

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DAS CARBOXIPEPTIDASES
DO PERFUSATO DO LEITO ARTERIAL
MESENTÉRICO DE RATO NO
PROCESSAMENTO DE ANGIOTENSINAS**

HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Hugo Juarez Vieira Pereira

Participação das carboxipeptidases do perfusato do leito
arterial mesentérico de rato no processamento de
angiotensinas

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira

Ribeirão Preto-SP

Março 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Hugo Juarez Vieira

Participação das carboxipeptidases do perfusato do leito arterial mesentérico de rato no processamento de angiotensinas. Ribeirão Preto, 2010.

134 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Bioquímica.

Orientador: Oliveira, Eduardo Brandt.

1. Angiotensina. 2. Carboxipeptidase A. 3. Mesentério. 4. Isolamento cromatográfico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hugo Juarez Vieira Pereira

Participação das carboxipeptidases do perfusato do leito arterial mesentérico de rato no processamento de angiotensinas

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: 30/03/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*A minha amada Saron, pelo apoio incondicional
por quase uma década.*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira pela orientação e pela paciência durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Profª Drª Maria Cristina de Oliveira Salgado, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo acesso ao seu laboratório e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Disney Oliver Sivieri Jr., e a Dra. Christiane Becari pela colaboração constante durante todo esse trabalho, sem a qual seria impossível a realização do mesmo.

À Odete Cunha pelo essencial auxílio de todos os dias. Agradeço a prestatividade em todos os momentos.

As colegas de laboratório Liliane e Lara por toda a ajuda e boa convivência.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela transmissão de conhecimentos durante o curso de pós-graduação.

Aos colegas da pós-graduação pela boa convivência durante esses anos.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo convívio e pelos auxílios prestados durante todo esse período.

Aos meus pais Juarez e Maria do Carmo e as minhas irmãs Tamara e Tassiana, pelo apoio em todos os momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado para a realização desse trabalho. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização de parte dessa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ang	Angiotensina
Bk	Bradicinina
DEAE	Dietilaminoetil
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminoetil)carbodiimida
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
HEPES	Ácido (N-[2-Hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico])
HBTU	<i>N</i> -[1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il](dimetilamino)metileno]- <i>N</i> -etilmetanaminio hexafluorofosfato <i>N</i> -óxido
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho

LAM	Leito arterial mesentérico
MGTA	Ácido metilguanidinotriacético
NMP	N-metilpirrolidona
OPD	Orto-fenilenediamino
PCI	Inibidor de carboxipeptidase de batata
PCR	Reação da polimerase em cadeia
SBTI	Inibidor de tripsina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TFA	Ácido trifluoracético
TNBS	Trinitrobenzenosulfonato

ÍNDICE

Índice

RESUMO	17
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	23
1- INTRODUÇÃO	24
1.1- O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)	24
1.2- PROTEASES DO PERFUSATO DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATO	30
OBJETIVOS	37
2- OBJETIVOS	38
2.1- OBJETIVO GERAL:.....	38
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	38
MATERIAIS	39
3- MATERIAIS	40
3.1- ANIMAIS.....	40
3.2- SUBSTRATOS, INIBIDORES E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	40
3.3- REAGENTES PARA ELETROFORESE	41
3.4- REAGENTES PARA OS EXPERIMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
3.5- REAGENTES PARA OS EXPERIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	42
MÉTODOS	45
4- MÉTODOS	46
4.1- REMOÇÃO E PERFUSÃO DO LAM ISOLADO DE RATO E CAMUNDONGO	46
4.2- CONCENTRAÇÃO DO PERFUSATO DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO	47
4.3- DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	47
4.4- SÍNTESE DAS RESINAS DE AFINIDADE	49
4.5- CROMATOGRAFIAS	52
4.6- ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	54
4.7- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS/MS)	55
4.8- SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	56
4.9- PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM HPLC DE FASE REVERSA.....	58
4.10- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS.....	58
4.11- ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO EM MESENTÉRIOS MURINOS	59
RESULTADOS	63
5- RESULTADOS	64
5.1- PROCESSAMENTO DE ANG I, ANG II E B _k POR PROTEASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO.....	64
5.2- COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CARBOXIPEPTIDASES NO MESENTÉRIO DE RATO E CAMUNDONGO	68
5.3- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DO PERFUSATO DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO.....	71
5.4- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES TIPO CPAs DO PERFUSATO DO LAM DE RATO 78	
5.5- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-9 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO	82
5.6- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-7 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO	89
5.7- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-9 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO POR TROCA IÔNICA.....	95

5.8- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 UTILIZANDO ANGIOTENSINAS COMO SUBSTRATOS	103
5.9- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 COM SUBSTRATOS SINTÉTICOS	109
DISCUSSÃO	111
6- DISCUSSÃO	112
6.1- PROCESSAMENTO DE ANG I, ANG II E B _k POR CARBOXIPEPTIDASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO	112
6.2- CARACTERIZAÇÃO DAS CARBOXIPEPTIDASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO	114
6.3- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 DO PERFUSATO DO LAM DE RATO	116
6.4- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 DO PERFUSATO DO LAM DE RATO	118
6.5- COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CARBOXIPEPTIDASES NO MESENTÉRIO E DE ATIVIDADES PRESENTES NOS PERFUSATOS DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO	121
CONCLUSÕES	125
7- CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ARTIGO PUBLICADO	147

RESUMO

RESUMO

PEREIRA, H.J.V. **Participação das carboxipeptidases do perfusato do leito arterial mesentérico de rato no processamento de angiotensinas.** 2010. 134 f. Tese (DOUTORADO) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O leito arterial mesentérico (LAM) é capaz de secretar algumas proteases solúveis que se acumulam no líquido de perfusão. Nosso laboratório tem se dedicado à caracterizar essas enzimas, entre elas, a elastase-2, anteriormente descrita como uma enzima unicamente digestiva, e, agora, apresentada também como a principal enzima formadora de Ang II no perfusato do LAM de rato. Além desta endopeptidase, atividades de carboxipeptidases foram detectadas neste perfusato, utilizando-se substratos sintéticos e vaso-peptídeos, como o ZVF, a Ang I e a Bk. A atividade formadora de des-Arg⁹-Bk foi recentemente caracterizada como sendo a CPB1. Novamente, uma protease antes descrita unicamente como digestiva, foi encontrada processando vaso-peptídeos no perfusato do LAM de rato. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar as enzimas capazes de agir sobre a região C-terminal de angiotensinas, clivando resíduos aromáticos e alifáticos. Inicialmente, as atividades tipo CPA do perfusato do LAM de rato foram separadas cromatograficamente em cinco picos distintos. Frações destes picos foram caracterizadas, determinando quais destas eram capazes de formar Ang 1-9 a partir de Ang I, e, Ang 1-7 a partir de Ang II. A atividade formadora de Ang 1-7 foi caracterizada com substratos e inibidores, e, mostrou-se que não correspondia a nenhuma das enzimas formadoras de Ang 1-7 descritas, a saber, ECA2, prolilcarboxipeptidase e catepsina A. Em paralelo, isolamos a atividade formadora de Ang 1-9, utilizando-se uma cromatografia por troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose e três cromatografias por afinidade em Arg-Sepharose, PCI-Sepharose e SBTI-Sepharose. Após o isolamento, esta enzima foi digerida com tripsina e cinco de seus fragmentos trípticos foram seqüenciados por espectrometria de massas, identificando-se essa enzima como sendo a CPA2, idêntica à pancreática. A enzima formadora de Ang 1-7 foi isolada por duas cromatografias de troca iônica, uma em DEAE-Sepharose e outra em Mono Q. Depois do isolamento, esta enzima foi digerida por tripsina, e três de seus fragmentos trípticos foram seqüenciados por espectrometria de massas, identificando-se essa enzima como sendo a CPA1, idêntica à pancreática. Em seguida, as CPA1 e CPA2 foram testadas para avaliar sua capacidade de processar angiotensinas, utilizando como substratos: Ang 1-12, Ang I, Ang 1-9 e Ang II. As duas CPAs isoladas foram capazes de hidrolisar a Ang I, sendo que, a CPA1 foi capaz de formar Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7 por clivagens seqüenciais, enquanto a CPA2 só foi capaz de formar Ang 1-9. A CPA1 foi capaz de processar a Ang II, enquanto a CPA2 não demonstrou essa capacidade. Quando o substrato ofertado foi a Ang 1-12, a CPA2 foi capaz de processá-la de maneira mais eficiente que a CPA1. Para uma caracterização complementar, oito substratos sintéticos, com seqüências baseadas em Ang 1-12, Ang I, Ang 1-9 e Ang II, foram sintetizados. Todos os oito substratos sintéticos demonstraram ser processados pelas CPA1 e CPA2, mas com especificidade diferente, mostrando que nem sempre a CPA1 hidrolisa

preferencialmente aminoácidos alifáticos, e, a CPA2 os aromáticos. Neste trabalho também comparamos a expressão de ECA, ECA2, CPAs 1-6, CPB e CPN no mesentério, e, as atividades enzimáticas correspondentes nos perfusatos do LAM de rato e de camundongo. Demonstrou-se que o mesentério de ambos os animais expressam as carboxipeptidases CPA1, CPA2, CPA3, CPB, CPN, ECA e ECA2. As atividades enzimáticas atuantes sobre as angiotensinas encontradas nos perfusatos do LAM de rato e camundongo, também se mostraram semelhantes, sendo capazes de processar Ang 1-12, Ang I, Ang II e Bk. Portanto, concluímos com este trabalho, que o perfusato do LAM de rato contém as CPA1 e CPA2, idênticas às pancreáticas, cujas ações sobre os vaso-peptídeos formaram peptídeos ativos como Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7, constituintes do sistema renina-angiotensina. Além disso, mostrou-se que os camundongos, assim como os ratos, podem ser utilizados em estudos referentes às vaso-peptidases do perfusato do LAM.

ABSTRACT

ABSTRACT

PEREIRA, H.J.V. **Participation of carboxypeptidases from perfusates of mesenteric arterial bed in processing of angiotensins.** 2010. 134 p. Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The rat mesenteric arterial bed (MAB) perfusate is a rich source of vasopeptidases, among which elastase-2, previously described as a digestive enzyme, has been recognized as the major angiotensin Ang II-forming enzyme in this preparation. In addition to endopeptidases, activities of carboxypeptidases have been detected in this perfusate by using various substrates such as Ang I, Ang II, Bk and ZVF. Recently, the CPB1, another digestive enzyme, was described with the major Bk-processing pathways in the perfusates of MAB. Besides, a perfused rat MAB secretes a considerable amount of thus far uncharacterized CPA-like enzymes which endows the corresponding perfusate with efficient Ang I and Ang II-processing pathways. Thus, the objective of our work was to achieve the structural and biochemical characterization of CPA-like activities in the perfusates of mesenteric arterial bed. Initially, we observed that an anion exchange chromatography of the perfusate would consistently split the characteristic ZVF-hydrolyzing activity of CPA-like enzymes into five distinct peaks, whose proteolytic activities were then determined using different substrates. The resulting proteolytic profile for each peak indicated that rat mesenteric arterial bed perfusate contains a complex mixture of carboxypeptidases; tentatively, five carboxypeptidases were distinguished based on their substrate preferences toward ZVF, Ang I and Ang II. The respective reactions, namely, ZVF cleavage, Ang I to Ang 1–9 conversion and Ang II to Ang 1–7 conversion, were inhibited by o-phenanthroline and nearly fully blocked by potato carboxypeptidase inhibitor. Also, all the CPA-like activity peaks prepared by anion exchange chromatography were tested negative for contaminating ACE2, cathepsin A and prolylcarboxypeptidase. Parallely, we isolated the Ang 1-9 forming-enzyme in perfusates of mesenteric arterial bed. Therefore, we submitted the perfusate an anion exchange chromatography in DEAE-Sepharose, and tree affinity chromatography in Arg-Sepharose, PCI-Sepharose and SBTI-Sepharose. After the isolation, the enzyme was submitted a tryptic fragmentation and five of tryptic fragments was sequencing by mass spectrometry. This structural analysis showed identity of sequence of Ang 1-9 forming enzyme with the rat pancreatic CPA2. The Ang 1-7 forming enzyme was isolated by two anion exchange chromatography, in DEAE-Sepharose and Mono Q. After the isolation, the enzyme was submitted a tryptic fragmentation and tree of tryptic fragments was sequencing by mass spectrometry. This structural analysis showed identity of sequence of Ang 1-7 forming enzyme with the rat pancreatic CPA1. The activities of CPA1 and CPA2 toward Ang 1-12, Ang I, Ang 1-9 and Ang II were determined. CPA1 hydrolyses Ang I, Ang 1-9 and Ang II, forming with final product the Ang 1-7, while the CPA2 preferentially hydrolyses Ang I and Ang 1-12, forming with final product the Ang 1-9. A complementary characterization was made with the determination of hydrolyses of eight synthetic substrates. This analyses showed that not even the CPA1 hydrolyses the aliphatic

and CPA2 the aromatic amino acids. To further understand the physiological importance of these enzymes in the local peptide metabolism of the mesentery we compared both the proteolytic compositions of rat and mouse mesenteric arterial bed perfusates, and the expression of mRNAs for various proteases in the mesentery of these murine species. The patterns of the rat mesenteric arterial bed perfusate-catalyzed cleavage of AI, AII and Bk were similar to those analogously generated by the mouse perfusate, as determined by HPLC analyses. The protease inhibitors SBTI, PCI, o-phenanthroline and MGTA interfered equally with the proteolytic actions of rat and mouse perfusates. The ACE, ACE2, CPB, CPN and CPAs 1-6 mRNA expressions in both rat and mouse mesenteries were evaluated, indicating that ACE, ACE2, CPB, CPN, CPA1, CPA2 and CPA3 mRNAs were present in these tissues. Our results suggest that both rat and mouse mesenteric arterial bed perfusates contain the same proteolytic array capable of forming des-Arg⁹ Bk from Bk, converting Ang I to Ang II, and generating Ang 1-9 and Ang 1-7 from Ang I and Ang II, respectively.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

O SRA é formado por um grande número de moléculas que participam em diversos aspectos da fisiologia e fisiopatologia cardiovascular (Campbell, 2001). O SRA desempenha um papel chave na regulação da pressão e fluxo sanguíneo, e no balanço eletrolítico em mamíferos (Inagami, 1994), sendo constituído por um conjunto de reações enzimáticas capazes de gerar os diversos efetores peptídicos do sistema (Figura 1). A via clássica de formação de Ang II, o principal efector do SRA, envolve clivagem do precursor protéico angiotensinogênio pela renina, liberando o decapeptídeo inativo Ang I, que é posteriormente clivado na ligação Phe⁸-His⁹ pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), formando o octapeptídeo ativo Ang II.

As propriedades do SRA apresentadas na figura 1 revelam as possíveis vias de geração dos respectivos mediadores peptídicos, e, certamente, nos diferentes tecidos apenas algumas das vias indicadas estarão ativas. Evidências de várias naturezas têm mostrado a importância do SRA locais, cujas ações dependem da presença de proteases específicas, receptores e diversos moduladores nos diferentes tecidos. A descrição de novos componentes regulatórios ampliam constantemente a nossa percepção da complexidade deste sistema peptídico (Burrell et al., 2004; Nagata et al., 2006) e, em alguns casos,

mostram que a função de um órgão pode requerer uma organização peculiar de enzimas, receptores e moduladores.

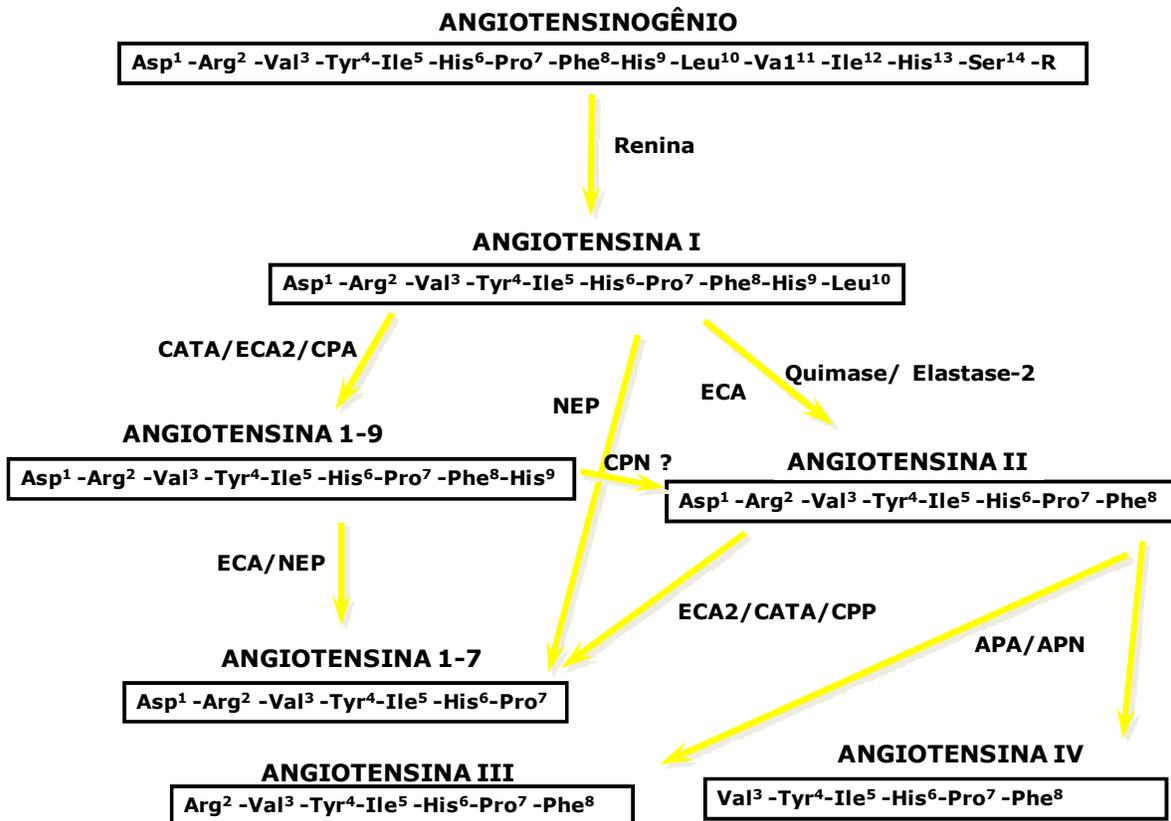


Figura 1. Sistema renina-angiotensina. Vias clássica e alternativas de geração de Ang II, e peptídeos correlatos. As abreviações representam as seguintes enzimas: CATA- catepsina A; ECA2- enzima conversora de angiotensina 2; CPA- carboxipeptidase A; ECA- enzima conversora de angiotensina; NEP- endopeptidase neutra; CPP- prolilcarboxipeptidase; APA- aminopeptidase A; APN- aminopeptidase N; CPN- carboxipeptidase N.

A Ang II exerce seu papel nas células-alvo, principalmente, através de dois receptores acoplados à proteína G (GPCRs), denominados AT₁ e AT₂. As funções clássicas das atividades da Ang II, quais sejam, vasoconstrição, reabsorção de sódio e proliferação celular, são atribuídas ao receptor AT₁ (Campbell, 2001).

O receptor AT₂ é abundantemente expresso em tecidos fetais, porém, está pouco presente em tecidos adultos. Entretanto, sua expressão é aumentada em alguns processos patológicos, como na insuficiência cardíaca (De Gasparo et al., 2000). As cascatas de sinalização dos receptores AT₁ e AT₂ são distintas, senão vejamos:

O receptor AT₁, além de sinalizar via fosfolipases-C, -D, -A, canais de cálcio voltagem-dependentes e adenilato ciclase (mecanismos clássicos de sinalização), este receptor também estimula a fosforilação de várias proteínas intracelulares, tais como, Jak 2, Stat 1, e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (De Gasparo et al., 2000). É importante ressaltar que as quinases ERK1/2 são ativadas independentemente da ativação da proteína G (Miura et al., 2004). Já a cascata de sinalização do receptor AT₂ não induz aumento dos níveis de inositol trisfosfato (IP₃), de diacilglicerol (DAG), nem de cálcio intracelular. A ativação do receptor AT₂ estimula um mecanismo que envolve tirosina e treonina fosfatases, óxido nítrico, GMPc e fosfolipase A₂. A ativação do receptor AT₂ contrabalança os sinais do receptor AT₁, inativando MAPKs, promovendo apoptose, inibindo a proliferação celular, abrindo canais de potássio e fechando canais de cálcio. Desta maneira, a ativação do receptor AT₂ possui uma funcionalidade antagônica à do receptor AT₁ (Carnovali, 2001).

Além da Ang II, os receptores AT₁ e AT₂ são estimulados por outros efetores do SRA, tal como a Ang III, que atua nos dois receptores com afinidade similar à da Ang II. Já a Ang IV e a Ang 1-7 interagem com receptores próprios (Campbell, 2001). A Ang III, produzida através da ação da APA sobre a porção N-terminal da Ang II, parece ter um papel chave no SRA do cérebro, atuando no controle central da pressão sanguínea, bem como na liberação de vasopressina (Wright et al., 1997). O metabolismo de Ang II, por APN, gera Ang IV (Ramírez-Expósito et al., 2008), intermediando tanto ações periféricas como, o aumento do fluxo renal sanguíneo e a natriurese, quanto centrais, facilitando o aprendizado e a memória (Mustafa et al., 2001; Hamilton et al., 2001).

O metabólito Ang 1-7, parece ser um importante regulador da função cardiovascular por promover efeitos opostos à Ang II (Kohara et al., 1991), tais como vasodilatação, antiproliferação celular e apoptose, em decorrência de interação com um receptor próprio, o receptor Mas (Santos et al., 2003).

O receptor Mas também é um GPCR, e foi primeiramente classificado como um receptor órfão, produto do proto-oncogene *mas* (Rabin et al., 1987). Recentemente este GPCR foi descrito como sendo o receptor de Ang 1-7, um metabólito gerado a partir da clivagem de Phe⁸ C-terminal da Ang II (Santos et al., 2003). As atividades do receptor Mas são descritas como antagônicas àquelas do receptor AT₁ (Zohn et al., 1998; Santos et al., 2003).

Diversas peptidases contribuem para a geração e degradação de peptídeos ativos derivados da Ang I. A principal via formadora de Ang II é mediada pela ECA (Skeegs et al., 1956), uma dipeptidil carboxipeptidase, também conhecida como cininase II, por sua atividade destruidora de cinina (Yang et al., 1971). A ECA é

composta por dois domínios homólogos, cada um contendo um sítio ativo, porém, com algumas diferenças em sua especificidade por substratos e perfil inibitório (Corvol et al., 1990). Vários estudos mostraram a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II. A serinoprotease quimase, isolada de coração humano e outros tecidos, também cliva o dipeptídeo His⁹-Leu¹⁰ da Ang I, formando a Ang II, estabelecendo a partir daí, uma via alternativa para geração de Ang II independente da ECA (Urata et al., 1990). Evidências indicam que as distribuições, celular e regional, das enzimas formadoras de Ang II determinam o papel patofisiológico das mesmas. Em extratos de artérias humanas, foram identificadas duas vias de formação de Ang II, a ECA e a serinoprotease quimase, esta última, sendo a via formadora de Ang II predominante nestes extratos (Urata et al., 1996). Em artéria carótida de rato não foi detectada a via formadora de Ang II dependente da quimase (Takai et al., 2001).

Uma variedade de enzimas mostrando atividade carboxipeptidase tipo A (CPA) tem sido também implicadas no processamento proteolítico de angiotensinas. Foi proposto que, uma enzima tipo CPA de mastócito regula a formação local de Ang II no coração humano por liberar um inibidor da ECA, o peptídeo Ang 1-9 no fluido intersticial (Kokkonen et al., 1997). Em rim de porco, a CATA parece participar do SRA local por gerar Ang 1-9 e Ang II, mas não Ang 1-7 (Miller et al., 1988). Entretanto, a CATA de coração humano gera os derivados Ang 1-9 e Ang 1-7 a partir de Ang I, que correspondem a um inibidor da ECA e a um potencializador de Bk, respectivamente (Jackman et al., 2002). Uma enzima tipo CPA de células mesangiais de rim de rato também é capaz de hidrolisar Ang I, produzindo Ang 1-9 e Ang II (Ilgic et al., 2003). Uma atividade tipo CPA liberada

por mastócitos peritoneais de camundongo pode formar Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7 devido a degradação seqüencial da Ang I, indicando, desta forma, que algumas enzimas tipo CPA podem também ser caracterizadas como vias formadoras de Ang II (Lundequist et al., 2004).

A identificação recente da ECA2, o primeiro homólogo humano conhecido da ECA (Tipnis et al., 2000; Donoghue et al., 2000), introduziu uma maior complexidade ao estudo do SRA. A ECA2 age sobre Ang I formando Ang 1-9, e sobre a Ang II formando Ang 1-7. Esses dois derivados de Ang I possuem ações opostas à da Ang II. Estes peptídeos funcionam como substratos e inibidores da ECA, apresentando diferentes afinidades para cada domínio catalítico desta enzima. A clivagem de Ang I pela ECA é inibida por estes dois derivados de Ang I, sendo que a Ang 1-9 é mais potente frente ao domínio N, enquanto que a Ang 1-7 é mais potente frente ao domínio C (Deddish et al., 1998). A ECA gera o fragmento Ang 1-5 a partir da Ang 1-7, e, também cliva a Ang 1-9 gerando Ang 1-5, tendo como intermediário a Ang 1-7. A ECA2 compete com a ECA pela Ang I para formar a Ang 1-9. Assim, a ECA2 parece ser uma enzima importante na regulação do SRA, pois, além de degradar a Ang II, também diminui a sua formação, já que compete pelo mesmo substrato com a ECA (Rice et al., 2004).

A possibilidade de dissecar e estudar isoladamente os segmentos do nefron permitiu avaliar, detalhadamente, a organização local do SRA no túbulo proximal do rato. Foram feitas medidas diretas das angiotensinas e das atividades enzimáticas ali presentes, além de análise da expressão de RNAm para vários outros componentes do SRA local (Li et al., 2005). A riqueza de informações contidas neste artigo mostrou claramente que o conjunto de proteases no túbulo

proximal (e não cada enzima separadamente) determinou o fluxo metabólico de formação das angiotensinas, que, inclusive, contrariou as expectativas baseadas puramente nos valores de eficiência catalítica da ECA2 para os substratos Ang I e Ang II.

Nas últimas décadas, o SRA vem se mostrando cada vez mais complexo com a identificação de uma isoforma da ECA, a ECA2 (Turner et al., 2002), de novos metabólitos de angiotensina (Erdös et al., 2002; Nagata et al., 2006) e de novos receptores de angiotensina (Kramár et al., 1997; Wilson et al., 2009), com conseqüente envolvimento deste sistema em novos processos fisiopatológicos. Dentre os inúmeros outros exemplos de tecidos, cujas funções são sensíveis à modulação experimental do SRA, nosso laboratório tem estudado o metabolismo de angiotensinas no leito vascular mesentérico de rato, caracterizando algumas proteases envolvidas no SRA local. A seguir, descreveremos as vasoceptidases que reconhecidamente são secretadas pelo leito mesentérico, destacando algumas de suas propriedades funcionais.

1.2- PROTEASES DO PERFUSATO DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE RATO

Os efeitos farmacológicos de vasoceptídeos sobre o leito arterial mesentérico (LAM) de rato isolado, a preparação de McGregor (McGregor, 1965), podem ser modulados por inibidores de proteases (Santos et al., 2000). As especificidade e seletividade de muitos dos inibidores atualmente disponíveis não permite, contudo, a determinação inequívoca das enzimas envolvidas no

metabolismo dos diferentes peptídeos. Um nível adicional de complexidade no sistema proteolítico da vasculatura mesentérica foi percebido quando se demonstrou a existência de quantidades apreciáveis de algumas atividades exo- e endopeptidásicas no perfusato do LAM de rato (Oliveira et al., 1991) que, além das proteases que podem estar ligadas a membranas do endotélio vascular como NEP (Skidgel, 1989), ECA (Skeggs et al. 1954), CPM (Skidgel e Erdos, 1998a), DPP-IV (Hopsu-Havu e Glenner 1966), etc., podiam modificar a ação farmacológica de vaso-peptídeos. Diante da ausência de literatura sobre proteases solúveis do LAM de rato e das implicações que estas enzimas poderiam ter nos estudos de farmacologia experimental e na fisiologia do referido leito arterial, nosso laboratório vem se dedicando à caracterização bioquímica destas vaso-peptidases (Oliveira et al., 1991; Paula et al., 1998; Santos et al., 2002a; Santos et al., 2002b Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2008 e Pereira et al., 2009) para subsidiar a análise de resultados experimentais da ação de vaso-peptídeos na preparação de McGregor (Leite et al., 1992; Leite et al., 1997; Santos et al., 2000).

Algumas das proteases do perfusato do LAM de rato estão sendo estudadas e encontram-se contextualizadas no SRA local, a saber:

1- Elastase-2 formadora de Ang II.

Esta endopeptidase foi inicialmente descrita como a enzima formadora de Ang II do perfusato, que se acumula no líquido de perfusão à taxa média de 0,25 mU/min (1mU corresponde a conversão de 1 nmol Ang I/min) (Oliveira et al., 1991; Paula et al., 1998). A determinação da estrutura parcial desta enzima mostrou sua identidade à elastase-2 pancreática (Paula et al., 1998) e o seqüenciamento do

respectivo cDNA confirmou identidade completa à forma pancreática (Santos et al., 2002a). Talvez, este tenha sido o primeiro exemplo de uma protease digestiva pancreática típica a ser detectada fora do trato digestivo, e, aparentemente, participando do SRA. A elastase-2 é produzida por células endoteliais em cultura, e seu RNAm é detectado em vários tecidos além do pâncreas e mesentério (Santos et al., 2002a). A especificidade proteolítica da elastase-2 é ampla, capaz de clivar somatostatina (Szilagyí et al., 1995), converter Ang I e alguns outros precursores de Ang II (Paula et al., 1998; Santos et al., 2004), e hidrolisar alguns substratos cromogênicos sintéticos (Santos et al., 2002b). Esta enzima é sensível aos inibidores clássicos de serinoproteases, inclusive a ovinibidor que foi escolhido como ligante da resina de afinidade para sua purificação (Paula et al., 1998).

2- Carboxipeptidases

As carboxipeptidases desempenham importantes funções biológicas em mamíferos e outros organismos, clivando especificamente aminoácidos da extremidade C-terminal de peptídeos e proteínas (Arolas et al., 2007; Thomas et al., 2006). O mecanismo catalítico utilizado se baseia em uma serina, cisteína ou zinco, sendo que este último se refere às metalocarboxipeptidases (Reznik e Fricker, 2001). Em mamíferos, a família das metalocarboxipeptidases compreende um total de treze genes conhecidos (Huang et al., 1999). Muitos outros genes, semelhantes aos das carboxipeptidases, são descritos no genoma humano. Contudo, ainda não se sabe, ao certo, se estes genes codificam algum produto ou se são pseudogenes.

Dentro do grupo de proteases, as metalocarboxipeptidases se agrupam na família M14, que foi dividida em três subfamílias, utilizando-se os critérios de homologia de suas seqüências, e, da função desempenhada (Arolas et al., 2007). Estas subfamílias são nomeadas com os dois primeiros membros descritos, a saber: subfamília A/B (ou M14A das proteases), subfamília N/E (ou M14B das proteases) e subfamília Nna 1/CCP (ou M14C das proteases) (Rodriguez et al., 2007; <http://merops.sanger.ac.uk>). Todas as metalocarboxipeptidases possuem domínios similares tipo carboxipeptidase, porém, a subfamília A/B, além deste domínio, possui um outro: o pro-peptídeo N-terminal, que é essencial para um correto enovelamento dessas enzimas, sendo clivado para suas ativações (Arolas et al., 2007; Aviles et al., 1993). A remoção do pro-peptídeo, na maioria das vezes, é feita através de múltiplas clivagens realizadas por endopeptidases (San-Segundo et al., 1982). A maioria das enzimas das subfamílias A/B e N/E são secretadas, e exercem funções fora da célula. Entretanto, recentemente, foram descritas carboxipeptidases citosólicas, as CPPs (Rodriguez et al., 2007; Kalinina et al., 2007); contudo ainda não foi possível saber a função dessas enzimas.

As enzimas da subfamília N/E são geralmente conhecidas como carboxipeptidases “regulatórias”. Este termo não é totalmente adequado, haja vista que, cada vez mais são atribuídas funções regulatórias para membros da subfamília A/B (Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2008; Bouma et al., 2006). Diferentemente dos membros da subfamília A/B, os da N/E, não são produzidos como zimógenos, ou seja, não precisam ser ativados por proteólise (Reznik e Fricker, 2001). A subfamília N/E possui ainda um domínio não encontrado na subfamília A/B, denominado de “semelhante à transretina”. Sua função não é

conhecida, mas acredita-se que seja importante para um correto dobramento do domínio carboxipeptidase (Aloy et al., 2001).

A CPE (ou CPH, ou encefalina-convertase), foi descoberta durante uma busca por carboxipeptidases capazes de hidrolisar um resíduo de lisina e/ou arginina de um precursor peptídico neuroendócrino (Fricker e Snyder 1982). Muitos destes peptídeos são produzidos na forma de pequenas proteínas, necessitando da clivagem de resíduos básicos na região C-terminal, pelas pro-hormônio-convertases, para, então, se tornarem ativos (Zhou et al., 1999). A CPE é extremamente específica para a clivagem de resíduos básicos, e, não apresenta atividade sobre aminoácidos não básicos (Fricker, 1998). Esta enzima é pouco ativa em pH neutro (Greene e Fricker, 1992), e, apresenta atividade ótima em pH 5-6; sendo esta faixa de pH, a mesma encontrada em vesículas onde os peptídeos neuroendócrinos são processados (Fricker, 1998).

As CPM e CPN também apresentam atividades no processamento de hormônios, porém diferentemente da CPE, exercem essa atividade extracelularmente. A CPM é encontrada em pulmão e em placenta, apresentando-se ligada a membrana plasmática por uma âncora, qual seja, glicosil-fosfatidilinositol (Skidgel e Erdos, 1998b). A forma solúvel da CPM pode ser encontrada em alguns fluídos, tais como: no líquido amniótico e na urina (Skidgel, 1998). A CPN é produzida pelo fígado, e, circula no plasma em um complexo protéico de 280 KDa, composto por duas cópias de CPN e duas cópias de uma glicoproteína de 83 KDa (Skidgel e Erdos, 1998b). As principais funções das CPN e CPM são inativar ou alterar a especificidade de peptídeos vasoativos, quais sejam, cininas e anafilotoxinas (Skidgel e Erdos, 1998b).

As três proteínas denominadas CPX1, CPX2 e AEBP1 (proteína semelhante à carboxipeptidase de aorta), formam um grupo distinto dentro da subfamília N/E. Essas três enzimas apresentam uma maior homologia de seqüência entre si (Reznik e Fricker, 2001), e as CPX1 e CPX2 não exibem atividade sobre os substratos padrões para carboxipeptidases (Lei et al., 1999; Xin et al., 1998), no entanto, a AEBP1 possui atividade catalítica sobre substratos descritos para CPB (He et al., 1995; Muise e Ro, 1999).

A subfamília A/B possui um total de nove membros (Arolas et al., 2007) com massas moleculares de aproximadamente 35 KDa, após a ativação por proteólise (Auld, 1998; Hendriks, 1998; Aviles e Vendrell, 1998). Os membros CPA1, CPA2 e CPB1 foram inicialmente descritos como originários do pâncreas, possuindo função digestiva (Barrett e McDonald, 1985). A CPA1 mostra preferência por resíduos alifáticos e aromáticos pequenos de substratos peptídicos, enquanto que, a CPA2, tem preferência por resíduos C-terminais aromáticos volumosos (Gardell et al., 1988). A CPA3 é produzida em mastócitos, e apresenta importantes funções em processos inflamatórios (Metsarinne et al., 2002). Pouco se conhece sobre as CPA4 e CPA5, sendo que, a CPA4, originalmente descrita com CPA3 (Huang et al., 1999), foi recentemente renomeada como CPA4 por um comitê de nomenclatura de genes. A CPA6, inicialmente descrita em um *screening* no genoma humano (Wei et al., 2002), é capaz de clivar aminoácidos hidrofóbicos de C-terminais de peptídeos e proteínas (Wei et al., 2002) e está associada à síndrome de retração ocular (Calabrese et al., 2000).

Uma enzima tipo CPA de células mesangiais de rim de rato, mostrou ser capaz de hidrolisar Ang I, produzindo Ang 1-9 e Ang II (Igic et al., 2003). A CPA3,

inicialmente descrita como capaz de formar Ang 1-9 a partir de Ang I (Everitt e Neurath 1980; Goldstein et al., 1987), é liberada por mastócitos peritoneais de camundongo, podendo formar Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7 através de degradação seqüencial da Ang I (Lundequist et al., 2004).

A subfamília A/B ainda possui dois membros que agem sobre aminoácidos C-terminais básicos: as CPB1 e CPB2. A CPB2 (ou CPU, ou CPR, ou TAFI), é produzida pelo fígado (Hendriks, 1998), e tem participação na regulação da fibrinólise (Bouma et al., 2006). Recentemente, mostrou-se que a CPB1 era a enzima responsável pela formação de des-Arg⁹-Bk no perfusato do LAM de rato (Oliveira et al., 2007). Verificou-se aqui, novamente, que uma enzima pancreática, reconhecida por seu papel na digestão, pode apresentar funções regulatórias quando secretada em outros tecidos. O perfil de expressão da CPB1 de rato indica valores altos para mesentério, fígado, pulmão, coração, aorta e carótida. A CPB1, isolada do perfusato, é inibida por PCI e MGTA.

Ante ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar bioquímica e estruturalmente as atividades tipo carboxipeptidases A, presentes no perfusato do LAM de rato, que agem sobre angiotensinas. Além disso, estudou-se também a ação da CPB1 sobre Ang 1-9, demonstrando uma possível participação no SRA local. Outro importante ponto deste estudo foi comparar o perfil de expressão de algumas carboxipeptidases nos mesentérios e atividades enzimáticas dos perfusatos dos LAM de ratos e camundongos.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL:

Isolar e caracterizar as enzimas responsáveis pelo processamento C-terminal de angiotensinas no perfusato do leito arterial mesentérico de rato.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar atividades presentes no perfusato do LAM de rato capazes de processar angiotensinas;
2. Isolar as carboxipeptidases formadoras de Ang 1-9 e Ang 1-7;
3. Investigar a especificidade das carboxipeptidases identificadas frente a substratos derivados de angiotensinas;
4. Investigar a especificidade das carboxipeptidases identificadas frente a substratos sintéticos.
5. Comparar o perfil de expressão de ECA, ECA2, CPAs 1-6, CPB e CPN no mesentério e suas respectivas atividades no perfusato do LAM de rato e camundongo.

MATERIAIS

3- MATERIAIS

3.1- ANIMAIS

Ratos machos wistar com peso entre 180-250g e camundongos machos C57BL/6 pesando 25-28g, foram fornecidos pelo Biotério Central do Câmpus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, em temperatura controlada de aproximadamente 25°C, com ração e água *ad libitum*. A experimentação nestes animais foi previamente aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP-USP).

3.2- SUBSTRATOS, INIBIDORES E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Ang I, Ang II, Ang 1-7, ZVF, Bk, MGTA, PCI, o-fenantrolina, OPD, Resina Sepharose 6B, DEAE-Sepharose e 1,4 butanediol diglicidil éter foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos), a coluna de Mono Q foi obtida da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Ang 1-9, Ang 1-12, Pro-Phe, o-aminobenzoyl-Ser-Pro-Tyr(NO₂), Hip-Pro-Leu, N-nicotinoil-His-Leu-Leu-Phe, N-nicotinoil-His-Leu-Leu-Tyr, N-nicotinoil-His-Pro-Phe-His, N-nicotinoil-Phe-His-Leu-Leu-, N-nicotinoil-Ile - His-Pro-Phe, N-nicotinoil-Ile-His-Leu-Phe, N-nicotinoil-Ile-His-Pro-Tyr e N-nicotinoil-

Pro-Phe-His-Leu foram produzidos através de síntese em fase sólida em resina Wang e Leu⁵-encefalinamida foi produzida através da síntese em fase sólida em resina Rink pelo nosso laboratório.

3.3- REAGENTES PARA ELETROFORESE

SDS, o Coomassie R-250, TEMED e DTT foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos). O persulfato de amônio foi obtido da GE Healthcare (USB Corporation, Cleveland, Estados Unidos). O marcador de peso molecular de proteínas foi obtido da Fermentas (Hanover, MD, Estados Unidos). O sistema de eletroforese (Mini-Protean 3) foi obtido da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, Estados Unidos). As soluções estoques foram as seguintes: tampão para gel de separação (acrilamida 12 % p/v, bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 375 mM pH 8,8 e SDS 0,1% p/v) e o gel de concentração (acrilamida 3% p/v, bisacrilamida 0,1% p/v, Tris-HCl 125mM pH 6,8 e SDS 0,1% p/v), persulfato de amônio 10%, tampão de corrida da eletroforese (Tris base 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1%, pH 8,3), tampão das amostras das proteínas (concentrado 5x: Tris-HCl 60mM, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol e BPB 0,1%) e água destilada.

3.4- REAGENTES PARA OS EXPERIMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O kit para gel NuPAGE 4-12% foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos) e o corante Coomassie G-250 da Amresco (Solon, OH, Estados

Unidos). Para redução, alquilação e digestão das bandas utilizou-se o kit (*Sequencing Grade*) da Roche Applied Science, (Indianapolis, IN, Estados Unidos). Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Thermo LTQ ion trap da Thermo Corp (San Jose, CA, Estados Unidos).

3.5- REAGENTES PARA OS EXPERIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.5.1- Extração de RNA total com Trizol™

Os reagentes Trizol e fenol foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos), clorofórmio, álcool isopropílico e etanol foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil) e água tratada com DEPC obtido da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos).

3.5.2- Extração de RNA total em coluna

O kit de extração em coluna foi adquirido da Ambion (Foster City, CA, Estados Unidos).

3.5.3- PCR quantitativo em tempo real

Para síntese de cDNA utilizou-se a enzima ImProm II, obtida da Promega (Madison, WI, Estados Unidos). O tampão First-Strand 5X, oligo(dT), dNTPs e DEPC foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Os primers utilizados, obtidos da Invitrogen Brasil (São Paulo, SP, Brasil), são os seguintes:

Alvo	Senso	Anti-senso
CPA1 de camundongo	5'-CACGGCCATTCTTGACAACA-3'	5'-TCGGTGTGTGATCGAGTTTTG-3'
CPA2 de camundongo	5'-AGAAATGGATAACCTCGTGG-3'	5'-TTCATGGGCCGATTTTCAA-3'
CPA3 de camundongo	5'-TTCAAAGTGCCTCCTAACCACC-3'	5'-ATTGTGGATGCTATTGGGCC-3'
CPA4 de Camundongo	5'-TGTGTTGGAGCCGATCCAAA-3'	5'-AATCCACCACCGATTTACCT-3'
CPA 5 de camundongo	5'-GATTGTCAATGCATACGGCAA-3'	5'-CTTGTTTTTTCGCCATAAGCG-3'
CPA6 de camundongo	5'-TCGTGGAGTTGATGCCAATC-3'	5'-CCTGATGCGCTTTCTGTGTTT-3'
CPB de camundongo	5'-TTTTGATGCTGGCTGGTGTG-3'	5'-TTCTGGCGGATGAAATCTGC-3'
Elastase-2 de camundongo	5'-TTGCCTTAATCAAAGTGGCCA-3'	5'-AGGCAAGCTGTCTGGATGTTT-3'
CPN de camundongo	5'-GACATCCAGAAAGAAAGAC-3'	5'-CTGTCCCAGATAATAAAGAG-3'
ECA de camundongo	5'-ATGCAGTACAAAGACTTACC-3'	5'-TGAGACTGTATAGATGCTTG-3'
ECA-2 de camundongo	5'-TATGAAGAGTATGTGGTCCT-3'	5'-ACTGGTTACGGTTATAGTTG-3'
CPA1 de rato	5'-CCAACTCTGAGGTGGAGGTCA-3'	5'-CCCATGGCTCGTCACAAAGT-3'
CPA2 de rato	5'-AGAAATGGATAACCTCGTGG-3'	5'-TTCATGGGCCGATTTTCAA-3'
CPA3 de rato	5'-TTGCGAGGATTGCCACTGAT-3'	5'-TTTGATGCCCAGGTCATAAGC-3'
CPA4 de rato	5'-TTGACTGGGCATACGACAACG-3'	5'-CCTAACCAGCTGCATIACTTAG-3'
CPA 5 de rato	5'-AGGGCCACTAGCTGCTTCTTTT-3'	5'-CCTTAGCTTTTCTTTCTCGGC-3'
CPA6 de rato	5'-CATGCCTGTGTTGAATGTCGA-3'	5'-CGATCATGTGTCCAGCTGAAA-3'
CPB de rato	5'-TGGAACCACATTTGAAGGACG-3'	5'-TCGATGAAGATGGCAGGCTTA-3'
Elastase-2 de rato	5'-TTGCCAGGCATCTAATGGC-3'	5'-CCAAAGCTCACAATACCGTGC-3'
CPN de rato	5'-AACTATAACAACCTCACAGG-3'	5'-GACTGAGTAAGTACCTGGAA-3'

ECA de rato	5'-GCTCAACGGCTACTCTGATG-3'	5'-CCT AGCAGGTGAGCAGGA ATG-3'
ECA-2 de rato	5'-TTGCCAGGC ATC TAATGGC-3'	5'-CCAAAGCTCACAATACCGTGC-3'
RPL13A de rato e camundongo	5'-AGGTCGGGTGGAAGTACCA-3'	5'-CCGTTTCTCCTCCAGAGT-3'

MÉTODOS

4- MÉTODOS

4.1- REMOÇÃO E PERFUSÃO DO LAM ISOLADO DE RATO E CAMUNDONGO

As preparações do leito mesentérico foram isoladas dos animais conforme descrito por McGregor (McGregor, 1965). Os procedimentos cirúrgicos para a remoção do leito arterial mesentérico foram feitos em animais anestesiados com injeção intraperitoneal de tribromoetanol 2,5% (p/v). Em seguida à laparotomia, o leito era estendido e tinha os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior ligados e seccionados. O intestino era ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior era isolada na sua origem, junto à aorta abdominal, e então canulada com uma cânula de polietileno de 4 cm de comprimento. Aproximadamente 1 mL de solução de Krebs (NaCl 120mM; KCl 4,7mM; CaCl₂·2H₂O 3mM; MgCl₂·7H₂O 1,43mM; NaHCO₃ 25mm; KH₂PO₄ 1,17mM; glicose 11mM; pH 7,4) heparinizada era injetado no leito mesentérico. O animal era sacrificado por rompimento do diafragma e em seguida o intestino delgado era separado cortando-se rente à borda intestinal, sendo a preparação lavada com 20 mL de solução de Krebs. Após este procedimento o leito mesentérico era conectado a um sistema de perfusão mantido a 37°C. A perfusão do LAM foi realizada com solução de Krebs, num fluxo constante de 1 mL/min, por meio de uma bomba peristáltica, conectada à cânula. Após perfusão aberta durante 30 min para garantir a total remoção de substâncias sanguíneas, as conexões do sistema

de perfusão eram modificadas para manter 15 mL de solução de Krebs recirculando através da preparação isolada. Esta solução de Krebs, após 3 e 5 horas de perfusão, correspondia ao perfusato do LAM.

4.2- CONCENTRAÇÃO DO PERFUSATO DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO

O perfusato de 4 ou 8 leitões mesentéricos (aproximadamente 120 ou 240 mL) foi centrifugado (5000 rpm x 5 min) à temperatura ambiente para a remoção de precipitado. A solução sobrenadante foi filtrada em membrana Millipore (0,45 µm) e o filtrado concentrado por ultrafiltração em membrana Amicon YM-10, sob pressão de 20 psi de N₂, para um volume final de 2 mL. O perfusato concentrado foi guardado a 4°C até o uso.

4.3- DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para todos os resultados apresentados neste trabalho, uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de produto por min, nas condições descritas.

A cromatografia em DEAE-Sepharose foi revelada por hidrólise do ZVF seguindo uma reação de desaminação oxidativa, utilizando-se uma solução reveladora contendo a enzima de veneno L-aminoácido oxidase, que reage com a Phe liberada pela reação com o substrato ZVF. Ao volume de reação (150µL) contendo as frações, tampão de reação e substrato (0,1 µmol) eram adicionados

400µL da solução reveladora (Tris-HCl 25mM pH 7,2; OPD 10mg/mL em metanol; Peroxidase 1mg/mL; veneno de urutu 10mg/mL) e esta mistura era incubada a 37°C por 30 min para que ocorresse a reação e após o aparecimento de cor, parava-se a reação com ácido cítrico 5% e realizava-se a leitura da absorbância das amostras em 490nm.

Para estudar a especificidade das CPAs isoladas neste trabalho utilizamos Ang I, Ang II, Ang 1-9 e Ang 1-12 como substrato. Os produtos destas hidrólises foram detectados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa em um equipamento Shimadzu SCL-6B acoplado a uma coluna Vydac C-18 (0,45x15cm), eluídos com um gradiente de acetonitrila em 0,1% de TFA, com fluxo de 1 mL/min e monitorados através da absorbância no comprimento de onda de 215 nm.

Para os ensaios com o substrato fluorescente o-aminobenzoyl-Ser-Pro-Tyr(NO₂) [Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂)], substrato para a enzima ECA2 (Yan et al., 2003). As análises foram feitas na presença ou ausência de inibidores, utilizando-se 15 µmol de substrato e 10 µL de cada fração pós DEAE-Sepharose (F1-F5) em 150 µL de tampão Tris HCl 30 mM pH 7,2 por 4 horas a 37°C.

Para avaliar a presença de carboxipeptidase B utilizamos Bk como substrato, analisando o produto des-Arg⁹-Bk por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), como descrito acima para as angiotensinas.

Para os ensaios com os substratos N-nicotinóil-His-Leu-Leu-Phe, N-nicotinóil-His-Leu-Leu-Tyr, N-nicotinóil-His-Pro-Phe-His, N-nicotinóil-Phe-His-Leu-Leu-, N-nicotinóil-Ile -His-Pro-Phe, N-nicotinóil-Ile-His-Leu-Phe, N-nicotinóil-Ile-His-

Pro-Tyr e N-nicotinoil-Pro-Phe-His-Leu, utilizou-se 40 nmol de cada substrato, unidades de atividade enzimática sobre ZFV iguais para CPA1 e CPA2. As reações foram feitas a 37°C por 30 min em tampão Hepes 20 mM pH 7,5, após o tempo de 30 minutos as reações foram matadas pela adição de 800 µL de tampão borato de sódio 0,2 M com 5 mM de EDTA. Imediatamente após a adição do borato as reações receberam 200 µL de solução 0,05% de fluorescamina em acetonitrila, agitando em vortex após o acréscimo da fluorescamina. Fez-se também uma curva padrão com 40, 20, 10, 5, 2, 1 e 0 nmol de glicina. As amostras então foram lidas em fluorímetro Shimadzu RF 535, com λ de excitação 395 nm e λ de emissão de 480 nm em sensibilidade baixa.

4.4- SÍNTESE DAS RESINAS DE AFINIDADE

4.4.1- Resina PCI-Sepharose

Primeiramente, 6 mL de resina Sepharose 6B foram lavados com 30 mL de água destilada em uma coluna, por gravidade. A seguir, foram feitas lavagens sucessivas com acetona nas seguintes concentrações: 25, 50, 75 e 100% com 20 mL cada e depois a mesma quantidade de acetona anidro. A ativação da resina procedeu-se da seguinte maneira: pesaram-se 140 mg de CDI que foram dissolvidos em 3 mL de dioxano anidro. Esta mistura foi agitada suavemente por 20 min a temperatura ambiente. Após este período, a resina foi lavada com acetona comum, no sentido inverso, isto é, 100% até água. Para o acoplamento, fez-se uma solução de 5 mg do PCI em tampão bicarbonato 0,5M pH 9,0 (v/v com

a resina ativada), que foi adicionada à resina e esta mistura foi deixada em geladeira por 24h. O bloqueio dos grupos remanescentes se deu através da adição de 200 μ L de etanolamina 1 M pH 9,0. Antes de utilizar esta resina, fez-se um ciclo de lavagem com as seguintes soluções: Tampão Hepes 10 mM pH 7,5 com NaCl 0,5 M; solução de Na_2CO_3 0,1 M pH11,6 e novamente tampão Hepes. A resina foi estocada em salina 0,15 M na geladeira até subseqüentes manipulações.

4.4.2- Resina SBTI-Sepharose

Para a ligação de 1,4 butanediol diglicidil éter (bisepxi) a resina, 5 mL de Sepharose 6 B foram lavados com 300 mL de água, secos por sucção, suspensos em 4 mL de NaOH 1,0 M com 30 mg de NaBH_4 e adicionou-se 1 mL bisepxi deixando-se por 5 horas a temperatura ambiente sob agitação rotatória suave. Após este tempo a resina foi transferida para um funil e lavada com 300 mL de água. Para a ligação do ácido 6-aminocaproico, fez-se 4 mL de uma solução 1 M deste ácido em pH 9,0 e transferiu-se para um frasco contendo a resina Sepharose 6B-bisepxi estes foram deixados por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foram acrescentados 100 μ L de β -mercaptoetanol para bloquear grupos reativos remanescentes e lavou-se a resina com 300 mL de NaCl 0,5 M. Para a ligação de hidrazina a resina Sepharose 6B-bisaepoxi-6-aminocaproico, os 5 mL da resina foram ressuspensos em 17 % de hidrazina (v/v) com pH previamente ajustado para 6,0. Com a resina já misturada a hidrazina o pH da mistura foi ajustado para

5,0 e adicionou-se 0,2 g de EDAC, ficando uma concentração final de 0,1 M; deixou sob agitação giratória suave por 1 hora. Seqüencialmente a resina Sepharose 6B-bisaepoxi-6-aminocaproico-hidrazida foi lavada com 200 mL de água, salina e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0.

A uma solução de 2 mL de SBTI (5mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 foi adicionado periodato de sódio para uma concentração final de 50 mM, submetendo-se a mistura à agitação lenta durante 30 min ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se glicina para uma concentração final de 0,2 M e imediatamente 30 µL de propileneglicol. A mistura foi deixada sob agitação lenta durante 1 hora ao abrigo da luz. A seguir a mistura foi filtrada numa coluna de Sephadex G-25 (25 x 0,8 cm) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e incubada com Sepharose 6B-bisaepoxi-6-aminocaproico-hidrazida (5mL) na presença de cloreto de manganês 1 mM durante 72 h a 4°C. Em seguida, a resina foi lavada com 20 mL de cada uma das seguintes soluções: NaCl 0,5 M, NaCl 0,25 M e NaCl 0,15 M. A resina SBTI-Sepahrose foi armazenada em NaCl 0,15 M a 4 °C até o momento do uso.

4.4.3- Resina Arginina-Sepharose

Aproximadamente 10 mL de resina Sepharose 6B foram lavados com 150 mL de água destilada em um funil de placa porosa. Após eliminar o excesso de água por sucção, suspendeu-se a resina em 7,5 mL de NaOH 1,0 M contendo 15 mg de NaBH₄ e transferiu-se a suspensão para um frasco plástico de aproximadamente 50 mL. A ativação da resina foi feita com bisepoxi, adicionando-

se 2 mL deste reagente, deixando-se a ativação ocorrer por 5 horas em temperatura ambiente sob agitação suave. Retornou-se a resina ativada para o funil de placa porosa e lavou-se com 150 mL de água. O acoplamento da arginina foi realizado em tampão bicarbonato 0,5 M pH 10 por 24 horas em temperatura ambiente utilizando-se volumes iguais de solução do ligante e de gel. O bloqueio dos grupos remanescentes foi feito por adição de 2-mercaptoetanol à solução do ligante e deixou-se por 1 hora. Antes do uso, a resina sofreu um ciclo de lavagem com 10 mL de Tris-HCl 30 mM pH 7,2 com 1 M de NaCl. Estocou-se em geladeira até o uso.

4.5- CROMATOGRAFIAS

4.5.1- Cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Sepharose

O perfusato concentrado (2 mL) foi centrifugado e aplicado numa coluna (61 x 1 cm) de DEAE previamente equilibrada em Tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,1 com NaCl 20 mM. A cromatografia foi desenvolvida em temperatura ambiente em um sistema de FPLC com fluxo de 0,5 mL/min, coletando-se frações de 2,0 mL. A eluição desta cromatografia foi feita com um gradiente salino de 20-250 mM de NaCl e após a coleta das frações realizou-se a detecção das CPAs por meio da atividade enzimática com ZVF de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.

4.5.2- Cromatografia de afinidade em coluna Arginina-Sepharose

A amostra foi concentrada para um volume de 1 mL e equilibrada em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 com 1 M de NaCl. Em seguida a amostra foi aplicada à coluna de afinidade Arginina-Sepharose, equilibrada em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 com 1 M de NaCl. Esta coluna foi operada em temperatura ambiente, sob um fluxo gravitacional. A etapa de lavagem e eluição para retirada das proteínas que são retardadas por essa resina foi feita passando-se tampão de equilíbrio. A detecção das atividades de CPA e CPB foi feita com os substratos ZVF e Bk, respectivamente.

4.5.3- Cromatografia de afinidade em coluna PCI-Sepharose

A amostra foi equilibrado por diálise em tampão Hepes 25 mM pH 7,5 com NaCl 0,5 M, após o equilíbrio a amostra foi concentrada para um volume de 1mL e aplicada em uma coluna de PCI-Sepahrose previamente equilibrada em tampão Hepes 25 mM pH 7,5 com NaCl 0,5 M. Esta coluna de afinidade foi operada em temperatura ambiente, com fluxo por gravidade. A resina foi lavada após a aplicação com o tampão de equilíbrio, as proteínas que se ligaram à resina foram eluídas com uma solução de Na_2CO_3 0,1 M pH 11,6 com 0,5 M NaCl, sendo as frações (0,5mL) neutralizadas logo após a coleta com 0,1 mL de tampão Tris HCl 1M pH 8,1 A presença da CPA foi acompanhada por meio da medida da atividade enzimática sobre o ZVF.

4.5.4- Cromatografia de afinidade em coluna SBTI-Sepharose

A amostra foi equilibrada em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,1 com NaCl 0,15 M e concentrada para 0,5 mL. Após a aplicação em uma coluna de SBTI-Sepharose fez-se a lavagem da resina com tampão de equilíbrio. A eluição dos componentes retidos foi feita aplicando-se solução de HCl 20 mM. A detecção das atividades de CPA foi feita com os substratos ZVF e Ang I, medindo a formação de Ang 1-9 e a atividade conversora foi feita utilizando-se Ang I como substrato, e medindo como produto Ang II.

4.5.5- Cromatografia de troca aniônica em coluna de Mono Q

A amostra foi equilibradas em Tris HCl 20 mM pH 8,1 com 20 mM de NaCl, concentrando-se até o volume de 2 mL antes de aplicar em uma coluna de Mono Q (0,5 X 5 cm). A cromatografia foi desenvolvida em temperatura ambiente em um sistema de FPLC com fluxo de 0,1 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL. A eluição desta cromatografia foi feita por um gradiente salino. Após a coleta das frações realizou-se a detecção das CPAs por meio da atividade enzimática sobre a Ang II, medindo a formação de Ang 1-7 ou sobre o ZVF.

4.6- ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A Eletroforese foi desenvolvida segundo Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando-se o sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad). O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida 15% e o gel de concentração de poliacrilamida 3%. A corrida foi feita sob amperagem constante de 10 mA, utilizando-se o tampão de corrida.

Para análise estrutural por MS/MS fez-se uma eletroforese em gradiente de 4-12% de acrilamida em gel previamente montado, NuPAGE 4-12% Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos). A corrida foi feita sob amperagem constante de 10 mA, utilizando-se o tampão de corrida presente no kit. Após a corrida corou-se com corante Comassie G-250 da Amresco (Solon, OH, Estados Unidos).

4.7- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS/MS)

As bandas presentes nos géis foram excisadas, reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, Estados Unidos). As análises de LC/MS/MS foram realizadas nos extratos digeridos *in-gel* utilizando 2-8 µL de cada amostra. As amostras foram injetadas por sistema automático de injeção, FAMOS (Sunnyvale, CA, Estados Unidos), em uma coluna de C18 (Michrom BioResources, Auburn, CA, Estados Unidos). O fluxo utilizado foi de 320 nL/min, em um gradiente de 0-100 de B sendo, A) 0.3% ácido acético + 99.7 % de água e B) 0.3% ácido acético + 99.7 % acetonitrila. Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Thermo LTQ ion trap (Thermo Corp., San Jose,

CA, Estados Unidos). O aparelho foi ajustado com os seguintes parâmetros: voltagem da agulha de 3 kV, uma resolução de 3 Da, energia de colisão em 30% e os íons recorrentes foram excluídos. Os espectros de MS/MS foram comparados ao banco de dados do NCBI usando o algoritmo SEQUEST.

4.8- SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os substratos Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂), Leu⁵-encefalinamida, Hip-Pro-Leu, Ang 1-12 e Ang 1-9, e, o inibidor Pro-Phe foram sintetizados para o desenvolvimento desta tese. As sínteses dos peptídeos foram realizadas em fase sólida pela estratégia Fmoc convencional, utilizando-se microondas para acelerar as reações (Yu et al., 1992). A resina Rink-amida ou Wang-X, sendo X o aminoácido C-terminal para cada peptídeo, foi inicialmente suspensa em 2 mL de NMP para inchar por 15 min e transferida para o reator de vidro. Após sete ciclos de lavagem (7 mL de NMP; 40 s de agitação com N₂; aspiração) com auxílio de sistema automatizado, procedeu-se à remoção do Fmoc protetor do grupo amino por adição manual de 2 x 1 mL de piperidina 20% (v/v) em DMF sobre a resina e incubação por 3 e 7 min após as respectivas adições, com agitação com N₂. A resina desbloqueada, cuja presença de grupos amina livres foi demonstrável por reação com TNBS 1% em metanol, na presença de DIPEA 0,5 M, foi lavada 7x com NMP, como descrito acima. Este processo de remoção de Fmoc de grupos amina foi também usado durante as etapas de elongação da cadeia peptídica. Todos os reagentes estavam presentes em excesso molar de 2,5 vezes em relação à resina. Na Elongação da cadeia cada Fmoc-AA dissolvido em 340 µL de

DMSO/NMP 20 % (v/v) foi misturado com 0,4 mL de HBTU/HOBt 0,45 M e incubado por 3 min antes de ser adicionado à resina enxuta, desbloqueada e condicionada com DMSO/NMP 20 % (v/v). Após agitação com N₂, adicionou-se 240 µL de DIPEA 1,5 M, seguindo-se 6 pulsos de microondas de 1 min (potência 10%) com intervalos para refrigeração do reator.

Para clivar o peptídeo da resina após desbloquear o Fmoc-peptídeo, a resina com o peptídeo foi transferida para um tubo de ensaio e adicionou-se TFA/Fenol/Tis/H₂O, 88% de TFA, 5% de Fenol 2% de Tis e 2% de água (v/v), e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida esta solução foi filtrada e diluída 40 vezes com uma solução 2% (v/v) de acetonitrila em água. A solução com os peptídeos foi passada por cartuchos de Prep-Sep SPE C18 equilibrados previamente em solução de 5% acetonitrila/0,1% TFA (v/v), a eluição foi feita com solução de 60% acetonitrila/0,1% TFA (v/v) coletando frações de 0,2 mL, fazendo-se teste TNBS 1% em metanol (p/v), na presença de DIPEA 0,5 M para definir em quais frações teríamos os peptídeos.

Para os peptídeos N-nicotinoil-His-Leu-Leu-Phe, N-nicotinoil-His-Leu-Leu-Tyr, N-nicotinoil-His-Pro-Phe-His, N-nicotinoil-Phe-His-Leu-Leu-, N-nicotinoil-Ile - His-Pro-Phe, N-nicotinoil-Ile-His-Leu-Phe, N-nicotinoil-Ile-His-Pro-Tyr e N-nicotinoil-Pro-Phe-His-Leu, o método de síntese foi semelhante ao acima descrito, mas neste caso em todos os peptídeos o primeiro aminoácido já estava ligado a resina wang. A recuperação dos peptídeos, após a clivagem, foi feita por precipitação a frio em éter, e não em Prep-Sep SPE C18. A solução de peptídeo em TFA foi filtração em coluna vazia de 3 ml com disco poroso, lavando-se a resina com 2 x 0,5 ml de TFA. O TFA e outros compostos voláteis foram removidos sob vácuo,

com a bomba protegida com 1) gelo seco, 2) NaOH e 3) gelo seco. O material obtido, na forma de filme no frasco de vidro, foi lavado com 4 x 5 ml de éter gelado. Nesta etapa o peptídeo é recuperado como uma massa, lavado com éter com ajuda de espátula. Após a evaporação do éter por várias horas em tubo aberto, o material foi ressuspenso em 400 µl de ácido acético 50% diluído sob agitação no vortex, adicionando-se 400 µl de H₂O após dissolução. A solução obtida foi clarificada por centrifugação 5000 rpm x 10 min à temperatura ambiente e então liofilizada.

4.9- PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM HPLC DE FASE REVERSA

Os peptídeos foram purificação em HPLC de fase reversa num equipamento Shimadzu SCL-6B acoplado a uma coluna Vydac C-18. Os peptídeos foram eluídos em diferentes concentrações de acetonitrila em TFA 0,1% (v/v) num fluxo de 1,0 mL/min e monitorados pela absorvância no comprimento de onda de 215 nm. Os picos de peptídeos foram coletados, secos e analisados quanto à sua composição e pureza.

4.10- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Análise de aminoácidos serviu para a quantificação, determinação da pureza e da composição de aminoácidos dos peptídeos sintetizados. Assim amostras de peptídeos secos e livres de sal, previamente purificados por HPLC, foram hidrolisadas em 50 µL de ácido metanossulfônico 4 N contendo 0,2% de triptamina

(p/v) a 115°C durante 20 horas em microcapilares devidamente selados, de acordo com o método descrito por (Liu e Boykins, 1989). Os hidrolisados foram retirados dos capilares, parcialmente neutralizados com 40 µL de NaOH 4 N, diluídos em tampão citrato de sódio 0,2 M pH 2,2 contendo 15% (v/v) de glicerol e alíquotas de volume adequado foram cromatografadas segundo Moore (Moore et., al 1958) modificado, em analisador automático equipado com uma coluna (0,6 X 22 cm) empacotada com resina Beckman W-3, sistema de coluna única. A sensibilidade do método é de 1-20 nmol/resíduo. A quantidade de cada aminoácido nas amostras foi determinada pela relação entre as alturas dos picos obtidos nas amostras dos hidrolisados e as alturas dos picos dos aminoácidos correspondentes (mesmo tempo de retenção pela coluna) num cromatograma obtido a partir de uma mistura padrão contendo 5 nmol de cada aminoácido. A composição em aminoácidos dos peptídeos foi calculada pela relação molar entre os resíduos encontrados nos hidrolisados.

4.11- ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO EM MESENTÉRIOS MURINOS

4.11.1- Extração de RNA total (protocolo do reagente de trizol™)

Para a extração do RNA de alguns tecidos coletados (mesentério e pâncreas) utilizamos o protocolo do reagente Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). O material ainda congelado foi macerado por pressão e a cada 100 mg

de tecido foi adicionado 1 mL de Trizol™. Após a homogeneização, foi adicionado clorofórmio, e a mistura agitada vigorosamente por 15 segundos. A fase aquosa foi separada por centrifugação e o RNA total precipitado com isopropanol. Seguido de nova centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado em etanol 75 % com DEPC 0,1 % e o precipitado seco ao ar. Após ressuspensão em água Mili-Q estéril com 0,1 % de DEPC e quantificado por absorbância a 260 nm, 1 µg de RNA total foi tratado com 1 U da enzima desoxirribonuclease I (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por 15 min à temperatura ambiente e a reação foi parada a 65 °C por 10 minutos após adição de EDTA numa concentração final de 2,5 mM. A integridade do RNA obtido foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.11.2- Extração de RNA total (protocolo de extração em coluna)

Para a extração do RNA de alguns tecidos coletados (mesentério, pâncreas e bulbo olfatório) utilizamos o protocolo de extração em coluna de sílica (Ambion Foster City, CA, Estados Unidos). Os tecidos extraídos foram macerados com um pistilo em 500 µL de tampão de lise (kit) em tubos de microcentrifugas de 1,5 mL e levadas ao vórtex. Um volume de 500 µL de etanol 64 % foi adicionado ao lisado e misturado, essa mistura foi transferida para uma coluna encaixada a tubos de microcentrifugas de 1,5 mL e, centrifugada a 10000g por 15 segundos. O líquido que passou por essa coluna foi então descartado, a coluna foi lavada e as amostras eluídas com soluções que acompanham o kit. O RNA total foi eluído em 50 µL de solução de eluição, pré aquecida a 80 °C, por centrifugação a 10000g

por 1 minuto. A solução obtida foi tratada com 5 µL de tampão de DNase 1 e 1 µL de DNase (kit), para cada amostra. Em seguida, foi incubada por 15 minutos a 37 °C. A DNase foi inativada com 5 µL do reagente de inativação e o RNA foi coletado, transferido para novo tubo e armazenado a -80°C.

4.11.3- Transcrição reversa

Foi utilizado o protocolo para a enzima ImProm II (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Em tubos de microcentrifuga foi misturado 0,5 µg de RNA total, 1 µL de Oligo-dT (0,5 µg/µL) e 11 µL de água DEPC. Estes tubos foram colocados a 70 °C por 5 min e depois transferidos rapidamente para o gelo. Foram então adicionados 4 µL de tampão First-Strand 5X, 2,4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL da enzima ImProm II, misturado cuidadosamente, incubado à temperatura ambiente por 5 min e a 42 °C por 1 hora. A reação foi inativada a 70 °C por 15 min. Os cDNAs sintetizados foram estocados a -20 °C.

4.11.4- Análise da expressão das proteases estudadas por PCR quantitativo em tempo real

Os cDNAs sintetizados foram utilizados para quantificação de RNAm por PCR em tempo real, utilizando como *housekeeping* gene, RPL13A. A seqüência de todos os *primers* utilizados neste trabalho encontra-se no item 3.5.3 de material. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas no aparelho ABI Prism 7500 Sistema de Detecção de Seqüência (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados

Unidos). O processo de ciclagem térmica constitui de 2 minutos a 50 °C, em seguida 2 minutos a 95 °C e 40 ciclos no modo de dois passos: 95 °C por 15 segundos, seguido de 60 °C por 1 min. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos, onde no lugar do cDNA foi usado a mesma quantidade de RNA tratado com DNase que foi utilizada para a síntese do cDNA. Estes procedimentos exclui a possibilidade de contaminação por DNA genômico. As condições do PCR em tempo real foram otimizadas para RNAm alvo com concentrações idéias de oligonucleotídeos, ausência de formação de dímeros dos oligonucleotídeos e condições para obtenção de apenas um pico na curva de dissociação durante a amplificação em tempo real.

Para a reação do PCR em tempo real foi utilizado 7,5 µL do mix Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo específico para cada gene amplificado, 1 µL de cDNA das diferentes amostras (1 µL de cada cDNA diluído 10 vezes) e 5,5 µL de água Mili-Q estéril. Dos 15 µL de reação preparados, 10 µL foram utilizados em 2 poços diferentes da placa de 96 poços (5 µL/poço), portanto todos os dados de PCR em tempo real foram obtidos em duplicata. Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da Applied Biosystems, utilizando RPL13A como referência para normalização. A quantificação foi feita utilizando o método $2^{\Delta CT}$, os valores obtidos para os genes alvos foram normalizados pelos valores de expressão de RPL13A .

RESULTADOS

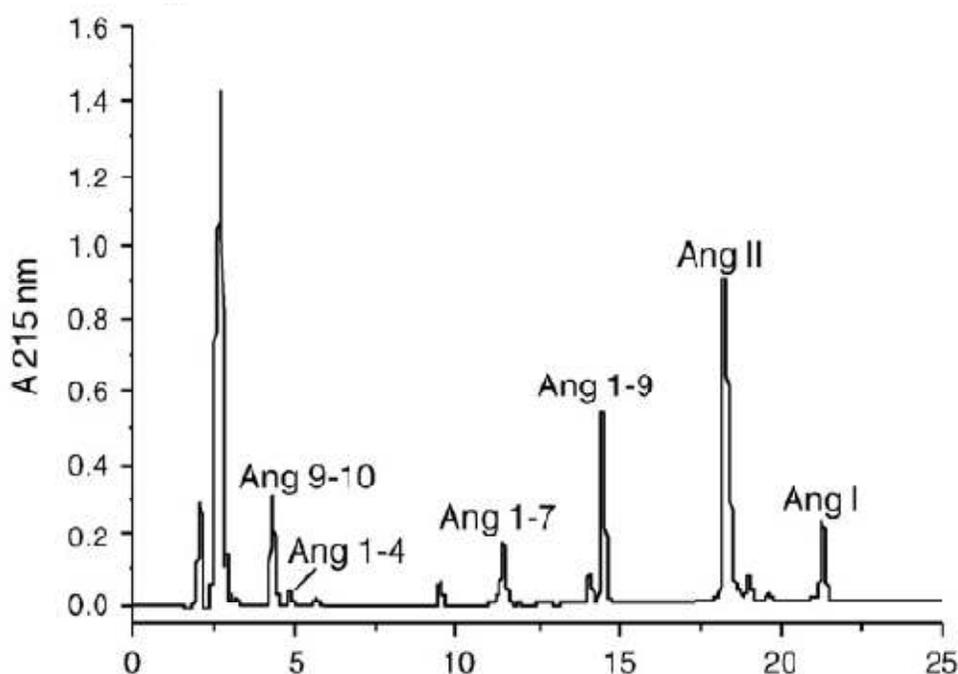
5- RESULTADOS

5.1- PROCESSAMENTO DE ANG I, ANG II E Bk POR PROTEASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Os vasoceptídeos Ang I, Ang II e Bk foram processados proteoliticamente durante a incubação com amostras do perfusato do LAM de rato, cujos produtos gerados foram identificados por cromatografia de fase reversa em HPLC. A recuperação percentual dos principais fragmentos, e do próprio substrato Ang I encontrados na figura 2 em relação à quantidade inicial foi: Ang II (33%), Ang 1-9 (22%), Ang 1-7 (10%), Ang 1-4 (1%), Ang 9-10 (27%), e Ang I (11%).

Na figura 3 vemos os produtos da hidrólise de Ang II realizada pelas enzimas presentes no perfusato do LAM de rato, formando o principal produto, qual seja, a Ang 1-7. A recuperação percentual dos principais fragmentos, e do próprio substrato Ang II encontrados na figura 3 em relação à quantidade inicial foi: Ang 1-7 (21 %), Ang 1-4 (11%), Ang 5-8 (17%) e Ang II (13%).

No processamento de Bk, figura 4, vemos que o principal produto formado é a des-Arg⁹-Bk. A recuperação percentual dos principais fragmentos e do próprio substrato Bk encontrados na figura 4 em relação à quantidade inicial foi: Bk 1- 7 (0,2%), des-Arg⁹-Bk (66 %) e Bk (30 %).



Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

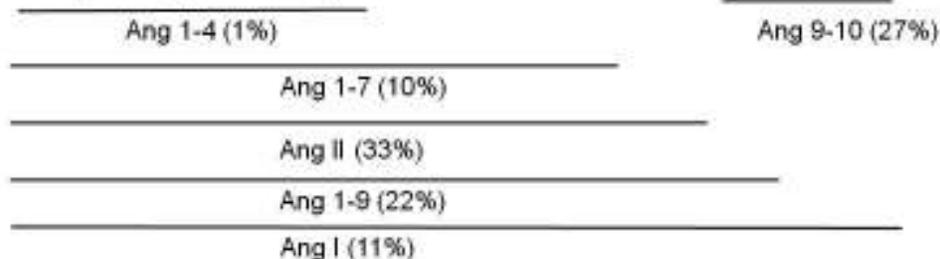


Figura 2: Identificação dos produtos gerados pela hidrólise de Ang I, realizada pelas enzimas do perfusato do LAM de rato. Os picos dos produtos gerados encontram-se marcados no cromatograma. Suas estruturas correspondentes e respectivas recuperações estão indicadas, por barras horizontais, no esquema abaixo do cromatograma. A reação foi feita com o equivalente da atividade secretada (em média) por um leito arterial mesentérico em 4 s de perfusão, frente a 30 nmol de Ang I em 150µL de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min a 37°C. A reação foi parada com a adição de 40µL de TFA 5%. A eluição foi realizada por um gradiente de 8-32% de acetonitrila em TFA 0,1%, em HPLC de fase reversa (C₁₈; 0,45 x 15cm).

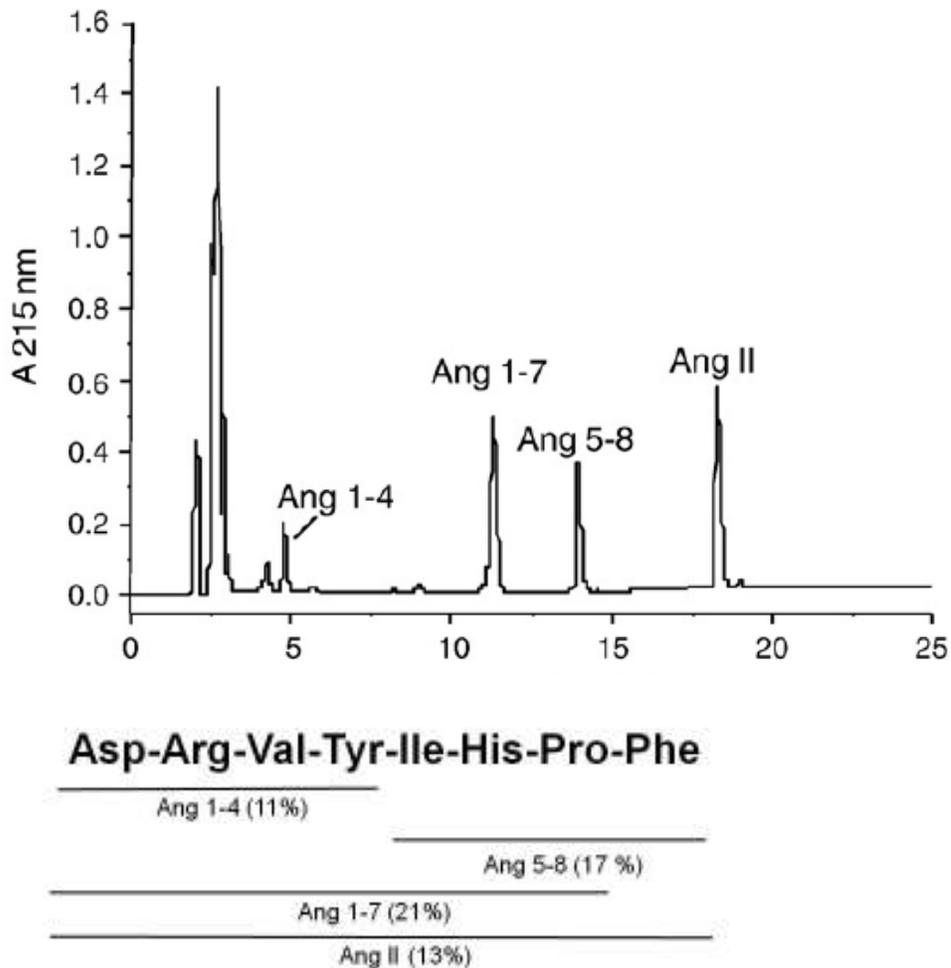
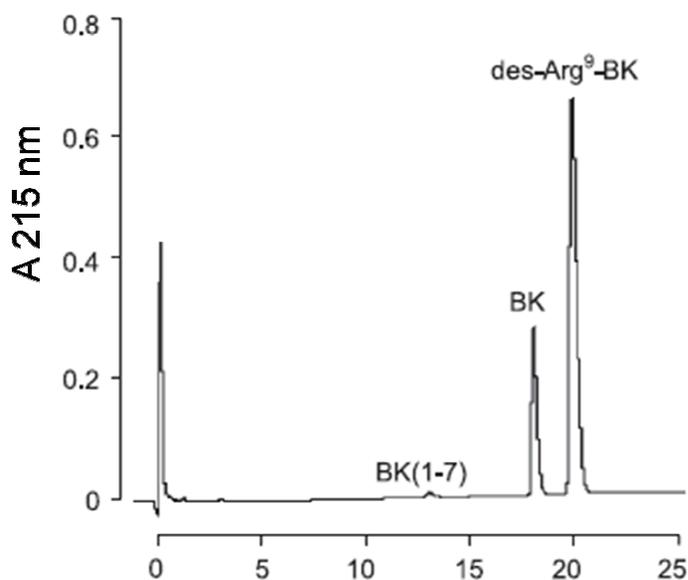


Figura 3: Identificação dos produtos gerados pela hidrólise de Ang II, realizada pelas enzimas do perfusato do LAM de rato. Os picos dos produtos gerados encontram-se marcados no cromatograma. Suas estruturas correspondentes e respectivas recuperações estão indicadas, por barras horizontais, no esquema abaixo do cromatograma. A reação foi feita com o equivalente da atividade secretada (em média) por um leito arterial mesentérico em 4 s de perfusão, frente a 30 nmol de Ang II em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min a 37°C. A reação foi parada com a adição de 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada por um gradiente de 8-32% de acetonitrila em TFA 0,1%, em HPLC de fase reversa (C₁₈; 0,45 x 15cm).



Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Bk 1-7 (0,2%)

des-Arg⁹-Bk(66%)

Bk(30%)

Figura 4: Identificação dos produtos gerados pela hidrólise de Bk, realizada pelas enzimas do perfusato do LAM de rato. Os picos dos produtos gerados encontram-se marcados no cromatograma. Suas estruturas correspondentes e respectivas recuperações estão indicadas, por barras horizontais, no esquema abaixo do cromatograma. A reação foi feita com o equivalente da atividade secretada (em média) por um leito arterial mesentérico em 1,2 min de perfusão, frente a 30 nmol de Bk em 150µL de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min a 37°C. A reação foi parada com a adição de 40µL de TFA 5%. A eluição foi realizada por um gradiente de 8-32% de acetonitrila em TFA 0,1%, em HPLC de fase reversa (C₁₈; 0,45 x 15cm).

5.2- COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CARBOXIPEPTIDASES NO MESENTÉRIO DE RATO E CAMUNDONGO

Com o intuito de caracterizar o perfil de expressão de algumas proteases, que agem na região C-terminal de angiotensinas e da Bk, no mesentério de rato e camundongo, quantificou-se o RNAm para carboxipeptidases A 1-6 (CPAs 1-6); carboxipeptidase B (CPB) e carboxipeptidase N (CPN); e, enzima conversora de angiotensina (ECA) e enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). A figura 5 indica que tanto o mesentério de rato quanto o de camundongo expressam três tipos de CPAs, quais sejam, CPA1, CPA2 e CPA3, mas não expressam CPA4, CPA5 e CPA6. A CPA6 foi detectada somente no bulbo olfatório de ambas as espécies, não mostrado. As CPA4 e CPA5 não foram detectadas em nenhum dos tecidos analisados, tanto em rato quanto em camundongo. Em rato, a carboxipeptidase mais expressa foi a CPA1, seguida pela CPA2 e CPA3. Já em camundongo, a CPA3 teve o maior nível de expressão no mesentério, seguida pelas CPA1 e CPA2, expressas em níveis praticamente iguais.

Na figura 6, observamos que as enzimas ECA e ECA2 são expressas no mesentério de rato e camundongo, e, notamos uma maior expressão de ECA2 em rato do que em camundongo.

A figura 7 mostra a expressão das carboxipeptidases que agem sobre Bk, quais sejam, CPN e CPB. Ambas as proteases são expressas em níveis muito próximos nos mesentérios de rato e camundongo.

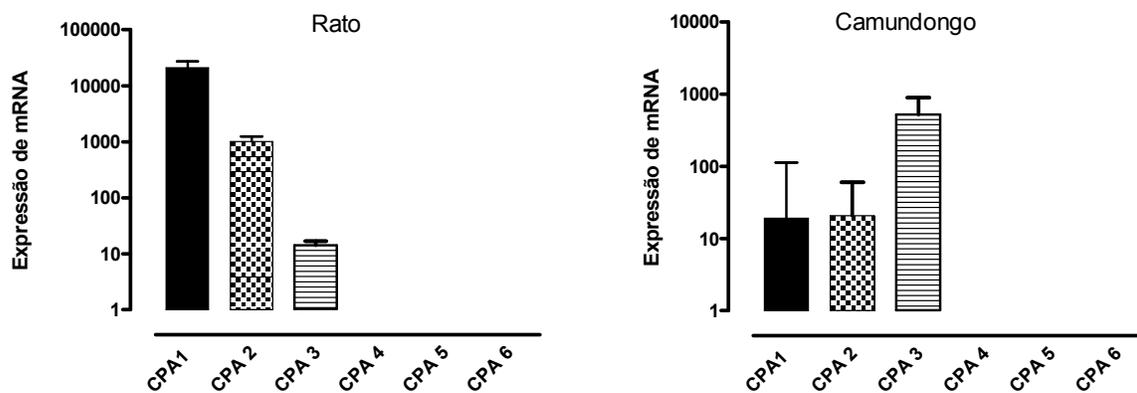


Figura 5: Comparação entre o nível de expressão RNAm das CPAs dos mesentérios de rato e camundongo. O Pâncreas foi utilizado como controle para a expressão de CPA1, CPA2 e CPA3. O bulbo olfatório foi utilizado como controle para a expressão de CPA6. O RNAm de diferentes tecidos foi extraído utilizando-se o kit RNAqueous-4PCR (Ambion). O cDNA foi sintetizado empregando-se a transcriptase reversa Improm II (Promega). O nível de expressão das proteases foi analisado por PCR em tempo real, utilizando-se Sybr Green I. Os valores de expressão foram obtidos pelo método $2^{\Delta CT}$.

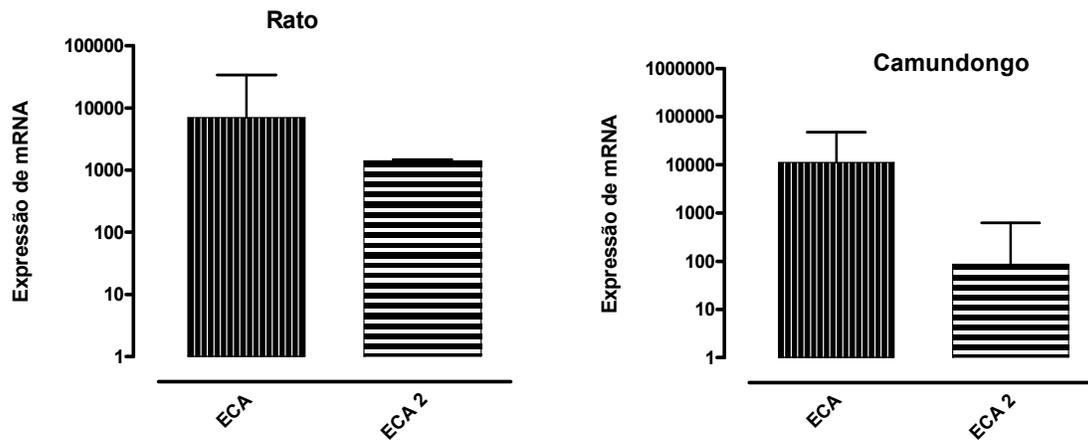


Figura 6: Comparação entre o nível de expressão RNAm das ECA e ECA 2 dos mesentérios de rato e camundongo. O RNAm de diferentes tecidos foram extraídos utilizando-se o protocolo do reagente TrizolTM. O cDNA foi sintetizado empregando-se a transcriptase reversa Improm II (Promega). O nível de expressão das proteases foi analisado por PCR em tempo real, utilizando-se Sybr Green I. Os valores de expressão foram obtidos pelo método do $2^{\Delta CT}$.

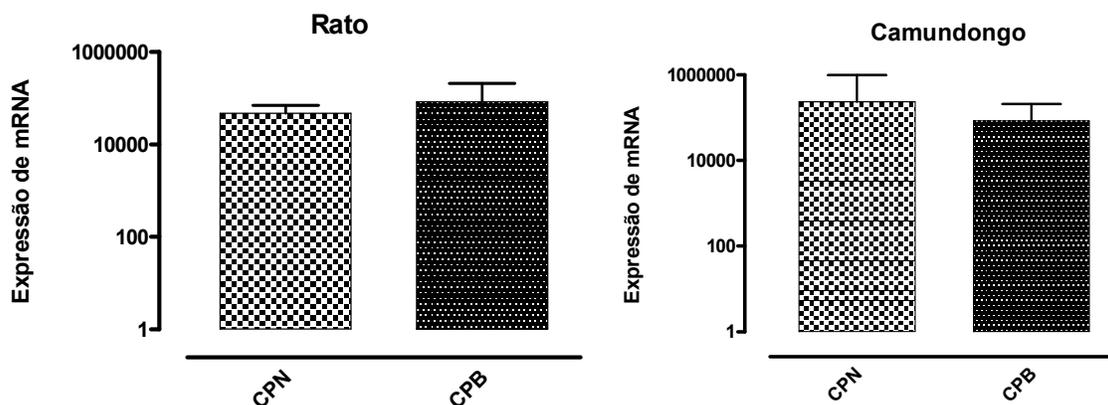


Figura 7: Comparação entre o nível de expressão RNAm das CPN e CPB dos mesentérios de rato e camundongo. O RNAm de diferentes tecidos foi extraído utilizando-se o kit RNAqueous-4PCR (Ambion). O cDNA foi sintetizado empregando-se a transcriptase reversa Improm II (Promega). O nível de expressão das proteases foi analisado por PCR em tempo real, utilizando-se Sybr Green I. Os valores de expressão foram obtidos pelo método do $2^{\Delta\text{CT}}$.

5.3- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DO PERFUSATO DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO

Para fins de caracterização das atividades detectadas no perfusato do LAM de rato e camundongo, foram feitos ensaios enzimáticos, na presença ou ausência de inibidores, frente aos substratos Ang 1-12, Ang I, Ang II e Bk. Para a detecção de CPAs, utilizou-se os inibidores o-fenantrolina e PCI. Para analisar a presença de CPB utilizou-se MGTA, PCI e o-fenantrolina. A presença de serinoproteases conversoras, como quimases e elastase-2, foi revelada através do uso de SBTI.

Vemos na figura 8, painel A, que o perfusato de LAM de rato é capaz de hidrolisar Ang 1-12, formando como principal produto a Ang II. Podemos ainda observar que a Ang I é o segundo produto mais formado, seguido pela Ang 1-9 e Ang 1-7. Ressalte-se ainda que o PCI inibe todas as atividades, mas de maneira parcial a formação de Ang II. A o-fenantrolina inibe completamente a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e, parcialmente a formação de Ang I e Ang II. O SBTI é capaz de inibir a formação de Ang II e Ang 1-7, porém, aumenta a formação de Ang I. A formação de Ang 1-9 não é alterada pelo SBTI.

Na figura 8, painel B, vemos os produtos formados pela hidrólise de Ang I realizada pelas enzimas presentes no perfusato do LAM de rato. O principal produto formado é a Ang II, seguidos pelas Ang 1-9 e Ang 1-7. O PCI também foi capaz de inibir a formação de todos os produtos, sendo a inibição total para a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e parcial para a formação de Ang II. A o-fenantrolina foi capaz de inibir totalmente a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e aumentar a formação de Ang II, figura 8, painel B. O SBTI foi capaz de inibir a formação de Ang II e aumentar a formação de Ang 1-9, sendo que a formação de Ang 1-7 não foi alterada por esse inibidor.

No painel C da figura 8, notamos os produtos formados pela hidrólise de Ang II, realizada pelas proteases do perfusato do LAM de rato. Vemos que o principal produto formado é a Ang 1-7, e, o segundo mais abundante, a Ang 5-8. O PCI e a o-fenantrolina inibem totalmente a formação de Ang 1-7, e não alteram a formação de Ang 5-8. O SBTI inibe completamente a formação de Ang 5-8, porém, não altera a formação de Ang 1-7.

Na figura 8, painel D, observamos o produto formado pela hidrólise de Bk, realizada pelas enzimas do perfusato do LAM de rato. O produto formado pela hidrólise de Bk é a des-Arg⁹-Bk. A formação de des-Arg⁹-Bk é totalmente inibida por PCI, o-fenantrolina e MGTA.

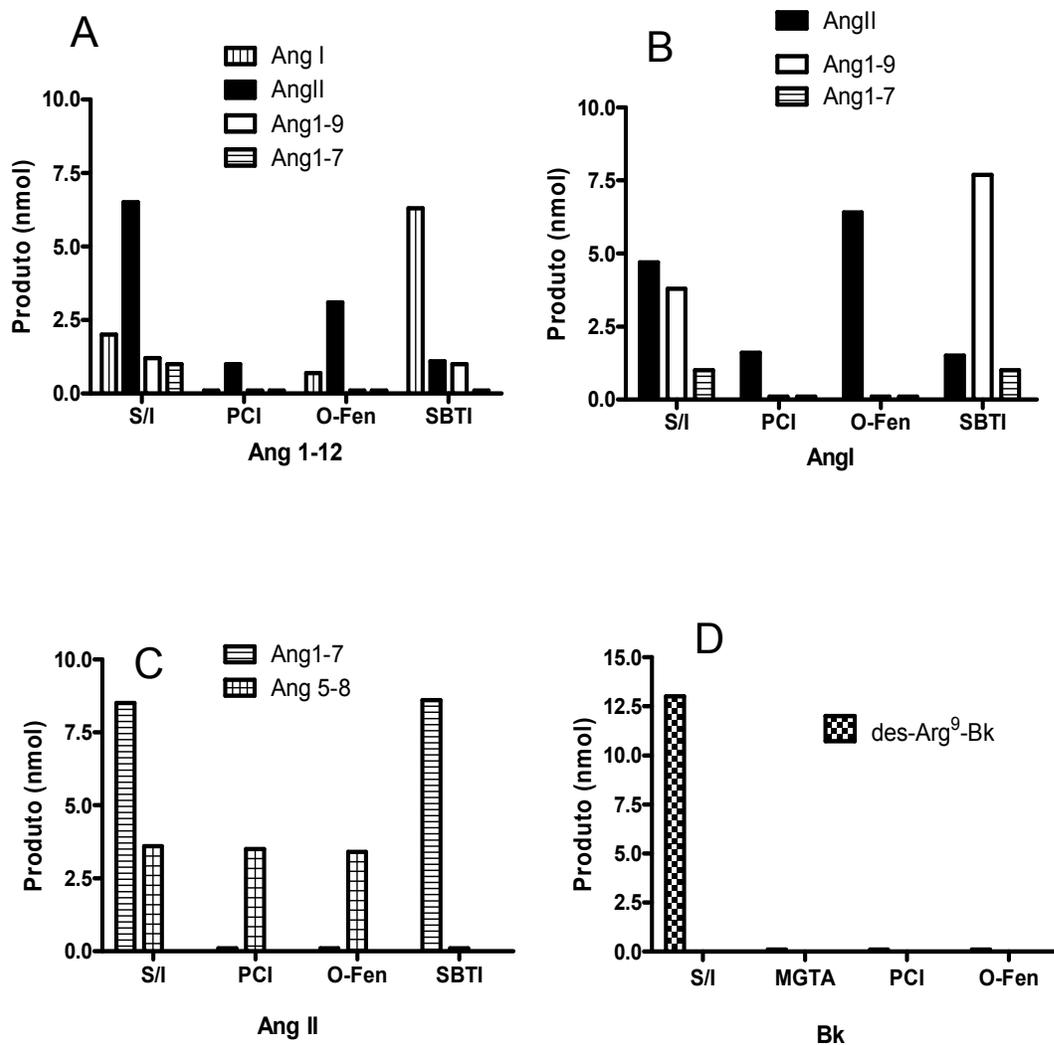


Figura 8: Comparação do perfil de inibição da hidrólise de Ang 1-12, Ang I, Ang II e Bk, realizada por proteases do perfusato do LAM de rato. Análises por cromatografia de fase reversa em HPLC dos fragmentos gerados pela incubação de 30 nmol de Ang 1-12 (painel A), Ang I (painel B), Ang II (painel C) ou Bk (painel D) por 30 min a 37°C, com o equivalente a atividade secretada (em média) por um LAM em 4 s de perfusão, na presença, ou não, dos inibidores indicados. S/I refere-se à reação sem inibidor, PCI à inibição pelo inibidor de carboxipeptidase de batata, o-Fen pela o-fenantrolina, que é um inibidor de metaloproteases. O SBTI é o inibidor de tripsina da soja, e o MGTA, um inibidor de carboxipeptidases básicas. PCI foi utilizado em uma concentração de 10 µM, MGTA e SBTI a 5 µM e o-fenantrolina a 1mM.

A figura 9, painéis A, B, C e D, mostra, respectivamente, os produtos formados pela hidrólise de Ang 1-12, Ang I, Ang II e Bk, realizada por proteases presentes no perfusato do LAM de camundongo. Como vemos nas figuras 8 e 9, o perfil de atividades em rato e camundongo é muito semelhante. Notamos na figura 9, painel A, que a perfusato de LAM de camundongo é capaz de hidrolisar Ang 1-12, formando como principal produto a Ang II. A Ang I é o segundo produto mais formado, seguido pela Ang 1-9 e Ang 1-7. O PCI inibe quase que completamente todas as atividades, restando somente um pouco da atividade conversora, formação de Ang II. A o-fenantrolina inibe completamente a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e, parcialmente a formação de Ang I e Ang II. O SBTI é capaz de inibir a formação de Ang II e Ang 1-7, contudo, aumenta a formação de Ang I e Ang 1-9, diferente do observado em rato, figura 8, painel A.

Na figura 9, painel B, observamos os produtos formados pela hidrólise de Ang I, realizada pelas enzimas presentes no perfusato do LAM de camundongo. O principal produto formado é a Ang 1-9, seguido pelas Ang II e Ang 1-7. O PCI foi capaz de inibir a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e, não teve efeito sobre a formação de Ang II, diferentemente do constatado em rato, figura 8, painel B. A o-fenantrolina foi capaz de inibir totalmente a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e de aumentar a formação de Ang II, figura 9, painel B. O SBTI foi capaz de inibir a formação de Ang II e aumentar a formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, figura 9, painel B.

No painel C da figura 9, verificamos os produtos formados pela hidrólise de Ang II, realizada pelas proteases do perfusato do LAM de camundongo. Vemos que o principal produto formado é a Ang 1-7, e, o segundo mais abundante é a

Ang 5-8. O PCI e a o-fenantrolina inibem totalmente a formação de Ang 1-7, e, não alteram a formação de Ang 5-8. O SBTI inibe completamente a formação de Ang 5-8, mas não altera a formação de Ang 1-7.

Na figura 9, painel D, averiguamos o produto formado pela hidrólise de Bk, realizada pelas enzimas do perfusato do LAM de camundongo. O produto formado pela hidrólise de Bk é a des-Arg⁹-Bk. A formação de des-Arg⁹-Bk é totalmente inibida por PCI, o-fenantrolina e MGTA.

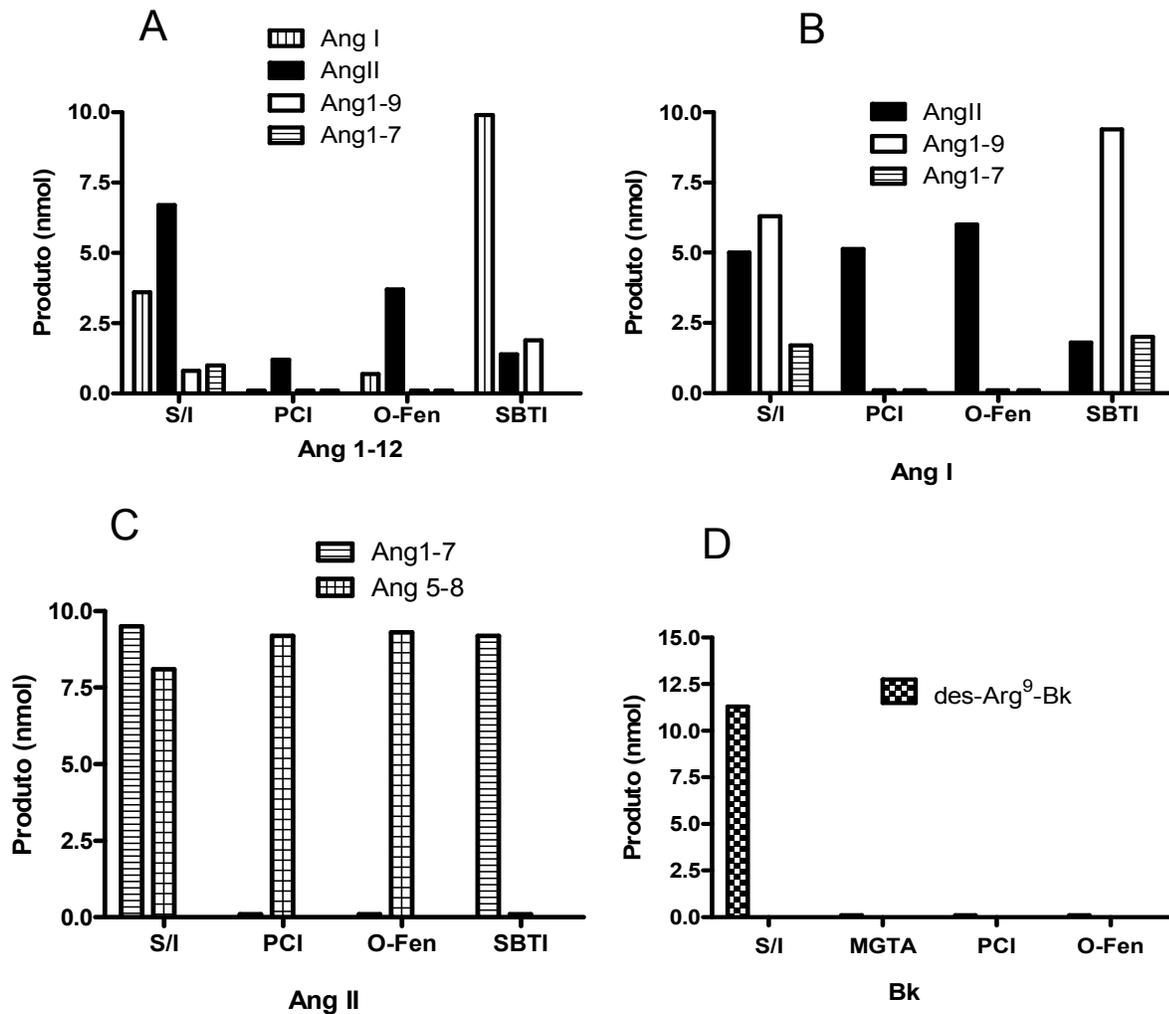


Figura 9: Comparação do perfil de inibição da hidrólise de Ang 1-12, Ang I, Ang II e Bk, realizada por proteases do perfusato do LAM de camundongo. Análises por cromatografia de fase reversa em HPLC dos fragmentos gerados pela incubação de 30 nmol de Ang 1-12 (painel A), Ang I (painel B), Ang II (painel C) ou Bk (painel D) por 30 min a 37°C, com o equivalente a atividade secretada (em média) por um LAM em 8 s de perfusão, na presença, ou não, dos inibidores indicados. S/I refere-se à reação sem inibidor, PCI à inibição pelo inibidor de carboxipeptidase de batata, o-Fen pela o-fenantrolina, que é um inibidor de metaloproteases. O SBTI é o inibidor de tripsina da soja, e o MGTA, um inibidor de carboxipeptidases básicas. PCI foi utilizado em uma concentração de 10 μ M, MGTA e SBTI a 5 μ M e o-fenantrolina a 1mM.

5.4- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES TIPO CPAs DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Como uma primeira tentativa de caracterizar as atividades atribuídas as CPAs, submetemos uma amostra do perfusato concentrado a uma troca iônica e monitoramos a atividade tipo CPA utilizando ZVF como substrato, figura 10. Vemos uma distribuição desigual da atividade tipo CPA no cromatograma, com uma recuperação de atividade formadora de Phe a partir de ZVF, de 18%, 7%, 58%, 17% e 0,4% respectivamente, para os picos 1, 2, 3, 4 e 5.

A tabela 1 demonstra o perfil de atividade de frações presentes nos picos 1-5. F 1-5 representam as frações com maior atividade sobre o ZVF nos picos 1-5. A tabela 1 mostra que todas as frações foram capazes de hidrolisar Ang I, sendo a F3 a fração mais ativa sobre Ang I. Somente uma fração foi capaz de agir sobre a Ang II, formando Ang 1-7, a F4, tabela 1. Sobre o ZVF todas as frações foram ativas, sendo a F1 a mais efetiva na hidrólise. Somente duas frações tiveram atividade frente ao substrato Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂), F1 e F4. As frações 1-5 não foram capazes de hidrolisar Leu⁵-encefalinamida e Hip-Pro-Leu, não mostrado.

A tabela 2 mostra o perfil de inibição das frações 1-5 frente dois inibidores, PCI e Pro-Phe. O PCI foi capaz de inibir quase que completamente todas as atividades, com exceção a hidrólise de Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂). O Pro-Phe, por sua vez, não foi capaz de inibir eficientemente nenhuma fração.

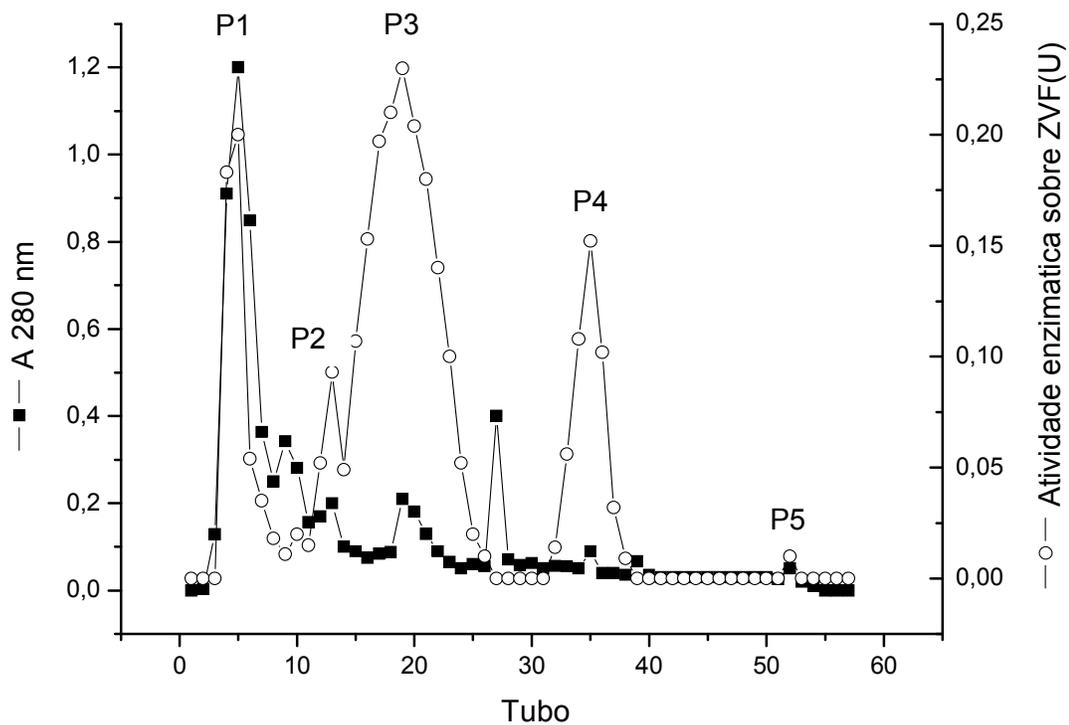


Figura 10: Isolamento de enzimas tipo CPA, presentes no perfusato do LAM de rato, por troca iônica em coluna DEAE-Sepharose (61 x 1 cm). P1-5 representam cinco picos com atividade tipo CPA. A amostra aplicada na coluna, corresponde à quantidade de perfusato produzida por quatro leitos durante 3 horas de perfusão. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 20mM pH 8,1 e a eluição das proteínas retidas foi realizada com um gradiente salino de 20-250mM de NaCl. A cromatografia foi desenvolvida com fluxo de 0,5 mL/min. A concentração de proteínas foi estimada por absorvância a 280 nm, e, a atividade enzimática das frações foi determinada pela hidrólise do substrato ZVF, quantificando-se colorimetricamente a Phe liberada por reação acoplada à L-aminoácido-oxidase. Uma unidade enzimática é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de Phe em 1 min nas condições descritas em métodos. A recuperação de atividade sobre o ZVF foi de 18%, 7%, 58%, 17% e 0,4% para os picos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 1

Atividades das CPAs presentes no perfusato do LAM de rato frente a Ang I, Ang II, ZVF e Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂).

Frações	Atividade			
	Ang I	Ang II	ZVF	Abz-Ser-Pro-Tyr(NO ₂)
F1	32±0	0	282±0	200
F2	170±0	0	138±20	0
F3	523±30	0	254±30	0
F4	333±0	273±0	189±50	60±0
F5	186±20	0	6±0	0

F1-F5 representam as frações dos picos 1-5, figura 10, com maior atividade sobre ZVF. As atividades sobre Ang I, Ang II e ZVF foram determinadas pela formação de Ang 1-9, Ang 1-7 e Phe, respectivamente, e foram expressas em mU. A atividade frente a Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂) foi expressa em unidades de fluorescência relativa. O n utilizado para cálculo do desvio padrão foi 2.

Tabela 2

Efeito inibitório de PCI e Pro-Phe sobre as atividades proteolíticas das frações isoladas da DEAE-Sepharose, frente a Ang I, Ang II, ZVF e Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂).

Frações	% de inibição							
	Ang I		Ang II		ZVF		Abz-Ser-Pro-Tyr(NO ₂)	
	PCI	PF	PCI	PF	PCI	PF	PCI	PF
F1	100±0	11±3	ND	ND	72±1	0	0	0
F2	90±0	2.1±1	ND	ND	78±1	0	ND	ND
F3	90±2	18±9	ND	ND	76±1	0	ND	ND
F4	97±0	31±6	100±0	5±1	85±0	0	0	0
F5	100±0	10±4	ND	ND	80±2	2,4±1	ND	ND

F1-F5 representam as frações dos picos 1-5, figura 10, com mais alta atividade sobre ZVF.

PCI é o inibidor de carboxipeptidase de batata. PF é Pro-Phe, um inibidor de ECA 2.

ND não determinado.

O n utilizado para cálculo do desvio padrão foi 2.

5.5- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-9 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Para isolar a enzima formadora de Ang 1-9, fizemos uma nova cromatografia, por troca iônica, em DEAE-Sepharose, partindo desta vez, do perfusato do LAM de oito ratos. O resultado obtido é análogo ao apresentado na figura 10. As frações contendo a maior quantidade de atividade formadora de Ang 1-9, o pico 3 (figura 10), foram reunidas e aplicadas em um coluna com resina Arg-Sepharose. Esta cromatografia por afinidade teve o objetivo de retirar a atividade formadora de des-Arg⁹-Bk, caracterizada como CPB por Oliveira e colaboradores (Oliveira et al., 2007). Notamos que a cromatografia foi eficaz em reter a CPB, separando-a da enzima capaz de hidrolisar ZVF (CPA), figura 11.

Após a retirada da CPB, procedeu-se uma cromatografia por afinidade em PCI-Sepharose para retirar CPA, figura 12. Essa coluna é capaz de reter a enzima que hidrolisa ZVF, deixando passar outras proteínas, demonstrado pela presença um grande pico de A 280 na aplicação e lavagem, sem nenhuma atividade sobre o ZVF, figura 12. Na eluição, vemos a saída da enzima que hidrolisa ZVF, porém, há ainda nesta amostra a contaminação por uma serinoprotease conversora, que apresentava inibição por SBTI, não mostrado.

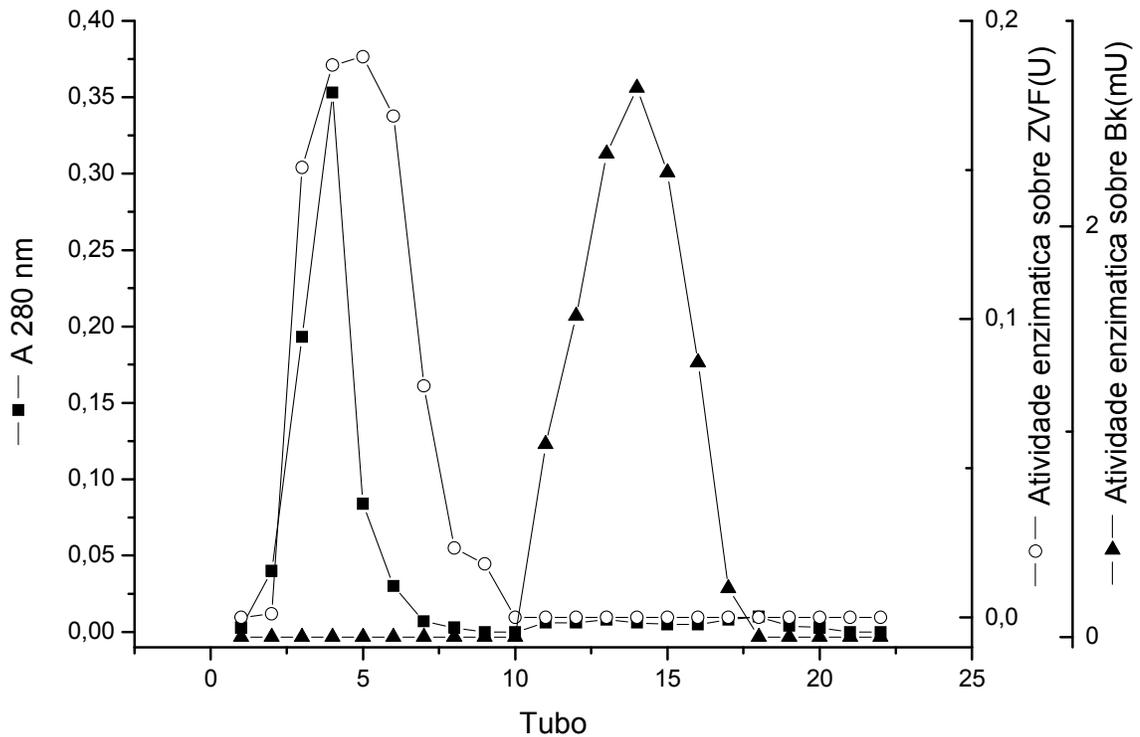


Figura 11: Perfil de eluição das proteínas e das atividades, nas frações obtidas por cromatografia de afinidade, do pico 3 da DEAE-Sepharose, em coluna Arg-Sepharose. Reunimos as frações 16-24 da DEAE, idêntica a figura 10, e equilibramos em tampão Tris-HCl 30mM pH 7,2 com NaCl 1 M (18 mL). Após o equilíbrio, a amostra foi concentrada para um volume de 1 mL e aplicada em uma coluna de Arg-Sepharose (1,5 x 1,5 cm). Após a aplicação na coluna, fez-se a lavagem da resina com 30 mL de tampão de equilíbrio para retirar a atividade formadora de des-Arg⁹-Bk. Atividade esta, que é retardada por essa resina. A detecção das atividades de CPA e CPB foi feita com os substratos ZVF e Bk, respectivamente. A recuperação para atividade sobre o ZVF foi de 100%.

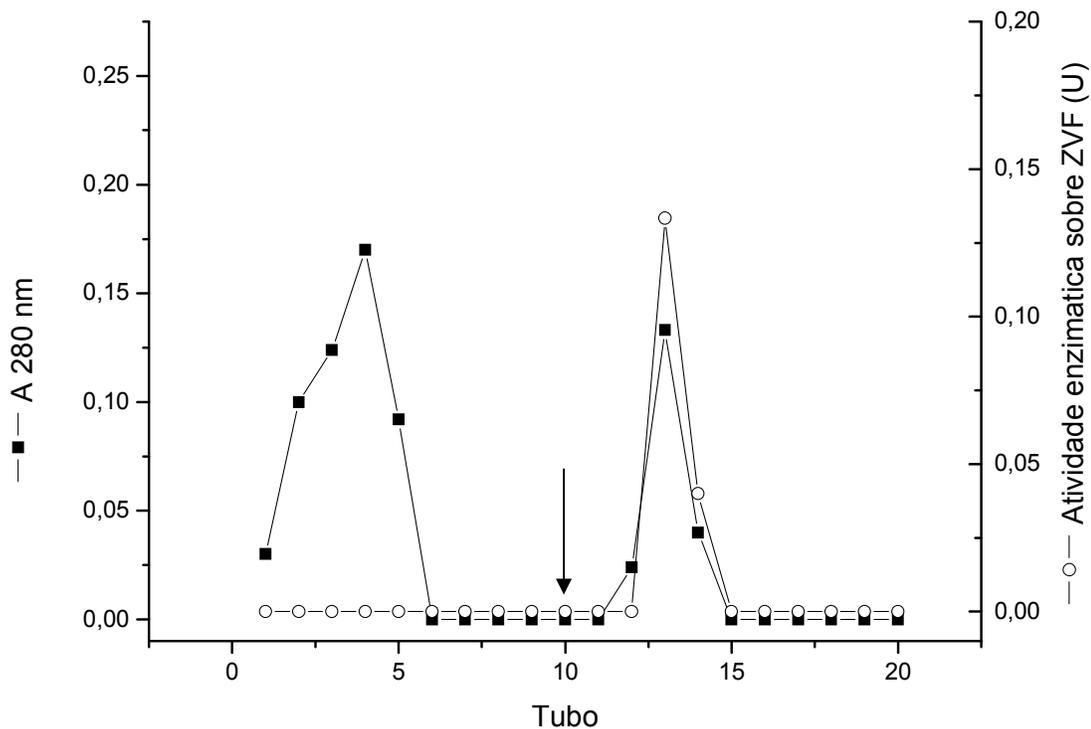


Figura 12: Perfil de eluição das proteínas e das atividades, nas frações obtidas por cromatografia de afinidade, das frações não retardadas pela coluna Arg-Sepharose, em PCI-Sepharose. Reunimos as frações 3-7 (figura 11) e equilibramos em tampão Hepes 25mM pH 7,5 com NaCl 0,5 M (5 mL). Após o equilíbrio, a amostra foi concentrada para um volume de 1 mL e aplicada em uma coluna de PCI-Sepharose (2 x 1,5 cm). Posteriormente à aplicação na coluna, fez-se a lavagem da resina com 8 mL de tampão de equilíbrio. A eluição dos componentes retidos foi feita aplicando-se solução de Na₂CO₃ 0,1 M pH 11,6 à coluna (indicado pela seta). A detecção das atividades de CPA foi feita com os substratos ZVF, recuperando-se 59% da atividade aplicada.

Como uma tentativa de retirar a serinoprotease inibida por SBTI, fizemos uma cromatografia por afinidade em SBTI-Sepharose, o que possibilitou a retirada desta enzima, figura 13. A enzima capaz de formar Ang II fica retida pela afinidade em SBTI-Sepharose, e, a enzima capaz de formar Ang 1-9 e hidrolisar ZVF (CPA) não é retardada por essa coluna, figura 13.

Para demonstrar o grau de pureza obtido na purificação desta enzima, utilizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e desnaturantes, figura 14. Podemos notar a complexidade da amostra inicial, o perfusato do LAM de rato, canaleta 1 (figura 14). Vemos que a DEAE-Sepharose é capaz de retirar do perfusato alguns contaminantes, canaleta 2 (figura 14). A cromatografia por afinidade em Arg-Sepharose, que se mostrou eficaz em retirar a CPB da amostra, figura 11, também retirou contaminantes, canaleta 4 (figura 14). A cromatografia por afinidade em PCI-Sepharose é capaz de retirar um contaminante de menor peso molecular, e, vemos a presença de uma só banda em 35 kDa no material que foi eluído, canaleta 3 (figura 14). Mesmo possuindo uma única banda, notamos uma contaminação por uma enzima conversora, não mostrado. A etapa final de purificação foi uma cromatografia por afinidade em SBTI-Sepharose, onde se retirou uma serinoprotease conversora, figura 13.

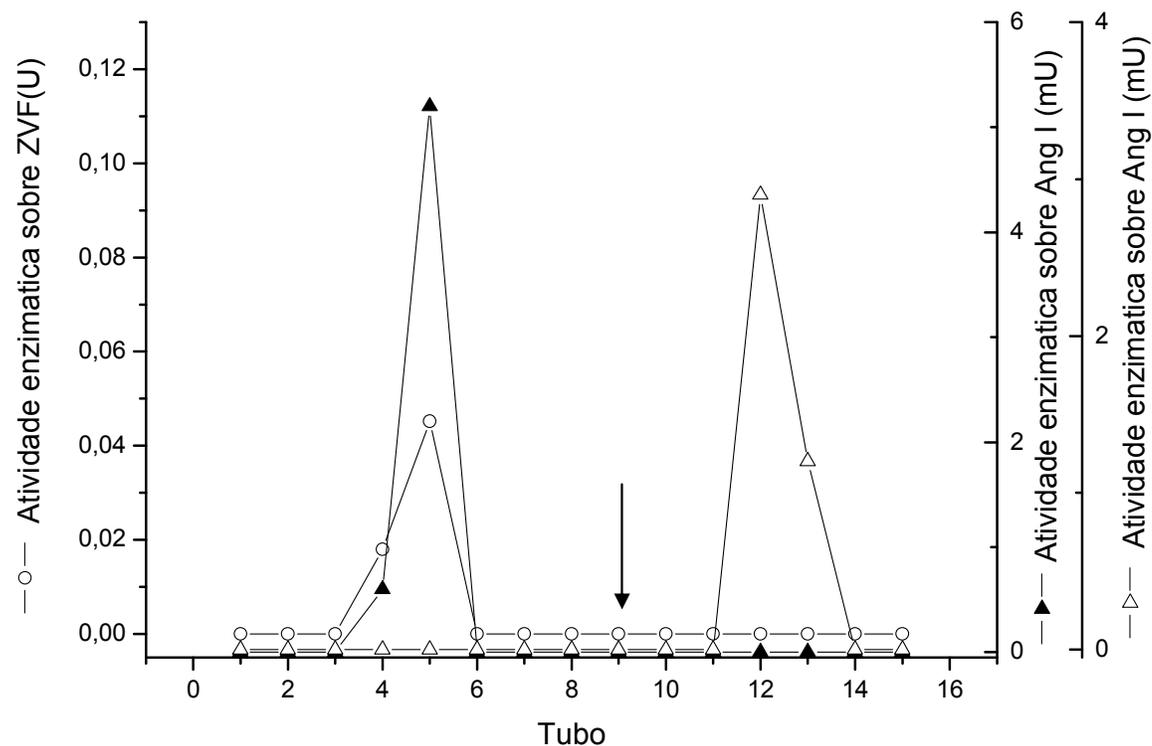


Figura 13: Perfil de eluição das atividades, nas frações obtidas por cromatografia de afinidade, das frações retidas pela coluna PCI-Sepharose, em SBTI-Sepharose. O tubo numero 13, eluído da coluna PCI-Sepharose (figura 12) e equilibrado em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,1 com NaCl 0,15 M (0,5 mL) foi aplicado em uma coluna de SBTI-Sepharose (2 x 1,5 cm). Após a aplicação na coluna, fez-se a lavagem da resina com 8 mL de tampão de equilíbrio. A eluição dos componentes retidos foi feita aplicando-se solução de HCl 20 mM à coluna (indicado pela seta). A detecção das atividades de CPA foi feita com os substratos ZVF e Ang I, formando Ang 1-9 como produto (triângulo preenchido). A atividade conversora foi feita utilizando-se Ang I, obtendo como produto Ang II (triângulo não preenchido). A recuperação da atividade sobre o ZVF foi de 95,8%.

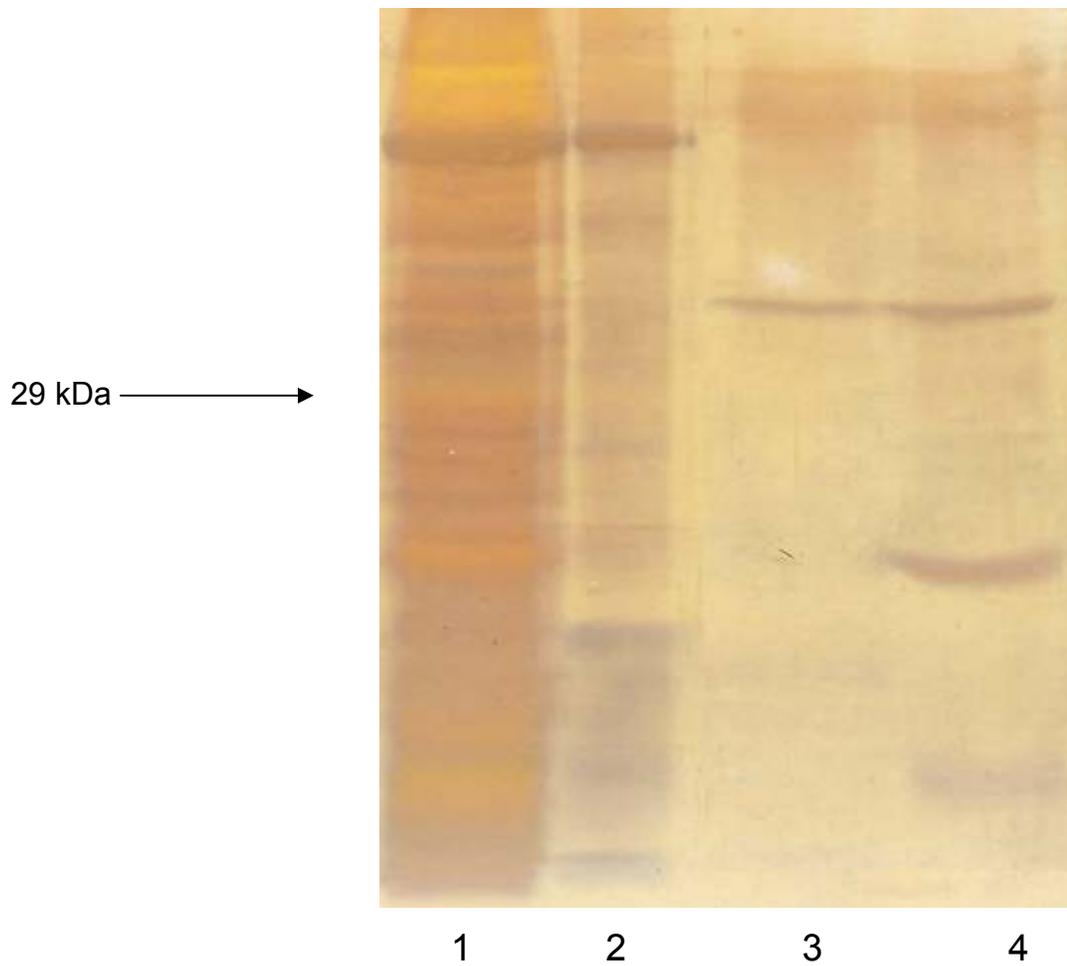


Figura 14: SDS-PAGE redutor (15%) para análise da purificação da carboxipeptidase formadora de Ang 1-9. 1- Perfusato, 2- Pico 3 da DEAE-Sepharose, 3- Fração não retardada pela SBTI-Sepahrose, 4- Fração não retardada pela Arg-Sepharose. O gel foi corado com prata.

Após a constatação da pureza da enzima isolada, corremos uma eletroforese em SDS-PAGE em condições redutoras em gradiente de 4-12% de acrilamida. Notamos a presença de única banda que foi recortada, tripsinizada e seqüenciada por espectrometria de massas. Após o seqüenciamento de cinco fragmentos trípticos, identificou-se a enzima formadora de Ang 1-9 como sendo a CPA2, idêntica a pancreática, figura 15 e tabela 3.

```
1   MIEDVQVLLD QEREEMLFNQ QRERGGNFNF EAYHTLEEIY QEMDNLVAEN PGLVSKVNIG
61  SSFENRPMNV LKFSTGGDKP AIWLDAGIHA REWVTQATAL WTANKIASDY GTDPAITSLL
121 NTLDIFLLPV TNPDGYVFSQ TTNRMWRKTR SKRSGSGCVG VDPNRNWDAN FGGPGASSSP
181 CSDSYHGPKP NSEVEVKSIV DFIKSHGKVK AFITLHSYSQ LLMFPYGYKC TKPDDFNELD
241 EVAQKAAQAL KRLHGTSYKV GPICSVIYQA SGGSIDWAYD LGIKYSFAFE LRDTGFYGF
301 LPAKQILPTA EETWLGLKTI MEHVRDHPY
```

Figura 15: Identificação por MS/MS dos fragmentos trípticos da CPA2. Os fragmentos marcados por barras horizontais, na estrutura da CPA2, correspondem às regiões seqüenciadas por espectrometria de massas.

Tabela 3

Fragmentos trípticos identificados por MS/MS e suas posições na estrutura da CPA2.

Peptídeos	Posição na estrutura da CPA2*	Score
VNIGSSFENRPMNVLK	57-72	0.76
SGSGCVGVDPNR	154-165	0.8
TIMEHVRDHPY	319-329	0.93
TIMEHVRDHP	319-328	0.89
TIMEHVR	319-325	0.84

* As posições indicadas se referem à forma madura da CPA2.

5.6- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-7 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Outra importante atividade caracterizada foi a formadora de Ang 1-7, a partir de Ang II. Para tanto, reunimos todas as frações presentes na cromatografia por troca iônica em DEAE-Sepharose, capazes de formar Ang 1-7 a partir de Ang II, pico 4 (figura 10). Tais frações foram obtidas em uma cromatografia por troca iônica em DEAE-Sepharose análoga à apresentada na figura 10, porém, mais uma vez, partimos do perfusato do LAM de oito ratos. Tentou-se um caminho cromatográfico semelhante ao utilizado para purificar a CPA2, contudo, este se mostrou impraticável, uma vez que, a cromatografia por afinidade em PCI-Sepharose destruía totalmente a atividade, por repetidas vezes (não mostrado).

Assim, um novo caminho foi tentado: após a cromatografia por troca iônica

em DEAE-Sepharose, utilizou-se uma coluna que também é trocadora de ânions, a Mono Q. A coluna de Mono Q foi capaz de resolver a amostra em quatro picos de proteína (leituras de A 280 nm), sendo que, um deles, mostrou atividade formadora de Ang 1-7, figura 16.

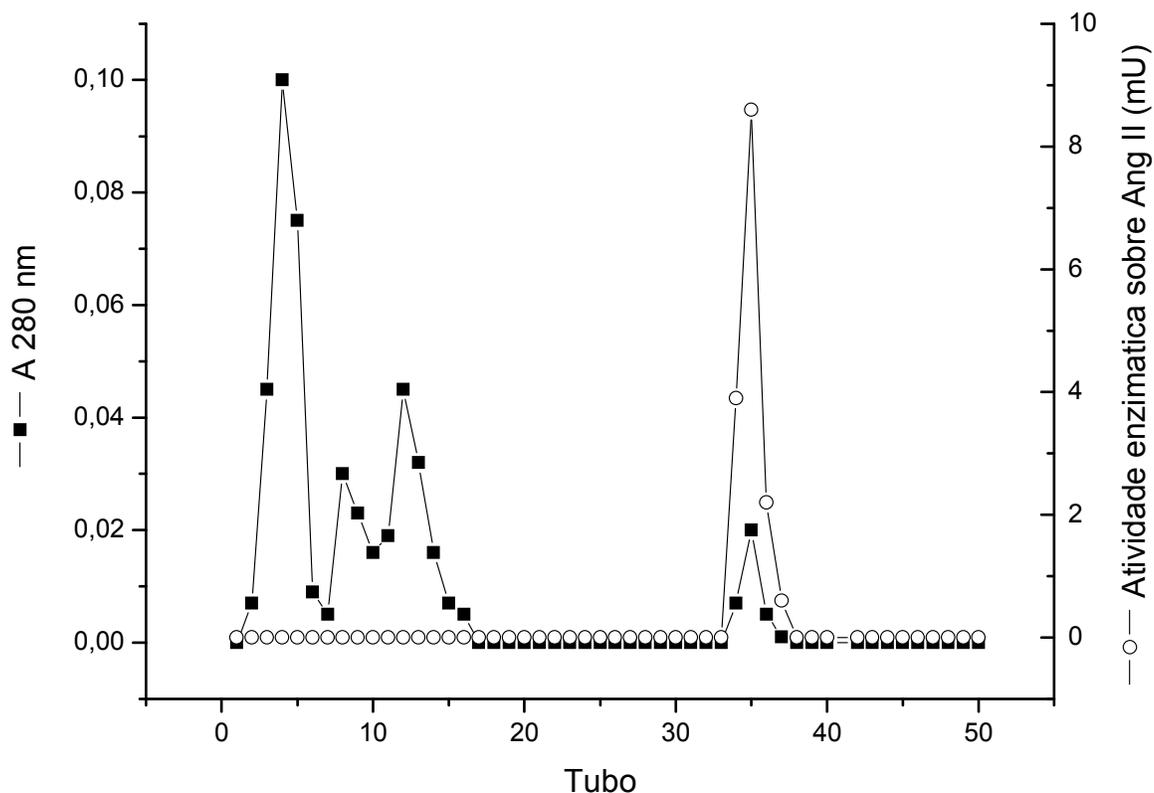


Figura 16: Isolamento da CPA capaz de formar Ang 1-7, presente no pico 4 da DEAE-Sepharose (figura 10), por troca iônica em coluna Mono Q (0,5 x 5 cm). A amostra aplicada na coluna corresponde à reunião das frações 33, 34 e 35, análogo ao mostrado na figura 10. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 20mM pH 8,1 e a eluição das proteínas retidas foi realizada com um gradiente salino de 20-250mM de NaCl. A cromatografia foi desenvolvida com fluxo de 0,1 mL/min. A concentração de proteínas foi estimada por absorvância a 280 nm, e a atividade enzimática das frações foi determinada pela hidrólise de Ang II, quantificando-se a formação de Ang 1-7. Recuperou-se 84% da atividade formadora de Ang 1-7.

Averiguamos a pureza da amostra capaz de formar Ang 1-7, através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e desnaturantes. A reunião das amostras pós-Mono Q apresentou apenas uma banda corada com comassie blue, canaleta 3 (figura 17). No perfusato do LAM de rato, canaleta 1, e, na reunião das amostras vindas da cromatografia por troca iônica em DEAE-Sepharose, canaleta 2, podemos notar a presença de inúmeras bandas, figura 17.

Constatada a pureza da enzima isolada, correu-se uma eletroforese em gradiente de 4 a 12% de acrilamida, recortando a banda, tripsinizando a enzima e seqüenciando por espectrometria de massas. Após o seqüenciamento de três fragmentos trípticos, identificamos a enzima formadora de Ang 1-7 como sendo a CPA1, idêntica a pancreática, figura 18 e tabela 4.

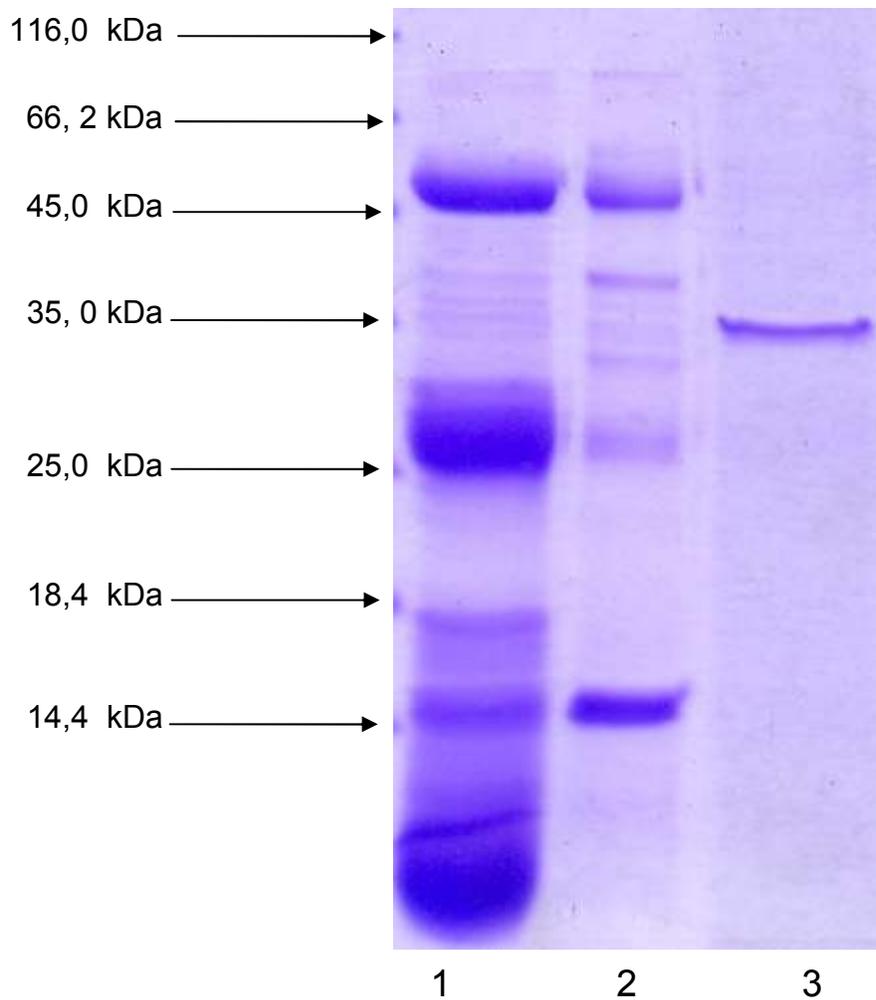


Figura 17: SDS-PAGE redutor (15%) para análise da purificação da carboxipeptidase formadora de Ang 1-7. 1- Perfusato, 2- Pico 4 da DEAE-Sepharose, 3- Reunião da frações capazes de formar Ang 1-7 da Mono Q. O gel foi corado com coomassie blue.

1 KQQMSAFQAR ALSTDSFNVA TYHTLDEIYE FMDLLVAEHP QLVSKIQIGN TFEGRPIHVL
61 KFSTGGTNRP AIWIDTGIHS REWVTQASGV WFAKKITKDY GQDPTFTAVL DNMDIFLEIV
121 TNPDGFAFTH KTNRMWRKTR SHTQGSLCVG VDPNRNWDAG FGMAGASSNP CSETYRGKFP
181 NSEVEVKSIV DFVTSHGNIK AFISIHSYSQ LLLYPYGYTS EPAPDQAELD QLAKSAVTAL
241 TSLHGTFKY GSIIDTIYQA SGSTIDWTYS QGIKYSFTFE LRDTGLRGFL LPASQIIPTA
301 EETWLALLTI MDHTVKHPY

Figura 18: Identificação por MS/MS dos fragmentos trípticos da CPA1. Os fragmentos marcados por barras horizontais, na estrutura da CPA1, correspondem às regiões seqüenciadas por espectrometria de massas.

Tabela 4

Fragmentos trípticos identificados por MS/MS e suas posições na estrutura da CPA1.

Peptídeos	Posição na estrutura da CPA1*	Score
GKFPNSEVEVK	177-187	0,83
FPNSEVEVK	179-187	0,63
SAVTALTSLHGTK	235-247	0,47

* As posições indicadas se referem à forma madura da CPA1.

5.7- ISOLAMENTO DA CARBOXIPEPTIDASE FORMADORA DE ANG 1-9 PRESENTE NO PERFUSATO DO LAM DE RATO POR TROCA IÔNICA

Como o método utilizado para o isolamento da CPA2 se mostrou muito laborioso, e, a Mono Q se mostrou eficaz no isolamento da CPA1, decidimos utilizar a troca iônica em Mono Q para tentar isolar a CPA2. Para tanto, fizemos uma nova coleta de perfusato do LAM de oito ratos e uma cromatografia em DEAE-Sepharose, obtendo um resultado análogo ao apresentado na figura 10. Novamente, o pico 3 da DEAE-Sepharose (figura 10) foi reunido, equilibrado em tampão com baixa força iônica e aplicado em coluna de Mono Q, figura 19. A coluna de Mono Q foi capaz de resolver a amostra em quatro picos de proteína (leituras de A 280 nm), sendo que, um deles, mostrou atividade sobre o ZVF, figura 19. Notou-se uma contaminação por CPB nas amostras com atividade sobre o ZVF, não mostrado. Para retirar a CPB, reunimos as frações com atividade tipo CPA, pós-Mono Q, e equilibramos em um tampão ideal para a cromatografia por afinidade em Arg-Sepharose. Como mostrado na figura 20, a coluna de Arg-Sepharose foi capaz de retardar a CPB.

Para averiguar a pureza da amostra após a cromatografia por afinidade em Arg-Sepharose, fizemos um SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes, figura 21. Constatamos que a Mono Q se mostrou eficaz em retirar alguns contaminantes da fração pós-DEAE-Sepharose, figura 21, canaletas 2 e 3. A Arg-Sepharose, por sua vez, retirou a CPB mostrada pela atividade formadora de des-Arg⁹-Bk, figura 20. Vemos que há o desaparecimento de uma banda com a massa molecular correspondente à da CPB, figura 21 canaletas 3 e 4. No entanto,

vemos ainda a presença de duas bandas, uma com 35 kDa e outra próxima 70 kDa.

Corremos outra eletroforese em gradiente de 4-12 % de acrilamida, e as duas bandas, com 35 e 70 kDa, foram recortadas, tripsinizadas e seqüenciadas por espectrometria de massas. Notamos na figura 22 e tabela 5, que a banda com 35 kDa foi identificada como sendo CPA2. Este novo método foi capaz de isolar novamente a CPA2, uma vez que, o contaminante presente nesta amostra, banda de 70 kDa, é a transferrina, figura 23 e tabela 6. Pelo fato do contaminante não se tratar de uma protease, consideramos que este método de purificação foi eficaz no isolamento da CPA2.

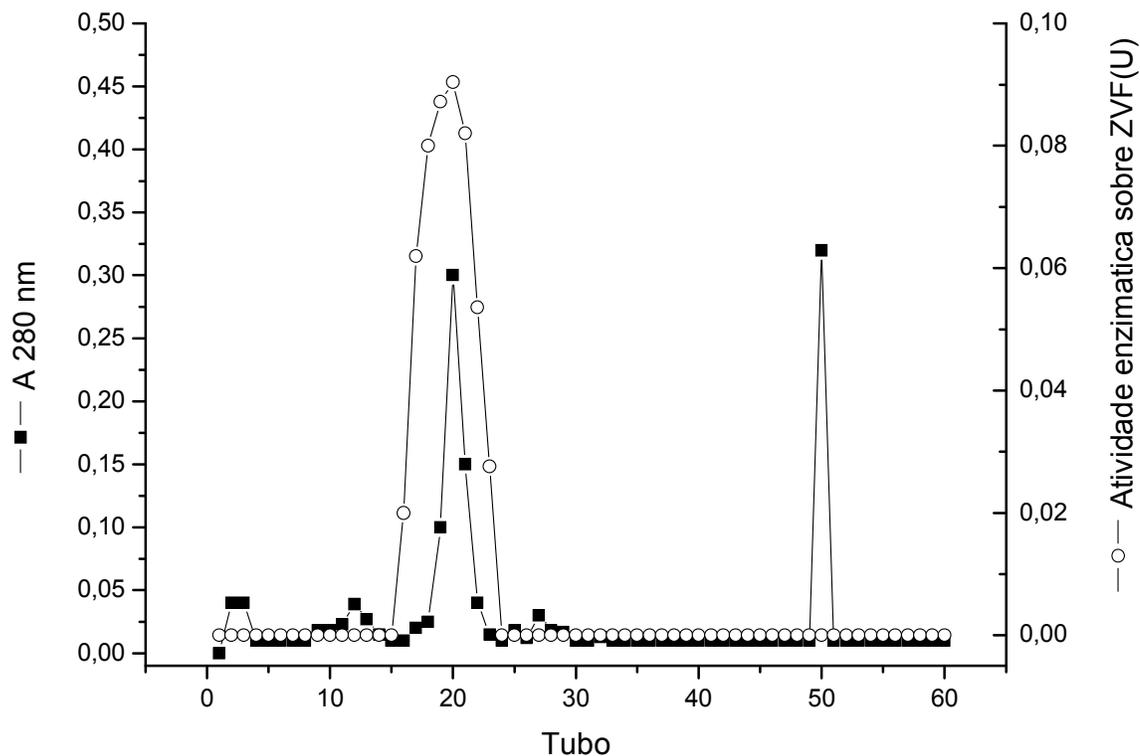


Figura 19: Isolamento da CPA2 presente no pico 3 da DEAE-Sepharose (figura 10), por troca iônica em coluna Mono Q (0,5 x 5 cm). A amostra aplicada na coluna corresponde à reunião das frações 16-24, figura 10. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 20 mM pH 8,1 e a eluição das proteínas retidas foi realizada com um gradiente salino de 20-120 mM de NaCl. A cromatografia foi desenvolvida com fluxo de 0,1 mL/min. A concentração de proteínas foi estimada por absorbância a 280 nm, e, a atividade enzimática das frações foi determinada pela hidrólise de ZVF, resultando em uma recuperação de 55% da atividade aplicada.

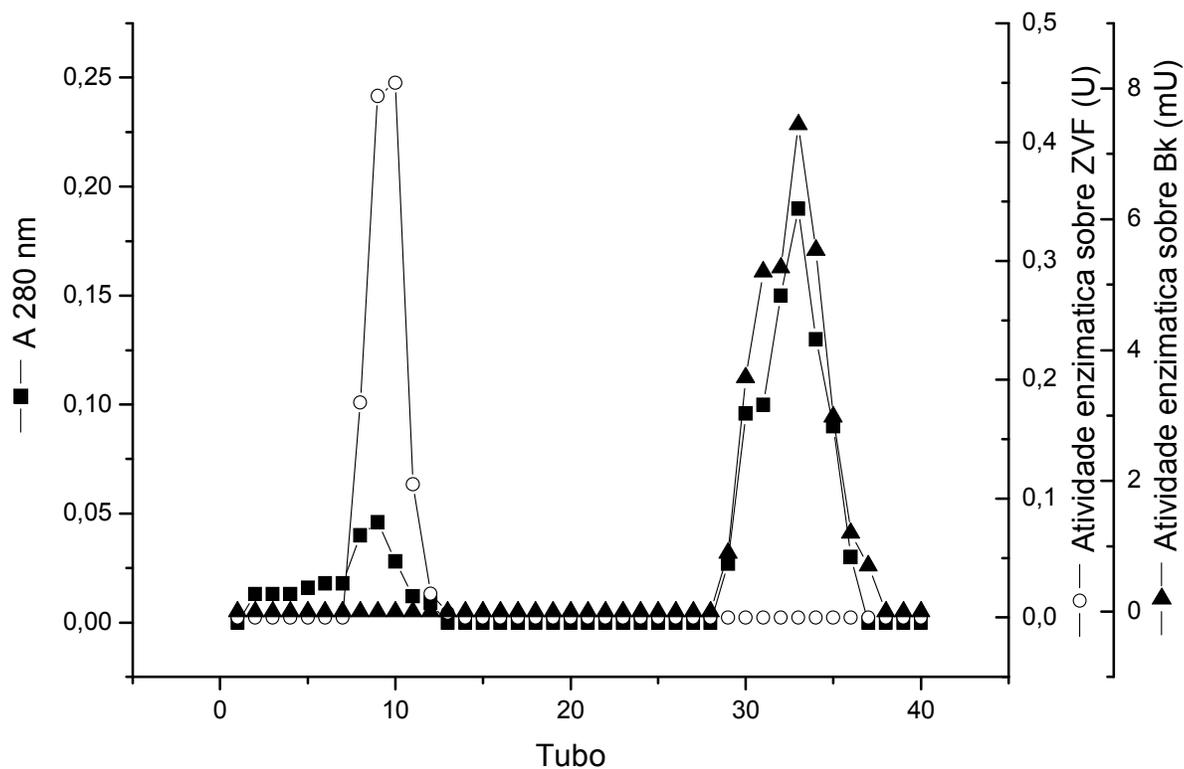


Figura 20: Perfil de eluição das proteínas e das atividades, nas frações obtidas por troca iônica em Mono Q, por cromatografia de afinidade em coluna Arg-Sepharose. A amostra aplicada foi a reunião das frações 16-23 vindas da Mono Q, figura 19. A amostra foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 com NaCl 1 M (18 mL). Após o equilíbrio, a amostra foi concentrada para um volume de 1 mL. Posteriormente à aplicação em uma coluna de Arg-Sepharose (1,5 x 3,5 cm), fez-se a lavagem da resina com 40 mL de tampão de equilíbrio para retirar a atividade formadora de des-Arg⁹-Bk. A detecção das atividades de CPA e CPB foi feita com os substratos ZVF e Bk, respectivamente. Houve uma recuperação de 95% da atividade de hidrólise de ZVF.

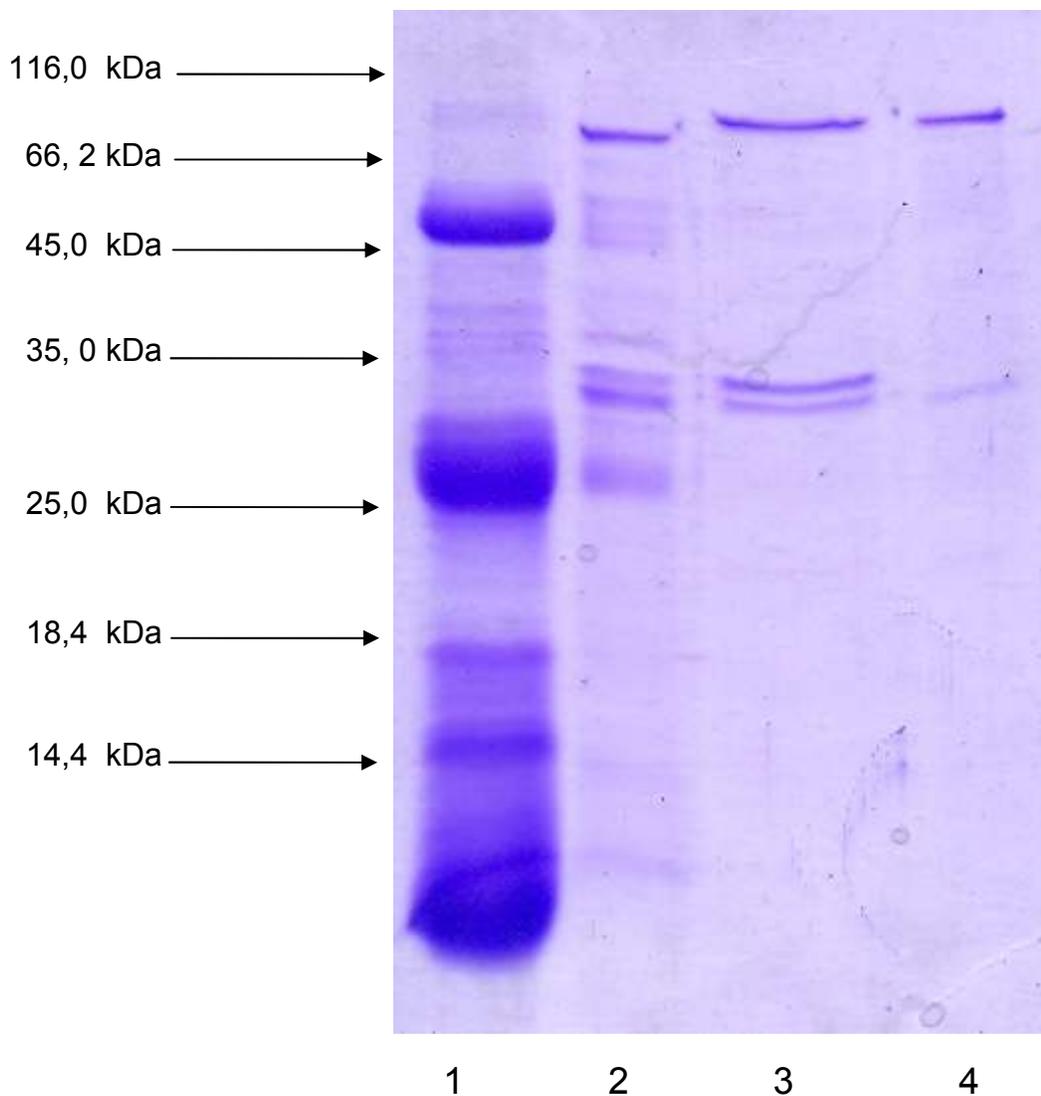


Figura 21: SDS-PAGE redutor (15%) para análise da purificação da CPA2. 1- Perfusato, 2- Pico 3 da DEAE-Sepharose, 3- Frações com atividade sobre ZVF da Mono Q, 4- Frações com atividade sobre ZVF da Arg-Sepharose. O gel foi corado com coomassie blue.

1 MIEDVQVLLD QEREEMLFNQ QRERGGNFNF EAYHTLEEIY QEMDNLVAEN PGLVSKVNIG
61 SSFENRPMNV LKFSTGGDKP AIWLDAGIHA REWVTQATAL WTANKIASDY GTDPAITSLD
121 NTLDIFLLPV TNPDGYVFSQ TTNRMWRKTR SKRSGSGCVG VDPNRNWDAN FGGPGASSSP
181 CSDSYHGPKP NSEVEVKSIV DFIKSHGKVK AFITLHSYSQ LLMFPYGYKC TKPDDFNELD
241 EVAQKAAQAL KRLHGTSYKV GPICSVIYQA SGGSIDWAYD LGIKYSFAFE LRDTGFYGFLL
301 LPAKQILPTA EETWLGLKTI MEHVRDHPY

Figura 22: Identificação por MS/MS dos fragmentos trípticos da CPA2 purificada por troca iônica. Os fragmentos marcados por barras horizontais correspondem às regiões seqüenciadas por espectrometria de massas.

Tabela 5

Fragmentos trípticos identificados por MS/MS e suas posições na estrutura da CPA2.

Peptídeos	Posição na estrutura da CPA2*	Score
EWVTQATALWTANK	92-105	0,92
SIVDFIKSHGK	198-208	0,76
RLHGTSYK	252-259	0,5
YSFAFELR	285-292	0,82
DTGFYGFLLPAK	293-304	0,86
QILPTAEETWLGLK	305-318	0,67
TIMEHVR	319-325	0,52

* As posições indicadas se referem à forma madura da CPA2.

1 MRFVAVGALLA CAALGLCLAV PDKTVKWCAV SEHENTKCIS FRDHMKTVLP ADGPRLACVK
 61 KTSYQDCIKA ISGGEADAIT LDGGWVYDAG LTPNNLKPVA AEFYGSLEHP QTHYLAVAVV
 121 KKGTDFQLNQ LQGKKSCHTG LGRSAGWIIP IGLLFCNLPE PRKPLEKAVA SFFSGSCVPC
 181 ADPVAFPQLC QLCPCGCGCSP TQPPFFGYVGA FKCLRDRGGGD VAFVKHTTIF EVLPQKADRD
 241 QYELLCLDNT RKPVDQYEDC YLARIPSHAV VARNGDGKED LIWEILKVAQ EHFSGKSKD
 301 FQLFGSPLGK DLLFKDSAFG CYGVPPRMDY RLYLGHSYVT AIRNQREGVC PEASIDSAPV
 361 KWCALSHQER AKCDEWSVTS NGQIECESAE STEDCIDKIV NGEADAMSLD GGHAYIAGQC
 421 GLVPVMAENY DISSCTNPQS DVFPKGYAV AVVKASDSSI NWNNLKGKKS CHTGVDRTAG
 481 WNIPMGLLFS RINHCKFDEF FSQGCAPGYK KNSTLCDLCI GPAKCAPNNR EGYNGYTGAF
 541 QCLVEKGDVA FVKHQTVLEN TNGKNTAAWA KDLKQEDFQL LCPDGTKKPV TEFATCHLAQ
 601 APNHVVVSRK EKAARVSTVL TAQKDLFWKG DKDCTGNFCL FRSSTKDLLF RDDTKCLTKL
 661 PEGTTYEEYL GAEYLQAVGN IRKCSTSRLL EACTFHKS

Figura 23: Identificação por MS/MS dos fragmentos trípticos da transferrina. Os fragmentos marcados por barras horizontais correspondem às regiões seqüenciadas por espectrometria de massas.

Tabela 6

Fragmentos trípticos identificados por MS/MS e suas posições na estrutura da transferrina.

Peptídeos	Posição na estrutura da CPA2*	Score
KGTFDFQLNQLQGK	122-134	0,6
HTTIFEVLPQK	226-236	0,1
ASDSSINWNNLKGK	455-468	0,69
GDVAFVK	547-553	0,13
HQTVLENTNGK	554-564	0,73
DLLFRDDTK	647-655	0,25

* As posições indicadas se referem à forma madura da transferrina.

A CPB, isolada pela cromatografia por afinidade em Arg-Sepahrose, foi ensaiada para ação sobre Ang 1-9, figura 24. Constatamos que há uma formação de Ang II, e, que a mesma é bloqueada pelos inibidores clássicos da CPB, como MGTA e PCI, não mostrado.

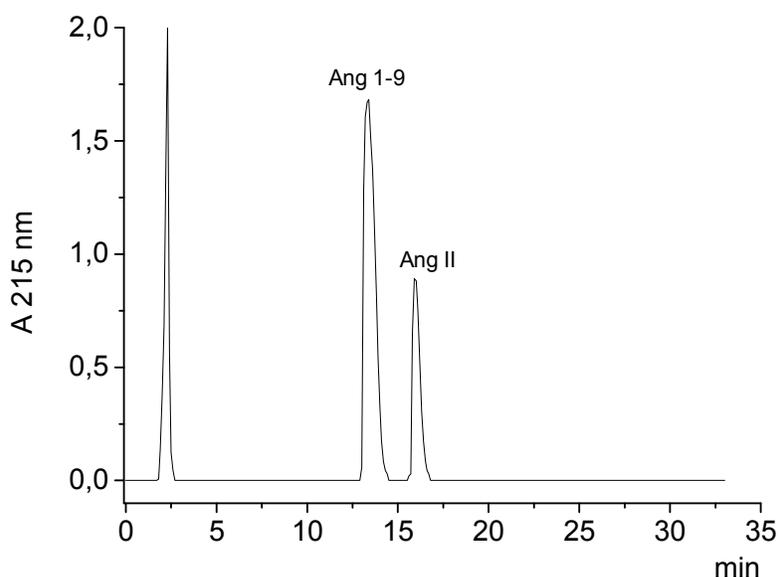


Figura 24: Cromatograma obtido por HPLC do produto gerado através da hidrólise de Ang 1-9 pela CPB do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas utilizando-se as frações com atividade formadora de des-Arg⁹-Bk da cromatografia em Arg-Sepahrose-, figura 19. A quantidade de atividade utilizada foi equivalente à secretada (em média) por um leito em 40 segundos de perfusão. As enzimas foram ensaiadas frente a 40 nmol de Ang 1-9 em 150µL de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min a 37°C. A reação foi parada com 40 µL de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 8-40% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C₁₈; 0,45 x 15cm). A atividade mostrada no cromatograma foi completamente inibida por 10 µM de PCI e 1 mM de o-fenantrolina, e 20 µM de MGTA.

5.8- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 UTILIZANDO ANGIOTENSINAS COMO SUBSTRATOS

Para caracterizar as CPA1 e CPA2 utilizamos inicialmente cinco substratos a saber: Ang I, Ang II, Ang 1-9, Ang 1-12 e ZVF. As reações foram feitas com quantidades de atividade enzimática sobre ZVF de 0,41 U para CPA1 e 1,02 U para CPA2. Como vemos na figura 25, CPA1 e CPA2 formam como principal produto a Ang 1-9, a partir de Ang I. A diferença é que a CPA1 forma também Ang II e Ang 1-7, figura 25. A formação de Ang 1-7 pela CPA1 (e não pela CPA2), foi confirmada após incubação com Ang II, figura 26. Vemos também que a CPA1 é capaz de hidrolisar a Ang 1-9, formando Ang II, enquanto a CPA2 praticamente não age sobre esse substrato, figura 27. Em relação ao novo peptídeo do SRA, Ang 1-12, se vê uma inversão: a CPA2 é capaz de clivar eficientemente este peptídeo, formando como principal produto a Ang I. Já a CPA1 não o faz, figura 28. A Ang 1-11 deve ser co-eluída com a Ang 1-12, e, por essa razão, não a vemos no cromatograma, figura 28. Para finalizar a caracterização utilizamos o ZVF como substrato, e, constatamos que a CPA2 é que preferencialmente cliva a Phe C-terminal deste substrato, figura 29.

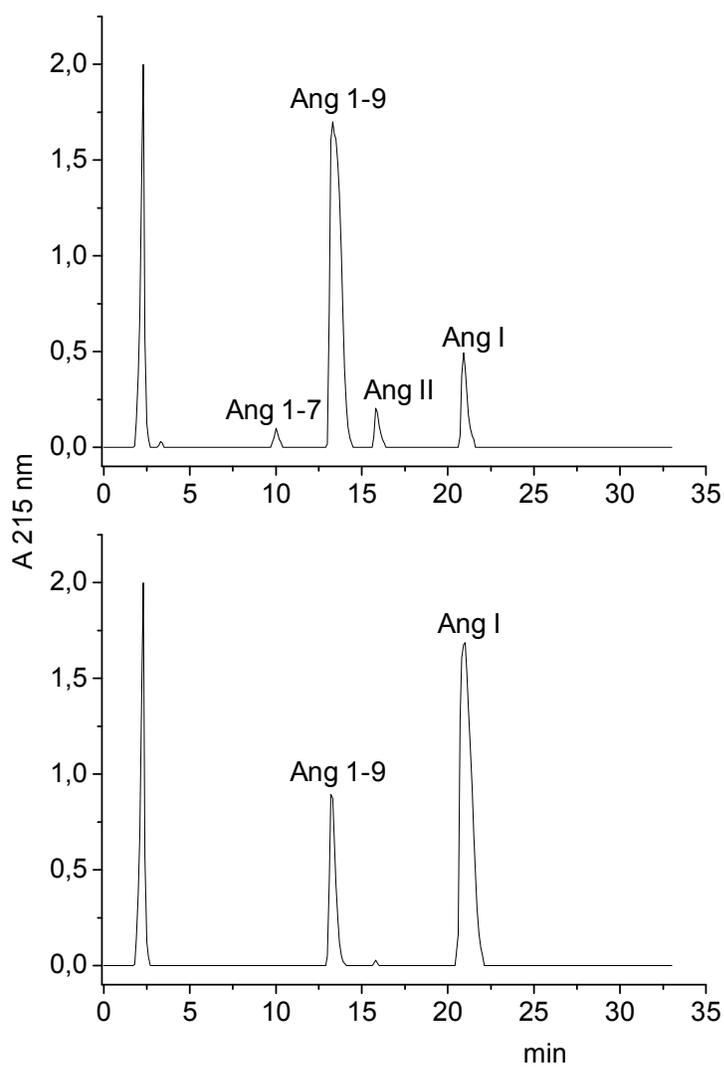


Figura 25: Cromatograma obtido por HPLC dos produtos gerados pela hidrólise de Ang I pelas enzimas CPA1 e CPA2 do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas com 0,41 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA1, e, 1,02 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA2. As enzimas foram ensaiadas frente a 40 nmol de Ang I em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min, a 37°C. A reação foi parada com 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 8-40% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C_{18} ; 0,45 x 15cm). Todas as atividades demonstradas nos cromatogramas foram completamente inibidas por 10 μ M de PCI e 1 mM de o-fenantrolina, mas não foram inibidas por 20 μ M de SBTI.

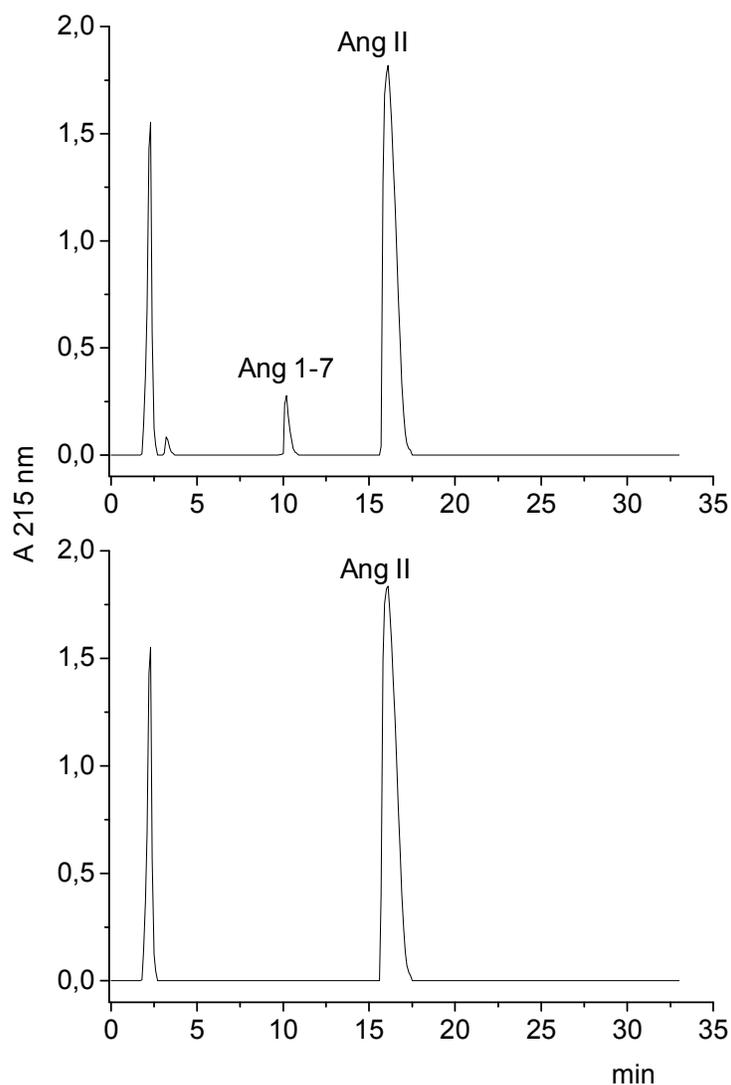


Figura 26: Cromatograma obtido por HPLC dos produtos gerados pela hidrólise de Ang II pelas enzimas CPA1 e CPA2 do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas com 0,41 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA1 e 1,02 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA2. As enzimas foram ensaiadas frente a 40 nmol de Ang II em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min, a 37°C. A reação foi parada com 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 8-40% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C18; 0,45 x 15cm). Todas as atividades demonstradas nos cromatogramas foram completamente inibidas por 10 μ M de PCI e 1 mM de o-fenantrolina, mas não foram inibidas por 20 μ M de SBTI.

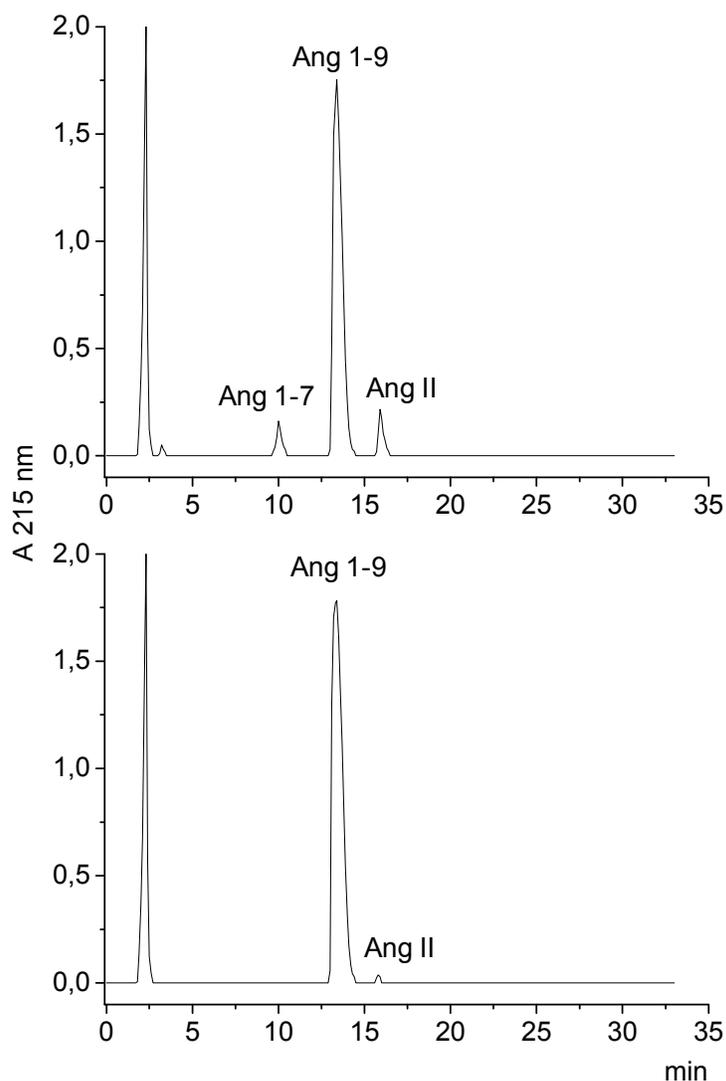


Figura 27: Cromatograma obtido por HPLC dos produtos gerados pela hidrólise de Ang 1-9 pelas enzimas CPA1 e CPA2 do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas com 0,41 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA1 e 1,02 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA2. As enzimas foram ensaiadas frente a 40 nmol de Ang1-9 em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min, a 37°C. A reação foi parada com 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 8-40% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C18; 0,45 x 15cm). Todas as atividades demonstradas nos cromatogramas foram completamente inibidas por 10 μ M de PCI e 1 mM de o-fenantrolina, mas não foram inibidas por 20 μ M de SBTI.

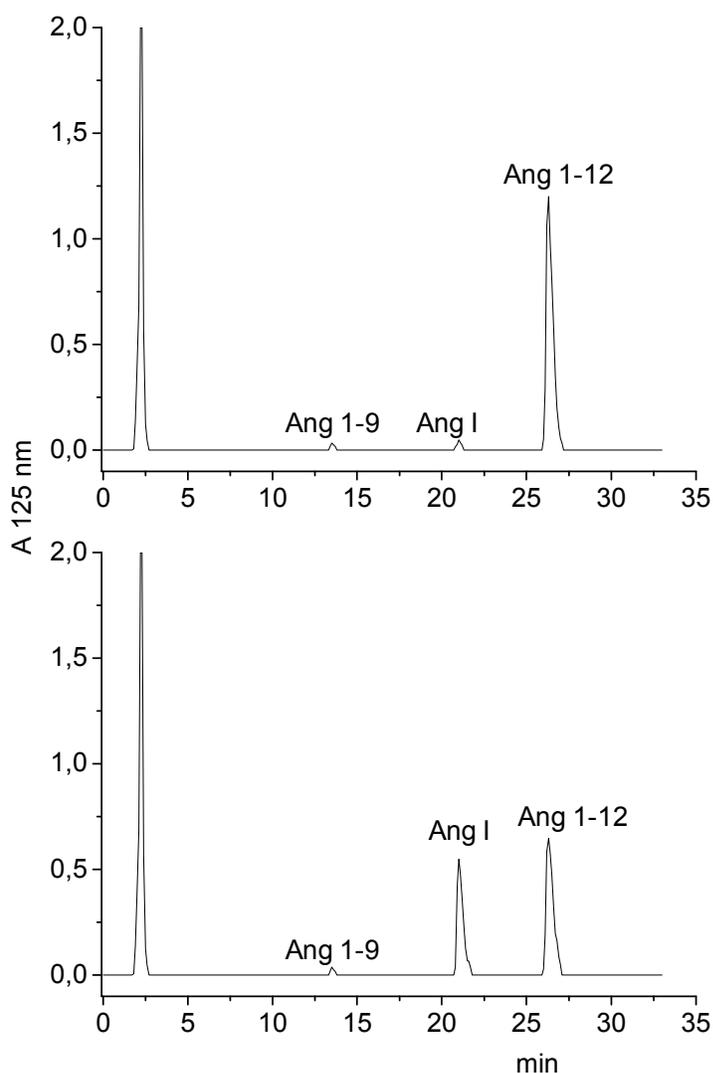


Figura 28: Cromatograma obtido por HPLC dos produtos gerados pela hidrólise de Ang 1-12 pelas enzimas CPA1 e CPA2 do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas com 0,41 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA1 e 1,02 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA2. As enzimas foram ensaiadas frente a 30 nmol de Ang1-12 em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min, a 37°C. A reação foi parada com 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 8-40% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C18; 0,45 x 15cm). Todas as atividades demonstradas nos cromatogramas foram completamente inibidas por 10 μ M de PCI e 1 mM de o-fenantrolina, mas não foram inibidas por 20 μ M de SBTI.

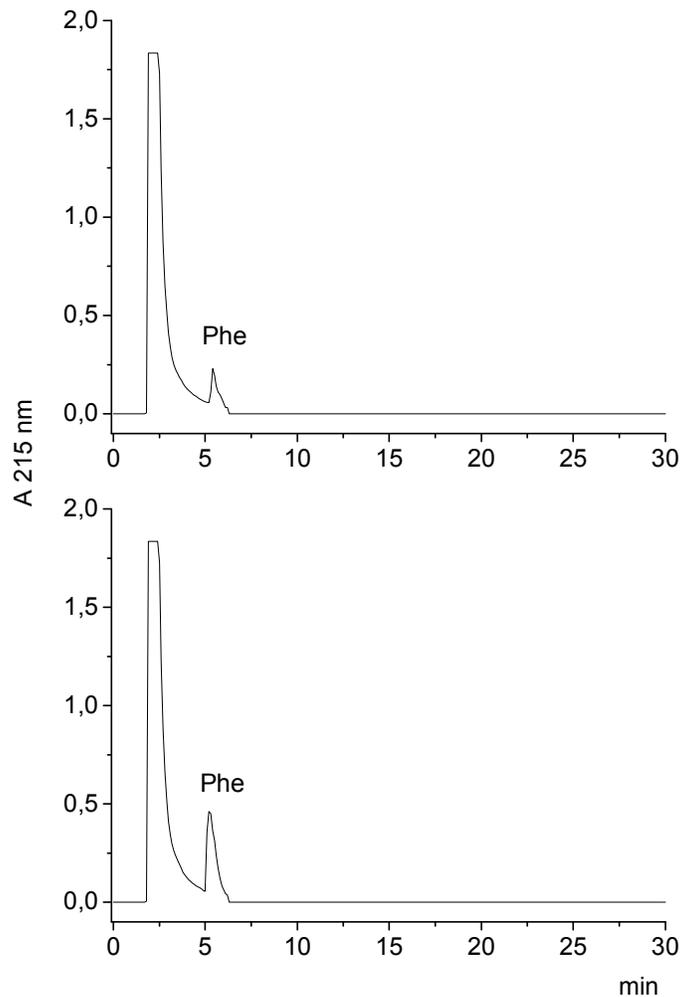


Figura 29: Cromatograma obtido por HPLC dos produtos gerados pela hidrólise de ZVF pelas enzimas CPA1 e CPA2 do perfusato do LAM de rato. As reações foram feitas com 0,41 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA1 e 1,02 U de atividade enzimática sobre o ZVF para CPA2. As enzimas foram ensaiadas frente a 40 nmol de ZVF em 150 μ L de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,2 por um período de 30 min, a 37°C. A reação foi parada com 40 μ L de TFA 5%. A eluição foi realizada através de um gradiente de 0-12% de acetonitrila em TFA 0,1% por HPLC de fase reversa (C18; 0,45 x 15cm). Todas as atividades demonstradas nos cromatogramas foram completamente inibidas por 10 μ M de PCI e 1 mM de o-Fenantrolina, mas não foram inibidas por 20 μ M de SBTI.

5.9- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 COM SUBSTRATOS SINTÉTICOS

Para investigar a ação das CPA1 e CPA2 em substratos com aminoácidos C-terminais aromáticos ou alifáticos, em diferentes seqüências, foram sintetizados oito substratos com as estruturas derivadas da seqüência da Ang I, Ang 1-9, Ang II e Ang 1-12. A resina utilizada para a síntese foi a fmoc-Wang-X, onde X corresponde ao aminoácido C-terminal de cada seqüência. Após a síntese, os peptídeos foram clivados da resina, precipitados em éter à frio, quantificados e analisados por HPLC e por análise de aminoácidos após hidrólise acida.

Como vemos na figura 30, todos os substratos foram hidrolisados pelas CPA1 e CPA2. Tais enzimas foram ensaiadas em quantidades idênticas de U de atividade sobre ZVF. Notamos que, como é descrito na literatura, a CPA2 tem uma preferência por aminoácidos aromáticos, tais como, a Phe e a Tyr. A CPA1 também se comportou como o esperado, hidrolisando preferencialmente aminoácidos C-terminais alifáticos, assim como a Leu. O inusitado se deu em relação aos substratos, cujos aminoácidos C-terminais aromáticos (Phe e Tyr) foram precedidos por Pro. Nestes casos, a predileção da CPA2 não foi confirmada, uma vez que, a CPA1 apresentou maior atividade sobre esses substratos, figura 30.

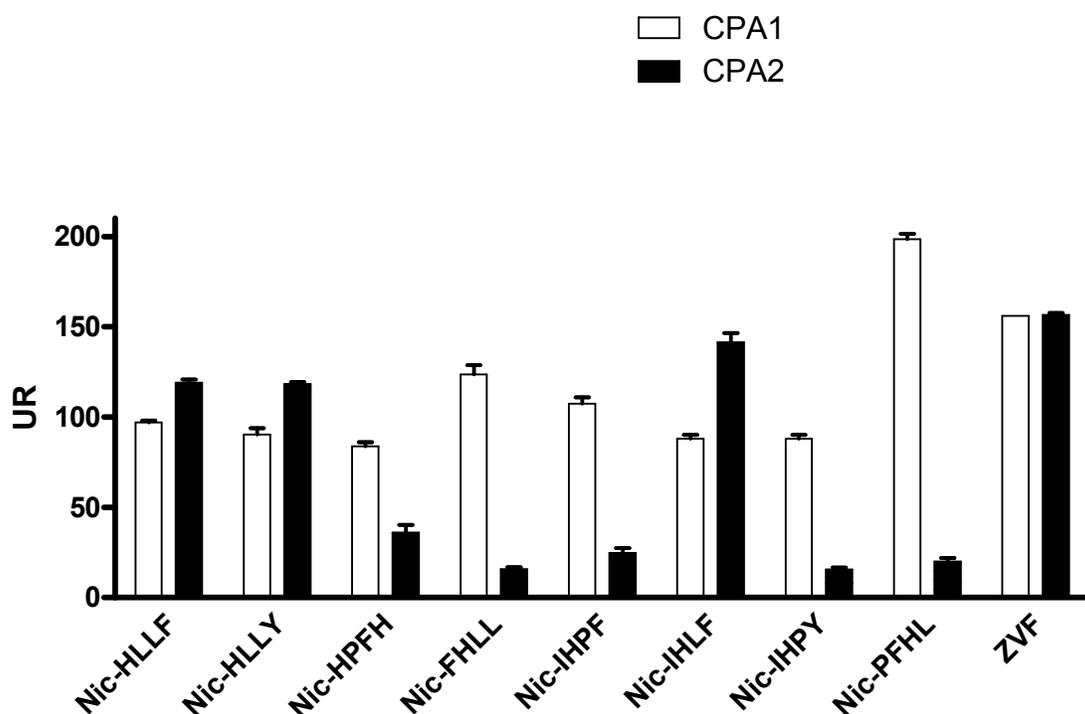


Figura 30: Atividade das CPA1 e CPA2 do LAM de rato sobre substratos sintéticos. Alíquotas com mesma quantidade de unidade de atividade sobre ZVF para CPA1 e CPA2 foram incubadas com 50 μM dos substratos por 30min, a 37°C. As reações foram paralisadas, e a atividade enzimática foi determinada pela análise fluorimétrica da reação entre o grupo amino, do aminoácido liberado, e a fluorescamina. A abreviação Nic no início de cada substrato representa o N-nicotinoil.

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

6.1- PROCESSAMENTO DE ANG I, ANG II E Bk POR CARBOXIPEPTIDASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Os resultados apresentados nesta tese demonstram a ação das CPA1, CPA2 e CPB presentes no perfusato do LAM de rato, no processamento de angiotensinas. Inicialmente, mostramos os produtos formados após a incubação de Ang I, Ang II e Bk, com uma alíquota do perfusato do LAM de rato. Quando se utiliza Ang I como substrato, o principal produto formado é Ang II (figura 2). Em grande parte, essa atividade conversora é atribuída à serinoprotease, elastase-2, caracterizada nesta preparação por Paula e colaboradores (Paula et al., 1998). O segundo produto mais abundante visto na figura 2 é a Ang 1-9, que pode ser gerado, por exemplo, por ação de CPAs (Kokkonen et al., 1997), CATA (Jackman et al., 2002) e ECA2 (Vickers et al. 2002). A Ang 1-7, mostrada nesta figura, poderia ser gerada por ação direta de uma endopeptidase sobre a Ang I. Temos como exemplos de enzimas com essa atividade: a neprilisina (NEP) (Campbell et al., 1998), a “*Thimet*” oligopeptidase (TOP) (Chappell et al., 1994) e a prolil oligopeptidase (Welches et al., 1991). A Ang 1-7 também poderia ser formada a partir da Ang II que foi produzida pela elastase-2, através da ação da ECA2 (Rice et al., 2004; Vickers et al. 2002), da CATA (Jackman et al., 2002) e da prolilcarboxipeptidase (PRCP) (Ody et al., 1978). A formação de Ang 1-4 (figura 2) pode ser explicada pela presença de uma quimase no perfusato do LAM de

rato; fato este, visto após uma cromatografia por afinidade com um inibidor para serinoproteases (Pereira et al., 2009).

Na figura 3, vemos os produtos da hidrólise de Ang II, que tem como principal produto a Ang 1-7, ação que poderia ser atribuída à ECA2 (Rice et al., 2004; Vickers et al. 2002), à CATA (Jackman et al., 2002) ou à PRCP (Ody et al., 1978). A formação de Ang 1-7 a partir de Ang II (figura 3) assinala que a Ang 1-7 mostrada na figura 2 é produto de uma clivagem seqüencial a partir da Ang I. A Ang 1-4 e seu complemento Ang 5-8, mais uma vez, apontam para a presença de angiotensinases nesta preparação, como descrito por Pereira e colaboradores (Pereira et al., 2009).

A figura 4 nos mostra que o principal produto formado, a partir de Bk, é a des-Arg⁹-Bk, atividade essa atribuída à CPB (Oliveira et., 2007). A figura 4 também aponta a presença de Bk 1-7, formada pela retirada da Phe⁸ da des-Arg⁹-Bk, que poderia ser formada, por exemplo, por ação da ECA2 (Turner et al., 2002). Além de agir sobre a Bk, nós também demonstramos que a CPB é capaz de hidrolisar a Ang 1-9 formando Ang II (figura 24).

Analisando as atividades apresentadas nas figuras 2 e 3 vemos importantes ações de carboxipeptidases presentes no perfusato do LAM de rato sobre angiotensinas, uma vez que, notamos a presença de Ang 1-9 formada a partir de Ang I (figura 2), e, de Ang 1-7 produzida a partir de Ang II (figura 3). As Ang 1-7 e Ang 1-9 são inibidores da ECA em concentrações na ordem de micromolar (Chen et al., 2005). A Ang 1-9 mostra maior efeito inibitório no domínio N em relação ao C quando se tem Ang I como substrato (Rice et al., 2004). A Ang 1-7 é clivada pelo domínio N da ECA, e só demonstra efeito inibitório sobre o domínio C

(Deddish et al., 1998). Há algum tempo, a inibição da ECA pela Ang 1-9 foi proposta como um mecanismo endógeno de controle desta enzima (Snyder e Wintroub, 1986), e, recentemente, a formação local de Ang 1-9 foi relacionada ao controle da produção de Ang II em coração humano (Kokkonen et al., 1997). Também é sugerido que as Ang 1-7 e Ang 1-9 atuem como potenciadores de bradicinina, via receptor B₂, por serem capazes de induzir mudanças conformacionais no complexo ECA/receptor B₂, se ligando a ECA (Jackman et al., 2002; Chen et al., 2005). A Ang 1-7 ainda possui inúmeras funções mediadas pelo receptor Mas, tais como vasodilatação, antiproliferação celular e apoptose (Santos et al., 2003; Burrell et al., 2004).

Diante das importantes ações de carboxipeptidases no perfusato do LAM de rato, num passo seguinte, examinamos essas atividades, a fim de investigar a presença de enzimas capazes de formar Ang 1-9 (ECA2, CATA e CPAs) e Ang 1-7 (ECA2, CATA e PRCP) a partir de Ang I e Ang II, respectivamente.

6.2- CARACTERIZAÇÃO DAS CARBOXIPEPTIDASES DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

Como uma primeira tentativa de caracterizar as atividades atribuídas a carboxipeptidases nós testamos a inibição da formação de Ang 1-9 e Ang 1-7, e, percebemos que foram inibidas por o-fenantrolina (não mostrado). Avaliamos também a hidrólise de ZVF (substrato para CPAs) (<http://merops.sanger.ac.uk>), Leu⁻⁵-encefalinamida (substrato para CATA) (Jackman et al., 2002) e Hip-Pro-Leu (substrato para PRCP) (Ody et al., 1978). Somente o ZVF foi hidrolisado pelas

enzimas presentes no perfusato do LAM de rato (não mostrado). Assim, descartamos a presença de CATA e PRCP nesta preparação, pois, além de seus substratos não terem sido hidrolisados, houve inibição por inibidor de metalocarboxipeptidase (o-fenantrolina), e, ambas são serinocarboxipeptidases (Jackman et al., 2002; Ody et al., 1978).

Começamos então a analisar as atividades formadoras de Ang 1-9 e Ang 1-7 como sendo produtos prováveis de CPAs e/ou ECA2. Para ter uma separação previa, submetemos então o perfusato do LAM de rato a uma cromatografia por troca iônica em DEAE-Sepharose, e, monitoramos a atividade tipo CPA utilizando ZVF como substrato (figura 10). A cromatografia resultou numa distribuição desigual da atividade tipo CPA, com uma recuperação de cinco picos de atividade tipo CPA. Em seguida, avaliamos as frações com maior atividade sobre o ZVF de cada pico (F1-F5), e, vimos uma distribuição desigual da atividade formadora de Ang 1-9 e Ang 1-7, tabela 1. Enquanto F1 foi a fração que apresentou maior atividade sobre ZVF em relação a Ang I, F5 demonstrou o inverso, tabela 1. F2 e F3 hidrolisaram ZVF e Ang I com intensidades na mesma ordem de magnitude. Somente a F4 foi capaz de agir sobre Ang I, Ang II e ZVF, tabela 1. Os resultados apresentados na tabela 1 sugerem que há múltiplas rotas de degradação de Ang I e Ang II no perfusato do LAM de rato formando Ang 1-9 e Ang 1-7. Querendo avaliar a presença da metalocarboxipeptidase ECA2 nos picos vindos da cromatografia em DEAE-Sepharose, nós ensaiamos todas as frações com o substrato para ECA2, Abz-Ser-Pro-Tyr(NO₂) (Yan et al., 2003). Nota-se que duas das frações, as F1 e F4, foram capazes de hidrolisar o substrato para ECA2, mas a F1 não foi capaz de formar Ang 1-7, tabela 1. Avaliamos também a inibição

destas frações por um inibidor de CPA, o PCI (Rayan et al., 1963), e pelo inibidor de ECA2, o Pro-Phe (Guy et al., 2003). Como vemos na tabela 2, o dipeptídeo Pro-Phe não foi capaz de inibir eficientemente nenhuma das frações, ao passo que o PCI inibiu quase que totalmente a hidrólise de Ang I, Ang II e ZVF em todas as frações. Vale ressaltar o fato de o PCI ser descrito como ineficaz sobre a ECA2 (Zisman et al., 2003). Isto demonstra que a hidrólise de Ang I, Ang II e ZFV se dão por ações de CPAs. As atividades (tabela 1) e o perfil de inibição (tabela 2) das enzimas presentes nas frações 1-5 evidenciam a presença de múltiplas CPAs no perfusato do LAM de rato.

6.3- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

A primeira evidência da presença de carboxipeptidases no perfusato do LAM de rato foi apresentada por Oliveira e colaboradores (Oliveira et al. 1991), que observaram a hidrólise de vasoceptídeos e substratos sintéticos por enzimas secretadas pela preparação de leite isolado. A contribuição das carboxipeptidases para o metabolismo de Bk e Ang I, foi avaliada, *in vitro*, pela análise dos fragmentos gerados durante a incubação de frações do perfusato com cada peptídeo. Os resultados destes experimentos indicaram que uma enzima tipo CPN era responsável pela maior parte da atividade cininásica do perfusato, e, gerava exclusivamente o produto des-Arg⁹-Bk. Por outro lado, a incubação de Ang I com frações do perfusato permitiu identificar duas vias principais de processamento deste vasoceptídeo, uma dependente da enzima formadora de Ang II,

posteriormente caracterizada como elastase-2 do LAM de rato (Paula et al., 1998), e outra envolvendo CPAs.

No presente estudo procurou-se aprofundar vários aspectos da caracterização das carboxipeptidases do perfusato do LAM de rato. Considerou-se a quantidade de atividade secretada por este leito vascular e a importância que os diferentes produtos gerados pelas carboxipeptidases podem ter como mediadores de eventos fisiológicos e patofisiológicos. Inicialmente, procuramos estabelecer procedimentos cromatográficos que permitissem o isolamento das CPAs do perfusato do LAM de rato para as caracterizações estruturais e funcionais destas enzimas. A cromatografia por troca aniônica é descrita para a purificação de CPAs e CPBs pancreáticas (Reeck et al., 1971), assim, fizemos uma separação prévia do perfusato do LAM de rato em DEAE-Sepharose. A cromatografia por troca aniônica, em DEAE-Sepharose, se mostrou muito eficaz em resolver, nesta preparação, carboxipeptidases com diferentes propriedades, figura 10 e tabelas 1 e 2. A cromatografia por afinidade em Arg-Sepharose, descrita na purificação de CPB (Sukenaga et al., 1980), se mostrou eficaz em retirar uma contaminação por CPB em frações onde se tentava isolar a CPA2, figuras 11 e 20. Verificamos que a resina de afinidade, PCI-Sepharose, utilizada genericamente para purificação de CPAs (Zwilling et al., 1979), retém a CPA2 da fração vinda da cromatografia por afinidade em Arg-Sepharose, permitindo sua recuperações por mudança de pH do eluente (Figura 12). A fração eluída da resina de PCI-Sepharose continha uma contaminação por serinoprotease, necessitando de um passo cromatográfico adicional (afinidade em SBTI-Sepharose) para o isolamento da CPA2 (figura 13). A ligação de uma serinoprotease à coluna de PCI-Sepharose (figura 12) deve ser

causada pela contaminação de um inibidor de serinoprotease ao PCI obtido da sigma. A CPA1 foi isolada por duas cromatografias de troca iônica seqüenciais, em DEAE-Sepharose e Mono Q. A purificação da CPA1 foi averiguada por SDS-PAGE, figura 17. A CPA 2, por sua vez, foi isolada de duas maneiras, uma, por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose e três afinidades seqüenciais (em Arg-Sepharose, PCI-Sepharose e SBTI-Sepharose), e, outra, por duas cromatografias de troca iônica em DEAE-Sepharose e Mono Q. A purificação da CPA2 foi analisada por SDS-PAGE, figuras 14 e 21. As CPA1 e CPA2 isoladas foram identificadas estruturalmente através do seqüenciamento, por espectrometria de massas, dos seus fragmentos trípticos. O isolamento e a identificação dessas enzimas mostraram que a carboxipeptidase capaz de formar Ang 1-9, é a CPA2, e, a enzima capaz de formar Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7, é a CPA1 (figuras 15, 18 e 22, e tabelas 3, 4 e 5).

6.4- CARACTERIZAÇÃO DAS CPA1 E CPA2 DO PERFUSATO DO LAM DE RATO

A capacidade das proteases do perfusato do LAM de rato de processar peptídeos vasoativos foi descrita por Oliveira e colaboradores (Oliveira et al., 1991), associando as atividades de uma endopeptidase, então denominada Ang II-FE, sobre a Ang I. Para um aprofundamento no estudo das atividades das CPAs isoladas neste trabalho, utilizamos diferentes angiotensinas como substrato e, vimos quais eram os produtos formados. Os resultados mostrados nas figuras 25, 26, 27, 28 e 29, comparam a ação das CPA1 e CPA2 sobre Ang I, Ang II, Ang 1-9,

Ang 1-12 e ZVF, respectivamente. Para estas comparações entre CPA1 e CPA2 foram utilizadas atividades enzimáticas sobre ZVF de 0,41 U para CPA1 e de 1,02 U para CPA2, ou seja, 2,5 vezes mais atividade sobre o ZVF para CPA2 em relação a CPA1. Na figura 25 vemos que a CPA1 é mais ativa sobre a Ang I, formando 4,5 vezes mais Ang 1-9, que a CPA2 (valor corrigido com as atividades sobre o ZVF), e, além disso, vemos que a CPA1 (e não a CPA2), é capaz de formar Ang II e Ang 1-7 por clivagens seqüenciais a partir da Ang 1-9 formada na reação. Isto demonstra as dificuldades de ordem metodológica inerentes a uma comparação mais rigorosa das especificidades destas enzimas frente às angiotensinas, isto porque os produtos gerados são também substratos para as enzimas presentes no meio de incubação. Sobre a Ang II (figura 26) somente a CPA1 teve atividade. Sobre a Ang 1-9 (figura 27), a CPA1 teve uma atividade 16 vezes maior para formar Ang II. Esse valor seria ainda maior se a própria Ang II formada na reação não fosse substrato para a CPA1. A Ang 1-12 (figura 28) mostra uma inversão de tudo o que foi visto anteriormente acerca das angiotensinas, uma vez que, a CPA2 demonstra uma atividade 6 vezes maior que a CPA1. Novamente salientamos que esse valor poderia ser maior se a Ang 1-11 e Ang I formadas não fosse substratos para a CPA2. Apesar da quantidade de atividade sobre o ZVF recuperada para CPA1 ser aproximadamente 75% daquela correspondente à CPA2 (Figura 10), a CPA1 contribui com mais atividade processadora de angiotensinas no perfusato do LAM de rato. Isto ocorre porque a CPA1 demonstra maior atividade sobre Ang I, Ang 1-9 e Ang II (figuras 25, 26 e 27). Assim, podemos sugerir que, neste fluído, a principal enzima envolvida na formação dos peptídeos Ang 1-9 e Ang 1-7, é a CPA1, e que possivelmente, a

CPA2 teria uma maior participação na degradação de Ang 1-12, formando Ang I como principal produto (figura 28).

A relevância das CPA1 e CPA2, presentes no perfusato do LAM de rato, para o SRA precisa ser avaliada considerando-se as atividades dos produtos Ang 1-9, Ang II e Ang 1-7. A capacidade do derivado Ang 1-9 de inibir a ECA levou à proposta de um mecanismo endógeno de controle de produção da Ang II (Snyder e Wintroub, 1986), e, recentemente Kokkonen et al. (1997) sugeriram que este mecanismo fosse responsável pelo controle da via clássica (ECA-dependente) de formação de Ang II no coração humano. Estes autores atribuíram a formação de Ang 1-9 à ação da CPA de mastócito, células abundantes no coração e caracterizadas imunohistoquimicamente pelo conteúdo de triptase e quimase.

A capacidade da CPA1 de liberar Ang 1-7 a partir Ang I, Ang 1-9 e Ang II pode indicar a participação desta enzima em mecanismos locais de regulação do SRA. O peptídeo Ang 1-7 é um membro biologicamente ativo do SRA, que apresenta funções opostas às da Ang II (principal componente efetor deste sistema). A recente identificação da ECA2 e de um receptor próprio para Ang 1-7, o receptor Mas, tem dado suporte ao novo conceito do SRA, que estabelece dois tipos principais de ações: vasoconstritor/proliferativo (devido à Ang II), e vasodilatador/antiproliferativo, (devido à Ang 1-7). Apesar da Ang 1-7 exercer seus efeitos por um receptor próprio, foi visto que algumas das suas ações são bloqueadas pelos antagonistas de receptores AT₁ ou AT₂, levantando a hipótese de que pode haver uma interação indireta de Ang 1-7 com estes receptores via Mas (Santos et al., 2000). Pelas observações do presente trabalho (conversão de Ang I, Ang 1-9 e Ang II pela CPA1 levando até a formação de Ang 1-7, e, Ang I e

Ang 1-12 pela CPA2, levando até a formação de Ang 1-9), sugerimos duas novas vias de formação de Ang 1-9 e uma via de formação de Ang 1-7, por ação das CPA1 e CPA2, nos tecidos onde elas forem produzidas.

Outro aspecto abordado acerca destas enzimas foi sua atividade sobre substratos sintéticos (figura 30). A CPA1 mostra preferência para resíduos alifáticos de substratos peptídicos, enquanto a CPA2 tem preferência por resíduos aromáticos, o que é descrito em inúmeros trabalhos na literatura (Neurath, 1960; Reznik e Fricker, 2001; Gardell et al., 1988). Vemos apenas uma modificação neste perfil de atividade quando o aminoácido C-terminal aromático (Phe e Tyr) é precedido por Pro. Nestes casos, a CPA1 se mostra mais ativa que a CPA2, porém, tal predileção é removida quando se troca a Pro por Leu, antecedendo os resíduos aromáticos, figura 30. Isso demonstra que nem sempre a CPA1 age sobre os aminoácidos alifáticos, e nem sempre a CPA2 age sobre os aromáticos; a seqüência também influencia nessa predileção.

6.5- COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CARBOXIPEPTIDASES NO MESENTÉRIO E DE ATIVIDADES PRESENTES NOS PERFUSATOS DO LAM DE RATO E CAMUNDONGO

Durante muito tempo, as CPAs e CPBs, foram consideradas enzimas envolvidas exclusivamente com o processo digestivo (Eaton et al., 1991; Marinkovic et al., 1979; Skidgel, 1988; Normant et al., 1995). Nosso trabalho, no entanto, demonstra a participação das CPA1, CPA2 e CPB1 no processamento de angiotensinas. Tradicionalmente, apenas as CPA3 e CPB2 são consideradas

enzimas regulatórias na subfamília A/B das metalocarboxipeptidases, nas quais se incluem as CPA1, CPA2 e CPB1 (Vendrell et al., 2000). Com futuras intenções de conduzir estudos funcionais por geração de camundongos *knockouts* para responder qual o papel funcional destas enzimas, fizemos uma comparação do nível de expressão no mesentério e das atividades de algumas enzimas presentes no perfusato do LAM de rato e camundongo. O nível de expressão das CPA1, CPA2 e CPB1 foi comparado à expressão de carboxipeptidases classicamente descritas como processadoras de vasopectides, a saber: CPA3, ECA, ECA2 e CPN. As CPAs, dentre as analisadas, não expressas nos mesentérios de rato e camundongo foram as CPA4, CPA5 e CPA6. A CPA6 teve sua expressão detectada somente no bulbo olfatório, como é descrito na literatura (Fontenele-Neto et al., 2005). As CPA4 e CPA5 não foram detectadas em nenhum dos tecidos analisados (mesentério, pâncreas e bulbo olfatório), em rato e camundongo, o que pode indicar que estas CPAs realmente não são expressas ou seus *primers* não funcionaram adequadamente. Apesar de encontrarmos a expressão de ECA, ECA2 e CPN nos mesentérios de rato e camundongo, a atividade relacionada a essas carboxipeptidases não é encontrada no perfusato do LAM de rato (Paula et al., 1998; Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2008).

Como relação às atividades encontradas nos perfusatos dos LAMs de rato e camundongo, vemos uma grande semelhança, e, destacamos duas diferenças: 1) o principal produto da hidrólise de Ang I por proteases do LAM de rato é Ang II, já no camundongo é a Ang 1-9 (figuras 8 e 9, painel B); 2) a formação de Ang II, a partir de Ang I não é inibida por PCI em camundongo (figura 9, painel B). Considerando todas as semelhanças encontradas na expressão de

carboxipeptidases nos mesentérios, e, os perfis de atividade das enzimas presentes nos perfusato dos LAM de rato e camundongo, concluímos que o camundongo pode ser utilizado em experimentos futuros para avaliação funcional das enzimas apresentadas neste trabalho.

A comparação entre as atividades dos dois perfusatos nos mostra a importância das CPAs no processamento de angiotensinas, por exemplo, ao inibir a hidrólise de Ang 1-12 com o-fenantrolina ou PCI há uma diminuição na formação de Ang I, Ang II, Ang 1-9 e Ang 1-7 (figuras 8 e 9, painel A). Outro aspecto importante é o aumento da formação de Ang I, a partir de Ang 1-12, quando se usa o SBTI como inibidor. Isso indica que as CPAs participam da conversão seqüencial de Ang 1-12 em Ang I, e que a elastase-2, uma serinoprotease conversora, converte a Ang I formada pelas CPAs em Ang II. A elastase-2 também converte diretamente Ang 1-12 em Ang I e Ang 1-12 em Ang II, pois a inibição com PCI ou o-fenantrolina não é capaz de inibir totalmente a formação de Ang II e Ang I (figuras 8 e 9, painel A). A clivagem dos dipeptídeo Leu¹¹-Tyr¹² e do tetrapeptídeo His⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Tyr¹² da Ang 1-12 formando Ang I e Ang II, respectivamente, pode ser feita pela elastase-2. Esta enzima também pode formar Ang II a partir da Ang I produzida por CPAs e por ela mesma. Dentre as CPAs caracterizadas nesse trabalho vemos que a CPA2 demonstrou uma capacidade 6 vezes maior de hidrolisar a Ang 1-12 (figura 28). Portanto, em grande parte, a atividade vista nas figuras 8 e 9 (painel A), se deve a ação da CPA2, e não da CPA1. Sobre a Ang I vemos que além dos produtos óbvios como Ang 1-9 e Ang 1-7 as carboxipeptidases participam na formação de Ang II, uma vez que, após a inibição com o SBTI (inibidor da elastase-2, a principal enzima conversora no perfusato) há

formação de Ang II. Podemos inferir que essa Ang II esteja sendo formada pelas CPA1 e CPB, que agem sobre a Ang 1-9 (figuras 24 e 27) formada pelas CPA1 e CPA2 (figura 25), gerando Ang II (figuras 8 e 9, painel B). Como o esperado, a CPA1 age sobre a Ang II gerando Ang 1-7 (figura 8 e 9, painel C), sendo totalmente inibida por PCI e o-fenantrolina. Notamos a presença de uma angiotensinase sensível a SBTI capaz de formar Ang 5-8, como já descrito por Pereira e colaboradores (Pereira et al., 2009). A CPB, como mostrado por Oliveira e colaboradores (Oliveira et al., 2007), forma des-Arg⁹-Bk, e, essa é inibida por MGTA, PCI e o-fenantrolina (figura 8 e 9, painel D).

CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

Existem no perfusato do LAM de rato carboxipeptidases, que participam no processamento de Ang 1-12, Ang I, Ang 1-9 e Ang II. Mostramos que essas são as CPA1, CPA2 e CPB. Conseguimos isolar a CPA2 utilizando dois caminhos cromatográficos, enquanto que a CPA1 foi isolada por um único caminho.

Os resultados do seqüenciamento dos fragmentos trípticos das CPA1 e CPA2 isoladas mostraram identidade de seqüência com as mesmas enzimas produzidas pelo pâncreas de rato, mostrando, mais uma vez, que enzimas antes descritas unicamente com função digestiva podem apresentar também função regulatória quando expressas em determinados tecidos extra-pancreáticos.

Frente as Ang I, Ang 1-9 e Ang II a CPA1 mostrou maior atividade processadora no perfusato do LAM de rato em comparação à CPA2, já em relação a Ang 1-12, a CPA2 foi que demonstrou maior atividade. Foi evidenciada também a participação da CPB na formação de Ang II a partir de Ang 1-9. A especificidade catalítica da CPA1 e da CPA2 sobre substratos sintéticos e sobre angiotensinas foi idêntica a descrita na literatura, com exceção nos casos onde o último aminoácido é precedido por Pro.

As carboxipeptidases que caracterizamos neste trabalho podem ter participação importante na regulação do sistema cardiovascular, uma vez que, são capazes de gerar Ang 1-9, Ang II, Ang 1-7 e de processar o mais novo peptídeo do SRA, a Ang 1-12.

A expressão observada para as CPAs, CPB, CPN, ECA e ECA2 nos mesentérios, e as atividades vistas nos perfusatos dos LAMs de rato e camundongo, refletem a semelhança entre dois animais, e, indica que no futuro será possível utilizar camundongos em experimentos para a caracterização funcional das enzimas aqui apresentadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloy P., Companys V., Vendrell J., Aviles F. X., Fricker L. D. The crystal structure of the inhibitor-complexed carboxypeptidase D domain II as a basis for the modelling of regulatory carboxypeptidases. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 16177– 16184.

Auld D. S. Carboxypeptidase A. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 1998; pp. 1321–1326, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, San Diego.

Arolas, J. L., Vendrell, J., Aviles, F. X., Fricker, L. D. Metallo-carboxypeptidases: emerging drug targets in biomedicine. *Curr. Pharm. Des.* 2007; 13:347–364

Áviles F. X. e Vendrell J. Carboxypeptidase B. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1998; pp. 1333–1335, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, San Diego.

Áviles FX, Vendrell J, Guasch A, Coll M, Huber R. Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *Eur. J. Biochem.* 1993; 211:381-389.

Barrett, A. J., e McDonald, J. K. *Mammalian Proteases, a Glossary and Bibliography*, Vol. 2, Academic Press, Orlando, FL. 1985

Bouma, B. N., e Mosnier, L. O. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis?. *Ann. Med.* 2006; 38:378–388.

Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2. A new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15:166–9.

Calabrese, G., Telvi, L., Capodiferro, F., Morizio, E., Pizzuti, A., Stuppia, L., Bordoni, R., Ion, A., Fantasia, D., Mingarelli, R., Palka, G. Narrowing the Duane syndrome critical region at chromosome 8q13 down to 40 kb. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8: 319–324.

Campbell, DJ. Bioactive angiotensin peptides other than angiotensin II, in: M. Epstein, HR Brunner (Eds), *Angiotensin II receptor antagonists*, Hanley and Belfus Inc., pp.9-27. 2001

Campbell DJ, Anastasopoulos F, Duncan AM, James GM, Kladis A, Briscoe TA Effects of neutral endopeptidase inhibition and combined angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition on angiotensin and bradykinin peptides in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287:567–577.

Carnovali M. [The role of the selective blocking of angiotensin II receptors in the treatment of cardiovascular diseases]. *Clin Ter.* 2001; 152:103-6.

Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM Conversion of angiotensin I to angiotensin-(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Med Biol* 1994; 5:129–137.

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

Corvol P, Chauveau D, Jeunemaitre X, Menard J. Human renin inhibitor peptides. *Hypertension* 1990; 16(1):1-11.

Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang H-Z, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain specific substrates and C-domain inhibitors of angiotensin converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 1998;31:912–917.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 415-472.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5):E1-9.

Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *The journal of Biological Chemistry* 1991; 266(32):21833-21838.

Erdös EG, Jackman HL, Brovkovich V, Tan F, Deddish PA. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34:1569-76.

Everitt MT, Neurath H. Rat peritoneal mast cell carboxypeptidase: localization, purification, and enzymatic properties. *FEBS Lett.* 1980; 110(2):292-6.

Fontenele-Neto, J. D., Kalinina, E., Feng, Y., Fricker, L. D. Identification and distribution of mouse carboxypeptidase A-6. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005; 137: 132–142.

Fricker L. D. Carboxypeptidase E/H. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 1998; pp. 1341–1344, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, London.

Fricker L. D. and Snyder S. H. Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin- synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982; 79: 3886– 3890

Gardell, S.J., Crick, C. S., Clauser, E., Goldsmith, E. J., Stewart, C., Graff, M., Rutter, W. J. A Novel Rat Carboxypeptidase, CPA2: Characterization, Molecular Cloning, and Evolutionary Implications on Substrat Sepecificity in the Carboxypeptidase Gene Family. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 17828-36.

Goldstein, S.M. Kaempfer, CE, Proud, D, Schwartz, LB, Irani, AM, Wintroub, BU. Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase. *J. Immunol.* 1987; 139: 2724–2729.

Greene D., Das B. and Fricker L. D. Regulation of carboxypeptidase E: effect of pH, temperature and Co^{++} on kinetic parameters of substrate hydrolysis. *Biochem. J.* 1992; 285: 613–618.

Guy JL, Jackson RM, Acharya KR, Sturrock ED, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2): comparative modeling of the active site, specificity requirements, and chloride dependence. *Biochemistry* 2003; 42:13185–92.

Hamilton TA, Handa, RK, Harding, JW, Wright, JW.. A role for the angiotensin IV/AT4 system in mediating natriuresis in the rat. *Peptides* 2001; 22:935-944.

He G. P., Muise A., Li A. W. and Ro H. S. A eukaryotic transcriptional repressor with carboxypeptidase activity. *Nature.* 1995; 378: 92–96.

Hendriks D. F. Carboxypeptidase U. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 1998; pp. 1328–1330, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, San Diego.

Huang H., Reed C. P., Zhang J. S., Shridhar V., Wang L. Smith D. I. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 1999; 59:2981–2988.

Hopsu-Havu, V.K. e Glenner, G.G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl–prolyl- β -naphthylamide. *Histochemie* 7 pp. 197–201. 1966.

Huang, H., Reed, C. P., Zhang, J. S., Shridhar, V., Wang, L., Smith, D. I. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 1999; 59:2981–2988.

Igic R, Garber S, Sekosan M, Urbanska RA, Behnia R. Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney. *Peptides* 2003; 24(8):1237-40.

Inagami T. The renin-angiotensin system. *Essays Biochem.* 1994; 28:147-164.

Jackman HL, Massad MG, Sekosan M, Tan NF, Brovokovych V, Marcic BM, Eerdos EG. Angiotensin 1–9 and 1–7 release in human heart: role of cathepsin A. *Hypertension* 2002; 39: 976–981.

Kalinina, E., Biswas, R., Berezniuk, I., Hermoso, A., Aviles, F. X., Fricker, L. D. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J.* 2007; 21: 836–850.

Kohara, K et al. Angiotensin 1-7: a member of circulating angiotensin peptides. *Hypertension* 1991; 17:131-138.

Kokkonen JO, Saarinen J e Kovanen PT. Regulation of local angiotensin II formation in the human heart in the presence of interstitial fluid: inhibition of chymase by protease inhibitors of interstitial fluid and of angiotensin converting enzyme by Ang(1–9) formed by heart carboxypeptidase A-like activity. *Circ Res* 1997; 80:1455–1463.

Kramár EA, Harding JW, Wright JW. Angiotensin II- and IV-induced changes in cerebral blood flow. Roles of AT1, AT2, and AT4 receptor subtypes. *Regul Pept.* 1997; 68:131-8.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Lei Y., Xin X., Morgan D., Pintar J. E. Fricker L. D. Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metallo-carboxypeptidase gene family with highest similarity to CPX-2. *DNA Cell Biol.* 1999; 18: 175–185.

Leite R, Salgado MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertention. *Hypertension* 1992; 19:575-81.

Leite R, Estevão R, Resende AC, Salgado COM. Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. *Braz Med Biol Res.* 1997; 30:649-56.

Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JÁ, Burns KD. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F353-62.

Liu TY, Boykins RA. Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube: high recovery of labile amino acids. *Anal. Biochem* 1989;182:383-87.

Lundequist A, Tchougounova E, Abrink M, Pejler G. Cooperation between mast cell carboxypeptidase A and the chymase mouse mast cell protease 4 in the formation and degradation of angiotensin II. *J Biol Chem.* 2004; 279(31):32339-44.

Marinkovic DV, Marinkovic JN, Hammon K. Studies of human carboxypeptidase B purification and properties from human small intestine. *Biochem Med.* 1979; 22(1):1-10.

McGregor, D. D. The effects of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels in rat. *J. Physiol Lond.*, v.177, p.21-30, 1965.

Metsarinne, K.P. Vehmaan-Kreula, P, Kovanen, PT, Saijonmaa, O, Baumann, M, Wang, Y, Nyman, T, Fyhrquist, FY, Eklund KK. Activated mast cells increase the level of endothelin-1 mRNA in cocultured endothelial cells and degrade the secreted Peptide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 268–273.

Miller JJ, Changaris DG, Levy RS. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cathepsin A isoenzymes of porcine kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 154:1122-1129.

Miura S, Zhang J, Matsuo Y, Saku K, Karnik SS. Activation of extracellular signal-activated kinase by angiotensin II-induced Gq-independent epidermal growth factor receptor transactivation. *Hypertens Res.* (2004) 27:765-70.

Moore, S., D. H. Spackman, et al. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc*, v.17, n.4, Dec, p.1107-15. 1958.

Muise A. M. and Ro H. S. Enzymic characterization of a novel member of the regulatory B-like carboxypeptidase with transcriptional repression function: stimulation of enzymic activity by its target DNA. *Biochem. J.* 1999; 343: 341–345.

Mustafa T. Chai SY, Mendelsohn FA, Moeller I, Albiston AL.. Characterization of the receptor AT4 receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC). *J. Neurochem.* 2001; 76:1679-1687.

Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:1026–1031.

Normant E, Gros C, Schwartz JC. Carboxypeptidase A isoforms produced by distinct genes of alternative splicing in brain and other extrapancreatic tissues. *J Biol. Chem.* 1995; 270:20543-9.

Neurath, H. Carboxypeptidases A and B, pp. 11–36. In: Boyer, P.D., Lardy, H.A., and Myrback, K., eds. *Enzymes*, Vol. 4. New York: Academic Press. 1960

Ody, C. E., Marinkovic, D.V., Hammon, K. J., Stewart, T. A., e Erdos, E. G. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. *J. Biol. Chem.*, 1978; 253: 5927–5931.

Oliveira EB, Salgado MCO, Turner AJ. A survey of vasoactive peptide metabolizing enzymes in the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochem Pharmacol* 1991; 42(10):1897-904.

Oliveira EB, Souza LL, Sivieri DO Jr, Bispo-da-Silva LB, Pereira HJ, Costa-Neto CM, Sousa MV, Salgado MC. Carboxypeptidase B and other kininases of the rat coronary and mesenteric arterial bed perfusates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(6):H3550-7. 2007.

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

Pereira HJV, Salgado MC, Oliveira EB. Immobilized analogues of sunflower trypsin inhibitor-1 constitute a versatile group of affinity sorbents for selective isolation of serine proteases. *J Chromatogr B Analyt.* 2009; 877(22):2039-44.

Pereira HJV, Souza LL, Salgado MC, Oliveira EB. Angiotensin processing is partially carried out by carboxypeptidases in the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Regul Pept.* 2008; 151(1-3):135-8.

Rabin M, Birnbaun D, Young D, Birchmeier C, Wigler M, Ruddle FH. Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene Res.* (1987) 1: 169-178.

Ramírez-Expósito, M.J., Martínez-Martos, J.M. Hypertension, RAS, and gender: what is the role of aminopeptidases?. *Heart Fail Rev.*, 2008; 13: 355-65.

Rayan, C. A e Peace, G. Purification of a carboxypeptidase inhibitor from potatos. J. Biol. Chem., 1963; 249: 5495-99.

Reeck, GR. Walsh, KA e Neurath, H. Isolation and characterization of carboxipeptidase A and B from activated pancreatic juice. Biochemistry 1971;10:4690–98.

Reznik, S.E. e Fricker, L.D.. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. Cell Mol Life Sci 2001; 58:1790–1804.

Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. Biochem J. 2004; 383(Pt 1):45-51.

Rodriguez de la Vega, M., Sevilla, R. G., Hermoso, A., Lorenzo, J., Tanco, S., Diez, A., Fricker, L. D., Bautista, J. M., e Aviles, F. X. Nna1-like proteins are active metallo-carboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily. FASEB J. 2007; 21: 851–865.

San-Segundo B., Martinez M. C., Vilanova M., Cuchillo C. M. Aviles F. X. The severed activation segment of porcine pancreatic procarboxypeptidase A is a powerful inhibitor of the active enzyme. Biochim. Biophys. Acta 1982; 707:74–80.

Santos CF, Coelho EB, Salgado MCO. Effect of captopril on neurally induced contraction and relaxation of mesenteric arteries of renal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78:469-75.

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

Santos, C. F., Paula, C. A., Salgado, M. C. O., Oliveira, E. B. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol* 2002b; 80:42-47.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MCO, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme *J Cardiovasc Pharmacol* 2002a; 39: 628-35.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin 1-7: an update. *Regulatory peptides* 2000; 91: 45-62.

Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin 1-7 is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. *PNAS* 2003; 100:8258-8263.

Skeegs LT JR, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956; 103(3):295-9.

Skeggs LT, Jr, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The purification of hypertensin I. *J Exp Med.* 1954; 100(4):363–370.

Skidgel R. A. Carboxypeptidase M. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 1998; pp. 1347–1349, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, San Diego.

Skidgel R. A. Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol Sci.* 1988; 9(8):299-304.

Skidgel, R.A. Erdos, E.G. Cellular carboxypeptidases. *Immunol. Rev.* 1998a; 161:129-141.

Skidgel R. A. Erdos E. G. Lysine carboxypeptidase. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 1998b; pp. 1344–1347, Barrett A. J., Rawlings N. D. and Woessner J. F. (eds), Academic Press, San Diego.

Skidgel RA, Weerasinghe DK, Erdos EG. Structure of human carboxypeptidase N (kininase I). *Adv Exp Med Biol.* 1989;247A:325-9.

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

Sukenaga, Y., Akanuma, H., Suekane, C., Yamasaki, M. Ligand bindings of bovine carboxipeptidase B. *J. Biochem.* 1980; 87: 695-707.

Szilagyi CM, Sarfati P, Pradayrol L, Morisset J. Purification, characterization and substrate specificity of rat pancreatic elastase II. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1251(1):55-65.

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

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275(43):33238-43.

Thomas, A. G., Wozniak, K. M., Tsukamoto, T., Calvin, D., Wu, Y., Rojas, C., Vornov, J., Slusher, B. S. Glutamate carboxypeptidase II (NAALADase) inhibition as a novel therapeutic strategy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006; 576: 327–337.

Turner A. J., Tipnis S. R., Guy J. L., Rice G. and Hooper N. M. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallocarboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 80: 346–353.

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

Urata H, Nishimura H, Ganten D, Arakawa K. Angiotensin converting enzyme independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. *Blood Press Suppl.* 1996; 2:22-8.

Vendrell J, Querol E, Avilés FX. Metallocarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477:284-98.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277:14838-14843.

Wei, S., Segura, S., Vendrell, J., Aviles, F. X., Lanoue, E., Day, R., Feng, Y., Fricker, L. D. Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 14954–14964.

Welches WR, Santos RAS, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM
Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain
angiotensin. *J Hypertens* 1991; 9:631–638.

Wilson WL, Munn C, Ross RC, Harding JW, Wright JW. The role of the AT4 and
cholinergic systems in the Nucleus Basalis Magnocellularis (NBM): effects on
spatial memory. *Brain Res.* 2009; 26:1272:25-31.

Wright JW and Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain
renin-angiotensin system. *Brain. Res.* 1997; 25:96-124.

Xin X., Day R., Dong W., Lei Y. and Fricker L. D. Identification of mouse CPX-2, a
novel member of the metalloprotease gene family: cDNA cloning, mRNA
distribution, and protein expression and characterization. *DNA Cell Biol.* 1998; 17:
897–909.

Yan ZH, Ren KJ, Wang Y, Chen S, Brock TA, Rege AA. Development of
intramolecularly quenched fluorescent peptides as substrates of angiotensin-
converting enzyme 2. *Anal Biochem* 2003; 312:141–7.

Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (Kininase II:
Angiotensin I converting enzyme). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1971; 177: 291-300.

Yu HM, Chen ST, Wang KT. Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *Jour Organ Chem.* 1992; 57:4781-84.

Zhou A., Webb G., Zhu X. Steiner D. F. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 20745–20748.

Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC. Increased angiotensin-(1–7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation* 2003;108:1707–12.

Zohn IE, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, Westwick JK, Der CJ. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol Cell Biol.* 1998 18: 1225-35.

Zwilling R, Jakob F, Bauer H, Neurath H, Enfield DL. Crayfish carboxypeptidase: Affinity chromatography, characterization and amino-terminal sequence. *Eur. J. Biochem.* 1979; 94:223-229.

ARTIGO PUBLICADO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)