados e, sob anestesia foram sacrificados. O coração e o rim esquerdo foram rapidamente retirados e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em solução salina gelada.

O coração e o rim dos animais foram lavados com solução salina, e dissecados para retirada de gordura e cápsula renal. O coração foi colocado em uma placa de Petri, em banho de gelo e a Câmara Ventricular Esquerda (CVE) (parede ventricular + septo) foi isolada. Os tecidos foram pesados (Balança Owa labor, Alemanha) e, posteriormente, congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, 03 dias. A metade de cada tecido foi utilizada para obtenção do peso seco (48h,  $100^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.6 Homogeneização dos Tecidos

Após o descongelamento da CVE e do rim esquerdo, estes foram imersos em solução salina gelada, para retirada do excesso de sangue e líquidos, colocados em

papel filtro (Whatman) para que o excesso de água fosse absorvido, e rapidamente pesados (Balança Owa labor, Alemanha). Em seguida, o rim esquerdo e a CVE foram colocados em uma placa de Petri em banho de gelo e picados separadamente em pequenos fragmentos com auxílio de um bisturi e uma pinça oftálmica curva. Aproximadamente 350mg do tecido foram homogeneizadas (Potter Elvjhem, Homogeneizador Metrohm E 381, Suíça) em solução gelada de sacarose 0,25M e Heps-Tris 1mM (pH 7,4) na proporção de 1:10 (peso/volume). Os homogenados foram centrifugados (Eppendorf 5804 R) a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e a fração sobrenadante foi armazenada a -20°C para posteriormente ser utilizada para a dosagem das atividades enzimáticas e do conteúdo protéico.

A concentração protéica da fração sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry et al (1951) modificado por Dully e Grieve (1975) e Peterson (1977), utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

Para a realização das dosagens enzimáticas e protéicas, os ensaios foram realizados até uma semana após a obtenção e congelamento dos órgãos, devido à instabilidade das enzimas armazenadas a -20°C. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que a atividade da proteinase multicatalítica se mantém estável por 2 semanas e a atividade das Calpaínas por até 12 semanas.

### 3.7 Determinação das atividades proteolítica e peptidásica

A atividade da Calpaína foi estimada de acordo com o método de Hardy et al.

(1981), modificado por Simonsem et al (1985), utilizando a azocaseína como substrato e realizando 3 ensaios: o primeiro para determinar a atividade total (Tubo1 -  $\text{CaCl}_2$  1mM); o segundo para medir a atividade independente de cálcio (Tubo 2 – EGTA 1mM); o terceiro para obter a atividade total menos Tio $\alpha$ -protease (Tubo 3 -  $\text{CaCl}_2$  1 mM + E-64 0,4mM -inibidor de cisteíno-proteases). A atividade das cálcio-proteases foi obtida pela diferença entre o tubo 1 e o tubo 2 ( $T_1 - T_2$ ) e a atividade da Calpaína pela diferença entre o tubo 1 e o tubo 3 ( $T_1 - T_3$ ). A azocaseína (0,8%) foi preparada em Tris-HCl 50mM (pH 7,4) no dia do ensaio e desnaturada por calor.

As frações sobrenadantes do ventrículo esquerdo (50  $\mu$ l) e do rim esquerdo (10 $\mu$ l), foram incubadas (Banho-maria Fanem Ltda., São Paulo) por 48h a 37°C, em um meio de reação contendo (0,5 ml):

Meio I (atividade total): Tris-HCl 50mM (pH 7,4), azida sódica 10mM,  $\text{CaCl}_2$  100mM e azocaseína 0,8%).

Meio II (atividade independente de cálcio): Tris-HCl 50mM (pH 7,4), azida sódica 10mM, EGTA 10mM e azocaseína 1,8%.

Meio III (cálcio-protease sem tiol): Tris-HCl 50mM (pH 7,4), azida sódica 10mM,  $\text{CaCl}_2$  100mM, E-64 0,4mM e azocaseína 0,8%.

Após o período de incubação, a reação foi finalizada pela adição de 0,5ml de TCA (10%). Posteriormente, o material foi centrifugado (Centrifuga clínica, marca FANEM) a 1.000 x g por 10 minutos e ao sobrenadante foi adicionado 2,5ml de NaOH (1M). Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em 440nm, em espectrocolorímetro (Spectronic 20 , Milton Roy, USA).

A atividade da Calpaína foi expressa em unidades de atividade (U). Uma U de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento na absorvância a 440 nm de 1,0 unidade ao percorrer um caminho óptico de 1cm, nas condições de ensaio descritas acima.

A atividade Peptidásica (Proteasome) foi estimada de acordo com método de Wilk & Orłowski (1983). O ensaio foi realizado empregando como substrato o peptídeo sintético Cbz-Leu-Leu-Glu-2Na 0,4mM em Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) em um volume final de 0,25ml. As frações sobrenadantes do rim esquerdo (10 $\mu$ l) e do ventrículo esquerdo (50 $\mu$ l) foram adicionadas ao meio de reação e incubadas por 15 minutos e 08 horas, respectivamente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com 1,4 volumes de TCA (10%). A  $\beta$ -naftilamina liberada foi determinada por diazotização, adicionando-se ao sobrenadante um volume (0,6ml) de nitrito de sódio 2%, um volume (0,6ml) de sulfato de amônio 0,5% e dois volumes (1,2ml) de naftilenoamônio 0,05%. A atividade da PMC foi expressa em termos de unidades de atividade, onde uma unidade foi definida como:  $\mu$ moles/h/mg de proteína. Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade liberada de 1 $\mu$ Mol de  $\beta$ -naftilamina por hora, a 37°C, em condições de ensaio.

### 3.8 Efeito de inibidores e ativadores enzimáticos

Além dos inibidores acima (EGTA, E-64) utilizados para avaliar as peptidases e proteases dependentes e independentes de cálcio e cisteíno peptidases e proteases, outros inibidores foram empregados para avaliação das atividades. A atividade

enzimática inibida ou ativada foi estimada de acordo com ensaios descritos anteriormente a 37°C em Tris-HCl 50mM (pH 7,4) contendo CaCl<sub>2</sub> 0,8mM tanto na ausência (atividade total) quanto na presença de inibidores de: metalopeptidases (EDTA 0,8mM), Ca<sup>2+</sup> peptidases (EGTA 0,8mM), tiolpeptidases (E-64 0,4mM), e outras (EDTA + E-64) possivelmente o Proteasome. Outras atividades representam a atividade residual obtida após a inibição das metalo e tiol-proteases. Nos ensaios das peptidases (Proteasome) o inibidor de Proteasome PSI (N-Cbz-Ile-Glu(o-t-butyl)-Ala-Leucinal) também foi utilizado, preparado em DMSO, em uma concentração de 10mM.

Os mesmos inibidores foram utilizados nos ensaios de proteases (Calpaínas). Outros compostos, como captopril (1,0mM), além dos reagentes ditioneitol (DTT 0,8mM); (CPI-1, inibidor de tiolproteases, principalmente a Calpaína I - 0,4mM) e ácido p-cloromercúrio-fenilsulfônico (CMFSF 0,8mM) foram empregados para auxiliar a análise. O DTT é um composto que ativa cisteíno-proteinase, mas inativa metalo-proteinase; o CPI-1 e o CMFSF são compostos inibidores de cisteíno-proteinase. Cada composto foi adicionado à mistura, na concentração final indicada, sem pré-incubação com a enzima. Os experimentos foram repetidos de 3 a 5 vezes em triplicatas, onde os valores de atividade enzimática foram representados como percentuais (%) da atividade total.

### 3.9. EQUIPAMENTOS

1. Biopac System Mod MPI 00A, Santa Barbara Califórnia – registro de parâmetros hemodinâmicos
2. II TC Life Science, USA Mod 29 Pulse Amplifier – pleitismografo

3. PE – 50 e PE 10 (Clay Adams, USA) – catéter
4. 1280 C Hewlett Packard - transdutor de pressão
5. Balança Owa labor, Alemanha
6. Whatman - papel filtro
7. Potter – Elvjhem
8. Metrohm E 381, Suíça – Homogeneizador
9. Eppendorf 5804 R – Centrifuga
10. Fanem Ltda., São Paulo - Banho-Maria
11. Spectrocolorímetro - Spectronic 20 , Milton Roy, USA

### 3.10. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica e todas as soluções foram preparadas em água purificada Mili Q exceto o N-acetil-Leu-Leu-NorLeucinal (CPI-1) e p-cloromercúriofenilsulfônico (CMFSF) que foram dissolvidos em DMSO, o mesmo utilizado na preparação do substrato (Cbz-Leu-Leu-Glu-2NA). A água Milli-Q tem resistividade normal 18,2 megahom/cm até 10 megahom/cm..

O etanol, éter etílico, reagente fenólico Folin-Ciocalteu, cloreto de naftilenediamônio, hidróxido de sódio, sulfamato de cobre, tartarato de sódio e potássio foram obtidos da Merk, Darmstad, Alemanha.

O ácido tricloroacético (TCA), azida de sódio, azocazeína, N-acetil-Leu-Leu-NorLeucinal (CPI-1), p-cloromercúriofenilsulfônico (CMFSF), ditioneitol (DTT), N-Cbz-Ile-Glu(o-t-butyl)-Ala-Leucinal (PSI), Cbz-Leu-Leu-Glu-2Na, Captopril, cisteína, EGTA (etileno glicol-bis ( $\beta$ -amino etil éter) N',N',N', ácido tetracético), nitrito de sódio, sacarose, sulfato de amônio, soro albumina bovina (BSA) e tris-hidroxi metil aminometano, foram da Sigma Chemical Co., St Louis, USA.

### 3.11 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise estatística das variáveis estudadas, foi aplicado o teste tstudent para comparação entre as linhagens e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias, realizado pelo método de Tukey, para a comparação do efeito do Captopril nos grupos experimentais. Os níveis de significância foram fixados em 1% e 5% ( $P < 0.01$  e  $P < 0.05$ )

## 4. Resultados

Inicialmente, foram determinados o peso úmido e o conteúdo protéico, tanto para a Câmara Ventricular Esquerda (CVE) como para o rim esquerdo, obtidos dos animais Wistar e SHR. Pode-se observar o aumento de 44% do peso úmido na CVE para os animais SHR, quando comparados aos animais Wistar (Controle) (Tabela 1). Este aumento no peso úmido foi acompanhado pelo aumento de 35% do conteúdo protéico no tecido, indicando a hipertrofia da CVE nos animais SHR. Para o rim esquerdo não foram encontradas alterações significativas tanto para o peso úmido, como para o conteúdo protéico (Tabela 02).

**Tabela 02. Peso úmido e conteúdo protéico dos tecidos de ratos Wistar e SHR.**

Tecido	Peso úmido dos tecidos			Conteúdo protéico		
	mg	mg/g	%	mg	mg/órgão	%
<b>Rim</b>						
Wistar	1107 ± 52	3,21 ± 0,08	100	9,1 ± 0,5	97 ± 5	100
SHR	1055 ± 31	3,24 ± 0,03	101	9,2 ± 0,4	97 ± 7	100
<b>CVE</b>						
Wistar	666 ± 15	1,98 ± 0,04	100	5,6 ± 0,4	37 ± 4	100
SHR	961 ± 37*	2,86 ± 0,05*	144	5,5 ± 0,1	50 ± 2*	135

Os valores de peso úmido foram calculados dividindo o peso do órgão pelo peso total do animal. O conteúdo protéico foi determinado dividindo o valor da dosagem de proteínas totais do tecido pelo peso do órgão. \* P < 0,01 comparado com o grupo Wistar (n=8).

Uma vez confirmado o desenvolvimento da hipertrofia para a CVE, foi determinado o perfil das peptidases que hidrolisam o peptídeo sintético Cbz-Leu-Leu-Glu-2NA, tanto em homogenado obtido a partir da Câmara Ventricular Esquerda (CVE), como a partir do rim esquerdo (Tabela 03).

**Tabela 03. Classificação das peptidases que hidrolisam o peptídeo Cbz-Leu-Leu-Glu-2NA.**

Atividade	Atividade sobre Cbz-Leu-Leu-Glu-2NA			
	Wistar		SHR	
	mU	%	mU	%
<b>RIM</b>				
Total	43520 ± 2102	100%	47872 ± 2323	100%
Metalopeptidase <sup>1</sup>	30464 ± 1500	70% <sup>70%</sup>	33510 ± 2393	70% <sup>70%</sup>
Tiolpeptidase	8704 ± 500	20%	9574 ± 465	20%
Proteasome	4352 ± 284	10%	4787 ± 460	10%
<b>CVE</b>				
Total	500 ± 30	100%	600 ± 85	100%
Metalopeptidase <sup>1</sup>	150 ± 10	75% <sup>75%</sup>	180 ± 12	30% <sup>30%</sup>
Tiolpeptidase <sup>2</sup>	325 ± 23	57% <sup>32%</sup>	390 ± 32	65% <sup>38%</sup>
Proteasome	50 ± 5	10%	60 ± 6	10%

<sup>1</sup> Ca<sup>+2</sup>-peptidase: diferença entre a atividade total e a atividade Ca<sup>+2</sup>-independente.

<sup>2</sup> Tiolmetalopeptidases: diferença entre a atividade total e a atividade determinada na presença de EDTA e E-64.

A seta indica o local de hidrólise revelado pela reação de diazotização do produto 2-NA liberado.

\* P < 0,05 comparado com o grupo Wistar (n=10).

Pode-se observar que a maior parte da atividade peptidásica encontrada (~70%) pode ser atribuída à atividade das metalopeptidases dependentes de Ca<sup>2+</sup>, tanto no Rim

quanto na CVE. Curiosamente, foi observada uma grande redução da atividade das metalopeptidases na CVE de animais hipertensos. Esta diminuição também foi acompanhada pela diminuição da atividade peptidásica dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabela 2).

Pode-se notar que as atividades peptidásicas foram maiores no rim do que na CVE. Foi observado que, no rim a atividade das metalopeptidases foi maior que a atividade das tiolpeptidases, enquanto que na CVE foi encontrada maior participação das tiolpeptidases em relação as metalopeptidases. A atividade referente ao Proteasome não foi modificada devido ao desenvolvimento da hipertensão, tanto no rim quanto na CVE.

A atividade das proteases que hidrolisam azocazeína também foi determinada em homogenado obtido, tanto a partir da CVE, quanto do rim esquerdo (Tabela 04). Pode-se observar que a atividade proteolítica determinada no rim foi bem maior do que na CVE. Pode-se observar que a fração da atividade referente à atividade da Calpaína foi maior na CVE do que no rim esquerdo, representando de 75 a 90% da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente na CVE, enquanto que no rim esquerdo representou de 40 a 50%. A atividade proteolítica determinada para os animais SHR mostrou uma redução significativa da atividade da Calpaína, sendo observada uma queda de 29% no rim esquerdo e 95% na CVE quando comparado com os animais Controle.

**Tabela 04. Classificação das proteases que hidrolisam azocazeína com base no efeito de inibidores enzimáticos no rato Wistar e SHR.**

Atividade	Atividade sobre Azocazeína				
	mU	Wistar		SHR	
		%	mU	%	
<b>RIM</b>					
Total	4400 ± 900	100%	3425 ± 637	100%	
Metalopeptidase <sup>1,2</sup>	3124 ± 605	71% <sup>70%, 30%</sup>	225 ± 370	65% <sup>59%, 30%</sup>	
Tiolpeptidase <sup>2</sup>	3120 ± 212	71% <sup>35%</sup>	1027 ± 120	30% <sup>30%</sup>	
Outras	375 ± 85	<10%	32 ± 8	<10%	
<b>CVE</b>					
Total	600 ± 96	100%	320 ± 60*	100%	
Metalopeptidase <sup>1,2</sup>	420 ± 70	70% <sup>70%, 63%</sup>	120 ± 10*	40% <sup>40%, 30%*</sup>	
Tiolpeptidase <sup>2</sup>	380 ± 72	63% <sup>63%</sup>	200 ± 8*	63% <sup>30%*</sup>	
Outras	100 ± 16	18%	60 ± 12	20%	

<sup>1</sup> Ca<sup>+2</sup>-peptidase: diferença entre a atividade total e a atividade Ca<sup>+2</sup>-independente.

<sup>2</sup> Calpaína: diferença entre as atividades Ca<sup>+2</sup>-dependentes determinadas na ausência e na presença de E-64.

Outras: referente à atividade residual, determinada na presença dos inibidores de metalo (EDTA) e tiolpeptidases (p-CMFA).

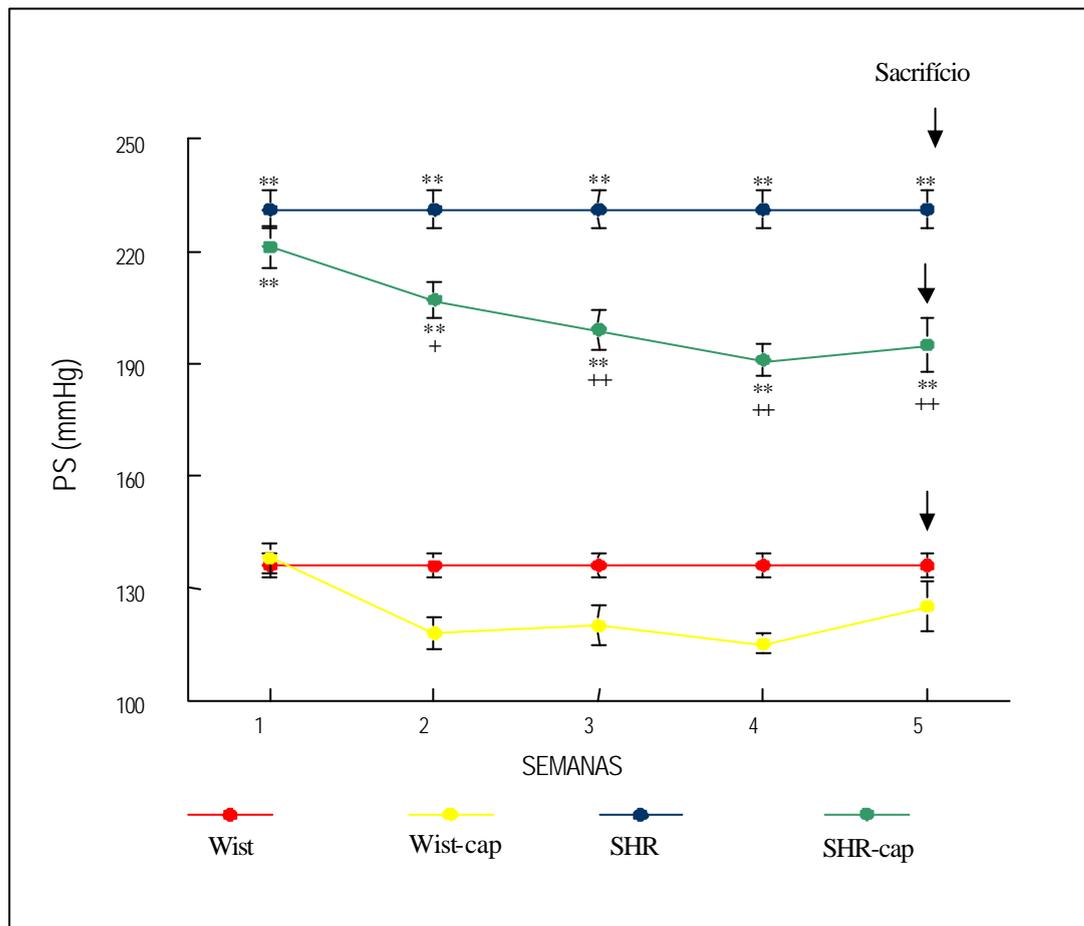
\* P < 0.05 comparado com o grupo Wistar (n=10).

O efeito do tratamento com Captopril durante 5 semanas sobre a Pressão Arterial Sitólica (PAS) foi determinado tanto em animais Controle, quanto em animais SHR (Figura 06).

Pode-se observar a redução progressiva da PAS em animais SHR logo após o início do tratamento com Captopril. Também foi observada a redução da PAS em

animais Controle, entretanto esta redução não se mostrou significativa após a análise estatística. O tratamento com Captopril durante 5 semanas não foi capaz de reduzir a PAS nos animais SHR até os mesmos níveis encontrados nos animais Controle.

**Figura 06. Efeito do tratamento com Captopril sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar e SHR.**



Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão (n=8).

\*\* P < 0,01 comparado com o grupo Wistar.

++ P < 0,01 quando comparado ao grupo SHR.

**Tabela 05. Efeito do tratamento com Captopril sobre o peso úmido dos tecidos de ratos Wistar e SHR.**

Animais	Peso úmido dos tecidos		
	mg	mg/g	%
<b>RIM</b>			
Wistar	1351 ± 55	3,3 ± 0,08	100
Wistar-Cap	1259 ± 67	3,2 ± 0,01	97
SHR	1016 ± 34	3,1 ± 0,03	94
SHR-Cap	960 ± 25	3,2 ± 0,01	97
<b>CVE</b>			
Wistar	784 ± 20	1,98 ± 0,03	100
Wistar-Cap	723 ± 20	1,90 ± 0,09	96
SHR	842 ± 20*	2,86 ± 0,01*	144
SHR-Cap	754 ± 19	2,54 ± 0,07	128

Os valores de peso úmido foram calculados dividindo o peso do órgão pelo peso total do animal.

Os valores foram representados como a média ± o erro padrão (n=8).

\* P < 0,01 comparado com o grupo Wistar.

Após a observação da queda na PAS em decorrência do tratamento com Captopril, foi estudado o efeito deste sobre o desenvolvimento da hipertrofia na CVE em animais SHR (tabela 05). Pode-se observar uma redução do peso úmido na CVE em animais SHR após o tratamento de 5 semanas com Captopril, entretanto este tratamento não foi capaz de reverter o grau de hipertrofia observado nos animais hipertensos. Não foi observada qualquer alteração no peso úmido para o rim esquerdo dos animais SHR em relação ao Controle.

**Tabela 06. Efeito do tratamento de 5 semanas com Captopril sobre o peso corporal dos ratos Wistar e SHR.**

Animais	Peso corporal (g)		
	Inicial	Final	$\Delta$ Peso corporal
Wistar	398 $\pm$ 13	413 $\pm$ 14	16 $\pm$ 4
Wistar-Cap	378 $\pm$ 14	387 $\pm$ 15	9 $\pm$ 4
SHR	314 $\pm$ 8 <sup>**</sup>	333 $\pm$ 15 <sup>**</sup>	19 $\pm$ 5
SHR-Cap	299 $\pm$ 6 <sup>++</sup>	297 $\pm$ 6	2 $\pm$ 1

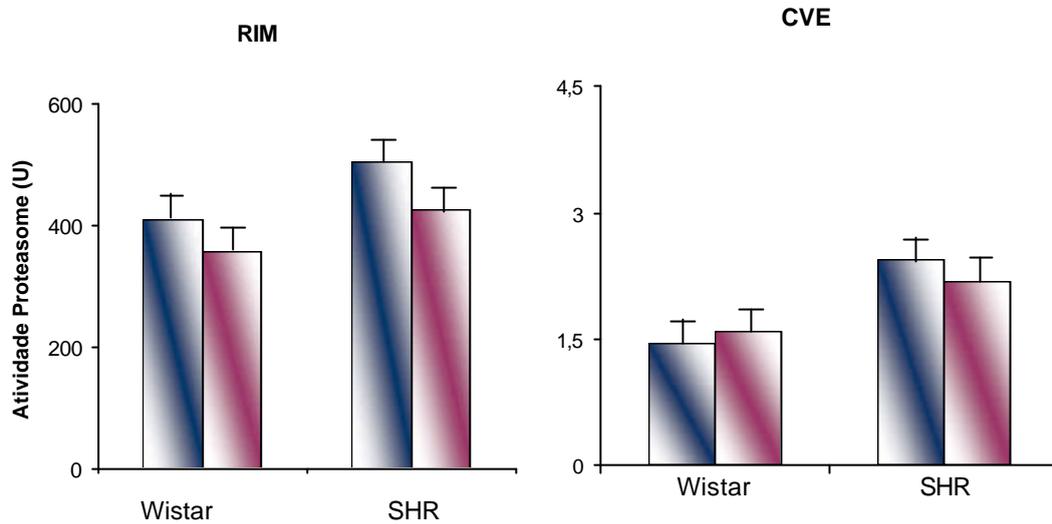
Os valores estão representados como a média  $\pm$  o erro padrão (n=8).

<sup>\*\*</sup> P < 0,01: comparado com o grupo Wistar.

<sup>++</sup> P < 0,01 quando comparado ao grupo SHR.

Foi observada uma redução significativa do peso corporal dos animais SHR (~20%) em relação aos animais do grupo Controle (tabela 06). O tratamento com Captopril reduziu o peso corporal dos animais (~5%), tanto no grupo Controle, como no grupo SHR. Os animais tratados com Captopril apresentaram menor ganho de peso após as 5 semanas de tratamento.

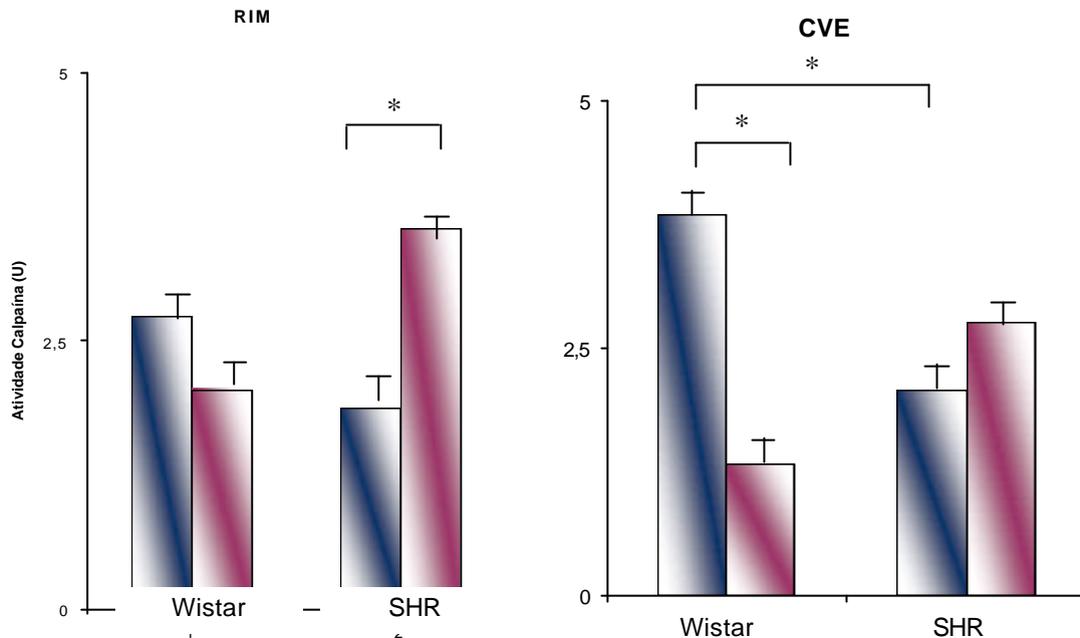
**Figura 07. Atividade do Proteasome obtida no rim esquerdo e na CVE após o tratamento de 5 semanas com Captopril.**



As barras azuis e as barras vermelhas representam os animais não tratados e tratados com Captopril, respectivamente. Os resultados foram expressos em (U). Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade liberada de 1  $\mu\text{Mol}$  de  $\beta$ -naftilamina por hora, a 37°C, em condições de ensaio. Os dados apresentam a média  $\pm$  EPM.

A atividade proteasômica, mostrou-se mais elevada no tecido renal, quando comparado a atividade no tecido da câmara ventricular esquerda, tanto em animais Wistar, quanto em SHR (figura 7).

**Figura 08. Atividade da Calpaína obtida no rim esquerdo e na CVE após o tratamento de 5 semanas com Captopril.**



As barras azuis e as barras vermelhas representam os animais não tratados e tratados com Captopril, respectivamente. Os resultados foram expressos em (U). A atividade da Calpaína foi expressa em unidades de atividade (U). Os dados apresentam a média  $\pm$  EPM.

\*  $P < 0,01$ : comparado com o grupo Controle.

Pode-se observar que a atividade da Calpaína foi diminuída após o tratamento com captopril apenas nos animais Wistar (normotensos), sendo que atingem valores significativos somente no tecido cardíaco (figura 8). Foi observado no rim o aumento da atividade da Calpaína após o tratamento com captopril, apenas nos animais SHR. Pode-se notar a inibição da atividade da Calpaína na CVE em animais SHR, quando comparados com os animais Wistar. Os dados também demonstram que a atividade da Calpaína foi aumentada nos animais hipertensos após o tratamento com captopril.

## 5. Discussão

De acordo com o Centro Nacional para Estatísticas de Saúde, aproximadamente 30% de adultos americanos (em torno de 50 milhões de pessoas) apresentam hipertensão. Além da hipertensão crônica, ocorre um remodelando patológico, produzindo uma hipertrofia cardíaca, como resultado do aumento do tamanho das fibras e do conteúdo de proteínas, podendo conduzir a uma parada cardíaca (WAKATSUKI et al., 2004). As mudanças nas taxas relativas de síntese de proteína das miofibrilas e o desequilíbrio entre, a síntese e a degradação protéica, parecem estar relacionados ao mecanismo de hipertrofia cardíaca.

Em nossos resultados foi observada uma redução do peso (tab. 05) dos animais SHR em relação aos animais Controle (Wistar). Apesar de não ser uma diferença estatisticamente significativa, esta observação está de acordo com o observado por outros autores. Sen et al (1974) demonstraram que os animais SHR começam a atrasar o seu crescimento ao atingir um peso corporal de aproximadamente 200g, quando comparados aos animais Wistar. Esta diferença também foi relatada por outros autores (OKAMOTO, 1969; TRIPPODO ; FROHLICH, 1981).

Embora o animal SHR seja considerado um excelente modelo de hipertensão, em relação ao animal Wistar são descritas diferenças quanto ao peso corporal. Usualmente, o animal SHR apresenta menor peso corporal do que os animais normotensos (Controle) (TRIPPODO ; FROHLICH, 1981), enquanto que os pacientes humanos hipertensos, geralmente, são mais pesados do que os indivíduos com

pressão normal (CHIANG; PERLMAN; EPSTEIN, 1969). Alguns estudos realizados em humanos indicam uma forte associação entre o baixo peso no nascimento e o desenvolvimento da hipertensão na infância e na vida adulta (CHERTOW ; BRENER, 1995).

Provavelmente, a redução do peso corporal, observado em animais SHR, durante o seu desenvolvimento seja uma característica genética selecionada juntamente com genes para a pressão arterial elevada, durante os cruzamentos para desenvolver a linhagem SHR.

Foi observado o aumento significativo do peso úmido da Câmara Ventricular Esquerda (CVE) em animais SHR (tab. 02). A bibliografia disponível sugere que o ganho de peso ventricular em animais jovens possa estar relacionado ao aumento, tanto do número, quanto do tamanho das células; enquanto que após 48 dias de idade, o ganho de peso deve-se exclusivamente à hipertrofia das fibras (ENESCO ; LEBLOND, 1962). Spirito et al (1991) sugerem que o crescimento do coração seja uma consequência, principalmente, do aumento no tamanho dos miócitos. Este efeito tem sido sugerido repetidamente na literatura disponível (ZACK, 1973; SEN et al, 1976).

Obtendo a relação entre o peso úmido da CVE e o peso corporal do animal (tab. 02), verificamos um aumento significativo para os animais SHR quando comparados aos animais Wistar. Esta hipertrofia ventricular pode ser uma consequência do desenvolvimento da hipertensão em animais SHR. O aumento da relação entre o peso úmido da CVE e o peso corporal dos animais SHR, tem sido demonstrado, tanto em animais adultos (200-250g), quanto em animais jovens (50-100g) que ainda não atingiram o período hipertensivo (SEM et al., 1987). Clubb et al. (1987) demonstraram

um aumento do peso do coração em animais SHR em relação aos animais Wistar ( $34,7 \pm 0,8$  mg vs  $29,8 \pm 0,7$ ;  $P < 0,05$ ) no nascimento.

Uma vez que ocorre a elevação da pressão sangüínea durante as primeiras semanas do período pós-natal, o aumento da carga hemodinâmica pode resultar em aceleração da divisão celular e o aumento no tamanho dos miócitos. De acordo com Tucker (1990) a hipertrofia cardíaca em animais SHR parece ser determinada geneticamente. Muitos autores têm sugerido que o animal SHR já nasce hipertenso (SMITH et al, 1984, GRAY, 1984, CLUBB et al, 1987).

Poucos estudos têm sido realizados em relação ao peso do rim em animais SHR. Um dos primeiros estudos sobre o crescimento do rim normal em ratos foi realizado por Winick e Noble (1965). Estes autores demonstraram que o crescimento do rim é um processo dual caracterizado por uma fase inicial de crescimento com multiplicação celular e uma fase tardia (aproximadamente 40 dias de idade) marcada por aumento do tamanho celular. Em ratos, a multiplicação celular do rim se mantém até a idade de 80-90 dias (CELSI et al., 1979).

Em nosso trabalho foi verificado que o peso úmido do rim do animal SHR está menor quando comparado como o animal Wistar, diminuindo ainda mais com o tratamento com o anti-hipertensivo Captopril (tab 05). Esta diminuição pode estar relacionada aos baixos índices de peso corporal verificados no animal SHR, pois quando foi feita a normalização, ou seja, a relação peso úmido do rim/peso corporal, não verificamos qualquer alteração.

Nossos resultados indicam a presença de uma enzima tiol-metaloproteinase, a Calpaína (tab. 04). Em animais Wistar, a atividade desta enzima representa 35% da

atividade total presente no rim e 70% na CVE. Portanto, o perfil da atividade proteolítica nos dois tecidos parece ser semelhante, diferindo quanto à proporção das diferentes enzimas.

A atividade da Calpaína (tab. 04) foi reduzida pela metade na CVE do animal SHR atingindo, assim, os mesmos níveis encontrados no rim. Esta redução da atividade da Calpaína pode indicar que esta enzima desempenhe um papel importante no mecanismo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca em animais SHR.

Poucos trabalhos têm explorado o papel da Calpaína na hipertensão arterial. Alguns estudos têm sugerido que a Calpaína além de ser uma enzima proteolítica, pode também agir como formadora de peptídeo vasoativo, como a bradicinina (VANHOULT et al., 1995). Contudo não se sabe, com certeza, qual o papel que estas enzimas poderiam exercer sobre os tecidos e órgãos de animais hipertensos.

O envolvimento da atividade de protease/peptidase (tab. 03) na hipertrofia cardíaca foi sugerido por diversos autores (ARTHUR ; BELCASTRO, 1997; STELLA et al., 1997; CICILINI et al., 1995; POLLACK et al., 2003; MEINERS et al., 2004). Porém, o mecanismo específico pelo qual a atividade das proteases/peptidases está envolvida na hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão ainda não está claro. Nossos resultados demonstram que há diminuição na atividade da Calpaína nos animais SHR. Não obstante a atividade da protease não foi alterada, sugerindo que o complexo multicatalítico (Proteasome) não está envolvido no mecanismo da hipertrofia em ratos SHR.

Recentemente, o envolvimento do sistema peptídico ubiquitina-Proteasome no remodelamento no tecido cardíaco foi sugerido em ratos espontaneamente hipertensos

(SHR). Meiners et al. (2004) mostrou uma significativa diminuição do total de metaloproteases e colágeno no tecido cardíaco de ratos SHR em tratamentos sistêmicos com inibidores de Proteasome (MG132), reduzindo assim, em até 38% as fibroses cardíacas. Porém, os mecanismos específicos pelos quais a hipertrofia cardíaca dos animais SHR pode estar relacionada à atividade do Proteasome ainda não estão claros.

Foi observado em nosso estudo que o tratamento com captopril (35 mg/Kg/dia), durante 5 semanas, diminuiu o peso corporal e o peso do tecido dos ratos Wistar e SHR (tab. 06). Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que outros autores também verificaram uma diminuição do peso visceral de animais tratados com captopril (LANE, 1995; MILANEZ, 1995). Entretanto, com os dados que dispomos, não podemos explicar a relação entre o uso de captopril e tais reduções renais. Podemos especular que o fato da Angiotensina II (All) ser considerada um fator de crescimento, especialmente, durante o desenvolvimento do rim, possa indicar que a inibição da formação da All, através do uso do inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), promova a atrofia renal verificada nos animais tratados. De fato, vários estudos demonstram que a All, é capaz de estimular a hipertrofia do músculo liso vascular, mesangial e de células tubulares proximais (ICHIKAWA et al, 1991; WOLF ; NIELSON, 1993).

O envolvimento do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) na gênese da hipertensão foi demonstrado por vários autores no modelo SHR (BAGBY et al., 1979; MACDONALD et al., 1980; UNGER et al., 1981). O tratamento precoce com inibidores de ECA promove uma redução na pressão sangüínea e na hipertrofia cardíaca (WU et

al., 1993; HARRAP et al., 1990). Nagano et al. (1991) relataram que o tratamento com inibidores de ECA reduz tanto a pressão sangüínea como também o peso ventricular esquerdo.

Nossos resultados demonstram a redução da pressão sangüínea após o tratamento com captopril (fig. 06). Verificamos, também, que o tratamento com captopril foi eficiente para a redução do índice de peso úmido do ventrículo esquerdo/peso corporal. Vários estudos têm sugerido que a ação dos inibidores de ECA sobre o SRA seja um mecanismo para a regressão da hipertrofia ventricular esquerda (NAKASHIMA et al, 1984; NAGANO et al, 1991; FUKUI et al, 1989). A Angiotensina II é um peptídeo biologicamente ativo do SRA, sendo capaz de estimular a síntese de proteína nos miócitos cardíacos tendo um papel fundamental na hipertrofia ventricular esquerda (KATO et al, 1989). Porém, a hipertrofia não foi revertida pelo tratamento oral crônico com captopril. O fato do captopril não poder reverter a hipertrofia em nossos experimentos pode estar relacionado à fase de desenvolvimento dos animais durante o tratamento. Wu et al. (1993) e Harrap et al. (1990) demonstraram uma redução da pressão sangüínea e da hipertrofia cardíaca em filhotes de cachorro e ratos SHR jovens, respectivamente. Nossos experimentos foram realizados com animais SHR adultos. Quanto à hipertrofia, esta pode estar correlacionada à atividade enzimática estudada. Na realidade, nossos resultados indicam que a atividade da Calpaína foi diminuída no grupo SHR. É possível que a hipertrofia ventricular esquerda associada à pressão arterial aumentada, observada em animais SHR, pode estar relacionada à diminuição da atividade da Calpaína e o tratamento com captopril prevenindo, assim, as alterações advindas da hipertensão em períodos maiores de tratamento.

## 6. Conclusão

A hipertensão arterial e o captopril parecem afetar a atividade das duas principais enzimas proteolíticas citosólicas; cuja função parece estar relacionada á regulação do conteúdo e a renovação celular das proteínas contráteis e do citoesqueleto (Calpaína) e das demais proteínas citosólicas (Proteasome). Entretanto, neste trabalho o tratamento com Captopril por 5 semanas não foi efetivo em reduzir a hipertrofia cardíaca. A hipertrofia cardíaca está associada ao aumento da pressão arterial e pode estar relacionada com a diminuição da atividade da Calpaína. Portanto, é possível que o tratamento com o captopril por 5 semanas não seja suficiente para reduzir a hipertrofia desde que não consiga restabelecer a atividade das peptidases no SHR.

Em conjunto, os presentes dados ressaltam a influência da hipertensão arterial sobre a atividade das peptidases e proteases neutras citoplasmáticas e levantam a possibilidade de que alguns medicamentos, como o captopril, possam vir a regular a hipertensão em conjunto com a regulação da atividade das peptidases.

## Referências

ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treatment Reviews**. v. 29, (Suppl. 1), p. 3–9, 2003.

AKIBA, Y.; YAMAGUCHI, N.; AMANO, H.; FUJII, T.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, K. Role of nitric oxide in control of blood pressure in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 1, (Suppl.1), p.S142-S143, 1995;.

ALMEIDA, F.A. Perspectivas futuras no tratamento da hipertensão arterial, **Revista SOCESP** v. 10, n. 1, p. 1-8, jan./fev.2000.

RIBEIRO, B. A.; KHLMANN, O. Jr.; TAVARES, A. Definição, classificação e etiopatogenia da hipertensão arterial, **Revista de hipertensão arterial**., p.23-29, 1997.

GAVAIN D. A.; BELCASTRO, A. N. A calcium stimulated cysteine protease involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. **Mol Cell Biochem**. v.176, n.1-2, p. 241-248(8), November 1997.

BAGBY, S.P.; McDONALD, W.J.; MASS, R.D. Serial renin-ANG studies in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal-to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension. **Hypertension**, v.1, p. 347-354, 1979.

BARRET, A. J. **Enzyme Regulation and mechanism of action**. Oxford : Pergamon, 1980. p.307.

BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZÜHL, F.; SEEMÜLLER, E. The Proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell**., n.92, p.367-380, 1998.

BEM-ISLAY, D.; SALITERNICK, R.; WELNER, A. Separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensitivity to DOCA-salt hypertension. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**. v 28, n. 11, Nov. 1972.

BEZAK, M. The effect of the different degrees on subdiaphragmatic aortic constriction on heart weight and blood pressure of normal and hypophysectomized rats. **Can. J. Med. Sci.**, n.33, p.985-994, 1995.

BISSOLI, N. S.; MOYSES, M. R.; VASQUEZ, E. C.; CABRAL, A. M. Captopril prevents ventricular hypertrophy in sinoartical deservated rats. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, n.24, p.191-194, 1991.

BROWN, A. L. Morphologic factors in cardiac hypertrophy. In: ALPERT, N.R. (Ed.) **Cardiac Hypertrophy**. New York: Academic Press. 1971. p. 11-17.

VASQUEZ, E. C.; MAUAD, A. M. H.; VASQUEZ, E. C.; MAUAD, H. Hipertensão Experimental: Aspectos Fisiopatológicos e Técnicas de Produção. In: AMODEO, C. L.; GALVÃO, E.; VASQUEZ, E. C. (Org.). **Hipertensão Arterial**. São Paulo, SP: Sarvier, 1997.p. 61-71.

CARAFOLI, E.; MOLINARI, M.; Calpain: A protease in search of a function. **Biochem. Biophys. Res. Common.**, n.247, p.193-203, 1998.

CELSI, G.; JAKOBSON, B.; APERITA, A. Influence of age on compensatory renal: Growth in rats. **Pediatric Research**, v. 20, 347-350, 1986.

CHAKRABORTY, R.; SCHULL, W. J.; HARBURG, E; SCHORK, M. A.; ROEPER, P. Heredity stress and blood pressure; a family set method. V-Heritability estimates. **J. Chronic. Dis.** n. 30, v.10, p.683-99, 1977.

CHERLOW, G. M.; BRENNER, B. M. Low birth weight as a risk factor for juvenile and adult hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**. p.89-97, 1995.

CHIANG, B. N.; PERLMAN, L. V.; EPSTEIN, F. H. Overweight and hypertension: A review. **Circulation.**, v.39, p.403-421, 1969.

CHRISTESEN, G. Release of atrial natriuretic factor. **Scand J. Clin Lab Invest**, v.53, p.91-100, 1993.

CRABOS, M.; COSTE, P.; PACCALIN, M.; TARIOSSE, L.; DARET, D.; BESSE. D.; BONORON-ADELE, S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.29, p.55-65, 1997.

CARRETERO, A. O.; SCICLI, A. G. Local hormonal factor (Intracrine, Autocrine, and Paracrine) in hypertension. **Hypertension**. v.18,3 (Suppl) p.58-69, 1991.

CLUBB, F.J.; BELL, P. D.; KRISEMAN, J. D.; SANFORD, P. B. Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. **Lab. Invest.**, v. 2, n.56, p.189-197, 1987.

CICILINI, M. A.; RESENDE, M. M.; BISSOLI, N. S.; VASQUEZ, E. C.; CABRAL, A. M. Calpain activity of hypertrophic hearts from hypertensive rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.28, p.621-625, 1995.

COHN, S. H.; VARTSKY, D.; YASUMURA, S.; VASWANI, A. N.; ELLIS, K. J. Indexes of body cell mass: nitrogen versus potassium. **Am. J. Physiol.** n.244, p.305-310, 1983.

CORVOL, P.; MICHAUD, A.; SOUBRIER, F.; WILLIAMS, T. A. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. **J. Hypertens.**, v.13, n.3, p.3-10, 1995.

COWLEY, A. W. Jr. Long-term control of blood pressure. **Physiol. Rev.** n.72, p.231-300, 1992.

CUERVO, A. M.; PALMER, A.; RIVETT, A. J.; KNECHT, E. Degradation of proteasome by lysosomes in rat liver. **European Journal Biochemistry**., n.227, p.729-800, 1994.

DAHL, L. K.; HEINE, M.; TASSINARI, L. Role of genetic factor in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. **Nature.**, p.194-480, 1962.

DJABALLAH, H.; ROWE, A. J.; HARDING, S. E.; RIVETT, A. J. The multicatalytic proteinase complex (Proteasome): structure and conformational changes associated with change in proteolytic activity. **Biochemical Journal.**, n.292, p.857-862, 1993.

II DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca **Arq. Bras. Cardiol.** v. 79, Supl. IV, 2002. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/#2002>> Acesso em: nov. 2003.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Arq. Bras. Cardiol.** v.82 supl.4 São Paulo mar. 2004. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/publicacoes/ivdiretriz/default.asp>> Acesso em: nov. 2004.

DESHPANDE, V. D.; GOUST, J.; CHAKRABARTI, A. K.; BARBOSA, E.; HOGAN, E. L.; BANIK, N. L. Calpain expression in lymphoid cells. Increase mRNA and protein levels after cell activation. **The Journal of Biological Chemistry.**, V.70, n.6, p.2497-2505, 1995.

DORER, K. Jr.; LENTZ, K. E.; LEVINE, M.; SKEGGS, L. T. Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. **Cir. Res.**, v.31, p.356-366, 1972.

DORER KAHN JR, LENTZ KE, LEVINE M, SKEGGS LT. Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme. **Cir. Res.**, v.34, p.824-827, 1974.

DeMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. The Proteasome, a novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v.32, p.22123-22126, 1999.

ENESCO, M.; LEBLOND, G. P. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. **Journal Embryology Experimental Morphology.**, v.10, p.530-562, 1962.

ELCE, J. S.; DAVIES, P. L.; HEGADORN, C.; MAURICE, D. H.; ARTHUR, J. S. C. The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. **Biochem. J.**, v. 15, n.326, p.31-38, 1997.

FERRARIO, C. M.; JAISWAL, N.; YAMAMOTO, K.; DIZ, D. I.; SHIAVONE, M. T. Hypertensive mechanisms and converting enzyme inhibitors. **Clinical Cardiology.** n.64, v.1, p.53-68, 1991.

FERREIRA, C.; POVOA, R.; COSTA, E. A.; LUNA, FILHO, B.; FERREIRA FILHO, C.; MURAD, M.; FERREIRA, M. Enalaprilat in the prevention of left ventricular hypertrophy induced by isoproterenol. **Arg. Bras. Cardiol.**, v.69, p.35-39, 1997.

FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E.; CHEN, W. E.; YUAN, H. M. E.; WILK, S. A novel chymotrypsin-like component of the multicatalytic proteinase complex optimally active at acid pH. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, n.317, p.69-78, 1995.

FRANCISCHETTI, E. A.; FAGUNDES, E. V. G. A.; FRANÇA, M. F. Endotélio vascular. Um importante Sistema Cibernético Vaso-Modulador e Modulador cuja Disfunção Participa no processo Hipertensivo. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia.**, v.64, p.54-68, 1995.

FROLHLICH, E. D. Clinical physiological correlations in the development of hypertensive Herat disease. **Circulation Research.**, v.44, p.446-455, 1977.

FOLKOW, B.; GRIMBY, G.; THULESIUS, O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. **Acta Physiol Scand.** v.15, n.44, p.255-72, 1958.

FUKUI, K.; IWAO, H.; NAKAMURA, A.; YAMAMOTO, A.; TAMAKI, T.; SHEJI, T.; KIMURA, S.; AKI, Y.; HASUI, K.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S.; ABE, Y. Captopril and Hydralazine supress atrial natriuretic peptide (ANP) gene expression in the ventricles of spontaneously hipertensive rat. **Biochemical and biophysical Research Communications.**, n.160, v., p.310-316, 1989.

GARLICK, P. J. Protein synthesis in skeletal muscle. **Nature.**, p.223- 261, 1969.

GIL-LONG, J.; FERNANDEZ-GRANDAL, D.; ALVAREZ, M.; SIERA, M.; ORALLO, F. Study of in vivo and vitro resting vasodilator nitric oxide tone in normotensive and genetically hypertensive rats. **Eur. J. Pharmacol.**, n.310, p.175-183, 1996.

GLOTZER, M.; MURRAY, A. W.; KRISCHNER, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin patway. **Nature.**, n.349, p.132-138, 1991.

GUIDI, E.; MENGHETTI, D.; MILANI, S.; MONTAGNINO, G.; PALAZZI, P.; BIANCHI, G. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follw-up of recipients grafted with kidney coming from donors with or without hypertension in their families. **Journal Society Nephrology.**, v.7, n.8, p.1131-1138, 1996.

GOLDBERG, A.L.; JOHN, A. C. S. T. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. **Ann. Rev. Biochem.**, n.46, p.747, 1976.

GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L Proteolysis, Proteasomes and Antigem Presentation Review; article, **Nature.**, p.357-379, 1992.

GONZÁLEZ, J. D.; LLINÁS, M. T.; NAVA, E.; GHIADONI, L.; SALAZAR, F. J. Role of nitric oxide and prostaglandis in the long-term control of renal function. **Hypertension.**, v.32, p.33-38, 1998.

GUSMÃO, J. L.; MION JR.,D.; PIERIN, A. M. G. Avaliação da qualidade de vida do

paciente hipertenso: proposta de um instrumento. **Rev. Hipertensão**, v. 8, n. 1, 2005.

HALL, C.; KARLBERG, B. E. Plasma concentration of angiotensina II and aldosterone during acute left ventricular failure in the dog. Effect of converting enzyme inhibition. **Res. Exp. Med.** n.186, p.387-995, 1986.

HARRAP, S. B.; VAN DER MERWE, W. M.; GRIFFIN, S. A.; MACPHERSON, F.; LEVER, A. F. Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. **Hypertension**. v.16, p.603-614, 1990.

HARRAP, S. B.; NICOLACI, J. A.; DOYLE, A. E. Persistent effects on blood pressure and renal hemodynamics following chronic angiotensina converting enzyme inhibition with perindopril. **Clinical Experimental Pharmacology Physiologic.**, v.13, p.753-765, 1986.

HARDY, M. F.; MANTLE, D.; RENNINGTON, R. J. T. Calcium-activated proetinases in human skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions.**, v.9, p.219-220, 1981.

HIRATA, Y.; ISHIMITSU, T.; VEHARA, Y.; IWAI, J.; SUGIMOTO, T.; MATSUOKA, H.; SUGIMOTO, T. Vascular eicosanoid production in experimental hypertensive rats with different mechanisms. **Prostaglandins leukot essent Fatty Acids**. v.43, p.179-184, 1991.

ICHIKAWA, I.; HARRIS, R. C. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the hormone. **Kidney International**. v.40, p.583-596, 1991.

ISLES, C. G.; WALKER, L. V.; BEEVERS, D. G. Morality in the Glasgow blood pressure clinic. **J Hypertens**. v.4, p.141 – 156, 1961.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Controle fisiológico da pressão arterial pelo sistema nervoso. **Rev. Hipertensão**. v. 8, n. 1, 2005.

KANNEL, W. B.; ABBOTT, R. D. A prognostic comparison of asymptomatic left ventricular hypertrophy and unrecognized myocardial infarction: the Framingham Study. **Am Heart J**. v.11, p.391 – 397, 1986.

KATO, Y.; KAMORO, I.; SHIBASAKI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YZAKI, Y. Angiotensin II induced hypertrophy and oncogenese expresión in cultured rat Herat myocyte.

**Circulation.** v.80 (suppl. II), p.411–450, 1989.

LANE, P. H. Furosemide treatment, angiotensin II and renal growth and development in the rat. **Pediatric Research.** v.37, p.747-754, 1995.

LI, E. K.; JACKSON, E. K. Enhanced slow pressor response to angiotensina II in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** n.251, p.909-921, 1989.

LIMA-COSTA, M. F.; PEIXOTO, S. V. E.; FIRMO, J. O. A. Validade da hipertensão arterial auto-referida e seus determinantes (projeto Bambuí). **Rev. Saúde Pública.** n.38, v.5, p.637-642, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAN, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** p.193-265, 1951.

MALINSKY, T.; KAPTURCZAK, M.; DAYHARSH, J.; BORH, D. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. **Biochem Biophys Res Commun.** n.194, p.654-658, 1993.

McDONALD, W.; WICKRE, C.; AUMANN, S.; BAN, D.; MOFFITT, B. The sustained antihypertensive effect of chronic cerebroventricular infusion of angiotensin antagonist in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology.** n.107, p.1305-1308, 1980.

McCARRON, D. A. Calcium metabolism and hypertension. **Kidney Int.** v.2. n.35, p.717-736, 1989.

MEERSON, F.Z. Compensatory hypertension of the heart and cardiac insufficiency. **Circulation Research.**, v10, p.250-258, 1962.

MEINERS Silke, HOCHER Berthold, WELLER Andrea, LAULE Michael, STANGL Verena, GUENTHER Christoph, GODES Michael, MROZIKIEWICZ Alexander, BAUMANN Gert, and STANGL Karl Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the Proteasome. **Hypertension.** v. 44, p. 471-477, oct. 2004.

MILANEZ, M.C. **Efeitos do uso de captopril sobre o conteúdo de colágeno cardíaco e em parâmetros ponderais e hemodinâmicos após o infarto do miocárdio em ratos.** 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Universidade Federal do Espírito Santo, ES, 1995.

MITCH, W.E.; GOLDBERG, A .L. Mechanisms of Muscle Wasting: The role of the Ubiquitin- proteasome pathway. **New England Journal of Medicine**. v.335, p.1897-1905, 1996.

MICHELINI, M..R. **Ontogenia das Calpaínas e da proteinase multicatalítica no ventrículo esquerdo e rim de ratos espontâneamente hipertensos**.1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Universidade Federal do Espírito Santo, ES. 1998.

MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-Proteasome pathway. **N. England J. Medicine**. n.335, p.1897-1905, 1996.

MURACHI, T. Intracellular regulatory systems involving calpain and calpastatin. **Biochemistry Internacional**. v.18, p.263-294 1989.

NAGANO, M.; HIGAKI, J.; MIKAMI, H.; NAKAMARU, M.; HIGASHIMORI, K.; KATAHIRA, K.; TABUCHI, Y.; MORIGUCHI, A.; NAKAMURA, F.; OGIHARA, T. Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertension**. n.9, v.7, p.595-599, 1991.

NAKAJIMA, T.; OSHIMA, G.; YEH, H. S. J.; IGIC, R.; ERDOS, E. G. Purification of the angiotensina l-converting enzyme of the lung. **Biochimica et Biophysica Acta**. n.315, p.430-438, 1973.

NAKAMURA, A.; EDUWARD, J. J. Influence of renal sympathetic nerves on renal and angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats during development. **Journal of Hypertension**. v.13, p.301-309, 1995.

NAKASHIMA, Y.; FOUAD, F. M.; TARAZI, R.C. Regresión of lefth ventricular from. Systemic hypertension. **American Journal of Cardiology**. v.53, p.1044-1049, 1984.

NIXON, R. A. Calcium -activated neutral proteinase as regulators of cellular function: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. **Annals New york Academy of Sciences**. p.568:198-208, 1989.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ Jr.** v.27, p.282-293, 1963.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry.** v.29, p.10289-10297, 1990.

PARMACEK, M. S.; MAGRID, N. M.; LESH, M.; DECKER, R. S.; SAMAREL, A. M. Cardiac protein synthesis and degradation during thyroxine-induced left ventricular hypertrophy. **The American Journal of Physiology.** n.251, p.727-736, 1986.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTE, N. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research.** v.39, p.77-88, 1998.

POLLACK, J. R.; RICHARD, C. W.; SUGIMOTO, J. T. Differential effects of calpain inhibitors on hypertrophy of cardiomyocytes. **Mol Cell Biochem.** n.251, p.47-50, 2003.

PONTREMOLI, S.; MELLONI, E.; SALAMINO, F.; SPARATORE, B.; VIOTTI, P.; MICHETTI, M.; DUZZI, L.; BIANCHI, G. Decreased Level of calpain inhibitor activity in red blood cells from Milan hypertensive rats. **Biochemical Biophysical Research Communications.** n.138, p.1370-1375, 1987.

PONTREMOLI, S.; MELLONI, E. Extralysosomal protein degradation. **Annual Review Biochemistry.** v.55, p.455-481, 1986.

PÜHLER, G.; WEINKAUF, S.; BACHMANN, L.; MÜLLER, S.; ENGEL, A.; HEGERL, R.; BAUMEISTER, W. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in Proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. **EMBO. J.**, v.11, p.1607-1616, 1992.

RABINOWITZ, M.; ZAK, R. Biochemical and cellular change in cardiac hypertrophy. **Annu Rev. Med.** v.23, p.245-262, 1972.

RAWLING, N. D.; BARRET, A. Families of serine Peptidase. **Meth. Enzymol.** n.244, p.18-61, 1994.

\_\_\_\_\_, A. Families of cysteine Peptidase. **Meth. Enzymol.** n.244, p.461-486, 1994.

\_\_\_\_\_, A. Families of metallopeptidase. **Meth. Enzymol.** n.248, p.183-228, 1994.

REVERTER, D.; SORIMACHI, H.; BODE, W. The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. **Trends Cardiovasc Med.**, n.11, v.6, p.222-229, 2001.

RIVETT, A. J. The multicatalytic proteinase complex. **Rev. Biol Cellular.** v.20, p.113-123. 1989.

\_\_\_\_\_, Review article. Proteasome: multicatalytic proteinase complexes. **Biochemical Journal.** n.291, p.1-10, 1994.

\_\_\_\_\_, Intracellular distribution of Proteasomes. **Curr Opin Immunol.** n.10, v.1, p.110-114, 1998.

RIVETT, A. J.; SAVORY, P. J.; DJABALLAH, H. Multicatalytic endopeptidase complexes: proteasome. **Methods in enzymology.** n.244, p.331-350, 1994.

RIBEIRO, A. B.; PLAVNIK, F.L. Modulo temático (Aspectos fisiológicos – vasos e rins). **Hipertensão.** v.1, p.11-17, 1998.

RIBEIRO A. B. Arterial Hypertension as a syndrome: The new challenge of anti-hypertensive Therapy. **Rev. Assoc .Med. Bras.** n.43, v.3, p.179, 1997.

SASAKI, T.; YOSHIMURA, N.; KIKUCHI, T.; HATANAKA, M.; KITAHARA, A.; SAKIHAMA, T.; MURACHI, T. Similarity and dissimilarity in subunit structures of calpains I and II from various sources as demonstrated by immunological cross-reactivity. **J. Biochem.** n.94, p.2055–2061, 1983.

SAÍDO, T.C.; SORIMACHI, H.; SUSUKI, K. Calpain: New perspective in molecular diversity and physiological pathological involvement. **The FASEB Journal,** v. 8, p. 814-822, 1994.

SALOM, M. G.; LAHERA, V.; FIKSEN-OLSEN, M.J.; ROMERO, J. C. Mediator role of endothelium-derived nitric oxide in renal vasodilatory and excretory effects of bradykinin. **Am. J. Hypertens.** v.4, p.260-262, 1991.

SCHIFFRIM, E. L. Endotelin: role in experimental hypertension. **J. Cardiovasc Pharmacol.** n.35 (Suppl. 2), p.33-35, 2000.

SEN S, TARAZI R. C, BUMPUS M. F. Biochemical changes associated with development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research.**, v.10, p.254-261, 1976.

SEN S, TARAZI R.C, KHAIRALLAH P.A, BUMPUS M.F. Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research.** v.35, n. 5, p.775-781, 1974.

SHOENHEIMER, R. **The dynamic state of body Constituents.** Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press, 1942.

SIMÕES-E-SILVA, S. C.; BARACHO, N. C. V.; PASSAGLIO, K. T.; SANTOS, R. A. S. Renal action of angiotensin – (1-7). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.30, p.503-513, 1997.

SIMONSEN, L.; BAUDRY, M.; SIMAN, R.; LYNCH, G. A. R. Y. Regional distribution of soluble calcium activated proteinases activity in neonatal and rat brain. **Brain Research.** n. 327, p.153-159, 1985.

SMITH, P. G.; POSTON, C. W.; MILLS, E. Ontogeny of neural and non-neural contributions to arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hipertensyon,** v.6, p.54-60, 1984.

SORIMACHI, H.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; KAWASAKI, H.; SUGITA, H.; MIYASAKA, M.; ARAHATA, K.; ISHIURA, S.; SUSUKI, K. Muscle-specific Calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting disappearance from muscle. **The Journal of Biological Chemistry.** n.268, p.10593-10605, 1993.

SMIRK, F. H.; HALL, W. K. Inherited hypertension in rats. **Nature.** n.182, p.727-728, 1958.

SIMPSON, F. O.; PHELAN, E. L. Body sodium level in hypertensive and normotensive rats effects of dietary sodium levels and sodium loads. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.6, p.121-125, 1984.

\_\_\_\_\_, Hypertension in the genetically hypertensive strain: In: DE JONG W (Eds). Handbook of hypertension: experimental and Genetic Models of Hypertension. Nomenclature of Hypertensive rats strain: Report of the Nomenclature Committee on Hypertensive Rat Strains of the International society of hypertension. **Clinical Science.** p.59-487, 1985.

SPIRITO, P.; FU, Y. M.; YUZ, X.; EPSTEIN, S. E.; CASSCELLS, W. Immunohistochemical localization of basic and fibroblast growth factors in the developing rat heart. **Circulation Research**, n.84, p.322-332, 1991.

STOLL, M.; JACOB, H. J. Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension. **Curr Hypertens Resp**. n.3, v.2, p.157-164, 2001.

SOKOLOW, M.; PERLOFF, D. The prognosis of essential hypertension treated conservatively. **Circulation**. n.23, p.697 – 713, 1961.

SPECK, P. A.; COLLINGWOOD, K. M.; BARDSLEY, R. G.; TUCKER, G. A.; GILMOUR, R. S.; BUTTERY, P. J. Transient changes in growth and in calpain and expression in ovine skeletal muscle after short-term dietary inclusion of cimaterol. **Biochimie**. n.75, p.17-923. 1993.

STELLA P, SOLDATI L, CIURLINO D, VEZZOLI G, CUSI D, BIANCHI G. Erythrocyte calpain activity and left ventricular mass in essential hypertension. **J. Hypertension**, v.15, (12 Pt 2), p. 1775-1778, 1997.

SUSUKI K, IMAJOH S, EMORI. Y, KAWASKI H, MINAMI Y AND OHNO S. *Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor*. FEBS Letter, 1987; 220: 271-277.

TANAKA, K.; YOSHIMURA, T.; KUMATORI, A.; ICHIHARA, A.; IKAI, A.; NISHIGAI, M.; KAMEYAMA, K.; TAKAGI, T. *Proteasome (Multi-protease complex) as 20S ring-shaped particles in a variety of eucaryotic cells*. **J. Biol. Chem**. n.263, p.16209-16217. 1988.

TANAKA, K. Molecular biology of the Proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.247, n.3, p.537-541, June 1998.

Tanase H, Suzuki Y, Oshima A, Yamori Y, Okamoto K Genetic analysis of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**. v.34, n.12, p.1197-212, Dec. 1970;

TOLINS, J. P. Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.258, p.4655-4662, 1990.

TRIPPODO, N. C.; FROLHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension- man and rat. **Circulation Research**. n.48, v.3, p.309-317, 1981.

TUCKER, D. C. Genetic, neurohumoral, and hemodynamic influences on spontaneously hypertensive rat heart development in oculo. **Hypertension**. v.15, p.247-256, 1990.

VANHOUTT, P. M.; BOULANGER, C. M.; MOMBOULI, J. V. Endothelium-derived relaxing factor and converting enzyme inhibition. **American Journal of cardiology**. V.76: p.01-12, 1995.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M.; ILLIANO, S. C.; NAGAO, T.; VIDAL, M.; MOMBOULI, J. V. Endothelium-dependent effects of converting-enzyme Inhibitors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.22 (Suppl. 5), p.10-16, 1993.

VASQUEZ, E. C.; LEWIS, S. J.; VARNER, K. J.; BRODY, M. J. Chronic lesion of rostral ventrolateral medulla spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v.19 (Suppl 2), p.154 -158. 1992.

YANG, H. Y. T.; ERDOS, E. G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin **Biochim Biophys Acta**, v.214, p.374-376, Aug. 1970.

YAJIMA, Y.; KAWASHIMA, S. Calpain function is the differentiation of mesenchymal stem cells. **Biol. Chem.** n.383, v.5, p.757-764, 2002.

UNGER, T.; KAUFMAN-BUHLER, I.; SCHOLKENS, B.; GANTEN, D. Brain converting enzyme inhibition: a possible mechanism for the anti-hypertensive action of captopril in spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**. v.70, n. 4, p. 467-478, Apr. 1981.

WAKATSUKI, T.; SCHLESSINGER, J.; ELSON, E. L. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. **Trends Biochem Sci**. n.29, v. 11, p.609-617, 2004.

WATERLOW, J. C. E, STEPHEN, J. M. L. The effect of low proteins diet on the turnover rates of serum, liver and muscle proteins in the rat measured by continuous infusions of <sup>14</sup>C-lysine. **Clin. Sci**. v.35, p.287, 1968.

WEI, L. I.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J. Biol. Chem.** n.266, v.14, p.9002-9008, 1991.

WINICK, K.; NOBLE, A. Quantitative change in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev. Biol.* v.12, n. 3, p.451-466, Dec. 1965.

WILK, S.; ORLOWSKI, M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. **Journal Neurochemistry**. v.35, p.1172-1182, 1980;

\_\_\_\_\_. Evidence that pituitary cation-sensitive neural endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *Neurochem*. v.40, n. 3, p.842-849, Mar. 1983.

WOLF, G.; NEILSON, E. G. Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. **Kidney International**. n.43(suppl39), p.100-107, 1993.

WOOD, J. M.; LEVENS, N. R. Intrarenal blockade of angiotensin II in experimental genetic hypertension. In: LARAGH JH and BRENNER BM (Eds). *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and manag.* ADAMS JULIAN, *The Proteasome: structure, function, and role in the cell Cancer*. **Treatment Reviews**. v.29(Suppl. 1), p.3–9, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Arterial Hypertension, Geneva, 1978. Report. Geneva, 1978. (Technical Report Series, 628).

WU, J. N.; BERECEK, K. H. Prevention of genetic hypertension by early treatment of spontaneously hypertensive rats with the angiotensin converting enzyme inhibitor Captopril. **Hypertension**. v.22, p.139-146, 1993.