

**ALESSANDRA MENEZES CAMPOS**

**EFEITOS DA PRÓ-RENINA HUMANA EM CARDIOMIÓCITOS DE  
RATOS NEONATOS E SEU PROCESSAMENTO PELA CATEPSINA B  
HUMANA EM CÉLULAS GH4C1**

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

**BRASÍLIA  
2008**

**ALESSANDRA MENEZES CAMPOS**

**EFEITOS DA PRÓ-RENINA HUMANA EM CARDIOMIÓCITOS DE  
RATOS NEONATOS E SEU PROCESSAMENTO PELA CATEPSINA B  
HUMANA EM CÉLULAS GH4C1**

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

**BRASÍLIA  
2008**

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Mardey Ribeiro do Couto, CRB 1/2294

C198e Campos, Alessandra Menezes.  
Efeitos da pró-renina humana em cardiomiócitos de ratos neonatos e seu processamento pela catepsina B humana em células GH4C1 / Alessandra Menezes Campos – Brasília : Universidade de Brasília, 2008.  
154 p. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília.

1. Pró-renina. 2. Catepsina B. 3. Cardiomiócitos. I. Neves, Francisco de Assis Rocha (Orientador). II. Título.

CDU 616-092.18:616.12(043)

Proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio eletrônico ou mecânico, inclusive através de processos xerográficos, sem permissão expressa do Autor. (Artigo 184 do Código Penal Brasileiro, com a nova redação dada pela Lei n.8.635, de 16-03-1993).

**ALESSANDRA MENEZES CAMPOS**

**EFEITOS DA PRÓ-RENINA HUMANA EM CARDIOMIÓCITOS DE  
RATOS NEONATOS E SEU PROCESSAMENTO PELA CATEPSINA B  
HUMANA EM CÉLULAS GH4C1**

Banca Examinadora

---

Professor e orientador Francisco de Assis Rocha Neves, Dr.  
Universidade de Brasília - Presidente da banca examinadora

---

Professor Rogério Baumgratz de Paula, Dr.  
Universidade Federal de Juiz de Fora - Membro externo

---

Professora Dulce Elena Casarini, Dra.  
Universidade Federal de São Paulo - Membro externo

---

Professora Patrícia Medeiros de Souza, Dra.  
Universidade de Brasília - Membro interno

---

Professor Joel Paulo Russomano Veiga, Dr.  
Universidade de Brasília - Membro interno

Aos meus pais, Zélia e João Carlos, e à minha avó Maria de Lourdes por terem, carinhosamente, motivado-me a sempre seguir em frente.

À minha irmã Gabriela, para que sirva como um grande exemplo de perseverança e obstinação.

À minha tia Nelma, por seu imenso carinho e amizade.

À Amélie Poulain, amor da minha vida, pela sua constante companhia e inesgotável alegria.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pelo sopro de vida que, incondicionalmente, me deste. Por toda inteligência e sabedoria que utilizei para conduzir este trabalho. A Ti, agradeço pela vida dos pequeninos animais que, respeitosamente, necessitei interromper.

Agradeço imensamente ao Professor Francisco de Assis Rocha Neves. Por toda a sua dedicação, desde os mais tenros momentos de minha graduação em Farmácia até a árdua tarefa de orientar-me no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada, Professor, por ter me aberto às portas de seu Laboratório e ter me dado à oportunidade de compartilhar de sua sabedoria. Sinto-me orgulhosa por ter sido tão bem recebida por sua seleta equipe de trabalho!

Ao querido Professor Ralff Carvalho Justiniano Ribeiro, que soube me conduzir com extremo brilhantismo, ainda no curso de graduação, pelos aventureiros caminhos da farmacologia e, juntamente com o Professor Francisco, mostrou-me o quão bela é a Ciência. Suas poesias ainda ecoam em meus pensamentos...

Ao Professor Luiz Alberto Simeoni que, com imensa presteza, sempre estendeu suas mãos nos momentos mais árduos. Agradeço por todos os momentos que pude compartilhar consigo, pois seu carisma, amizade e sua alegria enchem este Laboratório e suavizam o maçante labor científico.

Ao Professor Nouredine Lomri, que me acolheu carinhosamente no seio de sua família nas mais longínquas terras francesas e me deu todo o apoio necessário para o desenvolvimento dos experimentos do doutorado-sanduíche. *“Au professeur Nouredine LOMRI, qui m’avez tendrement accueilli au sein de la votre famille aux plus lointaines terres françaises et qui m’avez donné tous les supports nécessaires pour le développement de ma thèse dans son laboratoire.”*

À Professora Martha Cecília Ambrósio Laboissière, grande exemplo de competência e determinação. Agradeço por sua amizade e por todos os debates científicos que me proporcionou. Sempre sentirei saudade de suas aulas...

À querida Rilva Pinho Soares, que sempre iluminou nossos experimentos com suas “mãozinhas de fada”. À Cristina Luíza Simeoni, por toda atenção e carinho que conduz rotineiramente seu trabalho. Muito obrigada pelo seu otimismo!

Aos queridos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, agradeço pela amizade cotidiana, pelas mãos estendidas e pelos ombros em que pude me debruçar. Ao

Guilherme Santos, Marie Togashi, Elaine Frazotti, Lara, Rutnéia Pessanha e Ranieri. Muito obrigada! Ao Gustavo Barra, preciso agradecer especialmente pela valiosa opinião diante dos resultados frustrados.

Aos meus queridos amigos Rafael Pansera, Mirna Anjos, Taís Werner, Karime Rocha, Janaina Neves e Leo Sodré.

Ao Biotério Central da Universidade de Brasília que, por meio do Sr. Claudionor, pontualmente forneceu os pequeninos animais. Ao Laboratório de Cirurgia Experimental, que prontamente cedeu suas salas assépticas e pelos laços de amizade. À Gabriela, Jair, Elizabeth e Sr. Tavares, agradeço imensamente o auxílio de todos. Aos funcionários do apoio didático, em especial ao Dionísio, que sempre disponibilizaram os projetores pontualmente para que os nossos seminários pudessem ser apresentados.

À Professora Roseli Aparecida da Silva Gomes, por toda a sua presteza em nos fornecer as amostras de renina humana utilizada em nossos controles. Obrigada, Professora, por colaborar com nosso trabalho!

Aos professores e alunos do curso de Farmácia do Centro Universitário Euro-Americano. Agradeço especialmente a Professora Viviany Nicolau de Paula Dias Coelho, por acreditar em minha capacidade profissional.

A CAPES, pela confiança em investir financeiramente no projeto que desenvolvi. Agradeço pela bolsa de estudos que tive o privilégio de receber no Brasil e na França.

Ao Dr. John D. Baxter, por todo financiamento suplementar que nos proporcionou e pelas sábias discussões.

E, finalmente, aos meus queridos pais, Zélia e João Carlos, à minha irmã Gabriela, à minha avó Maria de Lourdes, ao meu avô Gabriel (*in memoriam*) e à minha tia Nelma. Obrigada por todas as demonstrações de amor, carinho, apoio e compreensão que vocês, incondicionalmente, sempre manifestaram. Apenas vocês souberam compartilhar os meus sorrisos, quando os experimentos eram bem-sucedidos, ou, silenciosamente, enxugaram as minhas lágrimas nos momentos em que eu fracassei. Somente vocês puderam compreender os meus momentos de silêncio, reclusão e ausência e, sem o amor de vocês, eu jamais me sentiria suficientemente forte para fazer tudo o que fiz e superar a minha imensa saudade!

“De tudo, ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando  
A certeza de que precisamos continuar  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção, um caminho novo  
Da queda, um passo de dança  
Do medo, uma escada  
Do sonho, uma ponte  
Da procura, um encontro.”

(Fernando Antônio Nogueira Pessoa)



## RESUMO

A renina é uma aspartil protease sintetizada *in vivo* pela remoção proteolítica do pró-segmento amino-terminal de seu precursor, a pró-renina. A catepsina B, uma tiol protease, tem sido sugerida como candidata à enzima conversora de pró-renina devido à sua co-localização com a renina nos grânulos secretórios e também pela sua capacidade de processar a pró-renina em renina *in vitro* e em cultura de células. Vetores de expressão de pró-renina selvagem (WT) e mutantes foram co-transfectados com catepsina B em células hipofisárias de ratos GH4C1, que naturalmente não converte pró-renina em renina. Mutações pontuais foram utilizadas para identificar quais aminoácidos presentes no sítio de clivagem da pró-renina são reconhecidos pela catepsina B. Experimentos de *pulse-chase* foram realizados para rastrear se a pró-renina radiomarcada é capaz de seguir para os grânulos secretórios das células GH4C1. Para investigar se a pró-renina humana poderia ativar o promotor do Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) em cardiomiócitos de ratos neonatos, essas células foram co-transfectadas com o plasmídeo repórter BNP-luciferase com (ou sem) angiotensinogênio humano. Os cardiomiócitos foram co-incubados com as células não-aderentes U937 transfectadas com pró-renina humana WT ou mutantes (-1-2 ou +5). Os cardiomiócitos foram lisados 96 horas após a eletroporação para a análise de geração de luciferase. Células não-transfectadas U937 foram usadas como grupo controle. Captopril e Losartan ( $10^{-7}$  M) foram usados para testar a participação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e dos receptores AT<sub>1</sub>. Os resultados demonstraram que mutações pontuais na metionina -3(M/A), lisina -2(K/A) e leucina +2(L/A) reduzem o processamento da pró-renina pela catepsina B. Além disso, a remoção da cadeia glicosídica na asparagina +5 aumenta a conversão de pró-renina, sugerindo que a glicosilação poderia impedir o processamento enzimático da pró-renina. Nos experimentos de *pulse-chase*, a pró-renina não foi direcionada aos grânulos secretórios e a presença de catepsina B não alterou esse resultado, indicando que o processamento de pró-renina provavelmente ocorre fora dessas organelas. A pró-renina WT secretada pelas células U937 é capaz de ativar o promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos transfectados com angiotensinogênio humano. O par de aminoácidos básicos arginina-lisina e a cadeia glicosídica +5 parecem ser tão importantes quanto a atividade enzimática da ECA e os receptores AT<sub>1</sub> para a ativação do promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos.

Palavras-chave: Pró-renina. Catepsina B. Cardiomiócitos.

## ABSTRACT

Renin is an aspartyl protease synthesized *in vivo* by proteolytic removal of amino-terminal prosegment of its precursor, prorenin. Cathepsin B, a thiol protease, has been proposed to be a good candidate for prorenin processing enzyme because of its co-localization with renin in secretory granules and also by its ability to activate prorenin *in vitro* and in cell culture. It was co-transfected vectors expressing wild type and mutant prorenins with cathepsin B in rat pituitary GH4C1 cells, which normally do not activate prorenin into renin unless co-transfected with a prorenin processing enzyme. Scanning mutagenesis was used to identify which amino acids at prorenin cleavage site are specifically recognized by cathepsin B. *Pulse-chase* experiments were performed to follow whether radiolabeled prorenin is sorted to secretory granules. To investigate whether human prorenin could activate the Brain Natriuretic Peptide promoter (BNP) in neonatal rat cardiomyocytes, these cells were co-transfected with a reporter gene BNP-luciferase associated or not with a human angiotensinogen. The cardiomyocytes were co-incubated with no adherent U937 cells transfected with human prorenin wild type (WT) or mutants (-1-2 or +5). Cardiomyocytes were lysated 96 hours after electroporation for luciferase generation analysis. No transfected U937 cells were used as a control group. Captopril and Losartan at  $10^{-7}$  M were used to test angiotensin converting enzyme (ACE) and  $AT_1$  receptors participation in this process. The results demonstrated that single mutations at -3 methionine (M/A), -2 lysine (K/A) and +3 leucine (L/A) reduced prorenin processing by cathepsin B. Moreover, removal of N-linked oligosaccharides at +5 asparagine enhanced prorenin conversion by cathepsin B, showing that glycosylation seems impair enzymatic prorenin processing. In *pulse-chase* experiments, prorenin was not targeted to secretory granules and cathepsin B co-transfection did not changed this sorting, indicating that prorenin processing probably occurs outside these organelles. These findings suggest that cathepsin B removes prorenin prosegment at correct cleavage site and this proteolysis occurs outside the dense core granules. Prorenin WT secreted by U937 cells could activate the BNP promoter in rat cardiomyocytes transfected with human angiotensinogen. Dibasic arginine-lysine prorenin amino acids and N-linked glycosilation seems to be important as well as ACE enzymatic activity and  $AT_1$  receptors for BNP promoter activation.

Keywords: Prorenin. Cathepsin B. Cardiomyocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ALDOSTERONA INTRAVASCULAR.....	XXV
<b>FIGURA 2</b> – AMINOÁCIDOS PRESENTES NO SÍTIO DE CLIVAGEM DA PRÓ-RENINA HUMANA. ....	XXVII
<b>FIGURA 3</b> – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PRÓ-RENINA HUMANA. ....	XXVIII
<b>FIGURA 4</b> – MODELAGEM MOLECULAR DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA RENINA. ....	XXIX
<b>FIGURA 5</b> – RECEPTOR DE MANOSE 6-FOSFATO.....	XXXIII
<b>FIGURA 6</b> – ECA COMO UMA MOLÉCULA TRANSDUTORA DE SINAIS. ....	XXXIX
<b>FIGURA 7</b> – VIAS METABÓLICAS DOS PEPTÍDEOS DE ANGIOTENSINA. ....	XLI
<b>FIGURA 8</b> – PRINCIPAIS EFEITOS SISTÊMICOS DA ANGIOTENSINA II.....	XLVIII
<b>FIGURA 9</b> – EXPRESSÃO TECIDUAL OS COMPONENTES DO SRA. ....	LVIII
<b>FIGURA 10</b> - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DA PRÓ-RENINA .....	LXVII
<b>FIGURA 11</b> - PROTOCOLO IMPLEMENTADO AO MÉTODO DE ANÁLISE DO PROCESSAMENTO DA PRÓ-RENINA EM RENINA. ....	LXVIII
<b>FIGURA 12</b> - PROTOCOLO IMPLEMENTADO AO MÉTODO DE ANÁLISE DO DIRECIONAMENTO DA PRÓ-RENINA PARA OS GRÂNULOS SECRETÓRIOS DAS CÉLULAS GH4C1.....	LXIX
<b>FIGURA 13</b> - PROTOCOLO IMPLEMENTADO PARA ANÁLISE DA CAPTAÇÃO DE PRÓ-RENINA POR CARDIOMIÓCITOS. .....	LXXIII
<b>FIGURA 14 A</b> - PROCESSAMENTO DE PRÓ-RENINA HUMANA PELA CATEPSINA B EM CÉLULAS HIPOFISÁRIAS GH4C1. .....	LXXVII
<b>FIGURA 14 B</b> - PROCESSAMENTO DE PRÓ-RENINA HUMANA PELA CATEPSINA B EM CÉLULAS HIPOFISÁRIAS GH4C1. .....	LXXVII
<b>FIGURA 15 B</b> - PROCESSAMENTO DOS MUTANTES N-TERMINAIS DE PRÓ-RENINA PELA CATEPSINA B HUMANA EM CÉLULAS GH4C1. ....	LXXX
<b>FIGURA 16 A</b> - OS EFEITOS DAS CADEIAS GLICOSÍDICAS DA PRÓ-RENINA NO PROCESSAMENTO PELA CATEPSINA B EM CÉLULAS GH4C1.....	LXXXII
<b>FIGURA 16 B</b> - OS EFEITOS DAS CADEIAS GLICOSÍDICAS DA PRÓ-RENINA NO PROCESSAMENTO PELA CATEPSINA B EM CÉLULAS GH4C1.....	LXXXII
<b>FIGURA 17</b> - PROCESSAMENTO DE MUTANTES C-TERMINAIS DE PRÓ-RENINA PELA CATEPSINA B HUMANA EM CÉLULAS GH4C1. ....	LXXXIV
<b>FIGURA 18</b> - PROCESSAMENTO DE MUTANTES C-TERMINAIS DE PRÓ-RENINA PELA CATEPSINA B HUMANA EM CÉLULAS GH4C1. AS CÉLULAS GH4C1 FORAM ELETROPORADAS COM VETORES DE EXPRESSÃO DE PRÓ- RENINA SELVAGEM (WT) E MUTANTES. OS SOBRENADANTES FORAM COLETADOS E SUBMETIDOS À IMUNOPRECIPITAÇÃO COM ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PRÓ-RENINA/RENINA. AS BANDAS CORRESPONDENTES À PRÓ-RENINA (47 kDa) E RENINA (43 kDa) ESTÃO INDICADAS COM SETAS. ....	LXXXV
<b>FIGURA 19</b> - DIRECIONAMENTO DA PRÓ-RENINA PARA AS VIAS SECRETÓRIAS EM CÉLULAS GH4C1 TRANSFECTADAS. ....	LXXXVII

<b>FIGURA 20</b> – ESTÍMULOS HIPERTRÓFICOS EM CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS E RESPECTIVAS RESPOSTAS GÊNICAS E CELULARES.....	LXXXVIII
<b>FIGURA 21</b> - LEITURA DE LUCIFERASE DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS TRANSFECTADOS COM OS VETORES DE EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DIRIGIDO PELO PROMOTOR DO BNP (BNP-LUCIFERASE) E/OU DO ANGIOTENSINOGENIO HUMANO (AGT) E EM CO-CULTURA COM CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS U937 TRANSFECTADAS (OU NÃO) COM O VETOR DE EXPRESSÃO DA PRÓ-RENINA HUMANA SELVAGEM (U937-PRO). A ADIÇÃO DE $10^{-7}$ M DE ANGIOTENSINA II (AII) NO MEIO DE CULTURA DOS CARDIOMIÓCITOS ESTIMULA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE POSITIVO). OS RESULTADOS FORAM ANALISADOS PELO TESTE ESTATÍSTICO KRUSKAL-WALLIS COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA COMPUTACIONAL PRISM GRAPHPAD VERSÃO 5.0, N = 11 E *P<0,001.....	XC
<b>FIGURA 22</b> - LEITURA DE LUCIFERASE DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS TRANSFECTADOS COM OS VETORES DE EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DIRIGIDO PELO PROMOTOR DO BNP (BNP-LUCIFERASE) E DO ANGIOTENSINOGENIO HUMANO (AGT) E EM CO-CULTURA COM CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS U937 TRANSFECTADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO DA PRÓ-RENINA HUMANA SELVAGEM (U937-PRO) E MUTANTE (+5(N/A)). A ADIÇÃO DE $10^{-7}$ M DE ANGIOTENSINA II (AII) NO MEIO DE CULTURA DOS CARDIOMIÓCITOS ESTIMULA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE POSITIVO). OS RESULTADOS FORAM ANALISADOS PELO TESTE ESTATÍSTICO KRUSKAL-WALLIS COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA COMPUTACIONAL PRISM GRAPHPAD VERSÃO 5.0, N = 11 E *P<0,001. ....	XCII
<b>FIGURA 23</b> - LEITURA DE LUCIFERASE DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS TRANSFECTADOS COM OS VETORES DE EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DIRIGIDO PELO PROMOTOR DO BNP (BNP-LUCIFERASE) E DO ANGIOTENSINOGENIO HUMANO (AGT) E EM CO-CULTURA COM CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS U937 TRANSFECTADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO DA PRÓ-RENINA HUMANA SELVAGEM (U937-PRO) E MUTANTE (-1-2(R/A E K/A)). A ADIÇÃO DE $10^{-7}$ M DE ANGIOTENSINA II (AII) NO MEIO DE CULTURA DOS CARDIOMIÓCITOS ESTIMULA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE POSITIVO). OS RESULTADOS FORAM ANALISADOS PELO TESTE ESTATÍSTICO KRUSKAL-WALLIS COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA COMPUTACIONAL PRISM GRAPHPAD VERSÃO 5.0, N = 11 E *P<0,001. ....	XCIV
<b>FIGURA 24</b> - LEITURA DE LUCIFERASE DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS TRANSFECTADOS COM OS VETORES DE EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DIRIGIDO PELO PROMOTOR DO BNP (BNP-LUCIFERASE) E DO ANGIOTENSINOGENIO HUMANO (AGT) E EM CO-CULTURA COM CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS U937 TRANSFECTADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO DA PRÓ-RENINA HUMANA SELVAGEM (U937-PRO) EM PRESENÇA DE $10^{-7}$ M DE CAPTOPRIL. A ADIÇÃO DE $10^{-7}$ M DE ANGIOTENSINA II (AII) NO MEIO DE CULTURA DOS CARDIOMIÓCITOS ESTIMULA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE POSITIVO). OS RESULTADOS FORAM ANALISADOS PELO TESTE ESTATÍSTICO KRUSKAL-WALLIS COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA COMPUTACIONAL PRISM GRAPHPAD VERSÃO 5.0, N = 11 E *P<0,05 E **P<0,0001.....	XCVI
<b>FIGURA 24</b> - LEITURA DE LUCIFERASE DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS TRANSFECTADOS COM OS VETORES DE EXPRESSÃO DA LUCIFERASE DIRIGIDO PELO PROMOTOR DO BNP (BNP-LUCIFERASE) E DO ANGIOTENSINOGENIO HUMANO (AGT) E EM CO-CULTURA COM CÉLULAS MONOCÍTICAS HUMANAS U937 TRANSFECTADAS COM O VETOR DE EXPRESSÃO DA PRÓ-RENINA HUMANA SELVAGEM (U937-PRO) EM PRESENÇA DE $10^{-7}$ M DE LOSARTAN. A ADIÇÃO DE $10^{-7}$ M DE ANGIOTENSINA II (AII) NO MEIO DE CULTURA	

DOS CARDIOMIÓCITOS ESTIMULA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE POSITIVO) E A ADIÇÃO DE  
10<sup>-7</sup> M DE .....XCVIII

LOSARTAN REDUZ A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO BNP (CONTROLE NEGATIVO). OS RESULTADOS FORAM  
ANALISADOS PELO TESTE ESTATÍSTICO KRUSKAL-WALLIS COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA COMPUTACIONAL  
PRISM GRAPHPAD VERSÃO 5.0, N = 3 E \*P<0,0001. ....XCIX

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> .....	LXXIV
GRUPOS EXPERIMENTAIS RESULTANTES DAS TRANSFEÇÕES DOS RESPECTIVOS VETORES DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS U937 E/OU CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS. AMBAS AS LINHAGENS CELULARES FORAM MANTIDAS EM CO-CULTURA. ....	LXXIV
<b>TABELA 2</b> .....	LXXVIII
VALORES, EM PORCENTAGEM, DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA SELVAGEM (WT) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS GH4C1. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA FOI INDIRETAMENTE MENSURADA PELA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	LXXVIII
<b>TABELA 3</b> .....	LXXX
VALORES, EM PORCENTAGEM, DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA SELVAGEM (WT) E MUTANTES N-TERMINAIS SECRETADAS NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS GH4C1. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA FOI INDIRETAMENTE MENSURADA PELA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	LXXX
<b>TABELA 4</b> .....	LXXXIII
VALORES, EM PORCENTAGEM, DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA SELVAGEM (WT) E MUTANTES EM RESÍDUOS DE GLICOSILAÇÃO SECRETADAS NO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS GH4C1. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE RENINA FOI INDIRETAMENTE MENSURADA PELA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	LXXXIII
<b>TABELA 5</b> .....	LXXXIX
VALORES, EM URL, DA LEITURA DE LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À CO-CULTURA COM CÉLULAS U937 EXPRESSANDO PRÓ-RENINA SELVAGEM (WT). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	LXXXIX
<b>TABELA 6</b> .....	XCI
VALORES, EM URL, DA LEITURA DE LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À CO-CULTURA COM CÉLULAS U937 EXPRESSANDO PRÓ-RENINA MUTANTE +5(N/A). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	XCI
<b>TABELA 7</b> .....	XCIII
VALORES, EM URL, DA LEITURA DE LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À CO-CULTURA COM CÉLULAS U937 EXPRESSANDO PRÓ-RENINA MUTANTE -1-2(R/A E K/A). OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	XCIII
<b>TABELA 8</b> .....	XCIV
VALORES, EM URL, DA LEITURA DE LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À CO-CULTURA COM CÉLULAS U937 EXPRESSANDO PRÓ-RENINA SELVAGEM EM PRESENÇA DE $10^{-7}$ M DE CAPTOPRIL. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....	XCIV
<b>TABELA 9</b> .....	XCVIII

VALORES, EM URL, DA LEITURA DE LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À CO-CULTURA COM CÉLULAS U937 EXPRESSANDO PRÓ-RENINA SELVAGEM EM PRESENÇA DE $10^{-7}$ M DE LOSARTAN. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....	XCVIII
<b>TABELA 10</b> .....	CXXXVIII
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT SECRETADA NO MEIO DE CULTURA SEM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).....	CXXXVIII
<b>TABELA 11</b> .....	CXXXIX
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).....	CXXXIX
<b>TABELA 12</b> .....	CXXXIX
RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM E SEM CATEPSINA B.....	CXXXIX
<b>TABELA 13</b> .....	CXL
RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT SECRETADA NO MEIO DE CULTURA SEM CATEPSINA B (CONTROLE) <i>VERSUS</i> RENINA WT COM CATEPSINA B. ....	CXL
<b>TABELA 14</b> .....	CXLI
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA -3(M/A) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).....	CXLI
<b>TABELA 15</b> .....	CXLII
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA -2(K/A) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).....	CXLII
<b>TABELA 16</b> .....	CXLIII
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA -1(K/A) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).....	CXLIII
<b>TABELA 17</b> .....	CXLIV
RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA MUTANTE SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B.....	CXLIV
<b>TABELA 18</b> .....	CXLV

RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT E MUTANTES SECRETADAS NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B <i>VERSUS</i> RENINA WT SEM CATEPSINA B (CONTROLE).	CXLV
<b>TABELA 19</b>	CXLVI
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA +5(N/A) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).	CXLVI
<b>TABELA 20</b>	CXLVII
RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA +75(N/A) SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B. OS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I FORAM REALIZADOS DIRETAMENTE COM A INCUBAÇÃO DO MEIO DE CULTURA (PRÉ-TRIPSINA) E UMA HORA APÓS A PRÉ-INCUBAÇÃO COM TRIPSINA (PÓS-TRIPSINA).	CXLVII
<b>TABELA 21</b>	CXLVIII
RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA MUTANTE SECRETADA NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B.	CXLVIII
<b>TABELA 22</b>	CXLVIII
RESULTADOS DAS PORCENTAGENS DA GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I A PARTIR DA RENINA WT E MUTANTES SECRETADAS NO MEIO DE CULTURA COM CATEPSINA B <i>VERSUS</i> RENINA WT SEM CATEPSINA B (CONTROLE).	CXLVIII
<b>TABELA 23</b>	CXLIX
RESULTADOS DAS LEITURAS DA INTENSIDADE LUMINOSA, EM URL, EMITIDA PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA DA LUCIFERASE, CUJA TRANSCRIÇÃO FOI REGULADA PELO PROMOTOR DO BNP EM CARDIOMÍOCITOS DE RATOS NEONATOS.	CXLIX
<b>TABELA 24</b>	CL
RESULTADOS DA TAXA DE ATIVAÇÃO (ADIMENSIONAL) DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA LUCIFERASE REGULADA PELO PROMOTOR DO BNP PRESENTE EM CARDIOMÍOCITOS DE RATOS NEONATOS.	CL
<b>TABELA 25</b>	CLI
RESULTADOS DAS LEITURAS DA INTENSIDADE LUMINOSA, EM URL, EMITIDA PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA DA LUCIFERASE, CUJA TRANSCRIÇÃO FOI REGULADA PELO PROMOTOR DO BNP EM CARDIOMÍOCITOS DE RATOS NEONATOS.	CLI
<b>TABELA 26</b>	CLII
RESULTADOS DA TAXA DE ATIVAÇÃO (ADIMENSIONAL) DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA LUCIFERASE REGULADA PELO PROMOTOR DO BNP PRESENTE EM CARDIOMÍOCITOS DE RATOS NEONATOS.	CLII
<b>TABELA 27</b>	CLIII
RESULTADOS DAS LEITURAS DA INTENSIDADE LUMINOSA, EM URL, EMITIDA PELA REAÇÃO ENZIMÁTICA DA LUCIFERASE, CUJA TRANSCRIÇÃO FOI REGULADA PELO PROMOTOR DO BNP EM CARDIOMÍOCITOS DE RATOS NEONATOS.	CLIII
<b>TABELA 28</b>	CLIV



RESULTADOS DA TAXA DE ATIVAÇÃO (ADIMENSIONAL) DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DA LUCIFERASE REGULADA  
PELO PROMOTOR DO BNP PRESENTE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS. .... CLIV

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP6AP2	Gene que codifica o receptor de (pró)-renina
ADN	Ácido deoxirribonucléico
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CK2	Caseína quinase 2 ou <i>Casein kinase II</i>
CMV	Citomegalovírus
DME H21	<i>Dulbecco's</i> modified Eagle médium
DNase	Ácido desoxirribonucléico exonuclease
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGF	Fator de crescimento epidérmico ou <i>Epidermal growth factor</i>
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular ou <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GH4C1	Linhagem de células hipofisária de ratos
iECA	Inibidores da ECA
IGF-2	Fator de crescimento induzido pela insulina do tipo II ou <i>Insulin-like growth factor type II</i>
JNK	Quinase N-terminal do c-Jun ou <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Quilodáltons
M6P	Manose 6-fosfato ou <i>Mannose 6-phosphate</i>
MAP	Proteína mitógena ativada ou <i>Mitogen-activated Protein kinase</i>
MKK7	Proteína mitógena ativada quinase quinase 7 ou <i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NEP	Endopeptidase neutra
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1 ou <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
(P)RR	Receptor de (pró)-renina ou <i>(Pro)renin receptor</i>
PBS	Tampão salino de fosfato ou <i>Phosphate buffer saline</i>

PC1	Pró-homônio convertase 1
PC5	Pró-homônio convertase 5
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PCR	Reação em cadeia de polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ou <i>Platelet-derived growth factor</i>
PEP	Prolil endopeptidase
PRECE	Enzima conversora de pró-renina ou <i>Prorenin Converting Enzyme</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucléico
RSV	Rous Sarcoma Vírus
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa ou <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SARS-CoV	Coronavírus associado à síndrome do estresse respiratório agudo
SBF	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato ou <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador- $\beta$ ou <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>

## LISTA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

AMPc	Adenilato monofosfato cíclico
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
HEPES	Ácido (N-[2-Hidroximetil] Piperazina-N`-[2-Etanossulfônico]
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
S <sup>35</sup>	Enxofre (radionuclídeo)
SDS	Sódio dodecil sulfato

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
cm	Centrím metro
g	Grama
kV	Quilovolt
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milím metro
mmHg	Milím metros de mercúrio
mmol	Milimol
nmol	Nanomol
rpm	Rotações por minuto
°C	Grau Celsius
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu\text{Ci}$	MicroCurie
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{F}$	MicroFaraday
$\mu\text{L}$	Microlitro
mol	mol omol
%	Porcentagem
UI	Unidades Internacionais
URL	Unidades Relativas de Luz

# SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	24
1.1.1 <i>Histórico</i> .....	24
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRAVASCULAR.....	25
1.2.1 <i>Pró-renina e renina</i> .....	26
1.2.2 <i>Enzima conversora de pró-renina (PRECE)</i> .....	30
1.2.3 <i>Receptores de pró-renina/renina</i> .....	32
1.2.3.1 Receptores de manose 6-fosfato .....	32
1.2.3.2 Receptores (P)RR .....	33
1.2.4 <i>Angiotensinogênio</i> .....	35
1.2.5 <i>Enzima conversora de angiotensina</i> .....	36
1.2.6 <i>Vias alternativas de formação de angiotensina II</i> .....	42
1.2.7 <i>Angiotensinas: receptores e efeitos fisiopatológicos</i> .....	44
1.2.7.1 Angiotensinas I, II, III e IV .....	44
1.2.7.2 Angiotensinas (1-9) e (1-7) .....	50
1.3 BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SRA .....	51
1.3.1 <i>Inibidores de ECA</i> .....	51
1.3.2 <i>Antagonistas de receptores AT<sub>1</sub></i> .....	53
1.3.3 <i>Inibidores de renina</i> .....	55
1.4 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA TECIDUAL .....	55
1.4.1 <i>Sistema renina-angiotensina cardíaco</i> .....	59
1.4.1.1 Renina .....	59
1.4.1.2 Enzima conversora de angiotensina .....	60
1.4.1.3 Quimase .....	61
1.4.1.4 Angiotensinogênio e angiotensinas I e II .....	61
1.4.1.5 Receptores de angiotensina .....	62
1.4.1.6 Efeitos do SRA cardíaco .....	62
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	65
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>66</b>
3.1 CULTURA DE CÉLULAS GH4C1 .....	66
3.2 PLASMÍDEOS E TRANSFEÇÃO DE ADN DE CÉLULAS GH4C1 .....	66
3.3 MARCAÇÃO RADIOATIVA DAS CÉLULAS GH4C1.....	67

3.4	EXPERIMENTOS DE “PULSE-CHASE” .....	68
3.5	IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	69
3.6	RADIOIMUNOENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PRÓ-RENINA E RENINA .....	70
3.7	ANIMAIS .....	70
3.8	CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS .....	71
3.9	PLASMÍDEOS E TRANFECCÃO DE ADN DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS .....	72
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	75
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
4.1	PROCESSAMENTO DE PRÓ-RENINA PELA CATEPSINA B .....	76
4.1.1	<i>Pró-renina selvagem (wild type)</i> .....	76
4.1.2	<i>Mutações N-terminais no pró-segmento da pró-renina</i> .....	78
4.1.3	<i>Mutações nos sítios de glicosilação da pró-renina</i> .....	81
4.1.4	<i>Mutações C-terminais no pró-segmento da pró-renina</i> .....	83
4.2	DIRECIONAMENTO DA PRÓ-RENINA PARA OS GRÂNULOS SECRETÓRIOS .....	86
4.2.1	<i>Experimentos de pulse-chase</i> .....	86
4.3	VIA INTRACELULAR MEDIADA PELA PRÓ-RENINA EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS	
	88	
4.3.1	<i>Pró-renina selvagem (wild type)</i> .....	88
4.3.2	<i>Pró-renina mutante +5(N/A)</i> .....	90
4.3.3	<i>Pró-renina mutante -1-2(R/A e K/A)</i> .....	92
4.3.4	<i>Pró-renina selvagem e captopril</i> .....	94
4.3.5	<i>Pró-renina selvagem e losartan</i> .....	97
<b>V.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>100</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>138</b>
	ANEXO A - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I.....	138
A.1	<i>Pró-renina selvagem (wild type)</i> .....	138
A.2	<i>Mutações N-terminais no pró-segmento da pró-renina</i> .....	141
A.2.1	Mutante -3(M/A).....	141
A.2.2	Mutante -2(K/A).....	142
A.2.3	Mutante -1(R/A).....	143
A.2.4	Porcentagens de angiotensina I formada a partir de pró-renina mutantes.....	144
A.3	<i>Mutações em sítios de glicosilação (resíduos de asparagina) da pró-renina</i> .....	146
A.3.1	Mutante +5(N/A).....	146
A.3.2	Mutante +75(N/A).....	147

A.3.4	Porcentagens de angiotensina I formada a partir de pró-renina mutantes.....	148
<b>ANEXO B - RESULTADOS DA TAXA DE ATIVAÇÃO DO GENE REPÓRTER BNP-LUCIFERASE EM</b>		
	<b>CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS .....</b>	<b>149</b>
B.1	<i>Pró-renina selvagem (wild type).....</i>	<i>149</i>
B.2	<i>Mutantes de pró-renina mutante (-1-2 e +5).....</i>	<i>151</i>
B.3	<i>Pró-renina e tratamento farmacológico (captopril ou losartan).....</i>	<i>153</i>



## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

#### 1.1.1 Histórico

Em 8 de Novembro de 1896, Robert Tigerstedt e Per Bergman injetaram extrato renal de coelhos na veia jugular desses animais. A cada 10 segundos, a pressão arterial dos animais foi aferida e ambos os pesquisadores observaram que, aos 80 segundos após a injeção, a pressão arterial elevou-se da faixa dos 62-67 mmHg para 100 mmHg, ocorrendo um aumento de quase 50% (TIGERSTEDT, R. e BEGMAN, P., 1898 *apud* PHILLIPS, M. I. e SCHMIDT-OTT, K. M., 1999, p. 271.).

Os experimentos foram repetidos com diferentes extratos renais obtidos a partir de extrações em água fria, água fervente, álcool 50%, álcool absoluto e glicerina. Tigerstedt e Bergman concluíram que a substância vasopressora era solúvel em água e álcool, além de ser termolábil, pois era destruída em temperaturas superiores a 56°C (TIGERSTEDT, R. e BEGMAN, P., 1898 *apud* PHILLIPS, M. I. e SCHMIDT-OTT, K. M., 1999, p. 271.).

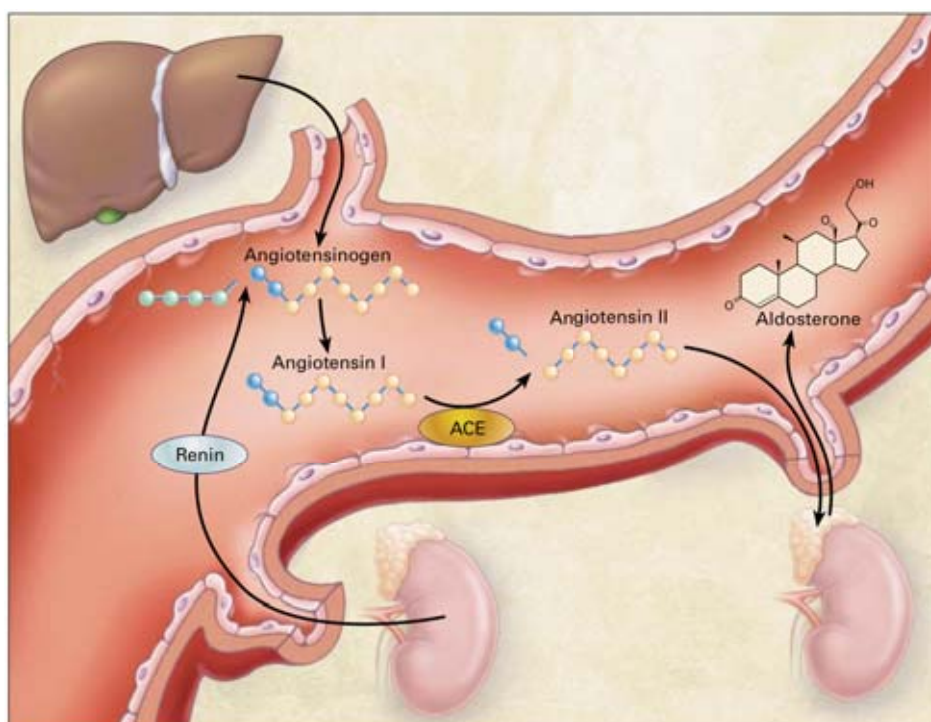
Em 1898, Tigerstedt e Bergman publicaram o primeiro artigo científico acerca do sistema renina-angiotensina (SRA), no qual os resultados de suas importantes descobertas foram detalhadamente relatados. Tigerstedt e Bergman concluíram que os extratos renais, especificamente oriundos do córtex renal, produziam significativo efeito pressórico quando administrado por via endovenosa em coelhos (TIGERSTEDT, R. e BEGMAN, P., 1898 *apud* PHILLIPS, M. I. e SCHMIDT-OTT, K. M., 1999, p. 272.).

Há 110 anos, a hipertensão arterial sistêmica vem sendo relacionada à disfunção renal. Embora os mecanismos fisiopatogênicos ainda não estejam completamente elucidados, o SRA continua sendo um sistema enzimático indiscutivelmente importante na fisiopatogenia das cardiopatias e vasculopatias e, até os dias de hoje, é alvo de incessantes pesquisas acerca dos novos mecanismos pelos quais essas doenças se desenvolvem e progridem. Pesquisas essas que, certamente, contribuem para importantes avanços científicos (RIBEIRO, A. B. e PLAVNIK, F. L., 2007).

## 1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRAVASCULAR

O sistema renina-angiotensina clássico é definido como sendo uma cascata enzimática intravascular, cujos produtos peptídicos bioativos desempenham importante papel endócrino na manutenção da pressão arterial e do balanço hidro-eletrolítico corporal.

Na via clássica do SRA, a renina é uma enzima que cliva o angiotensinogênio em um decapeptídeo, a angiotensina I. Esse decapeptídeo é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), principalmente nos leitos vasculares pulmonares, em um octapeptídeo, a angiotensina II, que executa diversas ações fisiopatológicas ao atuar em seus diferentes subtipos de receptores AT, tais como: elevação da pressão arterial, estimulação da secreção adrenal de aldosterona e promoção de efeitos tróficos celulares em diversos tecidos (**Figura 1**) (RIBEIRO, A. B. e PLAVNIK, F. L., 2007).



**Figura 1** – Sistema renina-angiotensina aldosterona intravascular.

O angiotensinogênio, precursor dos peptídeos de angiotensinas, é sintetizado pelo fígado. Na circulação sistêmica, ele é clivado pela renina, que é secretada no lúmen das arteríolas aferentes renais pelas células justaglomerulares. A renina cliva dez resíduos de aminoácidos do angiotensinogênio, formando a angiotensina I. Em seguida, a angiotensina I é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ACE), uma enzima ancorada à membrana das células endoteliais, formando a angiotensina II. Na zona glomerulosa do córtex adrenal, a angiotensina II estimula a produção de aldosterona.

Fonte: WEBER, K. T. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med*, v. 345, n. 23, p. 1689-1697, Dec 6 2001.

### 1.2.1 Pró-renina e renina

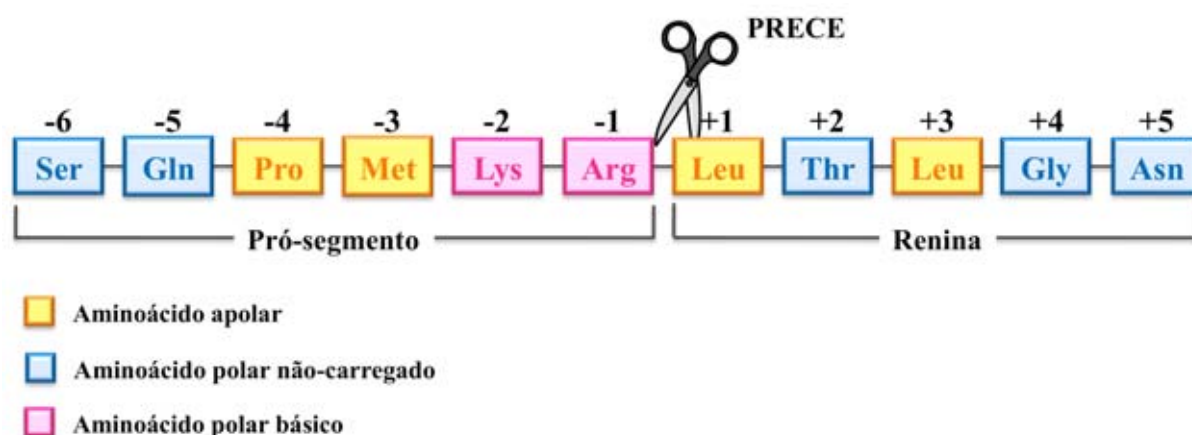
A renina é uma aspartil protease, cujo nível plasmático é o fator limitador para a produção de angiotensina I, a partir da clivagem enzimática do angiotensinogênio (**Figura 1**) (SEALEY, J. E. *et al.*, 1977). A renina é principalmente sintetizada pelas células justaglomerulares renais a partir de um zimogênio constituído por 406 resíduos de aminoácidos – a pré-pró-renina (VON LUTTEROTTI, N. *et al.*, 1994).

Após a síntese protéica, a clivagem de um peptídeo de 23 resíduos de aminoácidos – que codifica o peptídeo do sinal – direciona o zimogênio para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (HSUEH, W. A. *et al.*, 1991), onde a molécula será processada e resultará na pró-renina (PRATT, R. E. *et al.*, 1987).

A pró-renina segue para o complexo de Golgi, onde será duplamente glicosilada. O processo de glicosilação tem início ainda no RER e continua nas cisternas desse complexo (HACKENTHAL, E. *et al.*, 1990). A pró-renina humana contém dois sítios de N-glicosilação em resíduos de asparagina (+5 e +75 em relação ao sítio de clivagem) (ROTHWELL, V. *et al.*, 1993). As cadeias de oligossacarídeos ligadas à estrutura peptídica da renina parece desempenhar um importante papel na estabilidade dessa aspartil protease (HORI, H. *et al.*, 1988). Caso os sítios de glicosilação sejam mutados, ocorre uma disfunção secretória de renina. Portanto, acredita-se que a glicosilação contribua para a eficiente secreção do produto pós-transcricional da renina (ROTHWELL, V. *et al.*, 1993). Entretanto, a remoção das cadeias glicosídicas da renina (biologicamente ativa) parece não afetar a sua atividade enzimática (FRITZ, L. C. *et al.*, 1986). Ao sair do complexo de Golgi, a pró-renina pode ser endereçada a uma de duas diferentes vias secretórias: a via constitutiva ou a via regulada (HACKENTHAL, E. *et al.*, 1990).

Na via constitutiva, a pró-renina é secretada continuamente na circulação sanguínea sem que haja aparente estímulo celular (BAXTER, J. D. *et al.*, 1989; HSUEH, W. A. *et al.*, 1991). Em situações fisiopatológicas, como gravidez e *diabetes mellitus*, parece que a via secretória constitutiva da pró-renina apresenta-se hiperativa, pois os seus níveis circulantes podem alcançar valores até dez vezes maiores do que os níveis normais (SEALEY, J. E. *et al.*, 1986; DERKX, F. H. e SCHALEKAMP, M. A., 1988).

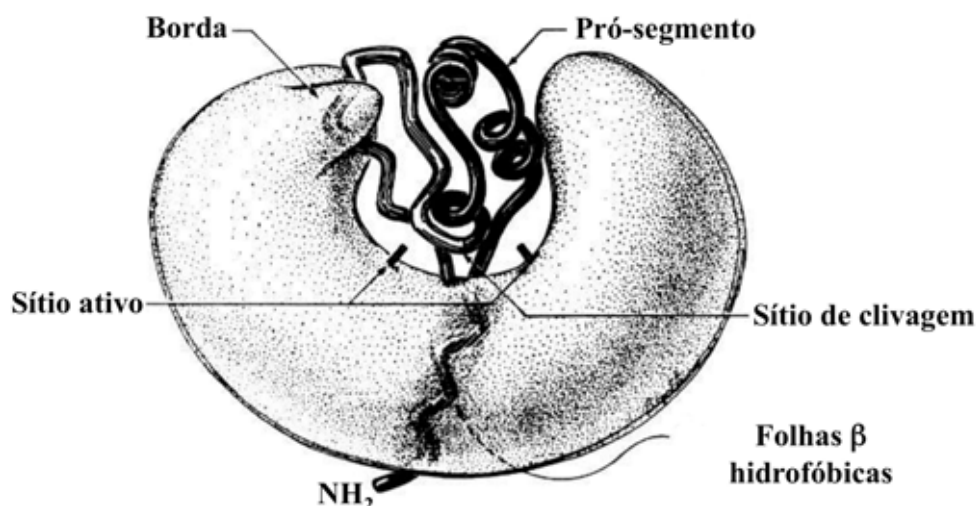
Na via regulada, a pró-renina é endereçada aos grânulos secretórios, onde será convertida em renina sob ação de uma protease ainda desconhecida, mas já denominada enzima conversora de pró-renina (PRECE). Essa protease reconhece o par de aminoácidos básicos lisina-arginina presente na molécula da pró-renina (**Figura 2**). Após o reconhecimento, a protease cliva o pró-segmento da pró-renina – constituído por 43 resíduos de aminoácidos N-terminais - (**Figuras 2 e 3**), transformando-a em renina por meio de uma ativação proteolítica (HIROSE, S. *et al.*, 1985; DO, Y. S. *et al.*, 1987). A renina sintetizada é acondicionada em grânulos secretórios, até que as células justaglomerulares recebam estímulos celulares secretando-a na circulação sistêmica (HSUEH, W. A. *et al.*, 1991).



**Figura 2** – Aminoácidos presentes no sítio de clivagem da pró-renina humana.

A secreção de renina pode ser regulada por três importantes mecanismos, sendo que o primeiro relaciona-se à mácula densa, que se encontra adjacente às células justaglomerulares. O aumento no fluxo de NaCl na mácula densa estimula a liberação de adenosina que, ao atuar em receptores  $A_1$ , inibe a secreção de renina. Contrariamente, a redução no fluxo de NaCl estimula a secreção de prostaglandinas, que, por conseguinte, estimula a secreção de renina. O segundo mecanismo relaciona-se à pressão de perfusão das arteríolas aferentes renais. O aumento da tensão na parede dos vasos pré-glomerulares inibe os barorreceptores renais, reduzindo a secreção de renina. Sendo assim, a redução da tensão intravascular é detectada pelos mecanismos barorreceptores intra-renais e esse mesmo sistema estimula a secreção de renina. O terceiro mecanismo refere-se aos estímulos neuro-endócrinos e parácrinos. A liberação de noradrenalina em terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares ativa receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, localizados em células justaglomerulares, ocasionando aumento abrupto de AMPc citoplasmático, o que causa uma rápida estimulação na secreção de renina. Autacóides, como a prostaglandina  $E_2$ , a prostaciclina e o óxido nítrico

também são capazes de estimular a secreção de renina *per si*, enquanto a vasopressina e a endotelina são capazes de inibir esse mecanismo secretório (KURTZ, A. e WAGNER, C., 1999; PERSSON, P. B., 2003).



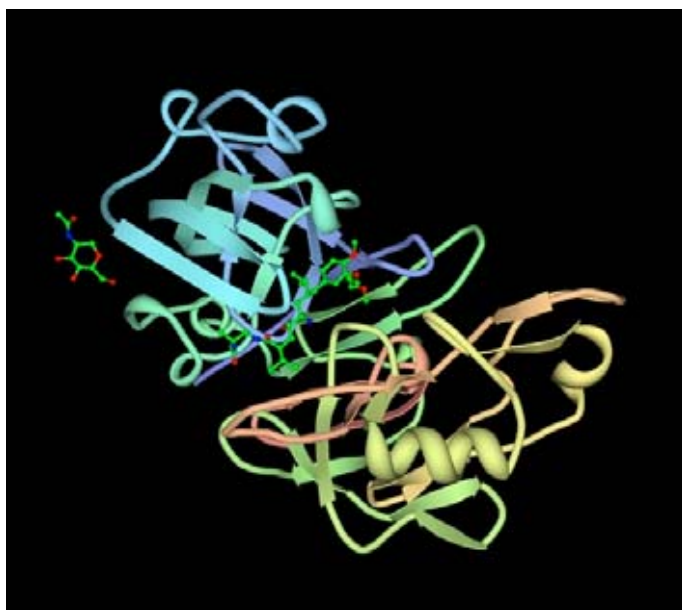
**Figura 3** – Representação da estrutura tridimensional da pró-renina humana.

Fonte: BAXTER, J.D. *et al.* The molecular biology of human renin and its gene. **Yale J Biol Med**, v. 62, n. 5, p. 493-501, Sep-Oct 1989.

Além da ativação proteolítica por ação enzimática da PRECE, a pró-renina pode também ser ativada de forma não-proteolítica. O pró-segmento – estrutura que recobre o sítio de clivagem e impede o contato do angiotensinogênio com o sítio ativo da renina – pode ser estruturalmente afetado e se deslocar, expondo o sítio ativo da renina. Essa ativação pode ser induzida pela exposição da pró-renina a baixo pH (pH 3.3) ou baixas temperaturas (4°C) (DERKX, F. H. *et al.*, 1976; LECKIE, B. J. e MCGHEE, N. K., 1980). A ativação não-proteolítica torna a pró-renina enzimaticamente ativa. Isso ocorre devido à alteração conformacional e conseqüente exposição do sítio ativo da enzima, sendo facilmente detectado pelo reconhecimento de anticorpos específicos (PITARRESI, T. M. *et al.*, 1992; SUZUKI, F. *et al.*, 2003).

Entretanto, existe um equilíbrio dinâmico entre as formas ativas – pró-segmento deslocado – e inativas – pró-segmento não-deslocado – da pró-renina em condições fisiológicas de pH neutro e temperatura de 37°C. Já está demonstrado que em condições fisiológicas é possível encontrar menos de 2% de pró-renina na forma ativa *versus* menos de 98% de pró-renina na forma inativa (NGUYEN, G. e DANSER, A. H., 2008). Essas descobertas sugerem um papel funcional da pró-renina independente de sua ativação proteolítica.

A renina é uma enzima formada por dois lobos homólogos, cuja fenda entre ambas estruturas abriga os resíduos de ácido aspártico que formam o sítio ativo (SIELECKI, A. R. *et al.*, 1989). A determinação cristalográfica da estrutura tridimensional da renina foi um passo importantíssimo para o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir a função catalítica dessa aspartil protease (**Figura 4**) (RAHUEL, J. *et al.*, 2000). Em 6 de Março de 2007, o alisquireno – primeiro fármaco inibidor de renina – foi registrado pelo órgão regulamentador americano *Food and Drug Administration* (FDA) e chegou ao mercado brasileiro em Julho de 2008 com a promessa de ser um fármaco anti-hipertensivo superior aos demais já existentes.



**Figura 4** – Modelagem molecular da estrutura tridimensional da renina.

Os dois lobos homólogos da renina são visualizados em tom azul e amarelo. A estrutura química colorida em verde e localizada na fenda entre os lobos (sítio ativo) corresponde à molécula do alisquireno.

Fonte: RAHUEL, J. *et al.* Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. **Chem Biol**, v. 7, n. 7, p. 493-504, Jul 2000.

### 1.2.2 Enzima conversora de pró-renina (PRECE)

Todas as evidências levam a crer que no pH 5.6 ocorre a ativação proteolítica de pró-renina em renina nos grânulos secretórios das células justaglomerulares por uma protease ainda não identificada (BRECHLER, V. *et al.*, 1996).

Apesar da PRECE ainda não ter sido bioquimicamente caracterizada, sabe-se que ela reconhece o par de aminoácidos básicos lisina-arginina e remove o pró-segmento de 43 resíduos de aminoácidos N-terminais, formando a renina (**Figura 2**) (HIROSE, S. *et al.*, 1985; DO, Y. S. *et al.*, 1987). Diversas proteases já foram sugeridas como sendo a verdadeira PRECE, como, por exemplo, a catepsina D (MORRIS, B. J., 1978), catepsina G (DZAU, V. J., GONZALEZ, D. *et al.*, 1987), calicreína tecidual (DERKX, F. H. *et al.*, 1979), pró-hormônio convertase 1 (PC1) (BENJANNET, S. *et al.*, 1992), pró-hormônio convertase 5 (PC5) (MERCURE, C. *et al.*, 1996), tripsina (CARILLI, C. T. *et al.*, 1988) e a enzima conversora de pró-renina da glândula submandibular de camundongos (KIM, W. S. *et al.*, 1990).

Entretanto, nenhuma dessas proteases apresentam as características bioquímicas necessárias para ser a enzima conversora de pró-renina. A calicreína, a catepsina G, a PC1, a PC5 e a tripsina não se co-localizam com a renina em grânulos secretórios das células justaglomerulares. A calicreína (DERKX, F. H. *et al.*, 1979) e a catepsina G (DZAU, V. J., GONZALEZ, D. *et al.*, 1987) atuam em um pH ótimo superior àquele encontrado nos grânulos secretórios das células justaglomerulares (SIGMON, D. H. e FRAY, J. C., 1991). A tripsina, além de converter a pró-renina em renina, degrada a renina (CARILLI, C. T. *et al.*, 1988) e a enzima conversora de pró-renina da glândula submandibular de camundongos. Esta enzima é específica para a pró-renina murina e não é capaz de atuar enzimaticamente na pró-renina humana (KIM, W. S. *et al.*, 1990).

A protease que parece ser a autêntica enzima conversora de pró-renina é a catepsina B. Estudos *in vitro* demonstraram que essa tiol protease remove precisamente o pró-segmento da pró-renina humana recombinante na seqüência correta, sem degradar a renina (WANG, P. H. *et al.*, 1991). Além disso, a catepsina B hidrolisa eficientemente peptídeos sintéticos fluorescentes que mimetizam o sítio de clivagem da pró-renina (ALMEIDA, P. C. *et al.*, 2000) e, principalmente, se co-localiza com a pró-renina humana (WANG, P. H. *et al.*, 1991) e está presente em células justaglomerulares renais de ratos (TAUGNER, R. *et al.*, 1985).

Todavia, em um sistema celular complexo como a cultura de células de mamíferos, os resultados acerca da catepsina B são controversos. Ainda não se sabe se a catepsina B é capaz de converter pró-renina em renina nos grânulos secretórios. Em células hipofisárias de ratos GH4C1, que em condições normais não converte pró-renina em renina, Neves *et al.* (1996) demonstraram que a catepsina B converte pró-renina em renina e a adição de secretagogos aumenta a secreção de renina, sugerindo que a conversão de pró-renina ocorreu exatamente na via secretória. Em células hipofisárias de camundongos AtT20, foi demonstrado que a catepsina B converte a pró-renina em renina no compartimento lisossomal, e não nos grânulos secretórios (JUTRAS, I. e REUDELHUBER, T. L., 1999).

Existem também divergências acerca de quais aminoácidos do sítio de clivagem da pró-renina são especificamente reconhecidos pela catepsina B. Experimentos realizados *in vitro* com pró-renina humana recombinante cujos aminoácidos foram pontualmente mudados por alanina nos resíduos de -5 a -1 (em relação ao sítio de clivagem) (**Figura 02**) sofreram redução do processamento em renina pela ação da catepsina B, especialmente a mutação na lisina -2(K/A) (JUTRAS, I. e REUDELHUBER, T. L., 1999). Contrariamente, peptídeos fluorescentes mutantes que mimetizam o sítio de clivagem da pró-renina foram, de modo geral, mais processados do que o peptídeo fluorescente da pró-renina selvagem – *wild type*. Segundo Almeida *et al.* (2000), os peptídeos com mutações nos resíduos de lisina -2(K/A), metionina -3(M/A) e glutamina -5(Q/A) foram clivados com uma eficiência maior do que o peptídeo selvagem. Por outro lado, as mutações nos resíduos de arginina -1(R/A) e prolina -4(P/A) dos peptídeos fluorescentes, que foram clivados pela catepsina B com uma eficiência menor do que o peptídeo selvagem.



### 1.2.3 Receptores de pró-renina/renina

#### 1.2.3.1 Receptores de manose 6-fosfato

O receptor de manose 6-fosfato (M6P/IGF2R) tem afinidade por proteínas fosfomanosiladas (p. ex. pró-renina e renina), mas o IGF-2 – que não é glicosilado – e o ácido retinóico também se ligam ao receptor M6P/IGF2R em sítios distintos (KORNFELD, S., 1992; KANG, J. X. *et al.*, 1997).

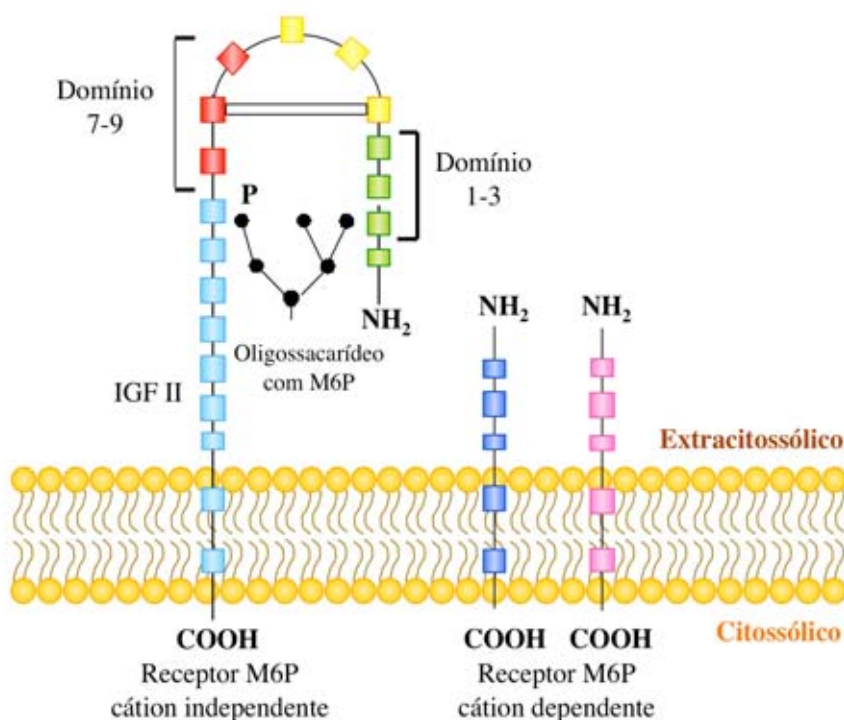
O receptor M6P/IGF2R possui um grande domínio extracelular, contendo quinze regiões de repetição e um pequeno domínio citoplasmático (DAHMS, N. M., 1996). Até o momento, dois receptores de manose 6-fosfato diferentes foram identificados. O receptor cátion-independente possui uma cadeia polipeptídica extensa e possui massa molecular igual a 300 kDa. Ele se acopla aos seus ligantes independentemente da presença de cátions divalentes. Já o receptor cátion-dependente possui uma cadeia peptídica menor (massa molecular igual a 46 kDa) e requer cátions divalentes para otimizar essa ligação (DAHMS, N. M. *et al.*, 1987) (**Figura 5**).

A participação dos receptores de manose 6-fosfato não se restringe apenas à ligação e à captação de pró-renina e renina, pois ele também está envolvido na ativação intracelular de pró-renina. A pró-renina e a renina ligam-se com alta afinidade ( $K_d \approx 1$  nM) ao receptor M6P/IGF2R (SARIS, J. J. *et al.*, 2001; VAN DEN EIJNDEN, M. M. *et al.*, 2001). O receptor cátion-dependente não exibe alta afinidade por proteínas fosfomanosiladas (TONG, P. Y. *et al.*, 1989; TONG, P. Y. e KORNFELD, S., 1989).

Em baixas temperaturas (4°C), cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e as células endoteliais se ligam à pró-renina humana recombinante de modo dose-dependente (SARIS, J. J. *et al.*, 2001; VAN DEN EIJNDEN, M. M. *et al.*, 2001). A ligação é significativamente reduzida pela adição de manose 6-fosfato (10 nM). Entretanto, em temperatura fisiológica (37°C), os níveis de pró-renina associada às células aumenta cerca de dez vezes (SARIS, J. J. *et al.*, 2001).

Intracelularmente, a pró-renina é ativada em renina pela remoção proteolítica do pró-segmento. Essa remoção pode ser verificada por meio do uso de anticorpos monoclonais direcionados especificamente à porção C-terminal do pró-segmento. Não existem evidências da saída de renina intracelular ou da saída de pró-renina ativada para o meio de cultura.

Portanto, a renina parece desempenhar ações intracelulares. Sabe-se que a renina é degradada pelas células ( $t_{1/2} \approx$  uma hora) e, possivelmente, o receptor M6P/IGF2R poderia estar envolvido na depuração de pró-renina e renina. Possivelmente, a ativação proteolítica da pró-renina seja apenas o primeiro passo de sua degradação (SARIS, J. J. *et al.*, 2001).



**Figura 5** – Receptor de manose 6-fosfato.

Os dois ligantes do receptor de manose 6-fosfato cátion independente estão ilustrados. Os resíduos de arginina na posição 435 e 1334 no domínio 3 e 9, respectivamente, são essenciais para a ligação de alta afinidade da manose 6-fosfato. Sequências no domínio 11 estão envolvidas na ligação do IGF-2.

Fonte: DANSER, A. H.; SARIS, J. J.; SCHUIJT, M. P. e VAN KATS, J. P. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? **Cardiovasc Res**, v. 44, n. 2, p. 252-265, Nov 1999.

### 1.2.3.2 Receptores (P)RR

Surpreendentemente, Nguyen *et al.* (2002) descreveram a expressão do cDNA de um receptor de (pró)-renina humana constituído por 350 resíduos de aminoácido, tendo um único domínio transmembrana e nenhuma homologia com proteínas já identificadas. O receptor foi denominado, segundo as normas internacionais, (P)RR. As células transfectadas

com o receptor demonstraram ligação específica à pró-renina e à renina. A pró-renina, ao ligar-se ao receptor, teve seu pró-segundo deslocado (ativação não-proteolítica) e adquiriu capacidade enzimática. Já a ligação da renina ao receptor aumentou em quatro vezes sua capacidade catalítica. Além disso, o receptor é capaz de ativar uma cascata de sinalização intracelular com a fosforilação de resíduos de tirosina e serina associados à ativação das MAP quinases ERK1 e ERK2.

A ativação das proteínas ERK1 e ERK2 eleva a expressão intracelular de moléculas pró-fibróticas, como TGF- $\beta$  (HUANG, Y. *et al.*, 2006; HUANG, Y. *et al.*, 2007), PAI-1 (ZHANG, J. *et al.*, 2008), colágeno-1 (HUANG, Y. *et al.*, 2006) e fibronectina (HUANG, Y. *et al.*, 2006). Em cardiomiócitos de ratos, (P)RR ativa a MAP quinase p38 e a Hsp-27, ambas envolvidas na dinâmica dos filamentos de actina (SARIS, J. J. *et al.*, 2006). Segundo Saris *et al.* (2006), a ativação de vias intracelulares que culminam com a alteração da dinâmica dos filamentos de actina pode estar envolvida nos mecanismos fisiopatogênicos de hipertrofia cardíaca.

De acordo com Nguyen *et al.* (2002), o mRNA do receptor foi detectado no coração, no cérebro, na placenta e, em menor proporção, nos rins, pâncreas e fígado. Foi detectada a mínima expressão do receptor em pulmões e músculo esquelético. O receptor está presente em células sub-endoteliais das artérias coronárias e renais, e se encontra colocalizado com a renina em células mesangiais do glomérulo renal.

Ratos transgênicos que expressam excessivamente o receptor de (pró)-renina (P)RR em células musculares lisas apresentaram aumento da pressão arterial, taquicardia e hiperaldosteronismo (BURCKLE, C. A. *et al.*, 2006). Já a expressão sistêmica excessiva do receptor de (pró)-renina (P)RR em ratos transgênicos causou, de forma insidiosa, proteinúria e glomeruloesclerose. A ativação intracelular de MAP quinase e de TGF- $\beta$  foi novamente visualizada e os animais se mantiveram euglicêmicos e normotensos durante o período de estudo (KANESHIRO, Y. *et al.*, 2007).

Em humanos, o gene do receptor de (pró)-renina – denominado ATP6AP2 – localiza-se no cromossomo X, locus 11.4 e é constituído por 9 éxons (NGUYEN, G. *et al.*, 2002). Ramser *et al.* (2005) descreveram uma mutação pontual no gene do receptor de (pró)-renina em pacientes com retardo mental ligado ao cromossomo X e epilepsia. A mutação encontrada é silenciosa (citosina trocada por timina) e ocorre em um sítio de *splicing*, resultando na inclusão do éxon 4 (485 pares de bases) em 50% dos mRNAs dos receptores de (pró)-renina. O éxon 4 é considerado um éxon variante, sendo, normalmente, removido pelo *splicing* diferencial em indivíduos saudáveis. O receptor de (pró)-renina mutado é capaz de

ligar-se à (pró)-renina e a geração de angiotensina I é comparável à obtida pelo receptor selvagem. Entretanto, o receptor mutado exibiu uma modesta capacidade de ativar a cascata de sinalização intracelular via MAP quinase, ERK1 e ERK2 em relação ao receptor selvagem. Esses resultados sugerem que a participação de componentes do SRA seria importante em processos cognitivos e no desenvolvimento cerebral.

#### 1.2.4 Angiotensinogênio

O angiotensinogênio é uma glicoproteína globular constituída por 452 resíduos de aminoácidos e com massa molecular variável, entre 55 e 65 kDa, dependendo da extensão das cadeias glicosídicas. O angiotensinogênio humano é o substrato específico da renina humana que, ao remover 10 aminoácidos da porção C-terminal do angiotensinogênio origina a angiotensina I, e suas concentrações plasmáticas são da ordem de micromolar, enquanto a concentração de renina é cerca de 1000 vezes menor (CORVOL, P. e JEUNEMAITRE, X., 1997).

O angiotensinogênio está presente tanto no plasma quanto em fluidos extracelulares, sendo este um suposto reservatório para a ação tecidual da renina (CORVOL, P. e JEUNEMAITRE, X., 1997). Um exemplo de reservatório extracelular de angiotensinogênio é o líquido cérebro-espinhal, que concentra a maior proporção de angiotensinogênio dentre todos os demais líquidos extracelulares (ITO, T. *et al.*, 1980; GENAIN, C. *et al.*, 1984).

A fonte primária do angiotensinogênio circulante é o fígado, apesar do mRNA do angiotensinogênio ter sido identificado no cérebro, coração, rim, glândula adrenal, ovário, placenta, tecido adiposo e na vasculatura (MORGAN, L. *et al.*, 1996). A secreção hepática de angiotensinogênio é constitutiva, havendo pequenas variações da quantidade secretada. Entretanto, a síntese do angiotensinogênio é estimulada por glicocorticóides, esteróides, hormônio tireoidiano, citocinas inflamatórias (p. ex. Interleucina-1 e Fator de Necrose Tumoral) e angiotensina II (MORGAN, L. *et al.*, 1996). Clinicamente, os efeitos hormonais na síntese do angiotensinogênio são visualizados na insuficiência adrenal, orquiectomia, hipotireoidismo e resistência insulínica. Em todas essas situações patológicas há um declínio da produção de angiotensinogênio hepático e tecidual (ATLAS, S. A., 2007).

Contrariamente, o aumento da síntese de angiotensinogênio é visualizado em situações fisiopatológicas em que há elevação de níveis hormonais, como, por exemplo, na gravidez e no hipercortisolismo - seja na síndrome de Cushing ou durante a corticoterapia. O aumento da secreção de angiotensinogênio pode ser um fator de risco para a hipertensão, apesar de existirem evidências que a estimulação crônica da secreção de angiotensinogênio é parcialmente compensada pela redução da secreção de renina (ATLAS, S. A., 2007).

Uma mutação *missense* no éxon 2 do gene do angiotensinogênio codifica a inserção de uma treonina na cadeia polipeptídica, ao invés de uma metionina existente na posição 235 (M235T). Esse fenômeno caracteriza um polimorfismo do gene do angiotensinogênio e ocorre comumente em vários grupos étnicos. A frequência do alelo T235 em indivíduos caucasianos é 0,35, enquanto em indivíduos negros a frequência é 0,80 (BLOEM, L. J. *et al.*, 1995). Em um estudo realizado com 27.906 indivíduos, foi atribuído maior risco de hipertensão arterial para a presença do alelo T. O grupo MM (homozigoto para a ausência do polimorfismo) foi estabelecido como controle. O grupo TT (homozigoto para a presença da mutação) apresentou risco de 31% de desenvolver hipertensão arterial em relação ao grupo controle. O grupo MT (heterozigoto para a presença da mutação) apresentou risco de 11% (STAESSEN, J. A. *et al.*, 1999). Além dos resultados em hipertensão arterial, a variação genética do polimorfismo M235T está associada a doenças, como coronariopatias, infarto agudo do miocárdio (KAMITANI, A. *et al.*, 1995; KATSUYA, T. *et al.*, 1995; WINKELMANN, B. R. *et al.*, 1999), progressão da aterosclerose carotídea e, conseqüentemente, lesões cerebrais isquêmicas (SCHMIDT, R. *et al.*, 2001).

### 1.2.5 Enzima conversora de angiotensina

O decapeptídeo angiotensina I é hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), que remove um dipeptídeo C-terminal, transformando a angiotensina I no octapeptídeo angiotensina II [Ang(1-8)] (ERDOS, E. G. e SKIDGEL, R. A., 1987). A ECA – também denominada cininase II (dipeptidil carboxipeptidase) – é uma zinco-metaloprotease com ação exopeptidase e é considerada promíscua pelo fato de clivar, inespecificamente, diversos substratos, como a bradicinina, substância P, encefalinas, endorfinas e neurotensina (MENG, Q. C. e OPARIL, S., 1996).

Apesar do seu potencial em hidrolisar diversas proteínas, a ECA, curiosamente, hidrolisa a bradicinina em bradicinina (1,5) com afinidade superior à dos demais substratos. Portanto, a ECA é uma peptidase que aumenta a produção da angiotensina II, que tem ação vasoconstritora, e reduz a disponibilidade da bradicinina, que tem ação vasodilatadora (ATLAS, S. A., 2007).

O segmento hidrofóbico C-terminal da ECA ancora-se à membrana plasmática de diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, células epiteliais com bordas em escova (p. ex. células dos túbulos proximais renais) e células neuroepiteliais (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003). Como a ECA se ancora em células endoteliais, conseqüentemente, ela está presente em diversos tecidos, como rim, coração, cérebro (THURMAN, J. M. e SCHRIER, R. W., 2003) e, em elevadas concentrações, no endotélio pulmonar (BADER, M., 2001). Existem duas formas de ECA descritas: a forma somática, constituída por dois domínios homólogos e presente nos supracitados tecidos, e a forma germinativa, constituída apenas pelo domínio C-terminal, que se encontra presente nos testículos (WEI, L. *et al.*, 1991).

Além da ECA ancorada à membrana plasmática, existe uma forma da ECA circulante em fluidos corporais (HOOPER, N. M., 1991). No que se refere às formas existentes da ECA, Casarini *et al.* (2001) demonstraram que a urina de indivíduos normotensos apresenta dois fragmentos da forma somática da ECA, que são eliminados com 190 kDa e 65 kDa. Surpreendentemente, a urina de pacientes hipertensos apresenta intacto apenas o fragmento de 65 kDa, pois o fragmento de 190 kDa é eliminado como uma forma truncada de 90 kDa, sugerida como um possível marcador molecular de hipertensão arterial.

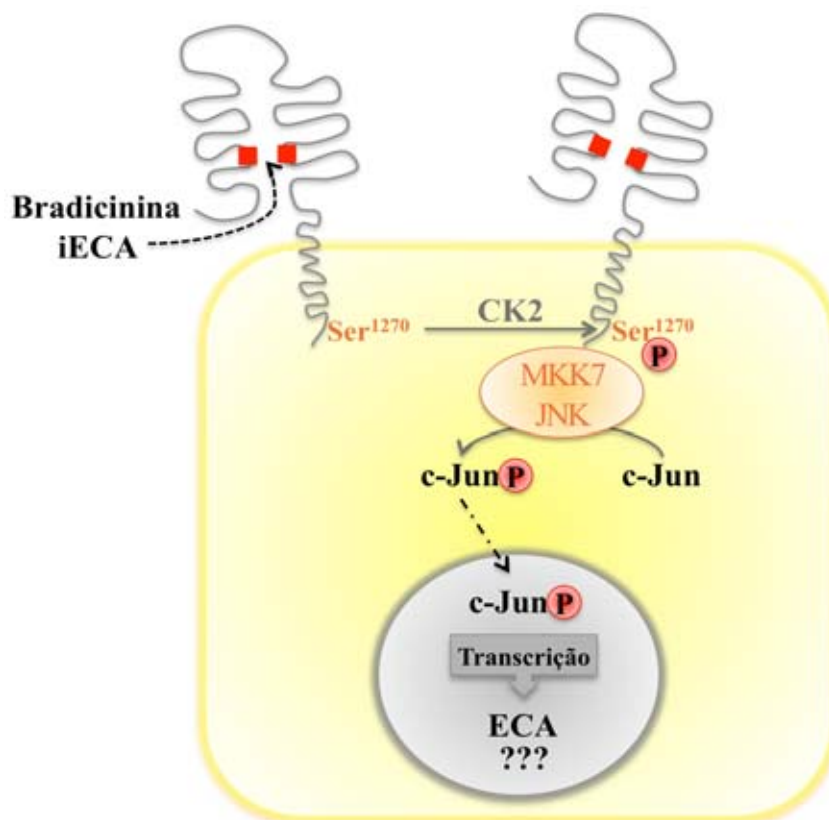
A concentração plasmática da ECA varia de acordo com as diferenças interindividuais. Todavia, as concentrações plasmáticas da enzima são semelhantes em indivíduos da mesma família, sugerindo importante influência genética na concentração plasmática da enzima (CAMBIEN, F. *et al.*, 1988). O gene da ECA humana contém um polimorfismo consistindo da presença (inserção (I)) ou da ausência (deleção (D)) de uma seqüência *alu* repetitiva de 287 pares de bases no íntron 16 (TIRET, L. *et al.*, 1992). Indivíduos portadores do genótipo DD apresentam níveis plasmáticos de ECA duas vezes maior do que indivíduos com genótipo II (RIGAT, B. *et al.*, 1990). No polimorfismo I/D, os níveis plasmáticos da ECA são intermediários, indicando uma co-dominância, e contabiliza, aproximadamente, a metade dos indivíduos testados (47%) (RIGAT, B. *et al.*, 1990).

Associações entre a presença do alelo D e o desenvolvimento e/ou progressão de sarcoidose (FURUYA, K. *et al.*, 1996), asma (BENESSIANO, J. *et al.*, 1997), beriliose (MAIER, L. A. *et al.*, 1999) e a síndrome do estresse respiratório agudo (MARSHALL, R. P. *et al.*, 2002) já

foram descritas. Entretanto, as pesquisas científicas quanto à participação do polimorfismo da ECA em mecanismos fisiopatogênicos avançam mais rapidamente em doenças cardiovasculares. Está demonstrado que a presença do alelo D aumenta significativamente o risco de hipertensão arterial sistêmica, hipertrofia ventricular esquerda, aterosclerose, coronariopatias, acidentes vasculares cerebrais e nefropatia diabética (SAYED-TABATABAEI, F. A. *et al.*, 2006).

Em 2004, Kohlstedt *et al.* (2004) atribuíram um novo papel funcional à ECA: molécula transdutora de sinais. Os mesmo autores já haviam publicado um estudo anterior demonstrando que o resíduo de serina (ser1270) presente na porção C-terminal da ECA era fosforilado pela proteína quinase CK2. À época, já era sabido que a fosforilação da serina 1270 era importante para o ancoramento da ECA à membrana plasmática (KOHLSTEDT, K. *et al.*, 2002).

Pelo mecanismo descrito por Kohlstedt *et al.* (2004) em células endoteliais, tanto inibidores da enzima (p. ex. ramiprilato) quanto substratos (p. ex. bradicinina) aumentam a fosforilação do resíduo de serina 1270 da ECA por ação da proteína quinase CK-2. O resíduo de serina 1270 fosforilado aumenta a atividade das proteínas quinases MKK7 e JNK, que fosforilam o fator transcricional c-Jun. Após a fosforilação, c-Jun é translocado para o núcleo da célula, no qual regulará a expressão do gene da ECA – *upregulation* – e, talvez, de outros genes (**Figura 6**).



**Figura 6** – ECA como uma molécula transdutora de sinais.

A ligação de bradicinina ou inibidores da ECA (iECA) aumentam a fosforilação do resíduo 1270 de serina pela ação da CK2. A ECA fosforilada ativa proteínas quinase MKK7 e JNK, que fosforilam o fator transcricional c-Jun, carreando-o ao núcleo da célula, no qual haverá maior transcrição do gene da ECA.

Fonte: RAHUEL, J. *et al.* Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. **Chem Biol**, v. 7, n. 7, p. 493-504, Jul 2000.

Dentre as recentes descobertas relacionadas ao SRA está a identificação da ECA2 como uma importante enzima capaz de gerar a angiotensina (1-7), peptídeo de grande relevância biológica, além da angiotensina II, no que tange seus efeitos vasoativos (DONOGHUE, M. *et al.*, 2000; TIPNIS, S. R. *et al.*, 2000; CRACKOWER, M. A. *et al.*, 2002).

Ambos os grupos descreveram separadamente a enzima homóloga à ECA, sendo que Donogue *et al.* (2000) denominaram-na ECA2. Já Tipnis *et al.* (2000) descreveram a enzima como sendo uma carboxipeptidase insensível ao captopril. Simultaneamente, Donogue *et al.* (2000) descreveram a capacidade de ECA2 hidrolisar a angiotensina I em angiotensina (1-9), enquanto Tipnis *et al.* (2000) e Vickers *et al.* (2002) demonstraram que a angiotensina II é o substrato preferido da ECA2, cuja afinidade é 400 vezes maior do que para angiotensina I. Contrariamente à ECA somática, a ECA2 aumenta a degradação da angiotensina II, reduzindo seu efeito vasoconstritor, e não degrada a bradicinina, mantendo



sua ação vasodilatadora (TURNER, A. J. *et al.*, 2002). Esse efeito vasodilatador predominante da ação da ECA2 parece contrapor as ações vasoconstritoras da ECA somática.

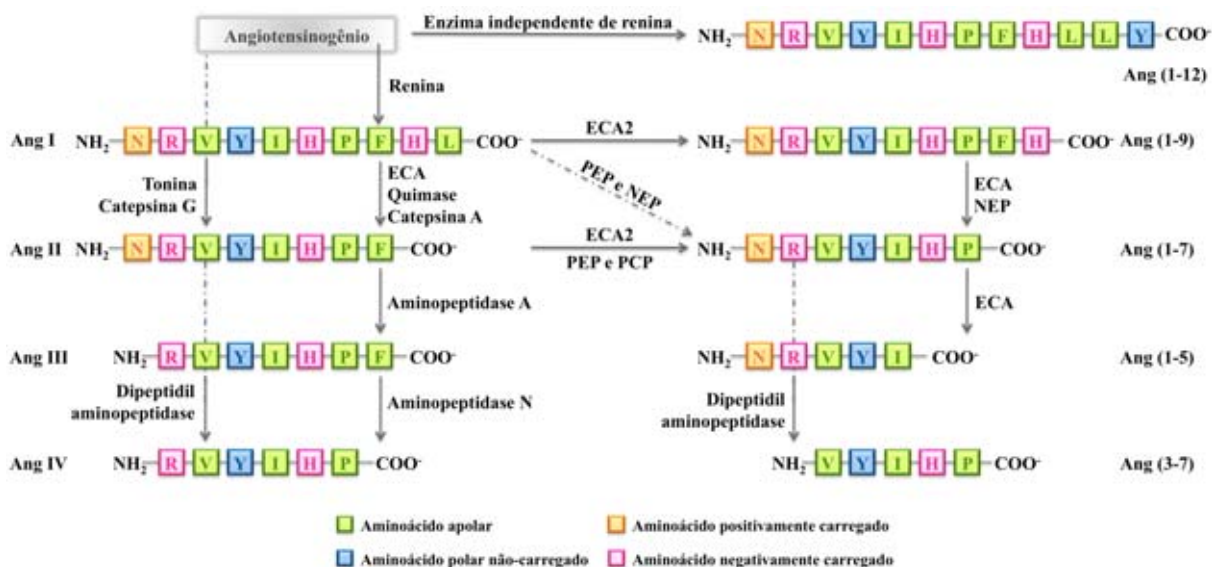
A hidrólise mediada por ECA2 ocorre, preferencialmente, entre resíduos de prolina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos C-terminais, como a fenilalanina (DONOGHUE, M. *et al.*, 2000; TIPNIS, S. R. *et al.*, 2000) (**Figura 7**). A ECA2 é encontrada tanto como uma enzima ancorada à membrana plasmática quanto como uma enzima secretada (DONOGHUE, M. *et al.*, 2000). A expressão da ECA2 já foi demonstrada na vasculatura cardíaca, epitélio dos túbulos renais, epitélio pulmonar e intestino delgado (HAMMING, I. *et al.*, 2004). A expressão específica de ECA2 no coração e nos rins sugere, em última instância, um importante papel homeostático do SRA localizado em ambos tecidos, uma vez que a ECA2 parece desempenhar um papel complementar ao da ECA somática (DONOGHUE, M. *et al.*, 2000; VICKERS, C. *et al.*, 2002).

A ECA2 atua na geração de angiotensinas alternativas, principalmente na conversão da angiotensina II em angiotensina (1-7). Enquanto a ECA somática atua enzimaticamente na angiotensina II, removendo o dipeptídeo His-Leu C-terminal, a ECA2 catalisa a clivagem da angiotensina II em angiotensina (1-7) ao remover a fenilalanina C-terminal (VICKERS, C. *et al.*, 2002) (**Figura 7**). Além disso, a ECA2 pode clivar a angiotensina I em angiotensina (1-9), que é precursora da angiotensina (1-7), se for degradada pela ECA somática (VICKERS, C. *et al.*, 2002) (**Figura 7**).

Além de degradar a angiotensina II, a ECA2 parece desempenhar importante papel homeostático do sistema cardiovascular. Camundongos *knockout* para o gene da ECA2 apresentaram um fenótipo de cardiomiopatia dilatada com disfunção ventricular esquerda (CRACKOWER, M. A. *et al.*, 2002). Ademais, observa-se uma expressão gênica renal de ECA2 drasticamente reduzida em ratos hipertensos Sabra sal-sensíveis, bem como em outras linhagens de ratos espontaneamente hipertensos (CRACKOWER, M. A. *et al.*, 2002). Embora a ECA2 compartilhe 42% de homologia com a ECA somática, os fármacos inibidores da ECA não são capazes de inibi-la (TURNER, A. J. *et al.*, 2002), porque o sítio ativo S2 da enzima é menor do que o sítio da ECA somática (RICE, G. I. *et al.*, 2004).

Interessantemente, a ECA2, dentre tantas ações já descobertas, atua como receptor funcional para o coronavírus associado à síndrome do estresse respiratório agudo, isto é, SARS-CoV (LI, W. *et al.*, 2003). A ECA2 parece desempenhar um papel protetor contra a lesão pulmonar causada pelo SARS-CoV (IMAI, Y. *et al.*, 2005). Esses dados reforçam a importância da investigação científica acerca da funcionalidade da ECA2 e, felizmente, o

desenvolvimento recente de um inibidor específico para essa isoforma promete auxiliar na elucidação de seus mecanismos fisiopatogênicos *in vivo* (HUANG, L. *et al.*, 2003).



**Figura 7** – Vias metabólicas dos peptídeos de angiotensina.

A renina cliva o angiotensinogênio humano no decapeptídeo angiotensina I. As enzimas ECA, quimase e catepsina A são capazes de remover o dipeptídeo histidina-leucina, convertendo a angiotensina I em II. As enzimas tonina e catepsina G são capazes de clivar o angiotensinogênio diretamente em angiotensina II. A angiotensina III é formada pela ação enzimática da aminopeptidase A sobre a angiotensina II, enquanto a angiotensina IV é formada por duas vias distintas: pela ação da aminopeptidase N sobre a angiotensina III ou pela ação da dipeptidil aminopeptidase sobre a angiotensina II. A ECA2, ao atuar enzimaticamente sobre a angiotensina I dá origem à angiotensina (1-9). A angiotensina (1-7) pode ser formada por três diferentes vias: a ECA somática ou a endopeptidase neutra (NEP) clivam a angiotensina (1-9) em angiotensina (1-7), a ação enzimática da prolil-endopeptidase (PEP) ou da endopeptidase neutra (NEP) sobre a angiotensina I dão origem à angiotensina (1-7) e ECA2, a prolil-endopeptidase (PEP) ou a prolil-carboxipeptidase (PCP) são capazes de clivar a angiotensina II em angiotensina (1-7), que pode ser degradada em angiotensina (1-5) pela ação da ECA ou em angiotensina (3-5) pela ação da dipeptidil aminopeptidase.

Fonte: Adaptado de RIBEIRO, Artur Beltrame e PLAVNIK, Frida Liane. **Atualização em Hipertensão Arterial - Clínica, Diagnóstica e Terapêutica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

### 1.2.6 Vias alternativas de formação de angiotensina II

Certamente, a ECA é a peptidase com a maior participação no SRA, mas ela não é a única capaz de formar angiotensinas. Existem outras enzimas que degradam seus respectivos substratos (seja a angiotensina I ou o próprio angiotensinogênio) e geram angiotensina II. A razão para co-existência dessas vias alternativas ainda não foi claramente estabelecida (KRAMKOWSKI, K. *et al.*, 2006). O angiotensinogênio pode ser diretamente degradado em angiotensina II pela ação enzimática das serino proteases catepsina G e tonina (PHILLIPS, M. I. *et al.*, 1993) (**Figura 7**).

A endopeptidase neutra (NEP) é uma zinco-metalopeptidase de 94 kDa ancorada à membrana plasmática (ROQUES, B. P. *et al.*, 1993). Inicialmente, a NEP foi encontrada em células renais com bordas em escova (KERR, M. A. e KENNY, A. J., 1974), mas essa ectoenzima já foi também identificada em pulmão, rim, cérebro, tireóide, intestino, leucócitos células linfoblásticas, células epiteliais, células musculares lisas vasculares e células endoteliais (JOHNSON, A. R. *et al.*, 1985; ERDOS, E. G. e SKIDGEL, R. A., 1989; DUSSAULE, J. C. *et al.*, 1993 *apud* GRAF, K. *et al.*, 1995 p. 230). A NEP é uma ectoenzima que, geralmente, cliva peptídeos na porção N-terminal de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (ROQUES, B. P. *et al.*, 1993). No SRA, ela é capaz de formar a angiotensina (1-7) a partir das angiotensinas I e (1-9) (SANTOS, R. A. *et al.*, 2000) (**Figura 7**).

A prolil-endopeptidase (PEP) é uma enzima que reconhece, especificamente, os resíduos de prolina presentes nas cadeias peptídicas. A PEP atua nas ligações peptidil prolil-peptídeo na porção C-terminal do resíduo de prolina (WALTER, R. *et al.*, 1980). No SRA, a PEP participa da formação da angiotensina (1-7) a partir das angiotensinas I e II (SANTOS, R. A. *et al.*, 2000) (**Figura 7**).

A aminopeptidase A é uma zinco-metalopeptidase homodimérica ancorada à membrana plasmática. É ativada pelo cálcio e cliva, especificamente a porção N-terminal dos resíduos de glutamil ou aspartil (HEALY, D. P. e WILK, S., 1993). Ao clivar o resíduo N-terminal do resíduo aspartil da angiotensina II, a aminopeptidase A transforma a angiotensina II em III (HEALY, D. P. e WILK, S., 1993). A aminopeptidase A está presente em células epiteliais com bordas em escova intestinais e renais e no endotélio vascular (LOJDA, Z. e GOSSRAU, R., 1980). Entretanto, a aminopeptidase A tem sido identificada em diversos núcleos cerebrais e está envolvida no controle hidro-eletrolítico corporal e funções

cardiovasculares (ZINI, S. *et al.*, 1997). Estudos realizados com inibidores seletivos da aminopeptidase A demonstraram, *in vivo*, que a aminopeptidase A é responsável pela conversão de angiotensina II em III, sendo que esta exerce ações estimulatórias no centro pressórico central em ratos espontaneamente hipertensos (CHAUVEL, E. N. *et al.*, 1994; ZINI, S. *et al.*, 1996; REAUX, A. *et al.*, 1999) (**Figura 7**).

A aminopeptidase N é uma zinco-transpeptidase homodimérica ancorada a membrana plasmática. Essa enzima hidrolisa a porção N-terminal dos resíduos de arginina. No SRA, a aminopeptidase N é capaz de hidrolisar a angiotensina III em IV (REAUX, A. *et al.*, 1999) (**Figura 7**). À angiotensina IV têm sido atribuído o controle do fluxo sanguíneo cerebral e a estimulação da expressão endotelial do fator inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-I) (MUSTAFA, T. *et al.*, 2001; LI, Y. D. *et al.*, 2002).

A quimase é uma serino-protease também capaz de converter a angiotensina I em angiotensina II. A quimase não é considerada componente do SRA. Sendo assim, a quimase configura uma via alternativa de formação de angiotensina II. Ou seja, a quimase é capaz de gerar angiotensina II sem ser farmacologicamente bloqueada pelo uso de fármacos inibidores da ECA (MANGIAPANE, M. L. *et al.*, 1994) (**Figura 7**).

A quimase foi primeiramente identificada no coração humano por Urata *et al.* (1990). Em experimentos preliminares realizados *in vitro* por Urata *et al.* (1990), foi demonstrado que essa protease era responsável por 80% da angiotensina II formada no coração humano. Os resultados obtidos por Balcells *et al.* (1996), em experimentos *in vitro* com corações de cães, corroboraram os dados obtidos por Urata *et al.* (1990) em corações humanos. Entretanto, resultados de experimentos realizados em cães, *in vivo*, foram diferentes. Atribuiu-se à enzima conversora de angiotensina o status de principal enzima cardíaca formadora de angiotensina II (BALCELLS, E. *et al.*, 1996). Supõe-se que, em condições mais próximas às fisiológicas, a ECA teria um maior acesso à angiotensina I plasmática do que a quimase, porque esta se localiza principalmente em grânulos citoplasmáticos mastocitários e no interstício cardíaco (URATA, H. e GANTEN, D., 1993).

Todavia, estudos farmacológicos recentes demonstraram que a formação de angiotensina II no tecido cardíaco é substancialmente reduzida com o uso dos inibidores de quimase: quimostatina, NK3201 e CD41 (TAKAI, S. *et al.*, 2000; RICHARD, V. *et al.*, 2001; TAKAI, S. *et al.*, 2001). A resistência arterial de pacientes com insuficiência cardíaca e coronariopatias foi efetivamente reduzida apenas com o uso combinado de inibidores da ECA e inibidor de quimase, sugerindo que formação de angiotensina II cardíaca depende de ambas as vias: ECA-dependente e quimase-dependente (PETRIE, M. C. *et al.*, 2001). Curiosamente,

um estudo realizado com camundongos *knockout* para o gene da ECA demonstrou uma formação de angiotensina II intra-renal inalterada. A manutenção dos níveis renais de angiotensina II foi atribuída ao aumento de 14 vezes na atividade enzimática da quimase (WEI, C. C. *et al.*, 2002).

Dados imunohistoquímicos de tecido renal de pacientes diabéticos associam o aumento da expressão de quimase na mácula densa e em miofibroblastos da camada íntima vascular com o desenvolvimento de glomeruloesclerose, fibrose tubulointersticial e esclerose arterial, além de aumento da pressão arterial e proteinúria. Entretanto, os resultados imunohistoquímicos revelaram que o aumento da expressão da ECA, que também ocorre nos rins de pacientes diabéticos, não se relaciona às lesões supracitadas e, nem mesmo, às alterações da pressão arterial e proteinúria. O aumento da expressão da ECA parece correlacionar-se apenas ao aumento da creatinina sérica (HUANG, X. R. *et al.*, 2003).

### **1.2.7 Angiotensinas: receptores e efeitos fisiopatológicos**

#### 1.2.7.1 Angiotensinas I, II, III e IV

A angiotensina II é, indubitavelmente, o principal peptídeo biologicamente ativo do SRA. A angiotensina II é um peptídeo hipertensor e causa aumento da pressão arterial tanto sistêmica quanto local ao atuar no débito cardíaco e na resistência vascular periférica (TIMMERMANS, P. B. *et al.*, 1993). Por isso, a angiotensina II atua, também, no débito cardíaco direta e indiretamente ao expandir a volemia. Ela influencia a retenção de sódio e água nos túbulos renais ao atuar diretamente em receptores  $AT_1$  renais e, indiretamente, ao estimular a secreção adrenal de aldosterona e a secreção hipofisária de vasopressina (KIM, S. e IWAO, H., 2000). Em relação à resistência vascular periférica, a angiotensina II atua como um potente vasoconstritor (TIMMERMANS, P. B. *et al.*, 1993; KIM, S. e IWAO, H., 2000).

Evidências farmacológicas e clínicas apontam que a angiotensina II desempenha um importante papel na etiologia de doenças, como hipertensão arterial sistêmica, hipertrofia e remodelamento cardíaco, insuficiência cardíaca, espessamento vascular, aterosclerose e glomeruloesclerose (KIM, S. e IWAO, H., 2000). A angiotensina II medeia seus efeitos

celulares a partir de dois subtipos de receptores ancorados à membrana plasmática: AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. Ambos os subtipos já foram clonados e farmacologicamente caracterizados (MURPHY, T. J. *et al.*, 1991; SASAKI, K. *et al.*, 1991; KAMBAYASHI, Y. *et al.*, 1993; MUKOYAMA, M. *et al.*, 1993).

Farmacologicamente, os receptores de angiotensina II podem ser facilmente distinguidos pelo antagonismo seletivo. O receptor AT<sub>1</sub> é seletivamente inibido por substâncias da classe dos bifenilimidazóis, como o losartan, enquanto o receptor AT<sub>2</sub> é seletivamente ativado pelo CGP-42112A – um hexapeptídeo semelhante à angiotensina II que também pode antagonizar os receptores AT<sub>2</sub> de modo dose-dependente (CRISCIONE, L. *et al.*, 1990; ARDAILLOU, R., 1999). Outros dois subtipos de receptores de angiotensina II já foram também caracterizados: os receptores AT<sub>3</sub> e AT<sub>4</sub>.

Os receptores AT<sub>1</sub> pertencem à família de receptores membranares acoplados à proteína G e, tipicamente, ativam a fosfolipase C (BERK, B. C. e CORSON, M. A., 1997). Em humanos, esse subtipo de receptor distribui-se no sistema cardiovascular, renal, endócrino e nervoso (ALLEN, A. M. *et al.*, 1999). Zhuo *et al.* (1998) e Allen *et al.* (2000) demonstraram que os receptores AT<sub>1</sub> estão presentes abundantemente na vasculatura humana, mais especificamente em células musculares lisas e, em menor proporção, na camada adventícia. Estudos realizados com biópsia miocárdicas humanas revelaram que os receptores AT<sub>1</sub> cardíacos estão presentes em átrios, ventrículos e fibroblastos (REGITZ-ZAGROSEK, V. *et al.*, 1995). Experimentos realizados com a técnica de radioligantes demonstraram que a abundância fisiológica de receptores AT<sub>1</sub> é reduzida em tecidos de pacientes com insuficiência cardíaca, provavelmente devido à redução transcricional do mRNA desse receptor (REGITZ-ZAGROSEK, V. *et al.*, 1997).

O receptor AT<sub>1</sub> pode exibir o polimorfismo A1166C, que corresponde a troca de uma adenina por uma citosina na posição 1166 da região 3' não-traduzida do gene AGTR1. Já foi identificado que esse polimorfismo parece estar associado à predisposição para hipertensão arterial sistêmica (CASTELLANO, M. *et al.*, 2003). Embora os receptores AT<sub>1</sub> não possuam atividade quinase intrínseca, eles são fosforilados em resíduos de serina e treonina em um estágio basal e também em resposta à angiotensina II. Estudos conduzidos por Thomas *et al.* (1998) demonstraram que a porção C-terminal, se rica em resíduos de serina e treonina, é fundamental para a fosforilação do receptor AT<sub>1</sub> e para a sua subsequente endocitose (THOMAS, W. G., 1999).

Recentes descobertas acerca do SRA e o sistema das cininas denotam uma heterodimerização de receptores AT<sub>1</sub> com o receptor B<sub>2</sub> de bradicinina. Esses dois receptores

podem se associar fisicamente, formando heterodímeros estáveis na membrana plasmática, o que resulta em aumento da ativação das proteínas G. Curiosamente, a heterodimerização AT<sub>1</sub>-B<sub>2</sub> parece potencializar os efeitos *in vivo* da angiotensina II, aumentando as sinalizações intracelulares o que, conseqüentemente, maximiza as respostas à esse peptídeo em pacientes com pré-eclâmpsia (ABDALLA, S. *et al.*, 2000; ABDALLA, S. *et al.*, 2001). Abdalla *et al.* (2001) demonstraram que mulheres pré-eclâmplicas têm um aumento significativo na formação de heterodímeros em plaquetas e na vasculatura omental, o que se correlaciona com um aumento de 4 a 5 vezes na expressão de receptores B<sub>2</sub>. Ainda acerca da patogênese da pré-eclâmpsia associada ao SRA, auto-anticorpos que ativam o receptor AT<sub>1</sub> já foram identificados em mulheres com manifestações clínicas de hipertensão e albuminúria (DECHEND, R. *et al.*, 2005).

Os efeitos da angiotensina II resultam de suas ações combinadas em receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. A ativação de receptores AT<sub>1</sub> estimula a vasoconstrição, hipertrofia e hiperplasia da parede vascular, retenção de sódio, indução da resposta inflamatória, trombótica e fibrótica (GRIENGLING, K. K. *et al.*, 1994; VAUGHAN, D. E. *et al.*, 1995; BOFFA, J. J. *et al.*, 1999; MULLER, D. N. *et al.*, 2000) (**Figura 8**). Já o AT<sub>2</sub> é o segundo principal receptor de angiotensina II. Assim como o receptor AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> é um receptor membranar acoplado à proteína G e com pequena homologia com os receptores AT<sub>1</sub> (~34%) (MUKOYAMA, M. *et al.*, 1993).

Apesar da via de sinalização mediada pelos receptores AT<sub>2</sub> ainda estar sob investigação, em condições fisiológicas, a atuação da angiotensina II nesses receptores pode antagonizar os efeitos dos receptores AT<sub>1</sub> ao inibir o crescimento celular e ao induzir a apoptose e a vasodilatação (ZHUO, J. *et al.*, 1998; HORIUCHI, M. *et al.*, 1999) (**Figura 8**). A expressão de AT<sub>2</sub> é ubíqua em tecidos mesenquimais de fetos humanos. Entretanto, a expressão desse receptor rapidamente declina após o nascimento (NAHMIAS, C. e STROSBURG, A. D., 1995). Em adultos, os receptores AT<sub>2</sub> são detectados no pâncreas, coração, rim, adrenal, cérebro e na vasculatura (BERRY, C. *et al.*, 2001).

Estudos realizados com tecidos cardíacos humanos demonstraram que o receptor AT<sub>2</sub> está presente em tecidos saudáveis e em corações doentes. Esse receptor encontra-se tanto no miócitos quanto nos fibroblastos cardíacos, sendo que, no tecido saudável, o receptor AT<sub>2</sub> predomina em miócitos. Contudo, em tecidos cardíacos lesionados, a expressão gênica de AT<sub>2</sub> permaneceu inalterada, ao passo que a expressão protéica foi reduzida (ASANO, K. *et al.*, 1997; HAYWOOD, G. A. *et al.*, 1997; WHARTON, J. *et al.*, 1998). Esses resultados sugerem um controle pós-transcricional da expressão de receptores AT<sub>2</sub> em tecidos cardíacos doentes.

A expressão de ambos os receptores de angiotensina II é finamente regulada. O receptor AT<sub>1</sub>, por exemplo, pode ser negativamente regulado pela ação da angiotensina II, enquanto a expressão do receptor AT<sub>2</sub> é aumentada pela depleção de sódio e inibida pela ação da angiotensina II e fatores de crescimento, como o PDGF e o EGF (AGUILERA, G. e CATT, K., 1981; OZONO, R. *et al.*, 1997).

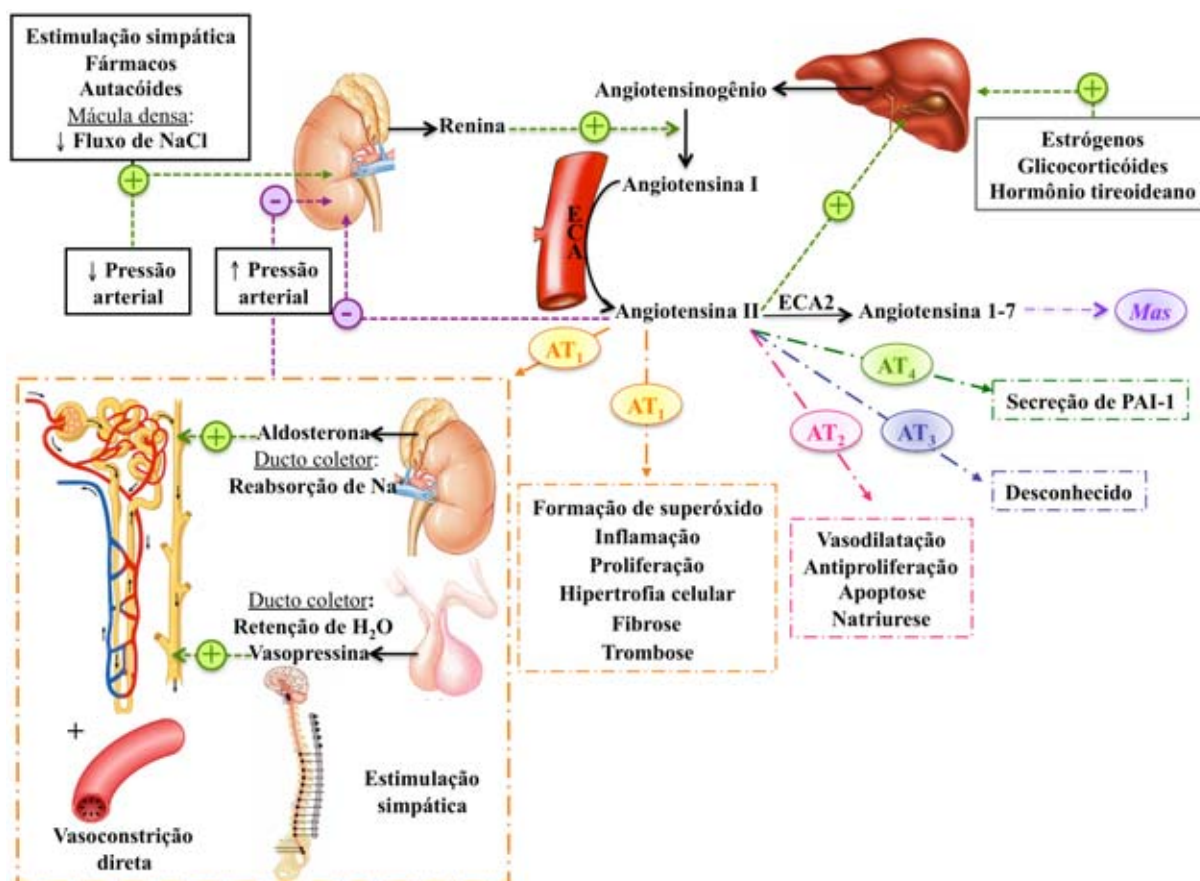
As ações da angiotensina II em receptores AT<sub>2</sub> parecem contrapor os seus efeitos em AT<sub>1</sub>. A importância dos receptores AT<sub>2</sub> na regulação da pressão arterial foi demonstrada por Tsutsumi *et al.* (1999) com a expressão excessiva de receptores AT<sub>2</sub> em células musculares lisas vasculares em camundongos transgênicos. Esses animais não apresentaram resposta hipertensora com as infusões de angiotensina II, diferentemente dos camundongos selvagens – *wild type*. Além disso, em presença do bloqueio de receptores AT<sub>1</sub>, a infusão de angiotensina II reduziu a pressão arterial em ambos os grupos de animais, transgênicos e selvagens. Esses resultados sugerem que os receptores AT<sub>2</sub> regulam a pressão arterial provavelmente por modular as respostas vasoconstritoras.

Os efeitos vasodilatadores, anti-tróficos e apoptóticos mediados pelos receptores AT<sub>2</sub> se opõem aos efeitos mediados pela angiotensina II ao atuar em AT<sub>1</sub>. Todavia, outros efeitos fisiológicos têm sido atribuídos aos receptores AT<sub>2</sub>, como modulação da sede, do comportamento e da atividade motora (HEIN, L. *et al.*, 1995; ICHIKI, T. *et al.*, 1995). Infelizmente, nem todos os efeitos mediados pelos receptores AT<sub>2</sub> são benéficos. Paradoxalmente, efeitos pró-inflamatórios promovidos pela indução do NF- $\kappa$ B e efeitos tróficos, ocasionando hipertrofia vascular e cardíaca podem ser observados com a ativação de receptores AT<sub>2</sub> (BOOZ, G. W. e BAKER, K. M., 1996; CAO, Z. *et al.*, 1999; RUIZ-ORTEGA, M. *et al.*, 2000). Tais observações refletem a complexidade do correto entendimento de todas as ações do SRA.

Além dos dois receptores previamente descritos, os receptores AT<sub>3</sub> e AT<sub>4</sub> já foram também identificados. O receptor AT<sub>3</sub> foi identificado por Chaki e Inagami na linhagem celular de neuroblastoma neuro 2A. Esse receptor é peptídeo-específico, ou seja, reconhece a angiotensina II e tem baixa afinidade pela angiotensina III. Farmacologicamente, os receptores AT<sub>3</sub> não exibem afinidade por ligantes já conhecidos, como o losartan e o PD 123319 – antagonista de receptores AT<sub>2</sub>. Sabe-se que a ligação de angiotensina II ao receptor AT<sub>3</sub> ativa a guanilato ciclase solúvel ligada à via do óxido nítrico (CHAKI, S. e INAGAMI, T., 1992; 1993). Entretanto, estudos devem ser desenvolvidos no sentido de se estabelecer os efeitos biológicos e a atividade farmacológica desse receptor de angiotensina.



O receptor  $AT_4$  é definido como sendo um receptor com alta afinidade pelo hexapeptídeo angiotensina IV e baixa afinidade pela angiotensina II. Esse receptor foi identificado como uma aminopeptidase ancorada à membrana plasmática e regulada pela insulina. O receptor  $AT_4$  pode ser encontrado no cérebro, adrenal, rim, pulmão e coração. No SNC, a maior concentração desse receptor aparece em estruturas classicamente associadas ao processo cognitivo, sensorial e motor, além de encontrá-lo em elevada concentração também nos rins. Até o momento, sabe-se que os receptores  $AT_4$  parecem mediar a secreção do inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1) por ação das angiotensinas II, III e IV. A secreção de PAI-1, em níveis fisiológicos, tem o propósito de limitar a formação de plasmina e frear a via fibrinolítica. Entretanto, a secreção excessiva parece estar associada a efeitos pró-trombóticos arteriais e distúrbios tromboembólicos venosos (DE GASPARO, M. *et al.*, 2000; HUBER, K. *et al.*, 2001; CHAI, S. Y. *et al.*, 2004) (Figura 8).



**Figura 8** – Principais efeitos sistêmicos da angiotensina II.

Os mecanismos regulatórios e contra-regulatórios do SRA intravascular estão ilustrados. As vias de estimulação estão marcadas com setas verdes, enquanto as vias inibitórias são representadas por setas roxas. Nos quadros coloridos estão citados os principais efeitos da angiotensina II mediados pelos respectivos receptores.

Fonte: Adaptado de RIBEIRO, Artur Beltrame e PLAVNIK, Frida Liane. **Atualização em Hipertensão Arterial - Clínica, Diagnóstica e Terapêutica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

Embora a angiotensina II seja o principal produto do SRA, existem evidências que apontam os peptídeos metabólitos das angiotensinas I e II como substâncias com significativa atividade biológica. É o caso das angiotensinas III e IV, que são formadas pela remoção de resíduos de aminoácidos da angiotensina II por ação de aminopeptidases A e N, respectivamente (**Figura 6**).

A angiotensina III é um peptídeo vasoconstritor menos potente do que a angiotensina II. Ela também estimula a secreção de aldosterona, tem atividade dipsogênica e é um ativador neuronal. A angiotensina III se liga aos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> com a mesma afinidade (BLAIR-WEST, J. R. *et al.*, 1980; GARCIA-SAINZ, J. A. *et al.*, 1997; LI, Q. *et al.*, 1997).

Embora a angiotensina IV tenha sido aventada como um produto inativo da degradação de angiotensina II, esse hexapeptídeo demonstrou ter marcantes efeitos na memória e no aprendizado de roedores normais, além de reabilitar a memória de modelos experimentais com amnésia. Os efeitos da angiotensina IV no sistema nervoso central são mediados pela sua ação em receptores AT<sub>4</sub>, que são particularmente encontrados no cérebro e, em elevadas concentrações, em regiões envolvidas com a cognição e com a função motora, como neocórtex, hipocampo e cerebelo (WRIGHT, J. W. e HARDING, J. W., 1997; ALBISTON, A. L. *et al.*, 2003). Fisiologicamente, a angiotensina IV parece regular o fluxo sanguíneo cerebral, atua na proliferação de células endoteliais pulmonares e na estimulação da expressão endotelial do PAI-1 (MUSTAFA, T. *et al.*, 2001; LI, Y. D. *et al.*, 2002).

Lochard *et al.* (2004) desenvolveram camundongos transgênicos com expressão crônica de angiotensina IV especificamente no cérebro. Esses animais apresentaram concentrações de angiotensina IV quatro vezes maior do que os controles e desenvolveram hipertensão refratária ao uso de captopril – inibidor de ECA. Entretanto, a hipertensão dos animais era sensível ao candesartan – antagonista de receptores AT<sub>1</sub>. Esses resultados sugerem que a elevação crônica de angiotensina IV cerebral pode induzir hipertensão arterial apenas tratada com antagonista de receptores AT<sub>1</sub>.

### 1.7.2.2 Angiotensinas (1-9) e (1-7)

O nonapeptídeo angiotensina (1-9) pode ser originado a partir da clivagem enzimática da angiotensina I pela ação da ECA2. A angiotensina (1-9) é um peptídeo rapidamente convertido em angiotensina (1-7) pela ação da ECA somática ou da NEP. Entretanto, existem outras vias enzimáticas que convergem para a formação de angiotensina (1-7), como, por exemplo, a degradação da angiotensina I pela PEP ou NEP ou ainda a degradação da angiotensina II pela ECA2, PEP ou PCP (GREENE, L. J. *et al.*, 1982) (**Figura 6**).

Schiavone *et al.* (1988) demonstraram a primeira função biológica da angiotensina (1-7). Em tecido cerebral canino homogeneizado, foi possível observar a degradação da angiotensina I marcada em angiotensina (1-7) que, ao ser perfundida no sistema neuro-hipotalâmico-hipofisário, elevou a secreção de vasopressina com a mesma potência que a angiotensina II, executando efeito anti-diurético. O proto-oncogene Mas é um receptor acoplado à proteína G e foi originalmente descrito como sendo um importante fator envolvido nos mecanismos de tumorigênese, sendo descrito posteriormente como sendo o receptor funcional de angiotensina (1-7) (JACKSON, T. R. *et al.*, 1988).

Um estudo recente desenvolvido por Santos *et al.* (2003) demonstrou a relação biológica entre a angiotensina (1-7) e o receptor Mas. Seus experimentos foram conduzidos com camundongos *knockout* para o gene que codifica esse proto-oncogene. Foi possível observar que esses animais deficientes de receptor Mas não apresentavam ligação da angiotensina (1-7) ao tecido renal. Conseqüentemente, o efeito anti-diurético mediado pela angiotensina (1-7) foi abolido, principalmente após sobrecarga hídrica. Em cultura de células transfectadas com Mas foi visualizado que a angiotensina (1-7) ligava-se a esses receptores e promovia a liberação de ácido aracdônico (SANTOS, R. A. *et al.*, 2003).

Sabe-se que a angiotensina (1-7) executa efeitos que potencializam a bradicinina, como a vasodilatação, por exemplo, que parece ser mediada pela ativação endotelial da óxido nítrico sintase (NOS) e a produção de NO (SAMPAIO, W. O. *et al.*, 2007). Possivelmente, o sinergismo existente entre a angiotensina (1-7) e a bradicinina seja outro importante ponto de cruzamento entre o SRA e o sistema das cininas.

### 1.3 BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SRA

A secreção de renina é um fator iniciador e, ao mesmo tempo, limitador da ativação do SRA intravascular. Conseqüentemente, a inibição enzimática da renina representou um importante alvo terapêutico, objetivando bloquear a formação de angiotensinas. Infelizmente, o efeito farmacológico da inibição da renina só era alcançado com infusões endovenosas dos fármacos desenvolvidos, porque a administração por via oral oferecida inúmeras dificuldades: baixa potência, baixa biodisponibilidade, meia-vida curta e elevado custo de síntese das moléculas farmacologicamente ativas. Sendo assim, o desenvolvimento dessas substâncias foi abandonado ainda na década de 90, permitindo que outras estratégias farmacológicas fossem então desenvolvidas com intuito farmacoterapêutico (ATLAS, S. A., 2007).

#### 1.3.1 Inibidores de ECA

Sérgio Ferreira *et al.* (1965) isolaram peptídeos do veneno da *Bothrops jararaca* capazes de inibir a cininase II (ou ECA) e que causavam hipotensão. Essa descoberta instigou o grupo a desenvolver inibidores da ECA com biodisponibilidade oral, sendo o primeiro deles o captopril (FERREIRA, S. H., 1965 *apud* ATLAS, S. A., 2007, p. S16). Os inibidores da ECA bloqueiam competitivamente a ação enzimática da ECA e impedem a conversão de angiotensina I em II. Além disso, os inibidores da ECA reduzem as secreções de aldosterona e vasopressina, bem como a atividade simpática (LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004) (**Figura 8**).

Sabe-se que farmacoterapias em curto prazo com inibidores da ECA reduzem os níveis circulantes de angiotensina II e aldosterona, elevando os níveis circulantes de renina e angiotensina I. Existem evidências que as longas terapias com inibidores de ECA estariam associadas ao retorno dos níveis basais de aldosterona e angiotensina II devido à provável ativação de vias alternativas (PITT, B., 1995; LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004).

De modo geral, em curto prazo, os inibidores de ECA reduzem a pré e pós-carga cardíaca, ao reduzir as pressões sistólica e diastólica, diminuem a resistência vascular periférica total sem afetar o cronotropismo cardíaco, reduzem a resistência vascular renal e,

conseqüentemente, melhoram o fluxo sanguíneo renal, além de promoverem a excreção de sódio e água, previnem a progressão da albuminúria e retardam o avanço da insuficiência renal em pacientes não-diabéticos e diabéticos (LEWIS, E. J. *et al.*, 1993; MASCHIO, G. *et al.*, 1996; LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004). De 40 a 60% dos pacientes com hipertensão moderada reduzem satisfatoriamente a pressão arterial quando submetidos à monoterapia com inibidor de ECA. Nessa população, os inibidores da ECA revertem a hipertrofia cardíaca e elevam a potência farmacológica dos beta-bloqueadores (KLINGBEIL, A. U. *et al.*, 2003; IBRAHIM, M. M., 2006).

Os pacientes com insuficiência cardíaca congestiva reduzem os edemas pulmonares devido à redução da pré e pós-carga cardíaca. Os inibidores da ECA parecem reduzir a pré-carga cardíaca ao realizar venodilatação, o que provoca uma acomodação venosa do sangue periférico, reduzindo a pressão sobre o átrio direito, a pressão no leito arterial pulmonar e a pressão – e o volume – de enchimento do ventrículo esquerdo. Além disso, os inibidores da ECA parecem reduzir a pós-carga cardíaca ao realizar a vasodilatação arterial, o que reduz a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, melhora o débito cardíaco desses pacientes (LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004). Além de todos os benefícios cardíacos, os inibidores da ECA também melhoram a disfunção endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, assim como em pacientes com coronariopatias e/ou *diabetes mellitus* tipo-2 (LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004).

Como a ECA é idêntica à cininase II, os fármacos inibidores da ECA também elevam os níveis teciduais de bradicinina – mas, infelizmente, não elevam os níveis circulantes desse autacóide. O acúmulo tecidual de bradicinina afeta a sinalização intracelular dos receptores B<sub>2</sub>, resultando em um aumento da produção de NO, prostaglandina E<sub>2</sub> e prostaciclina. Conseqüentemente, o somatório dos efeitos de todas essas substâncias secretadas simultaneamente caracterizam os efeitos vasodilatadores, anti-trombóticos, anti-aterogênicos e anti-proliferativos proporcionados pelo uso dos inibidores da ECA (LOPEZ-SENDON, J. *et al.*, 2004).

Em termos terapêuticos, os inibidores da ECA são fármacos bem tolerados pela maioria dos pacientes. O efeito adverso mais freqüente é a tosse seca – atribuída ao acúmulo de substância P que é normalmente degradada pela cininase II. Entretanto, o uso de inibidor da ECA pode ocasionar angioedema – devido à potencialização das cininas não-metabolizadas –, anormalidades com mortalidade fetal, hipotensão, deterioração da função renal em pacientes com doença terminal e hipercalcemia. Os efeitos tóxicos associados

principalmente ao consumo de captopril, são: paladar metálico ou salgado, rash cutâneo, neutropenia, hepatotoxicidade e proteinúria – nefropatia membranosa (WONG, J. *et al.*, 2004).

### 1.3.2 Antagonistas de receptores AT<sub>1</sub>

Como previamente descrito, os receptores AT<sub>1</sub> medeiam inúmeras ações sistêmicas da angiotensina II que contribuem para o aumento da pressão arterial e da retenção hídrica – vasoconstrição, secreção de aldosterona, resposta dipsogênica, reabsorção renal de sódio e resposta pressórica e taquicárdica – além de ocasionar lesões cardiovasculares – hipertrofia/hiperplasia celular, efeitos pró-trombóticos, pró-inflamatórios e formação de radicais superóxidos (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003; STANTON, A., 2003) (**Figura 8**).

Sendo assim, o receptor AT<sub>1</sub> tornou-se um importante alvo terapêutico, uma vez que o seu antagonismo, teoricamente, proporcionaria efeitos mais específicos do que aqueles obtidos com a inibição da ECA. O desenvolvimento de antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> não-peptídicos com biodisponibilidade oral teve início na década de 90 com a síntese do losartan (FERRARIO, C. M., 2006). Como os antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> agem bloqueando a ligação da angiotensina II ao seu receptor, significa dizer que esses fármacos executam suas ações farmacológicas independentemente da via pela qual a angiotensina foi sintetizada – seja pela ação enzimática da ECA somática ou pela via alternativa (RUILOPE, L. M. *et al.*, 2005).

Contrariamente aos inibidores da ECA, a terapia com antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> resulta em aumento dos níveis de angiotensina II, porque o bloqueio desses receptores inibe a alça de *feedback* negativo, ocasionando maior secreção de renina e, conseqüentemente, maior síntese de angiotensina I (**Figura 8**). A angiotensina II excessivamente formada, em presença do antagonismo de receptores AT<sub>1</sub>, torna-se livre para atuar em receptores AT<sub>2</sub> ou outros subtipos de receptores. Estudos clínicos sugerem que a ativação de AT<sub>2</sub> parece mediar efeitos benéficos na vasculatura, coração e rins mediados pela ação da bradicinina e do NO (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003).

Como os inibidores da ECA, os antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> promovem seus efeitos hipotensores ao reduzirem a resistência vascular periférica sem afetar o cronotropismo cardíaco. Os efeitos na resistência vascular periférica resultam de um somatório de fatores: inibição da vasoconstrição mediada pela angiotensina II, redução da atividade simpática e

redução do volume extracelular – por ação direta na reabsorção de sódio no túbulo proximal e por inibição da secreção de aldosterona (HERNANDEZ-HERNANDEZ, R. *et al.*, 2002).

Assim como os inibidores da ECA, o uso de antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> como monoterapia reduz satisfatoriamente a pressão arterial de 40 a 60% dos pacientes com hipertensão moderada (IBRAHIM, M. M., 2006). Além disso, os antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> demonstram benefícios vasculares, cardíacos e renais tais quais aqueles promovidos pelo uso dos inibidores da ECA (LEWIS, E. J. *et al.*, 2001; DICKSTEIN, K. e KJEKSHUS, J., 2002; PFEFFER, M. A. *et al.*, 2003).

Os antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> são também contra-indicados durante a gestação devido à morbi-mortalidade fetal, principalmente se a exposição ocorrer a partir do segundo trimestre. A terapia prolongada, em geral, é melhor tolerada do que com os inibidores da ECA, embora já tenham sido observados angioedema e tosse seca com o uso dessa classe de medicamentos. Os efeitos colaterais estão associados ao bloqueio do SRA, como, por exemplo, a hipercalemia e a redução da função renal – exatamente igual com o uso dos inibidores da ECA (ATLAS, S. A., 2007).

Os receptores de angiotensina II são amplamente expressos em tecidos fetais e parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento embrionário e fetal. Conseqüentemente, o bloqueio farmacológico da formação de angiotensina II – realizado pelos inibidores da ECA – ou de seus receptores – realizado pelos antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> – durante os dois últimos semestres de gestação ocasionam fetopatias, que incluem: oligohidrânio, retardo de crescimento intrauterino, hipocalvaria, displasia renal, anúria, insuficiência renal e morte (COOPER, W. O. *et al.*, 2006).

Segundo o FDA, o uso de inibidores da ECA e antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> durante o segundo e o terceiro trimestres gestacionais oferecem riscos ao feto e, por essa razão, foram classificados na categoria D de teratogenicidade. Entretanto, o uso de ambas as classes de medicamentos durante o primeiro trimestre gestacional pode oferecer riscos que ainda são desconhecidos. Por essa razão, durante esse período gestacional, esses fármacos foram classificados na categoria C de teratogenicidade (FDA, 2006).

### 1.3.3 Inibidores de renina

Os inibidores de renina representam a mais nova classe de medicamentos que atua no SRA. O alisquireno foi desenvolvido com intuito de diferir dos inibidores da ECA e dos antagonistas de receptores  $AT_1$  por atuar, especificamente, bloqueando o sítio catalítico da renina e, provavelmente, da pró-renina ativada pelo receptor (P)RR. Conseqüentemente, o alisquireno deve impedir a síntese de todos os peptídeos de angiotensina derivados da via clássica do SRA e deve evitar o efeito compensatório de estimular a secreção plasmática de renina (POOL, J. L., 2007).

Como o alisquireno obteve registro do FDA em Março de 2007 e começou a ser comercializado recentemente, os ensaios clínicos com intuito de se avaliar os possíveis benefícios terapêuticos e, talvez, a superioridade dessa classe em relação às demais, ainda estão sendo desenvolvidos.

## 1.4 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA TECIDUAL

Durante quase cem anos, acreditou-se que o SRA era um conjunto de reações enzimáticas intravasculares de caráter exclusivamente endócrino, cujo objetivo primordial seria proporcionar importantes alterações hemodinâmicas sistêmicas. Todavia, recentes descobertas sugerem que a biossíntese das angiotensinas possa também acontecer fora da circulação sistêmica. Ou seja, evidências experimentais apontam para diversos tipos celulares capazes de reunir os componentes do SRA e que provavelmente seriam aptas a sintetizar angiotensinas *in loco*. À esse novo conceito de síntese extravascular de angiotensinas denominou-se Sistema Renina-Angiotensina Tecidual.

A identificação dos peptídeos truncados de angiotensina com efeitos biológicos, os diversos subtipos de receptores de angiotensinas capazes de ativar vias de sinalização celular e a identificação de receptores de (pró)-renina na superfície celular são observações recentes que embasam a hipótese de haver biossíntese tecidual de angiotensinas e ao mesmo tempo esse novo conceito rompe os paradigmas endócrinos do SRA tradicional (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003). Existem evidências que a biossíntese de angiotensina II poderia



ser iniciada pela captação celular de renina e/ou angiotensinogênio da circulação sistêmica. Além disso, já foi postulado a existência de angiotensina II no coração, nos vasos sanguíneos periféricos, rim, cérebro, adrenal, hipófise, tecido adiposo, testículos, ovários e pele (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003).

Diversas outras serino proteases – tonina, quimase, catepsina G – são capazes de contribuir para a formação de angiotensina II no SRA tecidual. Estudos sugerem que vias independentes da ECA sejam responsáveis por cerca de 40% da angiotensina II gerada em tecido renal humano intacto e que a quimase constitui uma dominante via alternativa no tecido cardíaco, coronárias e, *in vitro*, em placas ateroscleróticas em aorta (URATA, H., HEALY, B. *et al.*, 1990; WOLNY, A. *et al.*, 1997; IHARA, M. *et al.*, 1999). Ultimamente, a ativação anormal do SRA tecidual tem sido proposta como uma importante via de contribuição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que podem ocorrer mesmo que não haja sinais patológicos na circulação sistêmica (PAGLIARO, P. e PENNA, C., 2005).

Em condições fisiológicas, a função aparente do SRA tecidual é a manutenção do balanço celular estabelecido entre a inibição e a indução do crescimento celular frente a respostas adaptativas de estiramento das fibras cardíacas. A maioria da angiotensina II presente no tecido cardíaco parece ser produzida a partir da síntese local de angiotensina I, e não parece ter sido captada da circulação sistêmica como se pensava anteriormente. Apesar de existir a possibilidade da renina ser sintetizada no tecido cardíaco, existem evidências em favor da captação cardíaca da renina circulante – possivelmente por meio dos receptores M6P/IGF2R – na qual ela atua localmente (DANSER, A. H. *et al.*, 1994; CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003; PAUL, M. *et al.*, 2006).

A angiotensina II exerce efeitos inotrópicos positivos, medeia a hipertrofia dos miócitos via receptores  $AT_1$  e está envolvida no remodelamento cardíaco. A ativação patológica do SRA cardíaco poderia causar um aumento na expressão da ECA, o que tem sido proposto como uma importante contribuição para o desenvolvimento e manutenção da hipertrofia ventricular (PAGLIARO, P. e PENNA, C., 2005).

As disfunções endoteliais também são atribuídas à hiperatividade do SRA tecidual, especialmente com a participação da ECA. A ativação da ECA vascular pode alterar outras funções, incluindo crescimento das células musculares lisas da vasculatura, inflamação e reações oxidativas na parede vascular. A produção de espécies oxidativas – superóxido e peróxido de hidrogênio – é aumentada pela angiotensina II, que está associada à inflamação, aterosclerose, hipertrofia, remodelamento vascular e angiogênese (PAGLIARO, P. e PENNA, C., 2005; PAUL, M. *et al.*, 2006).

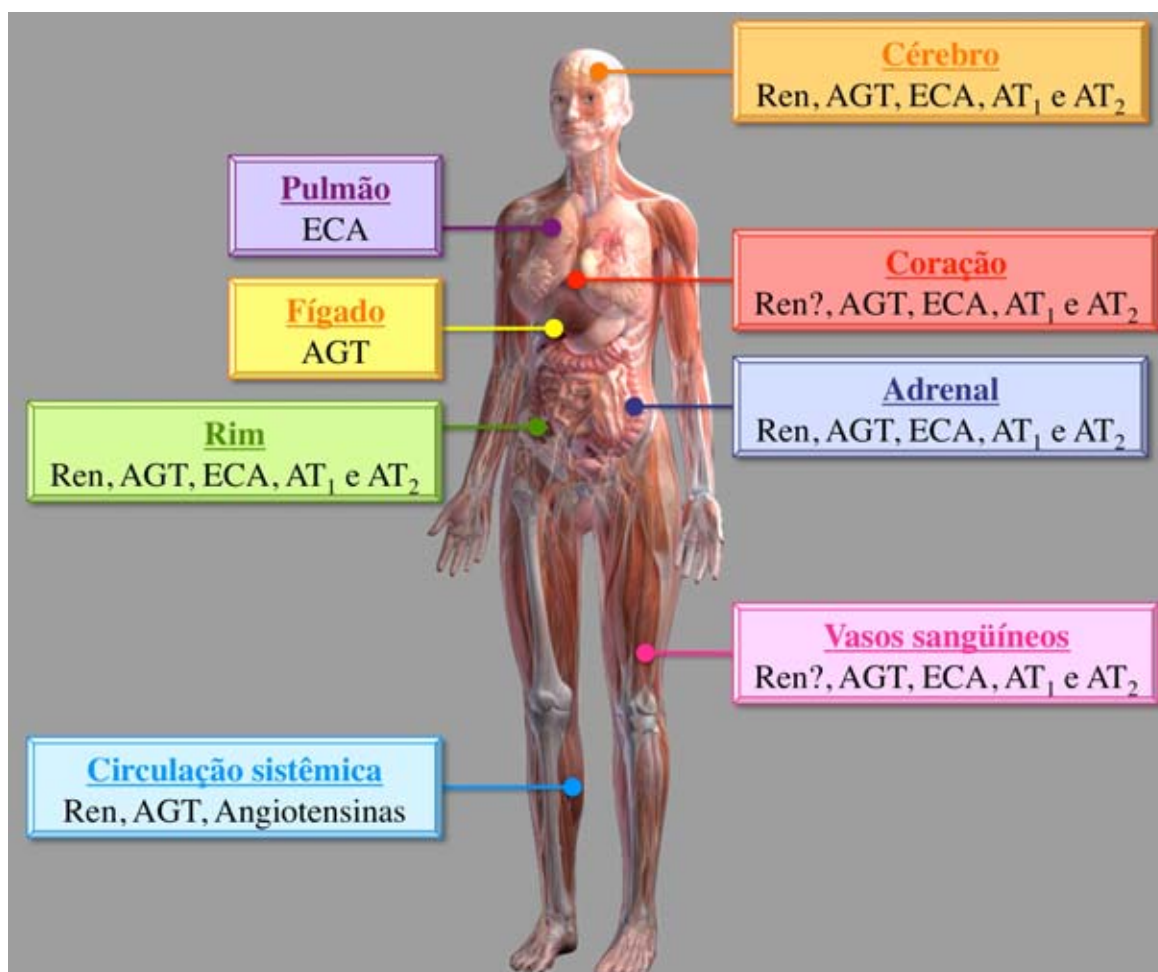
O SRA intra-renal demonstra ações parácrinas da angiotensina II ao realizar o controle da função renal. As ações diretas da angiotensina II incluem a vasoconstrição, reabsorção tubular de sódio, modulação da pressão/natriurese e promoção do crescimento do tecido renal. Em condições normais, a angiotensina II contrai tanto as arteríolas aferentes, quanto as arteríolas eferentes, além de estimular a contração das células mesangiais, o que resulta em redução do fluxo sanguíneo, redução da taxa de filtração glomerular e a filtração de sódio. Contrariamente, a hiperatividade do SRA intra-renal pode contribuir com a patogênese de doenças em que há retenção de sódio, como hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Entretanto, situações em que há redução da perfusão renal, como a estenose das artérias renais, a circulação aferente torna-se relativamente refratária às ações constritivas da angiotensina II e, somente as arteríolas eferentes se contraem, mantendo a pressão de perfusão glomerular e a taxa de filtração glomerular (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003).

Embora a angiotensina II sistêmica possa afetar as funções neurológicas em sítios específicos, o sistema nervoso central é protegido do SRA intravascular pela barreira hematoencefálica. Sendo assim, a síntese tecidual de angiotensina II tem sido proposta como um mecanismo fundamental para o controle da pressão arterial central. Ratos hipertensos, por exemplo, demonstram maior atividade da renina cerebral, maior expressão de mRNA da pró-renina e angiotensinogênio e receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> detectáveis no tecido encefálico (**Figura 9**). A inibição seletiva de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> cerebrais reduz a pressão arterial central em ratos hipertensos, o que corrobora a importância desses subtipos de receptores no SRA cerebral. Ademais, a administração direta de angiotensina II no cérebro promove o aumento da pressão arterial sistêmica a partir de uma combinação de efeitos: secreção de vasopressina, ativação do sistema nervoso simpático e inibição de baroreflexos. Animais transgênicos com inibição permanente da síntese de angiotensinogênio cerebral demonstraram significativa redução da pressão sistólica quando comparada ao grupo controle (PAUL, M. *et al.*, 2006).

Todos os componentes do SRA estão presentes no córtex adrenal e constituem o SRA adrenal. O mRNA da pró-renina e do angiotensinogênio foram identificados na glândula adrenal e a formação de angiotensina II foi demonstrada nas células da zona glomerulosa (**Figura 9**). Cerca de 90% da atividade de renina adrenal foi localizada na zona glomerulosa e mais de 90% da angiotensina II adrenal é formada exatamente no tecido. Modelos animais transgênicos demonstraram que a restrição de sódio eleva os níveis adrenais de renina e aldosterona, independentemente dos níveis plasmáticos ou renais de renina. Além disso, a nefrectomia bilateral – que reduz os níveis de renina cardíaco e vascular – não reduz os níveis

de renina adrenal em animais experimentais. Esses resultados sustentam a hipótese de haver renina extra-renal – e, conseqüentemente, a produção de angiotensina II na glândula adrenal (CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M., 2003; VAN KATS, J. P. *et al.*, 2005).

Acredita-se que o SRA tecidual tenha ações complementares às ações do SRA intravascular, atuando, fisiologicamente, como um mecanismo de manutenção e homeostase. Contudo, processos patológicos podem ser desenvolvidos, hipoteticamente, quando os componentes do SRA são exageradamente expressos ou inibidos, causando distúrbios nesse sistema regulatório.



**Figura 9** – Expressão tecidual dos componentes do SRA.

Os sítios de expressão dos diferentes componentes do SRA estão ilustrados na figura acima. Ren: Renina, AGT: Angiotensinogênio, ECA: Enzima conversora de angiotensina, AT<sub>1</sub>: Receptor de angiotensina II do subtipo 1 e AT<sub>2</sub>: Receptor de angiotensina II do subtipo 2.

### 1.4.1 Sistema renina-angiotensina cardíaco

A existência e a funcionalidade do SRA cardíaco têm sido motivo de debates, uma vez que se torna difícil diferenciar os efeitos da síntese de angiotensina II intracardíaca das ações da angiotensina II plasmática. Indubitavelmente, tornou-se claro que os efeitos cardíacos de fármacos que inibem as ações da angiotensina II – como os inibidores da ECA e antagonistas de receptores  $AT_1$  – são parcialmente explicados pelos efeitos locais, em nível celular, como ocorre com o remodelamento cardíaco (ATLAS, S. A., 2007).

O SRA cardíaco parece desempenhar importante papel fisiológico na manutenção da homeostase celular associada aos estímulos inibitórios/indutores de crescimento e proliferação celular decorrentes de uma resposta adaptativa ao estresse miocárdico, como, por exemplo, o estiramento das fibras cardíacas (ATLAS, S. A., 2007).

#### 1.4.1.1 Renina

Embora diversos pesquisadores tenham detectado o mRNA de renina no tecido cardíaco de várias espécies – por meio de Northern blot, ensaios de hibridização e RT-PCR –, a expressão de renina no tecido cardíaco ainda é motivo de controvérsia (DZAU, V. J., ELLISON, K. E. *et al.*, 1987; PAUL, M. *et al.*, 1988; PAUL, M. *et al.*, 1993).

Em todos os estudos de expressão de renina, os níveis de mRNA obtidos eram muito baixos, ou então, eram necessárias grandes quantidades de RNA total para se obter níveis detectáveis de mRNA de renina (VON LUTTEROTTI, N. *et al.*, 1994). Animais transgênicos que expressavam excessivamente o gene da renina humana dirigida pelo promotor murino não demonstravam a presença de mRNA de renina no tecido cardíaco (YAN, Y. *et al.*, 1998).

Porém, menos controversa é a evidência da captação de renina da circulação sanguínea, sendo essa captação inespecífica – difusão para o interstício celular – ou a partir da ligação da (pró)renina em sítios específicos de receptores M6P/IGF2R. Os receptores M6P/IGF2R são capazes de se ligarem à pró-renina e renina em cardiomiócitos (DANSER, A.

H. *et al.*, 1997; DE LANNOY, L. M. *et al.*, 1997; SARIS, J. J. *et al.*, 2001; CATANZARO, D. F., 2005).

A hipertrofia de cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura e o aumento da síntese protéica nessas células foram visualizados apenas durante a co-incubação com pró-renina e angiotensinogênio, uma vez que a pró-renina sozinha não executa tais efeitos. Os efeitos da associação da pró-renina com o angiotensinogênio foram comparáveis aos efeitos de 100 nM de angiotensina II, embora os níveis desse peptídeo no meio de cultura não tenham ultrapassado 1 nM (SARIS, J. J. *et al.*, 2002). Esses dados sugerem que a síntese cardíaca de angiotensina II seria intracelular.

Além dos efeitos mediados pelos receptores M6P/IGF2R, os receptores (P)RR, que são abundantemente expressos no tecido cardíaco – são capazes de ativar vias de transdução de sinais via MAP e ERK quinases, independentemente da presença de angiotensina II (NGUYEN, G. *et al.*, 2002; NGUYEN, G. *et al.*, 2004).

Essas descobertas acerca dos receptores de (pró)renina sustentam a hipótese que o SRA cardíaco desempenha um papel fisiológico de acordo com a taxa de ligação em receptores de (pró)renina e receptores de angiotensina II. Esse microambiente permitiria uma eficiência máxima da geração da angiotensina local – possivelmente, com a ligação imediata da angiotensina II em seus receptores e com o mínimo de extravasamento do peptídeo para o espaço intersticial (NGUYEN, G. *et al.*, 2004).

#### 1.4.1.2 Enzima conversora de angiotensina

Contrariamente à existência de renina, não existem dúvidas quanto à expressão da ECA no tecido cardíaco. O mRNA da ECA pôde ser facilmente detectado em corações murinos e humanos, assim como a sua atividade enzimática. Estudos comprovam a presença da ECA em cardiomiócitos de ratos e, no coração humano, a expressão da ECA ocorre principalmente após o infarto do miocárdio. A expressão de ECA2 também já foi demonstrada em corações de ratos e humanos (HIRSCH, A. T. *et al.*, 1991; PAUL, M. *et al.*, 1993; HOKIMOTO, S. *et al.*, 1996; PAUL, M. *et al.*, 1996; CRACKOWER, M. A. *et al.*, 2002).

#### 1.4.1.3 Quimase

A quimase cardíaca humana converte a angiotensina I em II e não é inibida pelos fármacos inibidores da ECA, podendo atuar em vias alternativas de formação de angiotensina II. Como previamente descrito, Urata *et al.* (1990) descreveram a formação de mais de 80% da angiotensina II cardíaca pela ação da quimase, sugerindo uma importante via alternativa presente no coração humano. Todavia, a magnitude desse efeito descrito por Urata *et al.* (1990) é discutível, uma vez que os inibidores da ECA são fármacos extremamente efetivos no tratamento de cardiopatias.

#### 1.4.1.4 Angiotensinogênio e angiotensinas I e II

Diferentemente da renina, o mRNA do angiotensinogênio foi mais facilmente identificado no tecido cardíaco humano e murino, mas em níveis inferiores aqueles encontrados nos hepatócitos, principal fonte de angiotensinogênio (DZAU, V. J., ELLISON, K. E. *et al.*, 1987; PAUL, M. *et al.*, 1993). Já as angiotensinas são detectadas no coração em concentrações superiores às plasmáticas. Apesar dessa elevada quantidade de angiotensinas possa ser um indicador de síntese cardíaca desses peptídeos, contudo, a hipótese de captação e de armazenamento de angiotensinas não deve ser descartada (DANSER, A. H. *et al.*, 1994).

Ademais, existe ainda a possibilidade da renina e do angiotensinogênio plasmáticos serem captados pelos cardiomiócitos e, com a presença da ECA cardíaca, formar angiotensina II intracardíaca. Com intuito de se verificar se essa hipótese poderia ter fundamento, van Kats *et al.* (1998) perfundiram angiotensinas I e II radiomarcadas em porcos e mensuraram seus níveis plasmáticos e teciduais. Os resultados indicaram que mais de 90% da angiotensina I mensurada é captada pelo coração, enquanto mais de 75% da angiotensina II mensurada é formada localmente. Esses resultados mostram claramente que a síntese tecidual de angiotensinas é um mecanismo relevante e independente da síntese tecidual de angiotensinogênio e/ou renina.

#### 1.4.1.5 Receptores de angiotensina

Ambos os subtipos de receptores, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, são expressos no tecido cardíaco e parecem ser mais localizados nos cardiomiócitos. Em fibroblastos cardíacos, os receptores de angiotensina parecem depender da presença de doenças cardíacas, porque em condições fisiológicas, os fibroblastos cardíacos expressam apenas o subtipo AT<sub>1</sub>, mas recrutam o subtipo AT<sub>2</sub> em situações patológicas. Parece existir uma harmonia no funcionamento de ambos os subtipos no tecido cardíaco, pois o subtipo AT<sub>1</sub> é capaz de estimular a hipertrofia e a proliferação de células cardíacas, enquanto o subtipo AT<sub>2</sub> medeia efeitos opostos (CRABOS, M. *et al.*, 1994; BOOZ, G. W. e BAKER, K. M., 1996; WIDDOP, R. E. *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.6 Efeitos do SRA cardíaco

Efeitos inotrópicos: A angiotensina II é capaz de elevar o inotropismo cardíaco. De modo indireto, a angiotensina II atua no sistema nervoso simpático, aumentando a força e a frequência de contração do músculo cardíaco e, diretamente, a angiotensina II medeia o influxo de cálcio intracelular e, conseqüentemente, altera o platô do potencial de ação cardíaco (LIBBY, P. *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* com preparações de átrio direito e ventrículo direito e esquerdo de pacientes cardiopatas sugerem que a angiotensina II exerça efeitos inotrópicos positivos apenas no átrio direito. Além disso, a expressão excessiva de receptores AT<sub>1</sub> humanos direcionada ao tecido cardíaco de camundongos transgênicos corrobora o aumento do influxo de cálcio após estimulação com angiotensina II (HOLUBARSCH, C. *et al.*, 1993; HOFFMANN, S. *et al.*, 2001).

Efeitos hipertróficos: Ao ativar os receptores AT<sub>1</sub>, a angiotensina II medeia efeitos hipertróficos. Enquanto a hipertrofia cardíaca, inicialmente, ocorre como um mecanismo compensatório para preservar a função cardíaca, mas pode tornar-se o principal fator de risco para a insuficiência cardíaca congestiva e, conseqüentemente, para a morte súbita (LIBBY, P. *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* realizados com cultura de cardiomiócitos

sugerem o efeito hipertrófico seja apenas resultado da secreção tecidual de diversos fatores de crescimento, como a endotelina -1 e TGF- $\beta$ .

A hipertrofia ventricular esquerda ocasionada pelo aumento tecidual de angiotensina II já foi descrita em ratos transgênicos com expressão excessiva de componentes do SRA, como a própria renina murina, receptores AT<sub>1</sub> humanos, ECA humana e a expressão concomitante de renina e angiotensinogênio humanos (PINTO, Y. M. *et al.*, 1997; VAN KESTEREN, C. A., VAN HEUGTEN, H. A. *et al.*, 1997; GRAY, M. O. *et al.*, 1998; MULLER, D. N. *et al.*, 1998; POKHAREL, S. *et al.*, 2004; HOFFMANN, S., 2005).

Em alguns desses modelos animais ficou evidente a participação exclusivamente tecidual da angiotensina II. Véniant *et al.* (1996) criaram ratos transgênicos com expressão sistêmica excessiva de pró-renina em hepatócitos. Surpreendentemente, os animais desenvolveram glomeruloesclerose e hipertrofia cardíaca em ausência de hipertensão arterial, sugerindo um importante papel funcional do SRA cardíaco ao mediar esses efeitos patológicos.

Estiramento mecânico: O estiramento mecânico das fibras cardíacas pode induzir a secreção de angiotensina II por cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo*. A sobrecarga ventricular esquerda, que representa uma situação associada ao estiramento crônico dos cardiomiócitos, resulta em ativação do SRA cardíaco. As vias ativadas intracelularmente pela indução do SRA cardíaco por estiramento são bloqueadas por antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> (SADOSHIMA, J. *et al.*, 1993; LERI, A. *et al.*, 1998; MALHOTRA, R. *et al.*, 1999).

Apesar de se atribuir somente aos receptores AT<sub>1</sub> esses efeitos fisiopatológicos, Senbonmatsu *et al.* (2000) criaram animais *knockouts* para o gene do receptor AT<sub>2</sub> e demonstraram que a deleção desse subtipo de receptor não permitiu que os animais desenvolvessem a hipertrofia ventricular esquerda após sobrecarga pressórica. Esses resultados sugerem que os receptores AT<sub>2</sub> também poderiam estar envolvidos na fisiopatogenia da hipertrofia cardíaca.

Remodelamento cardíaco: O remodelamento cardíaco tem por objetivo a estabilização da função cardíaca frente à uma lesão que se instala nesse tecido (LIBBY, P. *et al.*, 2007). A expressão de ECA desempenha uma importante função no remodelamento do coração, principalmente após o infarto do miocárdio. A lesão pós-infarto parece estimular a transcrição do gene da ECA e também sua atividade enzimática, caracterizando uma possível estimulação do SRA tecidual (HIRSCH, A. T. *et al.*, 1991).

Os corações de ratos observados em 1 e 4 semanas após o infarto do miocárdio demonstraram que os miofibroblastos expressavam uma grande quantidade de receptores de



---

angiotensina II. Sendo assim, os animais foram tratados com antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> logo após o infarto e observaram uma significativa redução do volume de colágeno nos sítios infartados em comparação ao grupo controle (SUN, Y. e WEBER, K. T., 1996; DE CARVALHO FRIMM, C. *et al.*, 1997).

Apoptose: Estudos realizados em células PC-12 – de feocromocitoma de ratos – sugerem que a morte celular programada seja mediada por receptores AT<sub>2</sub>. Entretanto, o subtipo de receptores que parece estar associado à apoptose de cardiomiócitos é o AT<sub>1</sub> (YAMADA, T. *et al.*, 1996; CIGOLA, E. *et al.*, 1997).

A apoptose parece estar envolvida no remodelamento cardíaco que ocorre após o infarto do miocárdio, na cardiomiopatia hipertensiva e na cardiomiopatia diabética. Existem evidências que o bloqueio do receptores AT<sub>1</sub> poderia amenizar esses efeitos apoptóticos e, conseqüentemente, retardar o avanço da insuficiência cardíaca (DIEZ, J. *et al.*, 1997; ANVERSA, P. *et al.*, 1998; FIORDALISO, F. *et al.*, 2000; DIEP, Q. N. *et al.*, 2002).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como principal objetivo estudar o processamento de pró-renina humana em renina pela ação enzimática da catepsina B em células hipofisária de ratos e a ação tecidual dessa pró-renina em cardiomiócitos de ratos neonatos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Investigar quais resíduos de aminoácidos do sítio de clivagem da pró-renina são reconhecidos pela catepsina B em cultura de células GH4C1.

2.2.2 Avaliar a influência das cadeias glicosídicas no reconhecimento e no processamento da pró-renina pela catepsina B em cultura de células GH4C1.

2.2.3 Analisar se a catepsina B é importante no direcionamento da pró-renina para os grânulos secretórios das células GH4C1.

2.2.4 Verificar se a pró-renina humana é capaz de ativar uma importante via de sinalização celular em cardiomiócitos de ratos neonatos.

2.2.5 Avaliar se as cadeias glicosídicas da pró-renina humana e o processamento em renina são essenciais para a ativação dessa via de sinalização celular.

2.2.6 Investigar se há participação indireta da ECA – via clássica do SRA – e de receptores  $AT_1$  na ativação dessa via de sinalização celular.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

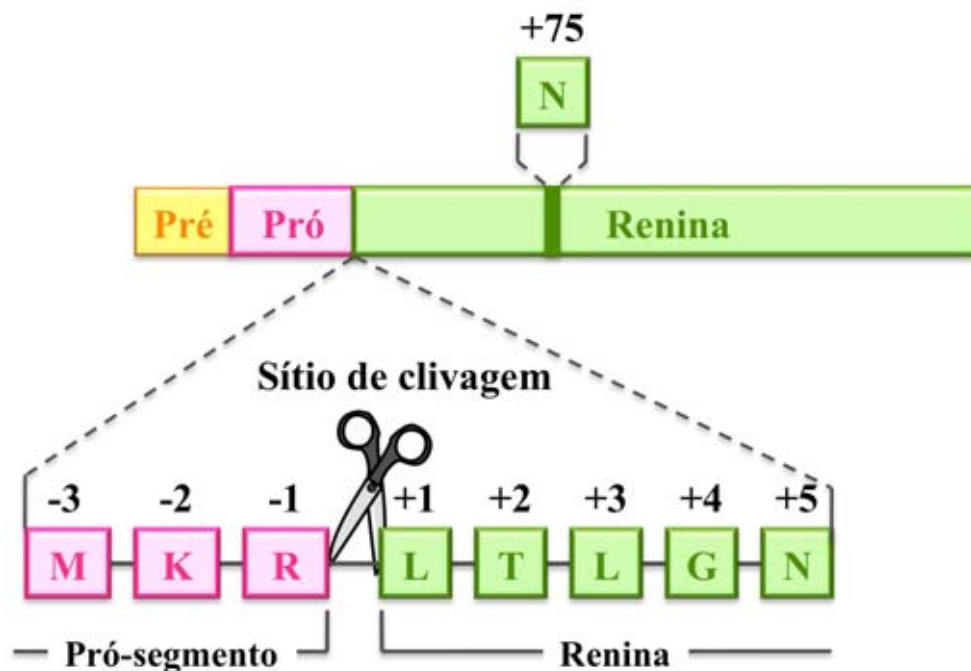
#### 3.1 CULTURA DE CÉLULAS GH4C1

As células hipofisárias de ratos GH4C1 foram cultivadas em monocamada em meio de cultura DME H21 suplementado com 10% de SFB, 2 mmol/L de glutamina, 50 UI/mL de penicilina G e 50 µg/mL de estreptomicina (fornecidos pela *Cell Culture Facility*) e foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Com a finalidade de aumentar o número de grânulos secretórios, a cultura de células foi tratada durante os sete dias que antecederam a transfecção com: 10 nmol/L de EGF humano (fornecido pelo *Collaborative Biomedical Products*), 1 nmol/L de estrógeno e 300 nmol/L de insulina (SCAMMELL, J. G. *et al.*, 1986).

#### 3.2 PLASMÍDEOS E TRANSFECÇÃO DE ADN DE CÉLULAS GH4C1

O gene da pré-pró-catepsina B humana foi previamente inserido no plasmídeo pHCB79-2 e sob controle do promotor RSV (gentilmente cedido pelo Dr. Donald F. Steiner, Universidade de Chicago) (CHAN, S. J. *et al.*, 1986). O gene da pré-pró-renina humana (selvagem e mutantes – **Figura 10**) foram clonados no plasmídeo pRhR1100 e sob controle do promotor RSV (CHU, W. N. *et al.*, 1990). As mutações pontuais foram induzidas por amplificação do gene da pré-pró-renina por PCR com *primers* contendo especificamente as mutações desejadas. Cada grupo experimental continha 5.10<sup>6</sup> células dispersas em 0,4 mL de tampão PBS com 0,1% de glicose e 10 µg/mL de BioBrene. As células foram eletroporadas com 10 µg do plasmídeo pRhR1100 e/ou com 40 µg de vetor pHCB79-2 a 960 µF e 0,3 kV. Cada grupo experimental foi semeado em duplicata em placas de cultura com poços de 2,5 cm de diâmetro.



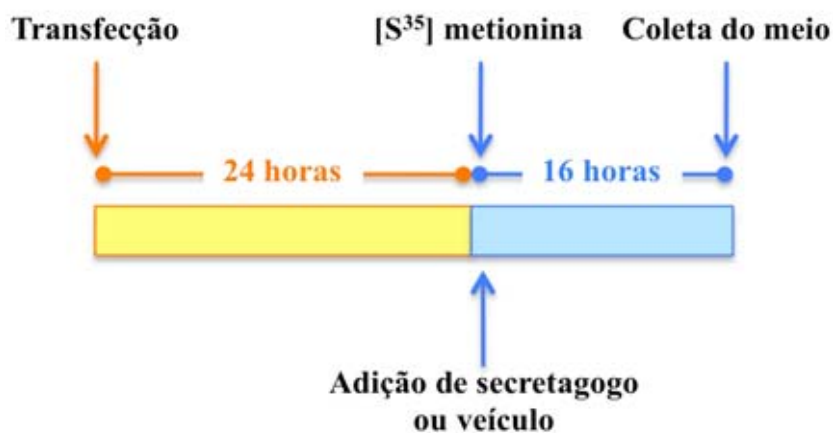
**Figura 10** - Representação esquemática do gene da pró-renina

O segmento “Pré” (amarelo) representa o peptídeo do sinal. O segmento “Pró” (rosa) representa o pró-segumento da pró-renina. O segmento “Renina” (verde) representa a enzima ativa. Os aminoácidos mutados por alanina encontram-se destacados, exceto a glicina na posição +4. A numeração dos resíduos de aminoácidos é referente ao aminoácido 1 da renina. A asparagina +75 também foi mutada por alanina.

### 3.3 MARCAÇÃO RADIOATIVA DAS CÉLULAS GH4C1

As células GH4C1, transfectadas com os plasmídeos contendo os genes da pré-pró-renina humana e/ou pré-pró-catepsina B humana, foram mantidas em meio de cultura DME H21, em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Ao findar o período de 24 horas de incubação, as células GH4C1 foram triplamente lavadas com tampão PBS morno e cultivadas por dezesseis horas em meio de cultura DME H21 sem metionina. Manualmente, foi suplementado ao meio de cultura 150  $\mu$ Ci/mL de [S<sup>35</sup>]metionina. Após a suplementação de metionina, foi acrescido ao meio de cultura os seguintes secretagogos: 50 mmol/L de KCl e 10  $\mu$ mol/L de forskolina, ambos solubilizados em etanol. O etanol (veículo) foi adicionado em grupos de células controle.

O meio de cultura das células GH4C1 foi coletado cerca de dezesseis horas após a adição de  $[S^{35}]$ metionina para realização dos experimentos de imunoprecipitação e quantificação de pró-renina e renina (**Figura 11**).



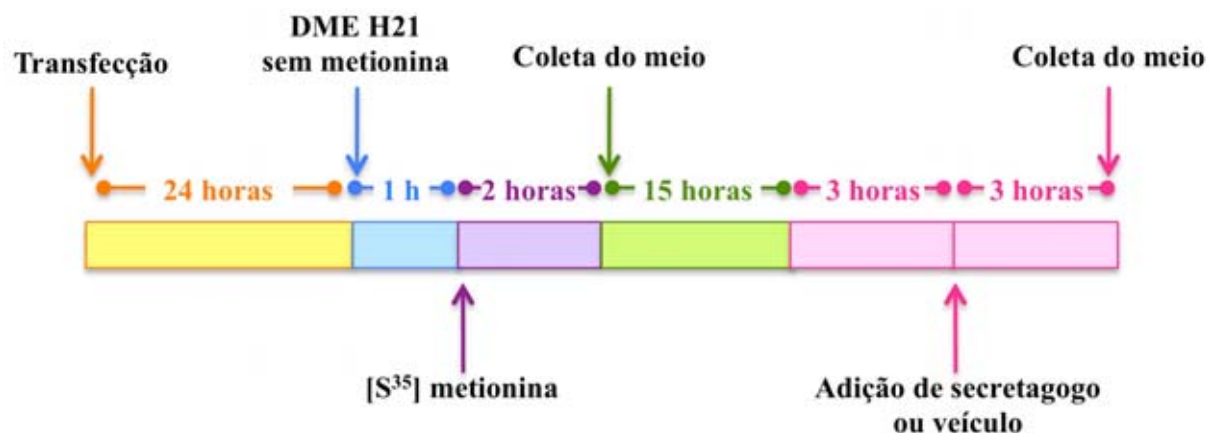
**Figura 11** - Protocolo implementado ao método de análise do processamento da pró-renina em renina.

#### 3.4 EXPERIMENTOS DE “PULSE-CHASE”

Aproximadamente 24 horas após a transfecção dos plasmídeos em células GH4C1, o meio de cultura foi removido e a cultura de células foi triplamente lavada com tampão PBS morno. Em seguida, as células foram incubadas com DME H21 sem metionina durante uma hora. Após período de privação de metionina, o meio de cultura das células GH4C1 foi suplementado com 300  $\mu$ Ci de  $[S^{35}]$ metionina/poço. As células foram expostas ao traçador radioativo por duas horas. Após o período de radiomarcagem protéica, a cultura de células foi duplamente lavada com tampão PBS morno e novamente incubadas em meio de cultura DME H21 com 10% de SBF durante quinze horas. Ao findar o período de quinze horas de incubação, o meio de cultura foi coletado e as células foram duplamente lavadas com tampão PBS morno e incubadas em meio de cultura DME H21 durante 3 horas sem adição de secretagogos ou veículo .

Ao término do período de três horas de incubação, o meio de cultura foi coletado e as células foram novamente incubadas em meio de cultura DME H21, sendo acrescentados os secretagogos (50 mmol/L de KCl e 10  $\mu$ mol/L de forskolina, ambos solubilizados em etanol) ou o veículo (etanol) (**Figura 12**). O meio de cultura foi coletado ao final das três

horas últimas horas de incubação para realização dos experimentos de imunoprecipitação e quantificação de pró-renina e renina.



**Figura 12** - Protocolo implementado ao método de análise do direcionamento da pró-renina para os grânulos secretórios das células GH4C1.

### 3.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os meios de cultura coletados foram incubados com anticorpos policlonais de coelhos – que reconhecem, mutuamente, os epítomos de pró-renina e renina – na proporção de 1:1000 durante quatorze horas em câmara fria a 4°C e sob lenta agitação. Ao término do período de incubação, foi adicionado aos meios de cultura a proteína A Sepharose (fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech*). Os meios de cultura foram novamente incubados durante três horas em temperatura ambiente sob lenta agitação.

O material resultante da incubação com anticorpos policlonais e proteína A Sepharose foi adicionado sobre solução de sucrose 30% em detergente mix (fornecido por *Sigma Biotech*) e centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes até que as partículas de proteína A Sepharose associadas ao complexo antígeno-anticorpo fossem devidamente lavadas. As proteínas precipitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, contendo 0,1% de SDS.

Após secagem, o gel SDS-PAGE foi mantido em contato com um filme radiográfico durante sete dias a -80°C para realização de auto-radiografia das proteínas separadas pela eletroforese. A imunoprecipitação de prolactina seguiu exatamente as mesmas

---

etapas experimentais, tendo sido realizada com anticorpos anti-prolactina de coelhos (fornecidos pelo *National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Disease* – NIDDK).

### 3.6 RADIOIMUNOENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PRÓ-RENINA E RENINA

Os níveis de pró-renina e renina presentes no meio de cultura foram determinados 36 horas após a transfecção por meio de radioimunoensaio enzimático de geração de angiotensina I (GammaCoat, Diasorin). A renina ativa presente no sobrenadante é determinada pela sua capacidade enzimática de clivar o angiotensinogênio presente no soro de ovelhas nefrectomizadas (gentilmente ofertado pela Professora Roseli A. S. Gomes, FMTM, Uberaba – MG, Brasil) em angiotensina I.

Primeiramente, os níveis de renina existentes no sobrenadante foram determinados. Em seguida, os níveis de renina total (renina + pró-renina) foram determinados após ativação enzimática da pró-renina existente no sobrenadante com 50  $\mu\text{g/mL}$  de tripsina durante uma hora a 21°C. A atividade de pró-renina foi estimada como a diferença existente entre os dois valores numéricos obtidos (Renina total – renina). A porcentagem de renina ativa foi representada pela razão entre a renina ativa e a renina total vezes 100.

### 3.7 ANIMAIS

As culturas primárias de cardiomiócitos foram obtidas a partir de corações de ratos Wistar independente do sexo com, no máximo, 72 horas de vida. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade de Brasília – UnB.

### 3.8 CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS

A cultura primária de cardiomiócitos foi obtida a partir da digestão enzimática de corações de ratos Wistar neonatos (com, no máximo, 72 horas de vida extra-uterina) (CHLOPČIKOVA, S. *et al.*, 2001). Os animais foram sacrificados por decapitação seguida de toracotomia para a remoção dos corações. O tecido cardíaco foi imediatamente preservado em tampão CBFHH gelado (139 nM de NaCl; 5,36 nM de KCl; 0,81 nM de MgSO<sub>4</sub>; 5,55 mM de dextrose; 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,34 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM de HEPES; 50 U/mL de penicilina G e 50 µg/mL de estreptomicina; em pH 7,5). Os átrios foram cirurgicamente separados dos ventrículos.

Os ventrículos foram submetidos a sucessivos ciclos de digestão enzimática com 5 mL de solução de 1 mg/mL de tripsina (fornecida pela *Call Fisher*) e 20 µg/mL de DNase (fornecida pela Roche), preparados em tampão CBFHH durante cinco minutos (por ciclo) sob agitação em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Os ciclos de digestão foram interrompidos pela adição de 5 mL de solução de 20 µg/mL de DNase (fornecida pela Roche) em tampão CBFHH e 10mL de SFB. As soluções resultantes de todos os ciclos de digestão foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos com a finalidade de se recuperar o decantado celular. As células obtidas com os ciclos de digestão enzimática foram ressuspensas em 30 mL de DME H21 com 10% de SBF, foram semeadas em placas de Petri e incubadas por quarenta minutos em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Os cardiomiócitos são normalmente separados das células mesenquimais (fibroblastos) por tempo de aderência diferencial à placa de Petri. As células mesenquimais se aderem mais rapidamente à placa (BLONDEL, B. *et al.*, 1971 *apud* CHLOPČIKOVA, S. *et al.*, 2001, p. 51). Após o período de incubação, as células cardíacas em suspensão foram recolhidas por aspiração do meio de cultura e, em seguida, foram contadas em câmara de Neubauer.



### 3.9 PLASMÍDEOS E TRANFEÇÃO DE ADN DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS

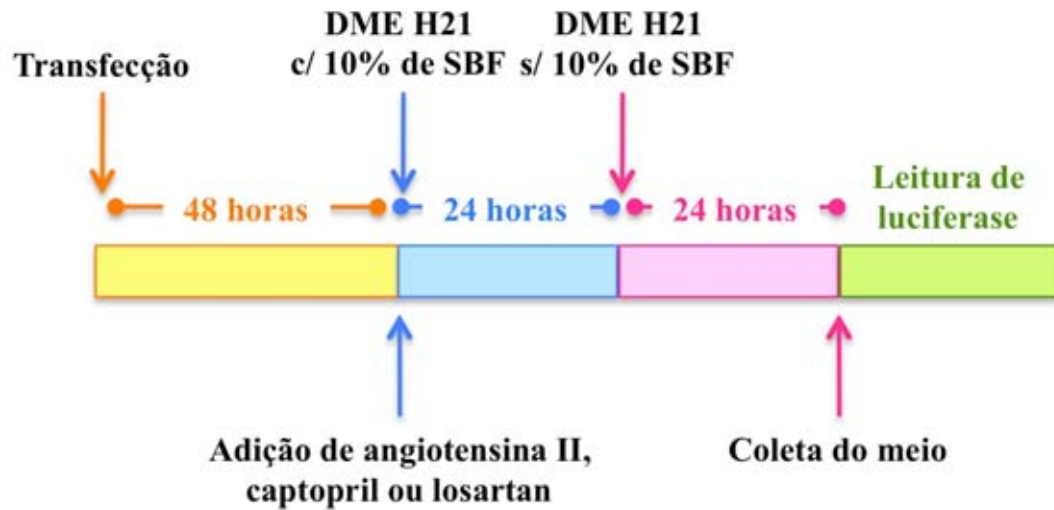
Cada grupo experimental continha  $10 \cdot 10^6$  células dispersas em 0,5 mL de tampão PBS com 0,1% de glicose. As células foram eletroporadas com 10  $\mu$ g do plasmídeo pRhR1100 contendo o gene do angiotensinogênio humano e/ou 2  $\mu$ g do plasmídeo repórter contendo o gene da luciferase sob controle do promotor do peptídeo natriurético cerebral (BNP) a 250  $\mu$ F e 0,29 kV. O controle da efetividade das transfeções foi realizado com a eletroporação, sob as mesmas condições descritas acima, de 1  $\mu$ g do plasmídeo repórter contendo o gene da luciferase sob controle do promotor do citomegalovírus (CMV). O promotor do citomegalovírus é constitutivamente ativado, o que eleva a transcrição gênica da luciferase.

As células foram tratadas com meio de cultura DME H21 com 10% de SBF, 2 mM de glutamina, 50 UI/mL de penicilina G e 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Cada grupo experimental foi semeado em triplicata em placas de cultura com poços de 2,5 cm de diâmetro. A cultura de células foi mantida em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Aproximadamente quarenta e oito horas após a transfeção, o meio de cultura foi trocado por DME H21 com 10% SBF fresco.

Células pró-monocíticas humanas (U937), previamente eletroporadas com o plasmídeo pRhR1100 contendo o gene da pró-renina humana (WT ou mutantes -1-2(R,K/A) e +5(N/A)) a 950  $\mu$ F e 0,30 kV, foram inseridas na cultura de cardiomiócitos transfectado, realizando-se uma co-cultura (**Tabela 1**). No grupo de células que representava o controle positivo experimental foi adicionado 0,1 mmol/L de angiotensina II. Os grupos de células que receberam tratamento farmacológico foi adicionado ao meio de cultura 0,1  $\mu$ mol/L de captopril ou 0,1  $\mu$ mol/L de losartan. As células foram novamente mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (**Tabela 1**).

Aproximadamente vinte e quatro horas após a primeira troca de meio de cultura, o procedimento foi novamente realizado. Entretanto, o meio de cultura utilizado foi o DME H21 sem SBF. Ao findar o período de vinte e quatro horas de incubação, as células foram lisadas com tampão de lise e incubadas com luciferina – substrato específico da luciferase (ambos reagentes fornecidos pela Promega) (**Figura 13**).

A intensidade luminosa resultante da clivagem enzimática da luciferina foi mensurada em um luminômetro em Unidades Relativas de Luz (URL).



**Figura 13** - Protocolo implementado para análise da captação de pró-renina por cardiomiócitos.

**TABELA 1**

Grupos experimentais resultantes das transfecções dos respectivos vetores de expressão em células U937 e/ou cardiomiócitos de ratos neonatos. Ambas as linhagens celulares foram mantidas em co-cultura.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Células U937</b>	<b>Cardiomiócitos</b>	<b>Tratamento farmacológico</b>
U937	—	BNP-Luciferase	—
U937-ProWT	Pró-renina WT	BNP-Luciferase	—
AGT + U937	—	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	—
AGT + U937-ProWT	Pró-renina WT	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	—
AGT + U937-Pro-1-2	Pró-renina -1-2(R,K/A)	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	—
AGT + U937-Pro+5	Pró-renina +5(N/A)	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	—
AGT + ProWT + Cap	Pró-renina WT	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	Captopril
AGT + ProWT + Los	Pró-renina WT	BNP-Luciferase + angiotensinogênio	Losartan
AII	—	BNP-Luciferase	Angiotensina II
AII + Los	—	BNP-Luciferase	Angiotensina II + Losartan
CMV	—	CMV-Luciferase	—

### 3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados numéricos obtidos experimentalmente foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

As diferenças entre as médias de cada variável foram analisadas segundo o teste t (duas variáveis) e a análise de variância (ANOVA) (mais de duas variáveis) foi realizada com o teste de comparações múltiplas Tukey nos experimentos com células hipofisárias. Os resultados dos experimentos realizados com cardiomiócitos de ratos neonatos foram analisados com o teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis.

O programa computacional Prism GraphPad versão 5.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos e confecção dos gráficos. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 PROCESSAMENTO DE PRÓ-RENINA PELA CATEPSINA B

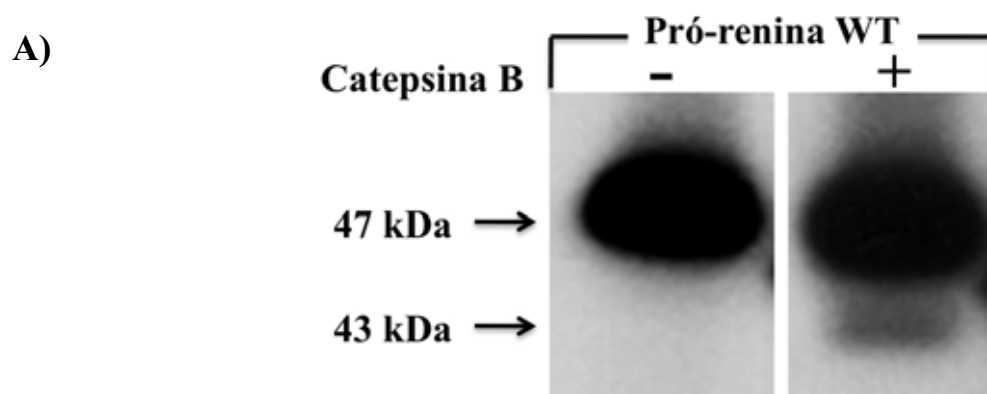
#### 4.1.1 Pró-renina selvagem (*wild type*)

Experimentos realizados por Neves *et al.* (1996) já haviam demonstrado que as células hipofisárias de ratos GH4C1 – naturalmente incapazes de converter pró-renina em renina – ao serem transfectadas com catepsina B humana passavam a secretar renina no meio de cultura.

Com intuito de confirmar os resultados descritos por Neves *et al.* (1996), as células GH4C1 foram co-transfectadas com os vetores de expressão da pré-pró-renina humana e da pré-pró-catepsina B humana. Aproximadamente vinte e quatro horas após a eletroporação, as células foram radiomarcadas com [<sup>35</sup>S] metionina e incubadas por dezesseis horas com o veículo – etanol – ou os secretagogos KCl e forskolina – para que o conteúdo dos grânulos secretórios fossem expelidos no meio de cultura. Após o período de secreção constitutiva da pró-renina (16 horas), as proteínas do meio de cultura foram submetidas à imunoprecipitação, sendo os resultados analisados por meio de auto-radiografia ou por meio do ensaio de geração de angiotensina I – método de quantificação indireta da atividade de renina.

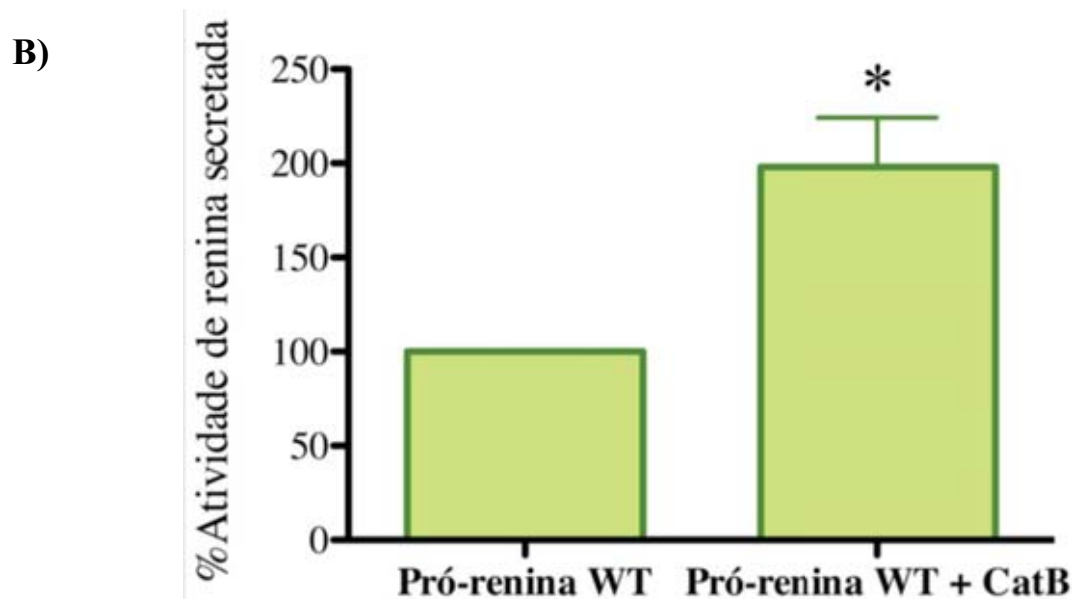
Como demonstrado na **Figura 14A**, a presença de uma banda única de 47 kDa – referente à massa molecular da pró-renina – confirma que as células GH4C1 são naturalmente incapazes de sintetizar a renina a partir da pró-renina. Entretanto, a catepsina B presente no meio intracelular foi capaz de clivar a pró-renina em renina. A presença de renina é visualizada como uma banda de massa molecular inferior à da pró-renina (43 kDa).

No gráfico subsequente (**Figura 14B**), é possível perceber que a renina apresentou atividade enzimática pelo menos duas vezes maior em presença de catepsina B do que em relação à pró-renina controle (Pró-renina = 100 ± 0% *versus* Pró-renina + catepsina B = 213,22 ± 26,88%, n = 7 e p = 0,0134 *versus* controle) (**Tabela 2**).



**Figura 14 A** - Processamento de pró-renina humana pela catepsina B em células hipofisárias GH4C1.

A) Análise em gel SDS-PAGE de pró-renina e renina imunoprecipitadas. As células GH4C1 transfectadas com pró-renina e catepsina B humana foram radiomarcadas com [<sup>35</sup>S] metionina como descrito em “Materiais e Métodos”. O meio de cultura das células foi precipitado com anticorpos monoclonais que reconhece simultaneamente pró-renina e renina. As proteínas precipitadas foram analisadas em gel SDS-PAGE. As bandas de pró-renina (47 kDa) e renina (43 kDa) estão indicadas com setas.



**Figura 14 B** - Processamento de pró-renina humana pela catepsina B em células hipofisárias GH4C1.

B) Gráfico relativo às quantidades de renina secretadas no meio de cultura celular. Células GH4C1 transfectadas com pró-renina humana ou co-transfectadas com catepsina B (CatB) foram mantidas por dezesseis horas em meio de cultura com forskolina e KCl. Aliquotas dos meios de cultura das células foram testados para a atividade de renina como descrito em “Materiais e Métodos”. O teste t de Student foi realizado com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0, n = 7 e \*p = 0,0134 *versus* controle.

TABELA 2

Valores, em porcentagem, da atividade enzimática de renina selvagem (WT) secretada no meio de cultura de células GH4C1. A atividade enzimática de renina foi indiretamente mensurada pela geração de angiotensina I. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Grupos experimentais	Média $\pm$ EPM (n)	p
Pró-renina WT (controle)	100 $\pm$ 0% (7)	—
Pró-renina WT + catepsina B	213,22 $\pm$ 26,88% (7)	0,0134*

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Neste estudo, foi demonstrado que a co-transfecção dos vetores de expressão contendo, separadamente, os genes da catepsina B humana e da pró-renina humana aumenta a secreção dos dois produtos de imunoprecipitação: um, correspondendo à pró-renina com 47 kDa e outro, correspondendo à renina com 43 kDa. Esse resultado foi confirmado pela determinação *in vitro* da geração da angiotensina I a partir da renina ativa secretada no meio de cultura e corrobora os resultados prévios obtidos por Neves *et al.* (1996).

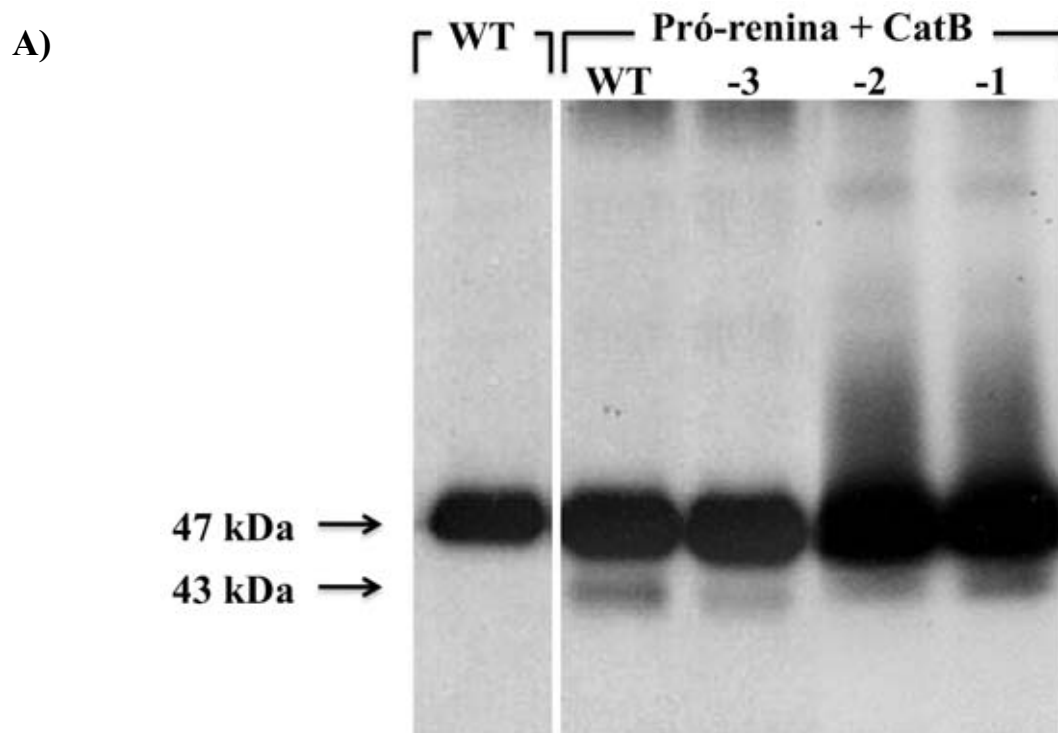
#### 4.1.2 Mutações N-terminais no pró-segmento da pró-renina

A identificação dos aminoácidos presentes no pró-segmento da pró-renina envolvidos com a proteólise mediada pela catepsina B foi realizada com mutações nos resíduos de metionina -3, lisina -2 e arginina -1 por resíduos de alanina (**Figura 10**).

Nos resultados do experimento de imunoprecipitação é possível observar que as mutações nos resíduos -3(M/A) e -2(K/A) reduziram o processamento desses mutantes de pró-renina em renina pela catepsina B. Entretanto, a mutação no resíduo -1(R/A) não parece alterar a capacidade proteolítica da pró-renina pela ação da catepsina B, uma vez que os níveis de renina imunoprecipitados se assemelham aos níveis secretados de renina selvagem (WT) (**Figura 15A**).

Os resultados dos experimentos de imunoprecipitação foram confirmados pelo ensaio de geração de angiotensina I. Os mutantes de pró-renina -3(M/A) e -2(K/A) demonstraram níveis de renina secretada estatisticamente comparáveis aos níveis do grupo

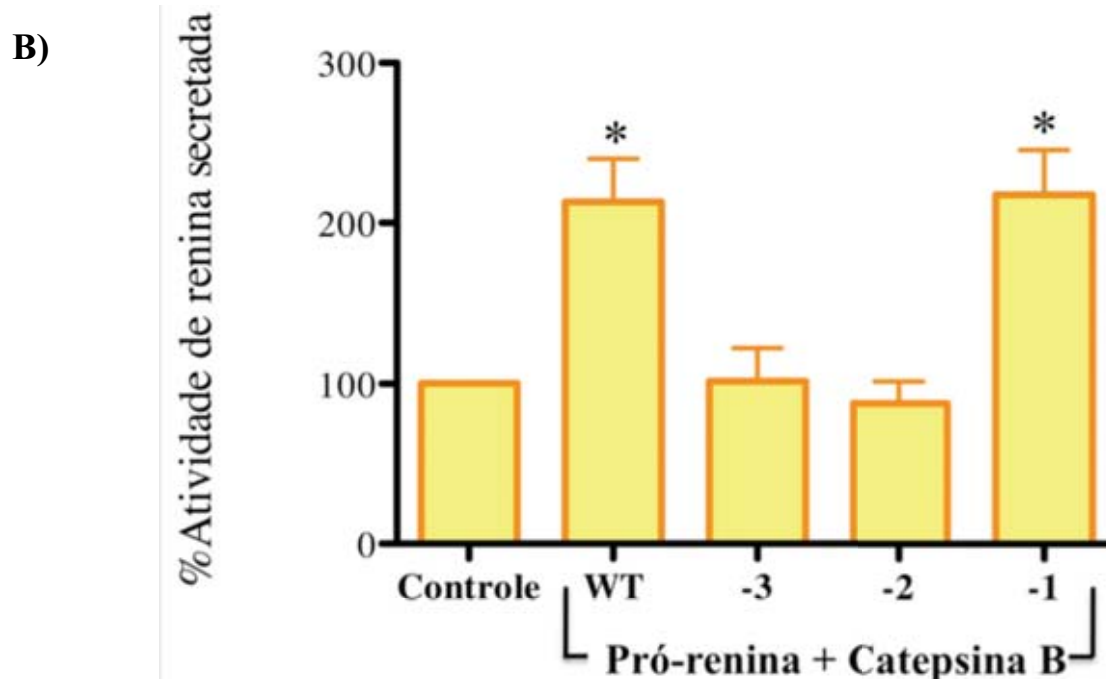
controle (-3(M/A) =  $101,51 \pm 20,88\%$  e -2(K/A) =  $87,77 \pm 13,74\%$  em relação à pró-renina selvagem (controle = 100%), n = 5 e  $p > 0,05$  *versus* controle), enquanto o mutante de pró-renina -1(R/A) apresentou níveis de renina secretada estatisticamente superiores ao da pró-renina selvagem clivada pela catepsina B (-1(R/A) =  $217,69 \pm 27,93\%$ , n = 4,  $p < 0,05$  *versus* controle) (Tabela 3 e Figura 15B).



**Figura 15 A** - Processamento dos mutantes N-terminais de pró-renina pela catepsina B humana em células GH4C1.

A) Células GH4C1 foram transfectadas por eletroporação com vetores de expressão contendo genes das proteínas indicadas e, subsequentemente, radiomarcadas por dezesseis horas com [ $^{35}$ S] metionina. Os sobrenadantes foram coletados e foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpos anti-pró-renina/renina. As bandas que correspondem à pró-renina (47 kDa) e renina (43 kDa) estão indicadas por setas.





**Figura 15 B** - Processamento dos mutantes N-terminais de pró-renina pela catepsina B humana em células GH4C1.

B) Os níveis de pró-renina e renina foram determinadas pelo ensaio de geração de angiotensina I em sobrenadantes coletados dezesseis horas após a transfecção. O controle foi obtido utilizando pró-renina transfectada em ausência de catepsina B. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Tukey foi realizado com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0,  $n = 5$  e  $4$  \* $p < 0,05$  versus controle.

**TABELA 3**

Valores, em porcentagem, da atividade enzimática de renina selvagem (WT) e mutantes N-terminais secretadas no meio de cultura de células GH4C1. A atividade enzimática de renina foi indiretamente mensurada pela geração de angiotensina I. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Grupos experimentais	Média $\pm$ EPM (n)	p
Pró-renina WT (controle)	100 $\pm$ 0% (7)	—
Pró-renina WT + catepsina B	213,215 $\pm$ 26,875% (7)	*p < 0,05
Pró-renina -3(M/A) + catepsina B	101,504 $\pm$ 20,880% (5)	p > 0,05
Pró-renina -2(K/A) + catepsina B	87,766 $\pm$ 13,743% (5)	p > 0,05
Pró-renina -1(R/A) + catepsina B	217,689 $\pm$ 27,934% (4)	*p < 0,05

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

As substituições dos resíduos de metionina -3(M/A) e lisina -2(K/A) da pró-renina humana mantiveram o processamento em renina pela ação da catepsina B semelhante ao do grupo controle, sugerindo que ambos os resíduos de aminoácidos são isoladamente essenciais para o reconhecimento da pró-renina pela catepsina B e para a subsequente clivagem enzimática.

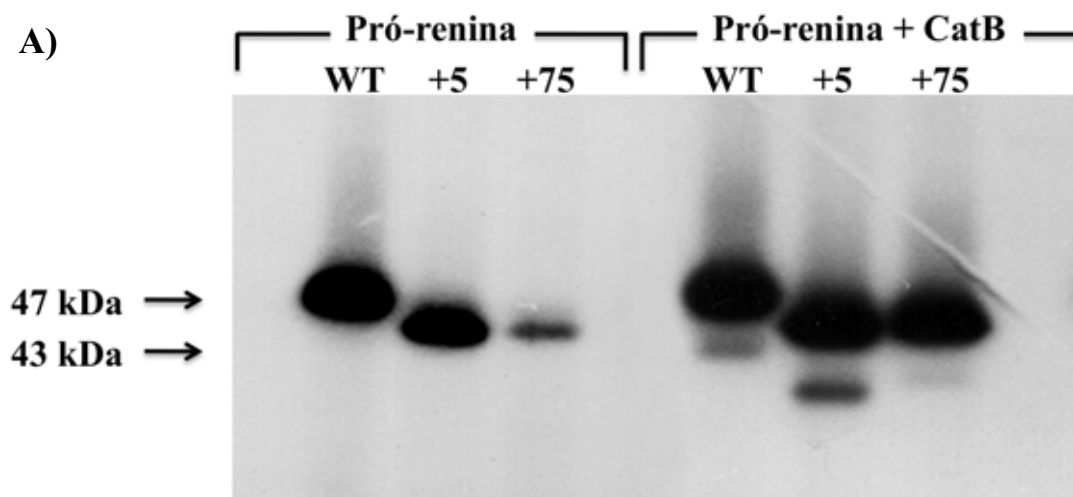
Já a mutação no resíduo de arginina -1(R/A) aumentou o processamento da pró-renina em relação ao grupo controle. Esse achado sugere que esse resíduo de arginina não é essencial para o reconhecimento da pró-renina pela catepsina B.

#### 4.1.3 Mutações nos sítios de glicosilação da pró-renina

A importância das cadeias glicosídicas no processamento de pró-renina pela catepsina B foi investigada por meio de mutações dos resíduos de asparagina (+5 e +75) por alanina (**Figura 10**). Os dois resíduos de asparagina (+5 e +75) recebem, fisiologicamente, a ligação covalente de cadeias glicosídicas. Sendo assim, mutações nesses resíduos de asparagina por alanina impedem a glicosilação da seqüência peptídica da renina e reduzem a massa molecular da proteína não-glicosilada – em relação à pró-renina e renina selvagens (JUTRAS, I. e REUDELHUBER, T. L., 1999).

Na **Figura 16A** é possível visualizar que tanto a pró-renina selvagem (WT) quanto os mutantes não foram processados em renina em ausência de catepsina B em células GH4C1. Entretanto, em relação à pró-renina selvagem, a mutação do resíduo de asparagina +5(N/A) aumentou a conversão de pró-renina pela catepsina B. Contrariamente, a mutação no resíduo +75(N/A) não altera o processamento de pró-renina em relação ao grupo controle (**Figura 16A**).

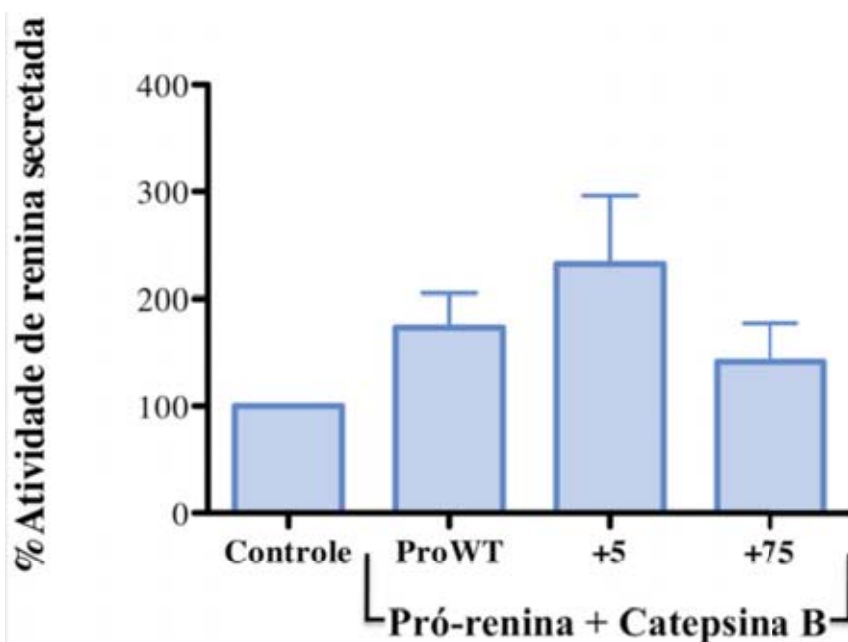
Nos experimentos de mensuração da geração de angiotensina I (**Figura 16B**) a pró-renina mutante +5(N/A) apresentou maior secreção de renina ativa em relação ao grupo controle (+5(N/A) =  $232,09 \pm 63,92\%$  em relação ao grupo controle = 100%, n = 4 e  $p > 0,05$ ). A pró-renina mutante +75(N/A) apresentou a atividade de renina secretada semelhante ao do grupo controle (+75(N/A) =  $141,38 \pm 36,23\%$ , n = 4 e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 4**).



**Figura 16 A** - Os efeitos das cadeias glicosídicas da pró-renina no processamento pela catepsina B em células GH4C1.

A) As células hipofisárias foram eletroporadas com vetores de expressão contendo os genes da pró-renina WT ou dos mutantes +5(N/A) e +75(N/A), sendo subsequente radiomarcadas por dezesseis horas. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos policlonais anti-pró-renina/renina. As bandas de proteínas correspondem à pro-renina selvagem (WT) (47 kDa) e à renina (43 kDa) são indicadas por setas. A pró-renina mutada no resíduo de glicosilação migra no gel de eletroforese com massa molecular menor do que da pró-renina selvagem (WT).

**B)**



**Figura 16 B** - Os efeitos das cadeias glicosídicas da pró-renina no processamento pela catepsina B em células GH4C1.

B) A atividade de pró-renina e renina foi determinada pelo ensaio de geração de angiotensina I nos meios de cultura das células GH4C1. Os níveis de renina foram mensurados antes e após a ativação da pró-renina com 50µg/mL de tripsina a 21°C por uma hora. Os níveis de pró-renina foram calculados a partir da diferença entre

os dois valores. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Tukey com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0, n = 4 e \*p<0,05.

**TABELA 4**

Valores, em porcentagem, da atividade enzimática de renina selvagem (WT) e mutantes em resíduos de glicosilação secretadas no meio de cultura de células GH4C1. A atividade enzimática de renina foi indiretamente mensurada pela geração de angiotensina I. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

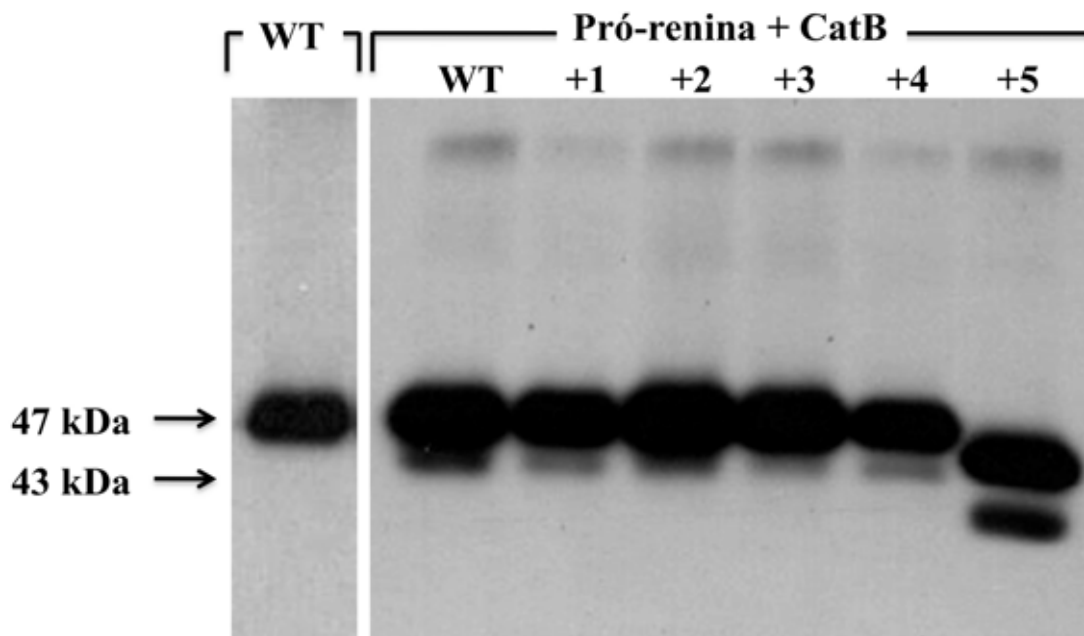
<b>Grupos experimentais</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM (n)</b>	<b>p</b>
Pró-renina WT (controle)	100 $\pm$ 0% (4)	—
Pró-renina WT + catepsina B	173,660 $\pm$ 31,356% (4)	p > 0,05
Pró-renina +5(N/A) + catepsina B	232,085 $\pm$ 63,921% (4)	p > 0,05
Pró-renina +75(N/A) + catepsina B	141,379 $\pm$ 36,226% (4)	p > 0,05

A estrutura peptídica da pró-renina sem a cadeia glicosídica permite que a hidrólise desse mutante +5(N/A) pela catepsina B seja, pelo menos 58,43  $\pm$  32,56% superior à hidrólise da pró-renina selvagem pela mesma protease (+5(NA) = 232,09  $\pm$  63,92% *versus* pró-renina selvagem = 173,66  $\pm$  31,36%). Em contrapartida, a substituição da asparagina +75 por alanina parece não interferir no processamento da pró-renina (+75(N/A) = 141,38  $\pm$  36,23% *versus* pró-renina selvagem = 173,66  $\pm$  31,36%). Esse resultado sugere que a cadeia glicosídica próxima ao sítio de clivagem (+5) limita, de alguma forma, o reconhecimento da pró-renina humana pela catepsina B, o que parece não acontecer com a cadeia glicosídica ligada ao resíduo +75 de asparagina.

#### **4.1.4 Mutações C-terminais no pró-segmento da pró-renina**

Os mutantes C-terminais da pró-renina – em relação ao sítio de clivagem – também foram analisados quanto ao reconhecimento e capacidade proteolítica da catepsina em gerar a renina.

As mutações nos resíduos de leucina +1, treonina +2 e glicina +4 não interferiram quanto ao reconhecimento da pró-renina pela catepsina B e, nem mesmo, quanto à capacidade proteolítica de gerar renina em relação à pró-renina selvagem. Contrariamente, a mutação no resíduo de leucina +3 reduziu o processamento da pró-renina em renina (**Figura 17**).



**Figura 17** - Processamento de mutantes C-terminais de pró-renina pela catepsina B humana em células GH4C1. As células GH4C1 foram eletroporadas com vetores de expressão de pró-renina selvagem (WT) ou mutantes. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos policlonais anti-pró-renina/renina. As bandas correspondentes à pró-renina (47 kDa) e renina (43 kDa) estão indicadas com setas.

Novamente, a mutação no resíduo de asparagina +5 favoreceu o processamento de pró-renina pela catepsina B.

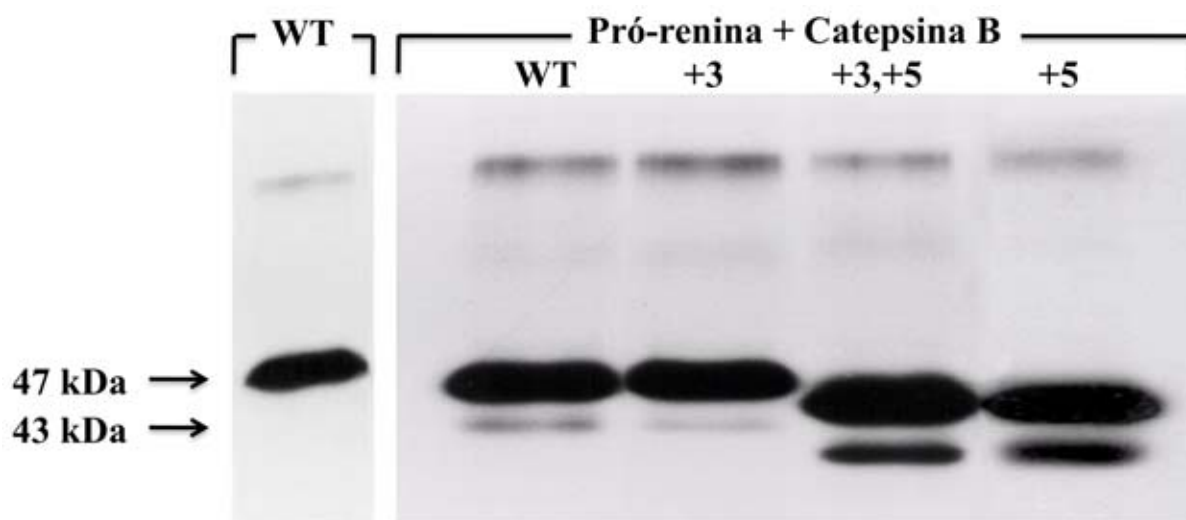
Esses resultados sugerem que, dentre os resíduos de aminoácidos C-terminais do sítio de clivagem da pró-renina, apenas a leucina +3 parece ser importante para o reconhecimento da pró-renina pela catepsina B além, obviamente, da importância da cadeia glicosídica ligada à asparagina + 5 já previamente demonstrada.

Com intuito de confirmar se realmente a cadeia glicosídica próxima ao sítio de clivagem inibe a interação da catepsina B com a pró-renina e, se realmente a leucina +3 é importante para o reconhecimento do sítio de clivagem, as células GH4C1 foram co-transfectadas com vetores de expressão de catepsina B e pró-renina com dupla mutação nos resíduos de leucina +3 e asparagina +5. As proteínas celulares foram radiomarcadas e imunoprecipitadas como descrito no capítulo III.

Na **Figura 18** é possível observar que realmente a leucina +3 parece desempenhar importante papel no reconhecimento da pró-renina pela catepsina B, porque a mutação +3(L/A) reduziu o processamento de pró-renina em renina pela catepsina B. Novamente é possível observar que a mutação no resíduo de asparagina +5 aumenta o reconhecimento da pró-renina pela catepsina B e, conseqüentemente, aumenta a secreção de renina no meio de cultura das células GH4C1.

Curiosamente, a dupla mutação (leucina +3 e asparagina +5) parece aumentar o processamento de pró-renina em renina pela ação enzimática da catepsina B (**Figura 18**).

Esse resultado sugere que a leucina +3 poderia realmente interferir no reconhecimento da pró-renina pela catepsina B apenas em presença da cadeia glicosídica, pois a remoção dessa cadeia – mutação do resíduo de asparagina +5 – restabeleceu a capacidade proteolítica da catepsina B ao hidrolisar a pró-renina mutante +3(L/A) (**Figura 18**).



**Figura 18** - Processamento de mutantes C-terminais de pró-renina pela catepsina B humana em células GH4C1. As células GH4C1 foram eletroporadas com vetores de expressão de pró-renina selvagem (WT) e mutantes. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à imunoprecipitação com anticorpos policlonais anti-pró-renina/renina. As bandas correspondentes à pró-renina (47 kDa) e renina (43 kDa) estão indicadas com setas.

---

## 4.2 DIRECIONAMENTO DA PRÓ-RENINA PARA OS GRÂNULOS SECRETÓRIOS

### 4.2.1 Experimentos de *pulse-chase*

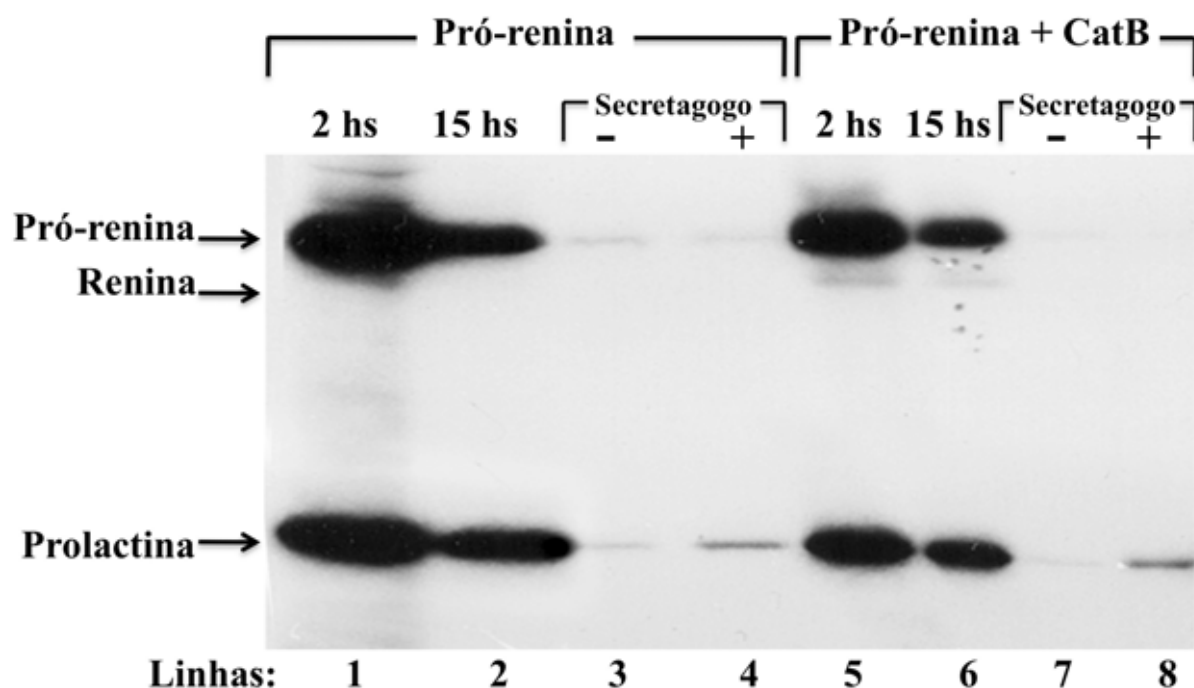
Estudos demonstram que os grânulos secretórios seriam a organela celular onde o processamento da pró-renina em renina ocorreria. Taugner *et al.* (1987) demonstraram por imunomarcção a presença de renina nos grânulos secretórios de células epitelioides, enquanto Jutras *et al.* (1999) demonstraram a co-localização da catepsina B e pró-renina em grânulos secretórios de células hipofisárias de camundongos – AtT20.

Sendo assim, os experimentos de *pulse-chase* foram conduzidos com intuito de se investigar se o processamento de pró-renina em renina estaria realmente ocorrendo nos grânulos secretórios das células GH4C1, como havia sido descrito em outros tipos celulares.

A linhagem celular GH4C1 é constituída por células hipofisárias de ratos e, portanto, naturalmente secretam a prolactina. Ou seja, a prolactina é armazenada e secretada pelos grânulos secretórios das células GH4C1 – principalmente se estimulados com a adição de substâncias secretagogas – e, portanto, a prolactina pode ser um marcador molecular do funcionamento dos grânulos secretórios.

Na **Figura 19** é possível observar que, em ausência de catepsina B, as células GH4C1 secretam constitutivamente apenas a pró-renina no meio de cultura (linhas 1 e 2). A co-expressão de catepsina induz à secreção de renina (linhas 5 e 6).

Entretanto, não foi possível observar a secreção tanto de pró-renina quanto de renina em presença de secretagogos (linhas 4 e 8), apesar do sistema secretório das células GH4C1 estar funcionando, uma vez que a prolactina armazenada nos grânulos foi secretada em resposta à adição dos secretagogos (linhas 4 *versus* 3 e 8 *versus* 7) (**Figura 19**).



**Figura 19** - Direcionamento da pró-renina para as vias secretórias em células GH4C1 transfetadas.

As células foram eletroporadas com vetores de expressão de pró-renina humana e catepsina B humana, como indicado. Os experimentos de “*pulse-chase*” foram realizados vinte e quatro horas após a realização do procedimento de eletroporação. As células foram radiomarcadas por duas horas com [<sup>35</sup>S] metionina e os sobrenadantes foram, posteriormente, coletados e imunoprecipitados. A coleta de meio de cultura realizada quinze horas após a radiomarcagem visa identificar as proteínas constitutivamente secretadas (linhas 2 e 6). O meio de cultura foi incubado por um período adicional de três horas sem secretagogos (-), sendo as proteínas do sobrenadante novamente imunoprecipitadas com intuito de se identificar se houve secreção constitutiva (linhas 3 e 7). Um novo meio de cultura foi adicionado e incubado por três horas adicionais em presença de secretagogos (+) (10µmol/L de forskolina e 50mmol/L de KCl). Os sobrenadantes foram finalmente coletados e imunoprecipitados com anticorpos policlonais anti-pró-renina/renina e anti-prolactina exatamente como as demais amostras com intuito de se identificar se houve secreção regulada da pró-renina e renina (linhas 4 e 8).

Esse resultado do experimento de *pulse-chase* sugere que o processamento da pró-renina em renina pela catepsina B ocorra fora dos grânulos secretórios das células GH4C1.



### 4.3 VIA INTRACELULAR MEDIADA PELA PRÓ-RENINA EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS

#### 4.3.1 Pró-renina selvagem (*wild type*)

Como previamente demonstrado, o coração é um órgão-alvo do SRA tecidual. O peptídeo cerebral natriurético (BNP) é um hormônio secretado em pequenas quantidades pelo ventrículo de um adulto normal. Entretanto, a expressão de BNP é ativada por estímulos hipertróficos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os cardiomiócitos de ratos neonatos respondem à substâncias tróficas (p. ex. endotelina-1, agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, angiotensina II e estiramento mecânico) com aumento da síntese protéica, aumento do tamanho celular e organização sarcomérica, havendo mudança do repertório de expressão gênica (CHIEN, K. R. *et al.*, 1991) (**Figura 20**).



**Figura 20** – Estímulos hipertróficos em cultura de cardiomiócitos e respectivas respostas gênicas e celulares.

Nakagawa *et al.* (1995) descreveram que a expressão do peptídeo cerebral natriurético (BNP) ocorria em resposta à sobrecarga ventricular mais rapidamente do que a expressão do peptídeo atrial natriurético (ANP). Atualmente, a mensuração da expressão do BNP é utilizada como marcador molecular, sendo um importante método de diagnóstico diferencial em estágios mais brandos da insuficiência cardíaca e um importante fator preditivo do manejo da insuficiência cardíaca avançada (TROUGHTON, R. W. *et al.*, 2000; DAO, Q. *et al.*, 2001).

Sendo assim, realizou-se experimentos com co-culturas de cardiomiócitos de ratos neonatos – transfectados com um plasmídeo repórter (BNP-luciferase) sensível à ativação pela angiotensina II – e células monocíticas em suspensão – transfectadas com pró-renina humana – com intuito de simular, em cultura, condições semelhantes às encontradas no SRA cardíaco.

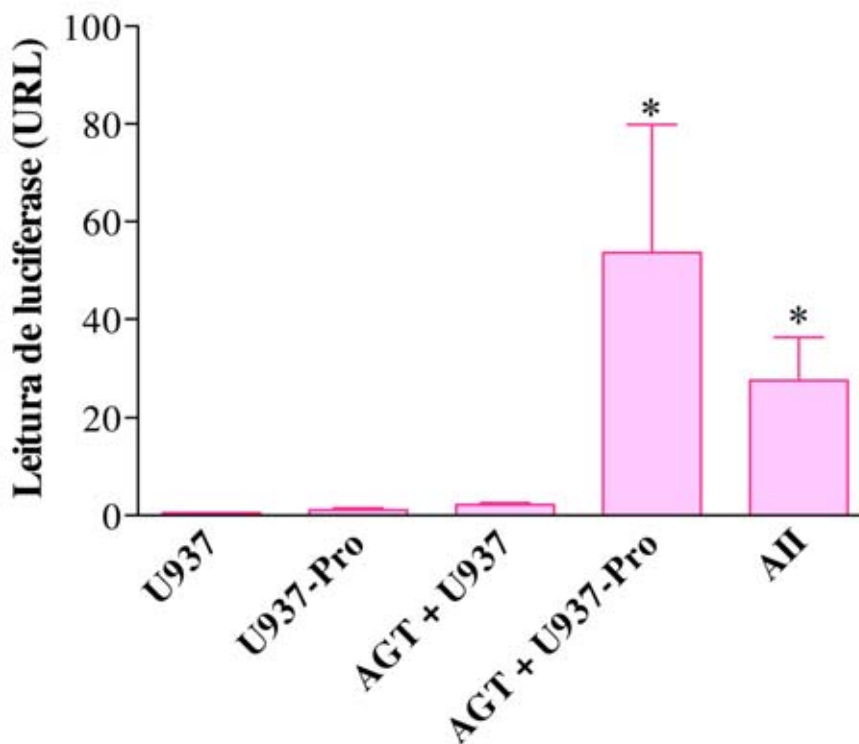
A pró-renina selvagem extracelular (WT) – secretada pelas células U937 – em presença de angiotensinogênio, de alguma forma, eleva a transcrição gênica da luciferase mediada pelo promotor do BNP (Controle =  $0,572 \pm 0,157$  URL *versus* AGT + U937-ProWT =  $58,154 \pm 28,396$  URL, n= 11 e  $p < 0,0001$ ). A ativação transcricional do gene da luciferase em cardiomiócitos expressando angiotensinogênio em co-cultura com a pró-renina selvagem (WT) foi estatisticamente semelhante à adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II ao meio de cultura dos cardiomiócitos (controle positivo) (AGT + U937-ProWT =  $58,154 \pm 28,396$  URL *versus* AII =  $29,798 \pm 9,297$  URL, n = 11 e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 5 e Figura 21**).

**TABELA 5**

Valores, em URL, da leitura de luciferase em cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos à co-cultura com células U937 expressando pró-renina selvagem (WT). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Grupos experimentais</b>		<b>Média <math>\pm</math> EPM (n)</b>	<b>p</b>
<b>Cardiomiócitos</b>	<b>U937</b>		
BNP-Luc	—	$0,572 \pm 0,157$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc	Pró-renina WT	$1,186 \pm 0,440$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AGT	—	$2,186 \pm 0,465$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT	$58,154 \pm 28,396$ URL (11)	$*p < 0,05$
BNP-Luc + AII	—	$29,798 \pm 9,297$ URL (11)	$*p < 0,05$

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 21** - Leitura de luciferase de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com os vetores de expressão da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (BNP-luciferase) e/ou do angiotensinogênio humano (AGT) e em co-cultura com células monocíticas humanas U937 transfectadas (ou não) com o vetor de expressão da pró-renina humana selvagem (U937-Pro). A adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II (AII) no meio de cultura dos cardiomiócitos estimula a ativação do promotor do BNP (controle positivo). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0,  $n = 11$  e  $*p < 0,001$ .

Sendo assim, a presença extracelular de pró-renina humana selvagem (WT) na cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos – que expressam angiotensinogênio humano – é capaz de ativar o promotor do BNP e a transcrição do gene da luciferase.

#### 4.3.2 Pró-renina mutante +5(N/A)

A participação de receptores de manose 6-fosfato – M6P/IGF2R – na captação de pró-renina por cardiomiócitos de ratos sugere o envolvimento de oligossacarídeos nesse reconhecimento celular e, conseqüentemente, uma possível participação das cadeias glicosídicas da pró-renina (VAN KESTEREN, C. A., DANSER, A. H. *et al.*, 1997; PETERS, J. *et*

*al.*, 2002). A mutação da asparagina +5(N/A) parece impedir a ligação da cadeia glicosídica à pró-renina.

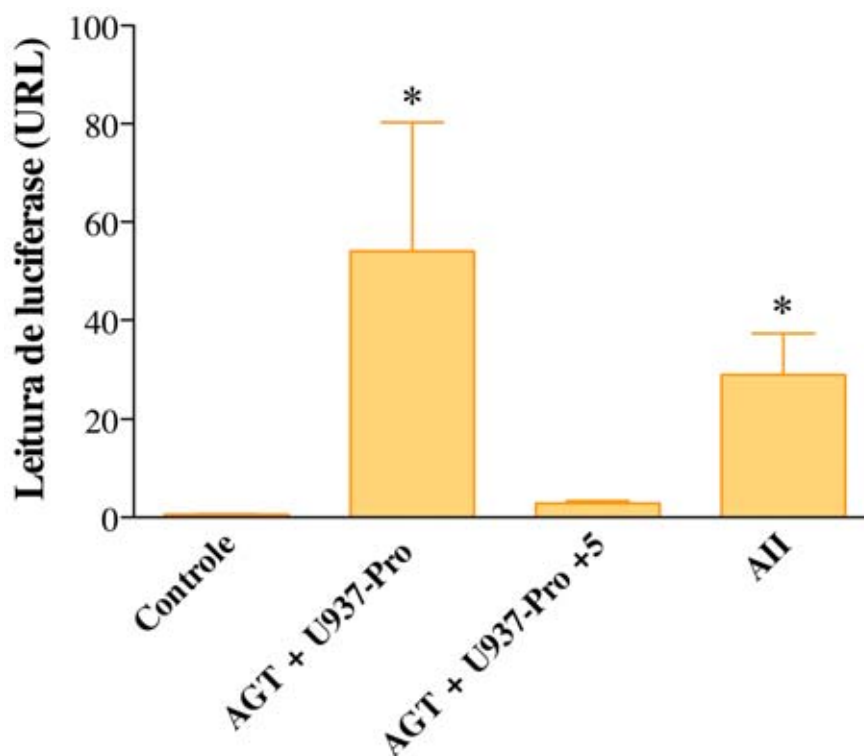
Diferentemente da pró-renina selvagem (WT), a pró-renina mutante +5(N/A) não conseguiu promover, indiretamente, a ativação do promotor do BNP. Conseqüentemente, a transcrição gênica da luciferase foi semelhante à transcrição promovida pela ausência de pró-renina extracelular (controle) (Controle =  $0,621 \pm 0,146$  URL *versus* AGT + U937-Pro +5(N/A) =  $3,717 \pm 0,404$  URL, n = 11 e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 6 e Figura 22**).

**TABELA 6**

Valores, em URL, da leitura de luciferase em cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos à co-cultura com células U937 expressando pró-renina mutante +5(N/A). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Grupos experimentais</b>		<b>Média <math>\pm</math> EPM (n)</b>	<b>p</b>
<b>Cardiomiócitos</b>	<b>U937</b>		
BNP-Luc	—	$0,621 \pm 0,146$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT	$58,392 \pm 28,351$ URL (11)	$*p < 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina +5(N/A)	$3,717 \pm 0,404$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AII	—	$30,918 \pm 8,991$ URL (11)	$*p < 0,05$

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 22** - Leitura de luciferase de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com os vetores de expressão da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (BNP-luciferase) e do angiotensinogênio humano (AGT) e em cocultura com células monocíticas humanas U937 transfectadas com o vetor de expressão da pró-renina humana selvagem (U937-Pro) e mutante (+5(N/A)). A adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II (AII) no meio de cultura dos cardiomiócitos estimula a ativação do promotor do BNP (controle positivo). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0,  $n = 11$  e  $*p < 0,001$ .

Portanto, a cadeia glicosídica ligada à asparagina +5 parece desempenhar importante papel no reconhecimento celular da pró-renina extracelular e, possivelmente, de sua conseqüente captação pelos cardiomiócitos de ratos neonatos.

#### 4.3.3 Pró-renina mutante -1-2(R/A e K/A)

O rim, durante muitos anos, foi tido como o único órgão capaz de converter pró-renina em renina (VON LUTTEROTTI, N. *et al.*, 1994). Entretanto, a identificação dos receptores (PRR) em diversos tecidos reacendeu a possibilidade de outros tecidos serem também aptos a sintetizar renina – a partir da pró-renina circulante – e aumentar a produção de angiotensina II – a partir da clivagem do angiotensinogênio pela pró-renina e/ou renina.

Por outro lado, o tecido cardíaco também expressa a catepsina B – protease candidata à enzima conversora de pró-renina – principalmente em condições patológicas (SEHL, P. D. *et al.*, 2000; GE, J. *et al.*, 2006). Surpreendentemente, o aumento na expressão da catepsina B no tecido cardíaco em condições patológicas parece acompanhar a hiperatividade do sistema renina-angiotensina presente nas cardiopatias.

Com intuito de se investigar uma possível ativação da pró-renina extracelular em cardiomiócitos de ratos, seja não-proteolítica por meio dos receptores (P)RR ou proteolítica por meio da catepsina B – as células U937 foram, então, transfectadas com a pró-renina mutante -1-2(R/A e K/A).

A dupla mutação dos resíduos de arginina-lisina por resíduos de alanina foi testada porque esse par de aminoácidos básicos presente no sítio de clivagem é tido como essencial para o processamento da pró-renina pela PRECE (HIROSE, S. *et al.*, 1985; DO, Y. S. *et al.*, 1987).

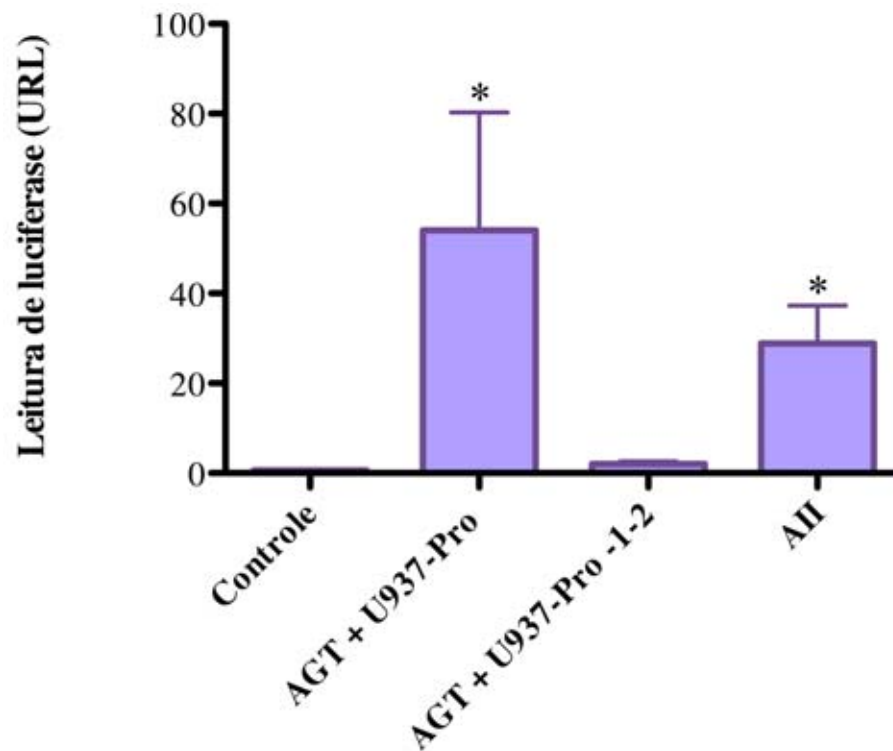
A dupla mutação dos resíduos de arginina-lisina da pró-renina extracelular – -1-2(R/A e K/A) – reduziu significativamente a ativação do promotor do BNP, promovendo leituras de luciferase semelhantes às do grupo controle (Controle =  $0,621 \pm 0,146$  URL *versus* AGT + U937-Pro-1-2 =  $2,149 \pm 0,569$  URL,  $n = 11$  e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 7 e Figura 23**).

**TABELA 7**

Valores, em URL, da leitura de luciferase em cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos à cocultura com células U937 expressando pró-renina mutante -1-2(R/A e K/A). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<u>Grupos experimentais</u>		Média $\pm$ EPM (n)	p
Cardiomiócitos	U937		
BNP-Luc	—	$0,621 \pm 0,146$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT	$58,392 \pm 28,351$ URL (11)	$*p < 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina -1-2(R/A e K/A)	$2,149 \pm 0,569$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AII	—	$30,918 \pm 8,991$ URL (11)	$*p < 0,05$

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 23** - Leitura de luciferase de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com os vetores de expressão da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (BNP-luciferase) e do angiotensinogênio humano (AGT) e em co-cultura com células monocíticas humanas U937 transfectadas com o vetor de expressão da pró-renina humana selvagem (U937-Pro) e mutante (-1-2(R/A e K/A)). A adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II (AII) no meio de cultura dos cardiomiócitos estimula a ativação do promotor do BNP (controle positivo). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0, n = 11 e \*p<0,001.

Portanto, os resíduos de aminoácidos básicos arginina-lisina presentes no sítio de clivagem parecem ser importantes na ativação – proteolítica ou não – da pró-renina humana extracelular e, por conseguinte, na ativação do promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos.

#### 4.3.4 Pró-renina selvagem e captopril

A enzima conversora de angiotensina é a peptidase mais importante da via clássica do SRA e é expressa no tecido cardíaco humano e de ratos. Além disso, é sabido que a ECA tem importante participação na fisiopatogenia de cardiopatias, uma vez que o bloqueio

da ECA realizado por fármacos como o captopril reduz o remodelamento cardíaco pós-infarto e retarda o avanço da insuficiência cardíaca (HOLTZ, J., 1998; LIJNEN, P. e PETROV, V., 1999).

Portanto, a participação da ECA no SRA cardíaco parece ser crucial. Por essa razão, foi adicionado  $10^{-7}$  M de captopril à co-cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com angiotensinogênio humano e o plasmídeo repórter BNP-luciferase e células U937 transfectadas com a pró-renina humana.

A adição de captopril à co-cultura reduziu significativamente a ativação do promotor do BNP e a transcrição gênica da luciferase se comparado ao grupo AGT + U937-ProWT sem captopril (AGT + U937-ProWT =  $57,643 \pm 28,489$  URL *versus* AGT + U937-ProWT + captopril =  $5,423 \pm 1,788$  URL,  $n = 11$  e  $p < 0,0001$ ). Entretanto, se comparado ao grupo controle, a ativação do promotor do BNP em presença do inibidor da ECA difere significativamente da ativação basal verificada no grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$  URL *versus* AGT + U937-ProWT + captopril =  $5,423 \pm 1,788$  URL,  $n = 11$  e  $p < 0,05$ ) (Tabela 8 e Figura 24).

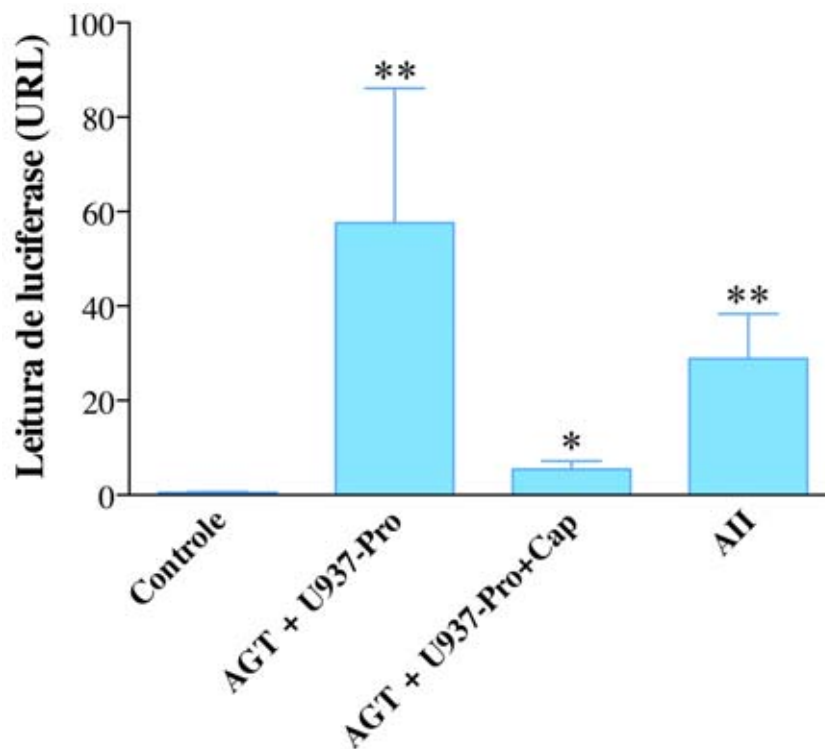
**TABELA 8**

Valores, em URL, da leitura de luciferase em cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos à co-cultura com células U937 expressando pró-renina selvagem em presença de  $10^{-7}$  M de captopril. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Grupos experimentais</b>		<b>Média <math>\pm</math> EPM (n)</b>	<b>p</b>
<b>Cardiomiócitos</b>	<b>U937</b>		
BNP-Luc	—	$0,530 \pm 0,163$ URL (11)	$p > 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT	$57,643 \pm 28,489$ URL (11)	$*p < 0,05$
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT + captopril	$5,423 \pm 1,788$ URL (11)	$*p < 0,05$
BNP-Luc + AII	—	$28,884 \pm 9,518$ URL (11)	$*p < 0,05$

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.





**Figura 24** - Leitura de luciferase de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com os vetores de expressão da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (BNP-luciferase) e do angiotensinogênio humano (AGT) e em co-cultura com células monocíticas humanas U937 transfectadas com o vetor de expressão da pró-renina humana selvagem (U937-Pro) em presença de  $10^{-7}$  M de captopril. A adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II (AII) no meio de cultura dos cardiomiócitos estimula a ativação do promotor do BNP (controle positivo). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0,  $n = 11$  e  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,0001$ .

A enzima conversora de angiotensina parece desempenhar importante função no SRA cardíaco e na ativação intracelular do promotor do BNP. Entretanto, ela não parece ser a única peptidase a atuar nesse sistema tecidual, uma vez que a ativação do promotor do BNP foi significativamente diferente da ativação basal observada no grupo controle.

#### 4.3.5 Pró-renina selvagem e losartan

Os receptores  $AT_1$  de angiotensina II parecem mediar importante atividade fisiopatogênica no SRA cardíaco, uma vez que efeitos tróficos – hipertrofia – são observados quando esses receptores cardíacos são ativados (BOOZ, G. W. e BAKER, K. M., 1996).

A participação dos receptores  $AT_1$  de angiotensina II no SRA cardíaco foi investigada com a adição de  $10^{-7}$  M de losartan – um antagonista de receptores  $AT_1$  – na co-cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com angiotensinogênio humano e o plasmídeo repórter BNP-luciferase incubados com células U937 transfectadas com pró-renina selvagem.

A angiotensina II ( $10^{-7}$  M) e o losartan ( $10^{-7}$  M) foram adicionados à cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com o plasmídeo repórter BNP-luciferase para testar se o losartan realmente era capaz de bloquear os efeitos da angiotensina II em cultura (controle negativo).

Realmente, os receptores  $AT_1$  de angiotensina II parecem estar envolvidos na resposta celular da ativação gênica do BNP. A adição de losartan à co-cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos promoveu uma redução significativa da ativação transcricional do gene da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (AGT + U937-ProWT =  $57,643 \pm 28,489$  URL *versus* AGT + U937-ProWT + losartan =  $5,423 \pm 1,788$  URL, n= 3 e  $p < 0,001$ ). Os efeitos do losartan se assemelham estatisticamente à resposta basal verificada no grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$  URL *versus* AGT + U937-ProWT + losartan =  $4,092 \pm 0,358$  URL, n= 3 e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 9 e Figura 25**).

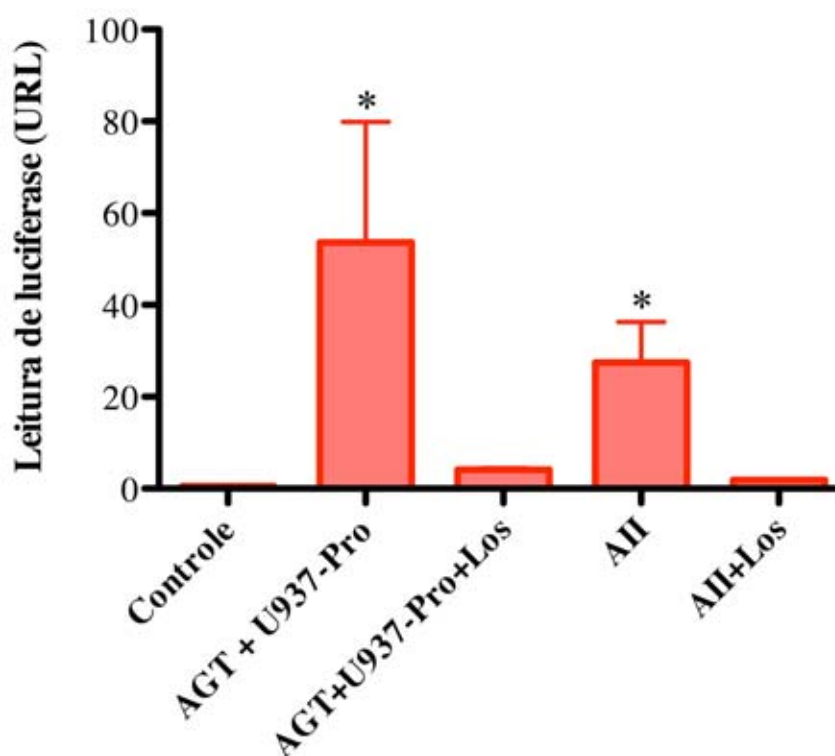
O losartan mostrou-se um fármaco efetivo no bloqueio das ações da angiotensina II nos receptores  $AT_1$ , pois a ativação do promotor do BNP foi estatisticamente semelhante à do grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$  URL *versus* U937 + AII + losartan =  $1,854 \pm 0,077$  URL, n= 3 e  $p > 0,05$ ) (**Tabela 9 e Figura 25**).

TABELA 9

Valores, em URL, da leitura de luciferase em cardiomiócitos de ratos neonatos submetidos à co-cultura com células U937 expressando pró-renina selvagem em presença de  $10^{-7}$  M de losartan. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Grupos experimentais</b>		<b>Média <math>\pm</math> EPM (n)</b>	<b>p</b>
<b>Cardiomiócitos</b>	<b>U937</b>		
BNP-Luc	—	0,530 $\pm$ 0,163 URL (11)	p > 0,05
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT	57,643 $\pm$ 28,489 URL (11)	*p < 0,05
BNP-Luc + AGT	Pró-renina WT + losartan	4,092 $\pm$ 0,358 URL (11)	p > 0,05
BNP-Luc + AII	—	28,884 $\pm$ 9,518 URL (11)	*p < 0,05
BNP-Luc + AII	Losartan	1,854 $\pm$ 0,077 URL (11)	p > 0,05

\* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 24** - Leitura de luciferase de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com os vetores de expressão da luciferase dirigido pelo promotor do BNP (BNP-luciferase) e do angiotensinogênio humano (AGT) e em co-cultura com células monocíticas humanas U937 transfectadas com o vetor de expressão da pró-renina humana selvagem (U937-Pro) em presença de  $10^{-7}$  M de losartan. A adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II (AII) no meio de cultura dos cardiomiócitos estimula a ativação do promotor do BNP (controle positivo) e a adição de  $10^{-7}$  M de

---

losartan reduz a ativação do promotor do BNP (controle negativo). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis com o auxílio do programa computacional Prism GraphPad versão 5.0, n = 3 e \*p<0,0001.

Os receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II participam, de alguma forma, da via de sinalização intracelular que ativa o promotor do BNP e a transcrição gênica da luciferase e o losartan é capaz de bloquear efetivamente as ações da angiotensina II nesse subtipo de receptor.

## V. DISCUSSÃO

Como previamente descrito na literatura científica, as células GH4C1 são incapazes de, fisiologicamente, sintetizar renina a partir da pró-renina humana, secretando-a ainda como um zimogênio no meio de cultura – e visualizado por imunoprecipitação como uma banda de 47 kDa (HATSUZAWA, K. *et al.*, 1990).

Contudo, a co-transfecção de células GH4C1 com pró-renina humana e com PC1 murina, PC5 humana ou catepsina B humana tornam as células hipofisárias aptas a converterem pró-renina em renina, que é secretada no meio de cultura sob estímulo de substâncias secretagogas (WANG, P. H. *et al.*, 1991; BENJANNET, S. *et al.*, 1992; MERCURE, C. *et al.*, 1996).

No presente estudo, foi demonstrado que a co-transfecção de vetores de expressão com os genes da pré-pró-catepsina B humana e da pré-pró-renina humana aumenta a secreção de dois produtos protéicos detectados pela imunoprecipitação: um corresponde à pró-renina – com 47 kDa – e o outro corresponde à renina – com 43 kDa (**Figura 14 A**). Os resultados do experimento de imunoprecipitação foram confirmados pelo ensaio de geração de angiotensina I com a determinação indireta da atividade enzimática da renina secretada no meio de cultura (**Figura 14 B**). Esses resultados corroboram os achados de Neves *et al.* (1996).

A seqüência polipeptídica da pró-renina possui diversos pares de aminoácidos básicos que, teoricamente, poderiam ser alvos da hidrólise enzimática mediada pela catepsina B. Portanto, tornou-se necessária a identificação de quais aminoácidos próximos ao sítio de clivagem da pró-renina contribuem para que ocorra a sua hidrólise pela tiol protease. Para investigar a importância desses resíduos de aminoácidos, as células GH4C1 foram co-transfectadas com vetores de expressão contendo o gene da catepsina B e com o gene de pró-renina mutantes, as quais sofreram substituições dos resíduos de aminoácidos próximos ao sítio de clivagem por alaninas.

Em células GH4C1, as mutações -3(M/A) e -2(K/A), localizadas na porção N-terminal do pró-segmento da pró-renina, reduziu, significativamente, a conversão em renina pela catepsina B, indicando que tanto o resíduo de metionina quanto o resíduo de lisina são importantes para o reconhecimento enzimático e para a subsequente proteólise (**Figura 15 A**). A mutação no resíduo de arginina -1(R/A) não afetou o processamento da pró-renina em renina, se comparada à pró-renina selvagem (WT). Diferentemente do que havia sido

proposto por Hirose *et al.* (1985) e Do *et al.* (1987), o resíduo de arginina -1 parece não ser fundamental para a ativação proteolítica da pró-renina, pelo menos no que tange aos efeitos enzimáticos da catepsina B em células GH4C1. Esses resultados contrapõem a maioria dos achados de Almeida *et al.* (2000) obtidos com peptídeos fluorescentes que mimetizam o sítio de clivagem da pró-renina. Almeida *et al.* (2000) demonstraram, *in vitro*, que a mutação -1(R/A) impede que a catepsina B converta a pró-renina, enquanto as mutações -3(M/A) e -2(K/A) aumentam essa proteólise (ALMEIDA, P. C. *et al.*, 2000).

Essas divergências de resultados poderiam ser atribuídas às diferenças de substratos estudados e às diferentes condições experimentais impostas a ambos os estudos. Apesar de conter a mesma seqüência de aminoácidos do sítio de clivagem da pró-renina, os peptídeos fluorescentes têm a limitação de não representar a holoproteína. Por exemplo, os peptídeos fluorescentes não são glicosilados e, nesse estudo, foi observado que os oligossacarídeos ligados à asparagina +5 parecem desempenhar importante função, uma vez que inibem a proteólise da pró-renina pela catepsina B. Conseqüentemente, os diferentes parâmetros cinéticos apresentados pelos peptídeos fluorescentes em relação à hologlicoproteína podem ser atribuídos à sua limitada estrutura molecular, à ausência de glicosilação no resíduo de asparagina +5 e, quiçá, às possíveis diferenças, ainda desconhecidas, existentes em outros domínios da pró-renina. Sendo assim, os peptídeos que mimetizam o sítio de clivagem da pró-renina poderiam não recriar as condições de proteólise necessárias à ação da catepsina B, tal qual observada com a hologlicoproteína.

Curiosamente, estudos desenvolvidos por Jutras *et al.* (1999) com a pró-renina recombinante secretada pelas células GH4C1 e incubada, *in vitro*, por 6 horas com catepsina B purificada demonstraram que a mutação na lisina -2(K/A) aboliu completamente o processamento da pró-renina. Esse resultado sugere que a lisina -2 é um dos aminoácidos mais importantes para o processamento da pró-renina pela catepsina B. Além disso, mutações na metionina -3(M/A) e arginina -1(R/A) reduziram a hidrólise da pró-renina pela catepsina B em aproximadamente 50%. No mesmo estudo, foi demonstrado que as células AtT20, co-transfectadas com catepsina B, são capazes de converter a pró-renina mutante -1(R/A).

Os resultados de alguns experimentos que compõem este trabalho confirmam a maioria dos achados de Jutras *et al.* (1999). As mutações na lisina -2(K/A) e metionina -3(M/A) reduziram, significativamente, o processamento da pró-renina pela catepsina B, mas não aboliu a formação de renina. Entretanto, ainda neste trabalho foi demonstrado que a mutação na arginina -1(R/A) não impediu o processamento de pró-renina pela catepsina B (**Figura 15 A**). O uso de diferentes métodos experimentais poderia explicar esses resultados

discrepantes. Neste trabalho, o tempo de incubação da pró-renina com a catepsina B foi superior, uma vez que nas células co-transfectadas, a pró-renina coexistiu com a catepsina B por, pelo menos, dezesseis horas, enquanto nos estudos *in vitro* desenvolvidos por Jutras *et al.* (1999) e Almeida *et al.* (2000) os sobrenadantes ricos em pró-renina foram incubados com catepsina B por apenas seis horas.

O efeito da glicosilação no processamento de pró-renina em renina pela catepsina B em células GH4C1 também foi estudado. A substituição do resíduo de asparagina +5(N/A), no qual é normalmente glicosilado, aumenta a hidrólise da pró-renina pela catepsina B em aproximadamente  $132,09 \pm 36,25\%$  (**Figura 16 B**). Por outro lado, o segundo sítio de glicosilação – asparagina +75 – não interferiu significativamente no processamento de pró-renina. Resultados semelhantes foram obtidos por Chu *et al.* (1992), que também demonstraram que a substituição da asparagina +5 por alanina aumentava a conversão da pró-renina.

É convincente pensar que a ruptura da glicosilação no resíduo +5 de asparagina pudesse expor o pró-segmento da pró-renina ao sítio catalítico da catepsina B. Todos esses resultados sugerem que a cadeia de oligossacarídeos ligada ao resíduo de asparagina +5 impede o acesso da catepsina B ao sítio de clivagem da pró-renina. Ou seja, provavelmente, a cadeia de oligossacarídeos vizinha ao sítio de clivagem pudesse executar um efeito protetor dos resíduos de metionina-lisina à ação enzimática da catepsina B. Essa hipótese é sustentada pela observação na qual a mutação da asparagina +5(N/A), que impede a inserção da cadeia glicosídica, recuperou a capacidade proteolítica da catepsina B em relação ao mutante +3(L/A) (**Figura 18**).

Estudos adicionais são necessários para determinar se a cadeia glicosídica ligada próxima ao pró-segmento não seria um mecanismo protetor do sítio de clivagem da ação enzimática da catepsina B ou, até mesmo, de outras proteases que estariam envolvidas na síntese de renina ou no *clearance* da pró-renina.

Mutações C-terminais no pró-segmento da pró-renina também foram avaliadas do resíduo +1 ao +5. Exceto o resíduo de leucina +3 (**Figura 17**), todas as demais mutações não tiveram significativo efeito no processamento pela catepsina B. Resultados semelhantes foram descritos por Jutras *et al.* (1999) e Almeida *et al.* (2000), nos quais mutações na porção C-terminal do pró-segmento não impediram o processamento da pró-renina. Contrariamente, ambos os estudos demonstraram que a mutação na leucina +3(L/A) aumentou o processamento da pró-renina pela catepsina B. A razão para a divergência nesse resultado não

é suficientemente clara, mas é possível que ocorra devido às diferenças metodológicas existentes entre experimentos realizados em culturas de células – *ex vivo* – e reações ocorridas *in vitro*.

Nos experimentos de *pulse-chase* foi novamente observado que a catepsina B é incapaz de direcionar a pró-renina para os grânulos secretórios das células GH4C1 e processá-la em renina. Essas células hipofisárias representam um excelente modelo experimental para o estudo do direcionamento intracelular de pró-renina, uma vez que a prolactina é fisiologicamente armazenada no interior dos grânulos secretórios e é secretada sob estímulo de substâncias secretagogas (REAVES, B. J. *et al.*, 1990). Na **Figura 19** é possível observar que, em ausência de qualquer estímulo, a pró-renina e a renina produzidas pelas células GH4C1 co-transfectadas – ou não – com catepsina B exibiu uma secreção constitutiva semelhante à da prolactina (**Figura 19**, linhas 1-3 e 5-7). Entretanto, quando tratadas com secretagogos, as células GH4C1 secretaram somente a prolactina. Não houve secreção de pró-renina e/ou renina nem mesmo quando as células foram co-transfectadas com catepsina (**Figura 19**, linhas 4 e 8). Esse resultado sugere fortemente que o processamento de pró-renina pela catepsina B ocorre fora dos grânulos secretórios das células GH4C1, ou seja, fora da via secretória regulada.

Considerando que a enzima conversora de pró-renina que atua nas células AtT20 funciona como uma chaperona, pois direciona a pró-renina para os grânulos secretórios onde ocorre o seu processamento e o seu armazenamento, os resultados do experimento de *pulse-chase* não comprovam essa função celular da catepsina B na via secretória de células GH4C1 (BRECHLER, V. *et al.*, 1996). Contudo, esse achado não exclui a possibilidade da catepsina B desempenhar essa função de chaperona em células justaglomerulares. Conseqüentemente, novos estudos serão necessários para responder esse incógnito mecanismo.

O processamento da pró-renina pela catepsina B fora dos grânulos secretórios poderia representar um mecanismo celular de *clearance* protéico ou, até mesmo, um novo mecanismo de produção extra-renal de renina. Por exemplo, existem evidências significativas que sugerem que os cardiomiócitos são células aptas a capturarem a pró-renina e processá-la em renina (VAN KESTEREN, C. A., DANSER, A. H. *et al.*, 1997). Essa captação da pró-renina extracelular explicaria como um camundongo transgênico, que secretava elevados níveis de pró-renina circulante, mas não de renina, desenvolveu hipertrofia cardíaca e glomeruloesclerose sem que houvesse a importante presença do estímulo pressórico ocasionado pela hipertensão arterial sistêmica (VENIANT, M. *et al.*, 1996).



A identificação dos receptores M6P/IGF2R na membrana plasmática de cardiomiócitos de ratos, e de seus efeitos celulares, reforça a hipótese de captação cardíaca da pró-renina circulante. Segundo Saris *et al.* (2002), os receptores M6P/IGF2R estariam envolvidos em um mecanismo de *clearance* tecidual de pró-renina. Sendo assim, a pró-renina usaria os receptores de manose 6-fosfato para entrar nas células e, possivelmente, fora dos grânulos secretórios poderia ser degradada em renina.

Estudos prévios desenvolvidos por Saris *et al.* (2002) demonstraram que os cardiomiócitos de ratos neonatos apresentavam um aumento da síntese protéica, sugestiva de hipertrofia celular, durante a co-incubação extracelular com pró-renina e angiotensinogênio. O aumento da síntese protéica é um método de mensuração de processos hipertróficos celulares. Entretanto, segundo Morgan *et al.* (1996), o tecido cardíaco seria capaz de expressar constitutivamente o angiotensinogênio, estando essa globulina presente no citoplasma das células cardíacas. Sendo assim, foram desenvolvidas co-culturas com intuito de simular situações semelhantes ao estado fisiológico do tecido cardíaco. Os cardiomiócitos de ratos neonatos foram co-transfectados com plasmídeo repórter BNP-luciferase e/ou vetor de expressão com o gene do angiotensinogênio humano, enquanto as células pró-monocíticas – não aderentes – foram transfectadas com o vetor de expressão da pró-renina humana.

O Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) é um hormônio secretado em pequenas quantidades pelo ventrículo humano normal. Já é sabido que agentes tróficos, como a angiotensina II, são capazes de estimular excessivamente a expressão do BNP, sendo esse peptídeo considerado um importante marcador molecular e a sua mensuração, atualmente, constitui um importante fator preditivo para cardiopatias (TROUGHTON, R. W. *et al.*, 2000; DAO, Q. *et al.*, 2001).

Assim como previamente descrito por Saris *et al.* (2002), foi observado que a presença concomitante de pró-renina e angiotensinogênio, mesmo que em compartimentos celulares distintos, é capaz de ativar uma resposta hipertrófica em células cardíacas. Quando incubadas com os cardiomiócitos transfectados, as células U937 não foram capazes de ativar significativamente o promotor do BNP e nem a conseqüente transcrição da luciferase. Esse achado sugere que as células U937 não secretam fatores tróficos capazes de sensibilizar suficientemente o promotor do BNP e, sendo assim, não proporcionariam respostas hipertróficas em células cardíacas. Dessa forma, esse grupo experimental foi estipulado como sendo o controle dos demais grupos. Apenas em presença concomitante de pró-renina humana e angiotensinogênio humano é que foi possível visualizar significativa ativação do promotor do BNP quantificado, indiretamente, pela intensidade luminosa emitida pela luciferase

sintetizada. Em relação ao grupo controle, houve um aumento de mais de 10.000% na leitura de luciferase, o que sugere que a pró-renina e o angiotensinogênio juntos poderiam, de alguma forma, ativar a formação de angiotensina II, que, por sua vez, estimularia uma via intracelular de ativação do promotor do BNP.

Saris *et al.* (2002) demonstraram que os efeitos hipertróficos visualizados como o aumento de síntese protéica em cardiomiócitos incubados com pró-renina em associação ao angiotensinogênio foram compatíveis com os efeitos de 100 nM de angiotensina II, embora os níveis desse octapeptídeo no meio de cultura não tenha ultrapassado 1 nM. Esses achados sugerem que a síntese de angiotensina II seria intracelular. Sendo assim, se a síntese de angiotensina II for realmente intracelular, a captação de pró-renina pelas células cardíacas parece ser um passo crucial nesse processo, podendo ser mediada pelos receptores M6P/IGF2R presentes na membrana plasmática dos cardiomiócitos (SARIS, J. J. *et al.*, 2001). Ao chegar no citoplasma dos cardiomiócitos, a pró-renina deveria ser processada em renina, dando início à via clássica do SRA no meio intracelular. Esse processamento poderia ocorrer segundo um mecanismo de *clearance* de pró-renina em que não se descarta a possibilidade da catepsina B, ou outras proteases, atuarem no citoplasma dos cardiomiócitos.

Outra possibilidade para a geração intracelular de angiotensina II seria a hidrólise do angiotensinogênio pela pró-renina – ou renina – ainda no meio extracelular seguido pela conversão de angiotensina I em II no citoplasma dos cardiomiócitos. Segundo Nguyen *et al.* (2002), a pró-renina é capaz de se ligar aos receptores (P)RR ancorados à membrana plasmática de cardiomiócitos e ter seu pró-segmento deslocado, tornando-a enzimaticamente ativa. Além disso, caso a renina produzida no citoplasma por meio do *clearance* de pró-renina fosse secretada no meio de cultura dos cardiomiócitos, ainda assim a ela poderia se ligar aos receptores (P)RR, aumentando a sua capacidade proteolítica em quatro vezes.

A co-cultura de cardiomiócitos transfectados com o angiotensinogênio humano em contato com as células U937 transfectadas com a pró-renina humana ativou o promotor do BNP de modo que as leituras de luciferase foram estatisticamente semelhante à adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina II à cultura (AGT + U937-ProWT =  $58,154 \pm 28,396$  URL *versus* AII =  $29,798 \pm 9,297$  URL, n = 11 e  $p > 0,05$ ) (**Figura 21**). Assim como descrito por Saris *et al.* (2002), o estímulo hipertrófico observado com a associação de angiotensinogênio e pró-renina em co-cultura de cardiomiócitos é compatível com os efeitos de 100 nM (ou  $10^{-7}$  M) de angiotensina II.

Curiosamente, a taxa de ativação da transcrição gênica da luciferase observada em cardiomiócitos transfectados com angiotensinogênio humano e co-incubados com células

U937 não-transfectadas com pró-renina humana foi estatisticamente superior à ativação do grupo controle (Controle =  $1,000 \pm 0,000$  versus AGT + U937 =  $9,721 \pm 3,399$ ,  $n = 11$  e  $p < 0,05$ ) (**Tabela 24 – Anexo A**). Esse resultado sugere que, mesmo em ausência de pró-renina humana extracelular, os cardiomiócitos, ainda assim, foram capazes de clivar o angiotensinogênio e ativar o promotor do BNP de modo estatisticamente significativo. O angiotensinogênio humano poderia estar susceptível à ação enzimática da pró-renina/renina presente no tecido cardíaco, uma vez que o mRNA da pró-renina já foi diversas vezes detectado em cardiomiócitos (DZAU, V. J., ELLISON, K. E. *et al.*, 1987; PAUL, M. *et al.*, 1988; PAUL, M. *et al.*, 1993). Todavia, a renina murina não é capaz de clivar o angiotensinogênio humano (BOHLENDER, J. *et al.*, 1996). Conseqüentemente, há de se pensar na possibilidade de outras proteases, como a tonina e a catepsina G, clivarem diretamente o angiotensinogênio intracelular em angiotensina II, o que reforçaria a existência de uma importante via alternativa de geração de angiotensina II em células cardíacas.

Como os receptores M6P/IGF2R podem estar envolvidos na captação da pró-renina extracelular por cardiomiócitos e esses receptores têm afinidade por proteínas fosfomanosiladas, como a pró-renina e a renina, supõe-se que os seus resíduos de carboidratos presentes nas cadeias glicosídicas poderiam, então, desempenhar uma importante função no mecanismo de captação dessas proteínas. Sendo assim, as células U937 passaram a ser transfectadas com a pró-renina mutante +5(N/A), em que a substituição da asparagina +5 por alanina não permite a inserção da cadeia glicosídica, e foram incubadas com cardiomiócitos transfectados com o angiotensinogênio humano para posterior leitura de luciferase.

A cadeia glicosídica ligada à asparagina +5 da pró-renina parece desempenhar um importante papel no mecanismo de ativação do promotor do BNP, uma vez que a mutação nesse resíduo de aminoácido aboliu a ativação transcricional da luciferase, sendo as leituras estatisticamente semelhantes às do grupo controle (Controle =  $0,621 \pm 0,146$  URL versus AGT + U937-Pro +5(N/A) =  $3,717 \pm 0,404$  URL,  $n = 11$  e  $p > 0,05$ ) (**Figura 22**). Esse resultado corrobora a hipótese de haver importante participação dos resíduos de oligossacarídeos no reconhecimento e na captação de pró-renina mediada pelos receptores M6P/IGF2R, uma vez que a inexistência dos resíduos de carboidratos próximos ao sítio de clivagem parecem interferir na resposta à estimulação do promotor do BNP em células cardíacas.

Com intuito de se verificar um possível processamento da pró-renina em renina pelos cardiomiócitos de ratos neonatos, as células U937 foram transfectadas com a pró-renina mutante -1-2(R/A e K/A). Segundo Hirose *et al.* (1985) e Do *et al.* (1987), o par de

aminoácidos básicos lisina-arginina são essenciais para o reconhecimento e o processamento da pró-renina pela PRECE. Sendo assim, a dupla mutação em ambos os resíduos interferiria, teoricamente, nesse reconhecimento e, se realmente esses resíduos são essenciais, a dupla mutação aboliria a conversão em renina.

Surpreendentemente, a dupla mutação -1-2(R/A e K/A) reduziu significativamente a ativação do promotor do BNP, sendo as leituras de luciferase desse grupo experimental semelhantes às do grupo controle (Controle =  $0,621 \pm 0,146$  URL *versus* AGT + U937-Pro-1-2 =  $2,149 \pm 0,569$  URL,  $n = 11$  e  $p > 0,05$ ) (**Figura 23**). Existem inúmeras elucubrações acerca desse resultado. Primeiramente, o par de aminoácidos é, realmente, essencial para o processamento da pró-renina por uma determinada protease em cardiomiócitos. Ou, assim como demonstrado em células hipofisárias, apenas a lisina -2(K/A) seria necessária ao processamento da pró-renina, não havendo participação da mutação na arginina -1(R/A). Ademais, um ou ambos os aminoácidos mutados poderiam ser importantes na ligação da pró-renina ao receptor (P)RR e, talvez, na sua ativação não-proteolítica. Caso fosse verdadeira essa afirmação, a dupla mutação -1-2(R/A e K/A) poderia reduzir a clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I mediada pela ligação da pró-renina aos receptores (P)RR.

É sabido que a enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma peptidase importantíssima na ativação da via clássica do SRA e, também, parece desempenhar papel crucial no SRA cardíaco, principalmente na fisiopatogenia de doenças cardiovasculares. Entretanto, a quimase cardíaca também parece ter participação na formação alternativa de angiotensina II cardíaca. Urata *et al.* (1990) descreveram que cerca de 80% da angiotensina II presente no coração seria originária da ação enzimática da quimase. Atualmente, não se acredita que a via alternativa seja capaz de superar os efeitos da ECA e formar 80% da angiotensina II cardíaca, uma vez que a inibição da via clássica com o uso de fármacos inibidores de ECA no tratamento de cardiomiopatias têm comprovada eficácia terapêutica.

Sendo assim, a co-cultura de cardiomiócitos transfectados com angiotensinogênio humano e células U937 transfectadas com pró-renina humana selvagem (WT) foi tratada com  $10^{-7}$  M de captopril – um inibidor da ECA. A inibição da via clássica mediada pelo captopril reduziu significativamente a ativação do promotor do BNP em relação ao mesmo grupo experimental não tratado com o fármaco inibidor da ECA (AGT + U937-ProWT =  $57,643 \pm 28,489$  URL *versus* AGT + U937-ProWT + captopril =  $5,423 \pm 1,788$  URL,  $n = 11$  e  $p < 0,0001$ ) (**Figura 24**). Contudo, a leitura de luciferase do grupo experimental tratado com captopril é significativamente superior à leitura do grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$

URL versus AGT + U937-ProWT + captopril =  $5,423 \pm 1,788$  URL,  $n = 11$  e  $p < 0,05$ ) (**Figura 24**). Esse resultado sugere que a ECA seja, realmente, a peptidase mais importante no SRA cardíaco, pois o uso de  $10^{-7}$  M de captopril na co-cultura reduziu em  $90,59 \pm 6,28\%$  a atividade transcricional do gene da luciferase. Entretanto, o captopril não foi capaz de executar um completo bloqueio na ativação transcricional do gene da luciferase. A diferença estatisticamente significativa existente entre a leitura de luciferase do grupo experimental tratado com captopril e do grupo controle sugere a participação de outra peptidase, que não a ECA, nesse processo. Sendo assim, a via alternativa pode desempenhar realmente um papel no SRA cardíaco, havendo a possível atuação enzimática da quimase. Esse efeito totaliza cerca de 9,41% da ativação do promotor do BNP, o que contrapõe os resultados de Urata *et al.* (1990), mas, que corrobora a hipótese da quimase ter participação inferior à ECA no SRA cardíaco, que é clinicamente visualizada com a eficácia terapêutica de fármacos como o captopril no tratamento de doenças cardiovasculares.

Como previamente descrito, os receptores  $AT_1$  de angiotensina II parecem mediar importantes efeitos patológicos da angiotensina II, inclusive miocárdicos, como a hipertrofia celular (BOOZ, G. W. e BAKER, K. M., 1996). Portanto, a participação dos receptores  $AT_1$  na ativação transcricional da luciferase foi investigada com o uso de  $10^{-7}$  M de losartan – um antagonista de receptores  $AT_1$  – na co-cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos transfectados com angiotensinogênio humano e incubados com células U937 transfectadas com pró-renina humana selvagem. A redução significativa da ativação do promotor do BNP em presença de losartan, em relação ao grupo não tratado, sugere importante participação dos receptores  $AT_1$  na via de sinalização celular que culmina com a transcrição gênica da luciferase (AGT + U937-ProWT =  $57,643 \pm 28,489$  URL versus AGT + U937-ProWT + losartan =  $5,423 \pm 1,788$  URL,  $n = 3$  e  $p < 0,001$ ) (**Figura 25**). Diferentemente do tratamento com captopril, o uso do losartan reduziu a ativação transcricional da luciferase às leituras do grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$  URL versus AGT + U937-ProWT + losartan =  $4,092 \pm 0,358$  URL,  $n = 3$  e  $p > 0,05$ ) (**Figura 25**). Farmacologicamente, o losartan mostrou-se um fármaco efetivo ao bloquear os efeitos de  $10^{-7}$  M de angiotensina II nos receptores  $AT_1$ , pois a ativação do promotor do BNP foi estatisticamente semelhante à ativação do grupo controle (Controle =  $0,530 \pm 0,163$  URL versus U937 + AII + losartan =  $1,854 \pm 0,077$  URL,  $n = 3$  e  $p > 0,05$ ) (**Figura 25**).

Obviamente, inúmeros outros estudos científicos devem ser conduzidos no sentido de se investigar todos os processos moleculares envolvidos no SRA cardíaco. Seria realmente interessante poder visualizar a captação de pró-renina por meio de microscopias de

fluorescência e, quiçá, poder observar se a sua conversão em renina seria realmente um mecanismo de *clearance*.

Além disso, seria verdadeiramente instigante identificar se a clivagem enzimática do angiotensinogênio seria apenas efetuada por ativação não-proteolítica da pró-renina pelos receptores (P)RR ou, ainda, se existiria uma protease capaz de ativá-la por meio da remoção enzimática do seu pró-segmento. Não podemos descartar a possibilidade da catepsina B assumir um papel proteolítico da pró-renina cardíaca, de forma semelhante a qual ela atua em células hipofisárias GH4C1. Sehl *et al.* (2000) identificaram a expressão de catepsina B, por meio da técnica de cDNA *microarray*, em fagócitos mononucleares em tecido cardíaco de ratos infartados. Ainda segundo Sehl *et al.* (2000) a expressão de catepsina B é maior no 10º dia do que no 4º após o infarto, sugerindo uma importante participação da catepsina B no remodelamento e no reparo tecidual pós-isquemia. Coincidentemente, há um aumento na expressão da ECA em tecidos infartados, o que sugere uma hiperatividade do SRA cardíaco após a instalação da lesão isquêmica com os mesmos propósitos do aumento da expressão de catepsina B (WEBER, K. T. e SUN, Y., 2000). Ge *et al.* (2006) demonstraram a presença de catepsina B em corações humanos saudáveis e insuficientes. Entretanto, os níveis do mRNA e protéicos da catepsina B foram significativamente superiores em corações humanos com insuficiência, outra situação patológica em que, coincidentemente, também há hiperatividade do SRA.

## VI. CONCLUSÕES

Em suma, no presente trabalho foi demonstrado que:

1. A catepsina B humana é capaz de converter a pró-renina humana em renina em células GH4C1.

2. A metionina -3 e a lisina -2 localizadas na porção N-terminal do sítio de clivagem da pró-renina humana foram identificadas como sendo importantes resíduos de aminoácidos para o eficiente processamento de pró-renina em renina em células hipofisárias GH4C1.

3. Os oligossacarídeos ligados à asparagina +5 da pró-renina humana parecem realizar um impedimento estérico do sítio de clivagem, executando um possível mecanismo protetor da proteólise desse zimogênio.

4. A leucina +3 localizada na porção C-terminal do sítio de clivagem da pró-renina humana parece ser um resíduo de aminoácido importante para o eficiente processamento da pró-renina em renina apenas quando a cadeia de oligossacarídeos encontra-se ligada à asparagina +5.

5. O processamento de pró-renina humana em renina pela ação enzimática da catepsina B ocorre fora dos grânulos secretórios das células GH4C1, sugerindo que essa tiol protease não seria capaz de direcionar a pró-renina à via regulada de secreção celular.

6. Cardiomiócitos de ratos neonatos foram capazes de ativar uma cascata intracelular durante a co-expressão de angiotensinogênio humano e pró-renina humana, culminando com a significativa ativação do promotor do BNP, um efeito gênico estatisticamente semelhante ao provocado pela adição de  $10^{-7}$  M de angiotensina à co-cultura.

7. A cadeia de oligossacarídeos fosfomanosilados ligada à asparagina +5 da pró-renina parece desempenhar importante efeito na via intracelular de ativação do promotor do BNP.

8. A arginina -1 e a lisina -2 presentes na porção N-terminal do pró-segmento da pró-renina humana parecem ser importantes resíduos de aminoácidos envolvidos na ativação dessa via intracelular, resultando na ativação do promotor do BNP.

9. A enzima conversora de angiotensina parece desempenhar um papel proteolítico fundamental, mas não exclusivo, na via intracelular de ativação do promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos, assim como os receptores  $AT_1$  de angiotensina II.

---

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; EL MASSIERY, A. e QUITTERER, U. **Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness.** Nat Med, v. 7, n. 9, p. 1003-1009, Sep 2001.

ABDALLA, S.; LOTHER, H. e QUITTERER, U. **AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration.** Nature, v. 407, n. 6800, p. 94-98, Sep 7 2000.

AGUILERA, G. e CATT, K. **Regulation of vascular angiotensin II receptors in the rat during altered sodium intake.** Circ Res, v. 49, n. 3, p. 751-758, Sep 1981.

ALBISTON, A. L.; MUSTAFA, T.; MCDOWALL, S. G.; MENDELSON, F. A.; LEE, J. e CHAI, S. Y. **AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement.** Trends Endocrinol Metab, v. 14, n. 2, p. 72-77, Mar 2003.

ALLEN, A. M.; ZHUO, J. e MENDELSON, F. A. **Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors.** J Am Soc Nephrol, v. 10 Suppl 11, p. S23-29, Jan 1999.

**Localization and function of angiotensin AT1 receptors.** Am J Hypertens, v. 13, n. 1 Pt 2, p. 31S-38S, Jan 2000.

ALMEIDA, P. C.; OLIVEIRA, V.; CHAGAS, J. R.; MELDAL, M.; JULIANO, M. A. e JULIANO, L. **Hydrolysis by cathepsin B of fluorescent peptides derived from human prorenin.** Hypertension, v. 35, n. 6, p. 1278-1283, Jun 2000.

ANVERSA, P.; CHENG, W.; LIU, Y.; LERI, A.; REDAELLI, G. e KAJSTURA, J. **Apoptosis and myocardial infarction.** Basic Res Cardiol, v. 93 Suppl 3, p. 8-12, 1998.

ARDAILLOU, R. **Angiotensin II receptors.** J Am Soc Nephrol, v. 10 Suppl 11, p. S30-39, Jan 1999.



ASANO, K.; DUTCHER, D. L.; PORT, J. D.; MINOBE, W. A.; TREMMEL, K. D.; RODEN, R. L. *et al.* **Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium.** *Circulation*, v. 95, n. 5, p. 1193-1200, Mar 4 1997.

ATLAS, S. A. **The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition.** *J Manag Care Pharm*, v. 13, n. 8 Suppl B, p. 9-20, Oct 2007.

BADER, M. **Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage.** *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 38 Suppl 2, p. S7-9, Nov 2001.

BALCELLS, E.; MENG, Q. C.; HAGEMAN, G. R.; PALMER, R. W.; DURAND, J. N. e DELL'ITALIA, L. J. **Angiotensin II formation in dog heart is mediated by different pathways in vivo and in vitro.** *Am J Physiol*, v. 271, n. 2 Pt 2, p. H417-421, Aug 1996.

BAXTER, J. D.; JAMES, M. N.; CHU, W. N.; DUNCAN, K.; HAIDAR, M. A.; CARILLI, C. T. *et al.* **The molecular biology of human renin and its gene.** *Yale J Biol Med*, v. 62, n. 5, p. 493-501, Sep-Oct 1989.

BENESSIANO, J.; CRESTANI, B.; MESTARI, F.; KLOUCHE, W.; NEUKIRCH, F.; HACEIN-BEY, S. *et al.* **High frequency of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in asthma.** *J Allergy Clin Immunol*, v. 99, n. 1 Pt 1, p. 53-57, Jan 1997.

BENJANNET, S.; REUDELHUBER, T.; MERCURE, C.; RONDEAU, N.; CHRETIEN, M. e SEIDAH, N. G. **Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment. Cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1.** *J Biol Chem*, v. 267, n. 16, p. 11417-11423, Jun 5 1992.

BERK, B. C. e CORSON, M. A. **Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases.** *Circ Res*, v. 80, n. 5, p. 607-616, May 1997.

BERRY, C.; TOUYZ, R.; DOMINICZAK, A. F.; WEBB, R. C. e JOHNS, D. G. **Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 281, n. 6, p. H2337-2365, Dec 2001.

BLAIR-WEST, J. R.; COGHLAN, J. P.; DENTON, D. A.; FEI, D. T.; HARDY, K. J.; SCOGGINS, B. A. *et al.* **A dose-response comparison of the actions of angiotensin II and angiotensin III in sheep.** *J Endocrinol*, v. 87, n. 3, p. 409-417, Dec 1980.

BLOEM, L. J.; MANATUNGA, A. K.; TEWKSBURY, D. A. e PRATT, J. H. **The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children.** J Clin Invest, v. 95, n. 3, p. 948-953, Mar 1995.

BLONDEL, B.; ROIJEN, I. e CHENEVAL, J. P. **Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts.** Experientia, v. 27, n. 3, p. 356-358, Mar 15 1971.

BOFFA, J. J.; THARAUX, P. L.; PLACIER, S.; ARDAILLOU, R.; DUSSAULE, J. C. e CHATZIANTONIOU, C. **Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal vasculature of transgenic mice during inhibition of nitric oxide synthesis: evidence for an endothelin-mediated mechanism.** Circulation, v. 100, n. 18, p. 1901-1908, Nov 2 1999.

BOHLENDER, J.; MENARD, J.; WAGNER, J.; LUFT, F. C. e GANTEN, D. **Human renin-dependent hypertension in rats transgenic for human angiotensinogen.** Hypertension, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 535-540, Mar 1996.

BOOZ, G. W. e BAKER, K. M. **Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy.** Hypertension, v. 28, n. 4, p. 635-640, Oct 1996.

BRECHLER, V.; CHU, W. N.; BAXTER, J. D.; THIBAUT, G. e REUDELHUBER, T. L. **A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway.** J Biol Chem, v. 271, n. 34, p. 20636-20640, Aug 23 1996.

BURCKLE, C. A.; JAN DANSER, A. H.; MULLER, D. N.; GARRELD, I. M.; GASC, J. M.; POPOVA, E. *et al.* **Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats.** Hypertension, v. 47, n. 3, p. 552-556, Mar 2006.

CAMBIEN, F.; ALHENC-GELAS, F.; HERBETH, B.; ANDRE, J. L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F. *et al.* **Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study.** Am J Hum Genet, v. 43, n. 5, p. 774-780, Nov 1988.

CAO, Z.; DEAN, R.; WU, L.; CASLEY, D. e COOPER, M. E. **Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy.** Hypertension, v. 34, n. 3, p. 408-414, Sep 1999.

CAREY, R. M. e SIRAGY, H. M. **Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.** *Endocr Rev*, v. 24, n. 3, p. 261-271, Jun 2003.

CARILLI, C. T.; VIGNE, J. L.; WALLACE, L. C.; SMITH, L. M.; WONG, M. A.; LEWICKI, J. A. *et al.* **Characterization of recombinant human prorenin and renin.** *Hypertension*, v. 11, n. 6 Pt 2, p. 713-716, Jun 1988.

CASARINI, D. E.; PLAVINIK, F. L.; ZANELLA, M. T.; MARSON, O.; KRIEGER, J. E.; HIRATA, I. Y. *et al.* **Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme.** *Int J Biochem Cell Biol*, v. 33, n. 1, p. 75-85, Jan 2001.

CASTELLANO, M.; GLORIOSO, N.; CUSI, D.; SARZANI, R.; FABRIS, B.; OPOCHER, G. *et al.* **Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project.** *J Hypertens*, v. 21, n. 10, p. 1853-1860, Oct 2003.

CATANZARO, D. F. **Physiological relevance of renin/prorenin binding and uptake.** *Hypertens Res*, v. 28, n. 2, p. 97-105, Feb 2005.

CHAI, S. Y.; FERNANDO, R.; PECK, G.; YE, S. Y.; MENDELSON, F. A.; JENKINS, T. A. *et al.* **The angiotensin IV/AT4 receptor.** *Cell Mol Life Sci*, v. 61, n. 21, p. 2728-2737, Nov 2004.

CHAKI, S. e INAGAMI, T. **New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis.** *Mol Pharmacol*, v. 43, n. 4, p. 603-608, Apr 1993.

**Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 182, n. 1, p. 388-394, Jan 15 1992.

CHAN, S. J.; SAN SEGUNDO, B.; MCCORMICK, M. B. e STEINER, D. F. **Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, n. 20, p. 7721-7725, Oct 1986.

CHAUVEL, E. N.; LLORENS-CORTES, C.; CORIC, P.; WILK, S.; ROQUES, B. P. e FOURNIE-ZALUSKI, M. C. **Differential inhibition of aminopeptidase A and aminopeptidase N by new beta-amino thiols.** *J Med Chem*, v. 37, n. 18, p. 2950-2957, Sep 2 1994.

CHIEN, K. R.; KNOWLTON, K. U.; ZHU, H. e CHIEN, S. **Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response.** FASEB J, v. 5, n. 15, p. 3037-3046, Dec 1991.

CHLOPČIKOVA, S.; PSOTOVA, J. e MIKETOVA, P. **Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart.** Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, v. 145, n. 2, p. 49-55, Dec 2001.

CHU, W. N.; BAXTER, J. D. e REUDELHUBER, T. L. **A targeting sequence for dense secretory granules resides in the active renin protein moiety of human prorenin.** Mol Endocrinol, v. 4, n. 12, p. 1905-1913, Dec 1990.

CHU, W. N.; MERCURE, C.; BAXTER, J. D. e REUDELHUBER, T. L. **Molecular determinants of human prorenin processing.** Hypertension, v. 20, n. 6, p. 782-787, Dec 1992.

CIGOLA, E.; KAJSTURA, J.; LI, B.; MEGGS, L. G. e ANVERSA, P. **Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro.** Exp Cell Res, v. 231, n. 2, p. 363-371, Mar 15 1997.

COOPER, W. O.; HERNANDEZ-DIAZ, S.; ARBOGAST, P. G.; DUDLEY, J. A.; DYER, S.; GIDEON, P. S. *et al.* **Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors.** N Engl J Med, v. 354, n. 23, p. 2443-2451, Jun 8 2006.

CORVOL, P. e JEUNEMAITRE, X. **Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen.** Endocr Rev, v. 18, n. 5, p. 662-677, Oct 1997.

CRABOS, M.; ROTH, M.; HAHN, A. W. e ERNE, P. **Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression.** J Clin Invest, v. 93, n. 6, p. 2372-2378, Jun 1994.

CRACKOWER, M. A.; SARAIO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E. *et al.* **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.** Nature, v. 417, n. 6891, p. 822-828, Jun 20 2002.

CRISCIONE, L.; THOMANN, H.; WHITEBREAD, S.; DE GASPARO, M.; BUHLMAYER, P.; HEROLD, P. *et al.* **Binding characteristics and vascular effects of various angiotensin II antagonists.** J Cardiovasc Pharmacol, v. 16 Suppl 4, p. S56-59, 1990.

DAHMS, N. M. **Insulin-like growth factor II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor and lysosomal enzyme recognition.** Biochem Soc Trans, v. 24, n. 1, p. 136-141, Feb 1996.

DAHMS, N. M.; LOBEL, P.; BREITMEYER, J.; CHIRGWIN, J. M. e KORNFELD, S. **46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor.** Cell, v. 50, n. 2, p. 181-192, Jul 17 1987.

DANSER, A. H.; VAN KATS, J. P.; ADMIRAAL, P. J.; DERKX, F. H.; LAMERS, J. M.; VERDOUW, P. D. *et al.* **Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis.** Hypertension, v. 24, n. 1, p. 37-48, Jul 1994.

DANSER, A. H.; VAN KESTEREN, C. A.; BAX, W. A.; TAVENIER, M.; DERKX, F. H.; SAXENA, P. R. *et al.* **Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding.** Circulation, v. 96, n. 1, p. 220-226, Jul 1 1997.

DAO, Q.; KRISHNASWAMY, P.; KAZANEGRA, R.; HARRISON, A.; AMIRNOVIN, R.; LENERT, L. *et al.* **Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting.** J Am Coll Cardiol, v. 37, n. 2, p. 379-385, Feb 2001.

DE CARVALHO FRIMM, C.; SUN, Y. e WEBER, K. T. **Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart.** J Lab Clin Med, v. 129, n. 4, p. 439-446, Apr 1997.

DE GASPARO, M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W. e UNGER, T. **International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.** Pharmacol Rev, v. 52, n. 3, p. 415-472, Sep 2000.

DE LANNOY, L. M.; DANSER, A. H.; VAN KATS, J. P.; SCHOEMAKER, R. G.; SAXENA, P. R. e SCHALEKAMP, M. A. **Renin-angiotensin system components in the interstitial fluid of the isolated perfused rat heart. Local production of angiotensin I.** Hypertension, v. 29, n. 6, p. 1240-1251, Jun 1997.

DECHEND, R.; MULLER, D. N.; WALLUKAT, G.; HOMUTH, V.; KRAUSE, M.; DUDENHAUSEN, J. *et al.* **Activating auto-antibodies against the AT1 receptor in preeclampsia.** *Autoimmun Rev*, v. 4, n. 1, p. 61-65, Jan 2005.

DERKX, F. H. e SCHALEKAMP, M. A. **Human prorenin: pathophysiology and clinical implications.** *Clin Exp Hypertens A*, v. 10, n. 6, p. 1213-1225, 1988.

DERKX, F. H.; TAN-TJIONG, H. L.; MAN IN'T VELD, A. J.; SCHALEKAMP, M. P. e SCHALEKAMP, M. A. **Activation of inactive plasma renin by tissue kallikreins.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 49, n. 5, p. 765-769, Nov 1979.

DERKX, F. H.; VON GOOL, J. M.; WENTING, G. J.; VERHOEVEN, R. P.; MAN IN 'T VELD, A. J. e SCHALEKAMP, M. A. **Inactive renin in human plasma.** *Lancet*, v. 1, n. 7984, p. 496-499, Sep 4 1976.

DICKSTEIN, K. e KJEKSHUS, J. **Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan.** *Lancet*, v. 360, n. 9335, p. 752-760, Sep 7 2002.

DIEP, Q. N.; EL MABROUK, M.; YUE, P. e SCHIFFRIN, E. L. **Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 282, n. 5, p. H1635-1641, May 2002.

DIEZ, J.; PANIZO, A.; HERNANDEZ, M.; VEGA, F.; SOLA, I.; FORTUNO, M. A. *et al.* **Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*, v. 30, n. 5, p. 1029-1034, Nov 1997.

DO, Y. S.; SHINAGAWA, T.; TAM, H.; INAGAMI, T. e HSUEH, W. A. **Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure.** *J Biol Chem*, v. 262, n. 3, p. 1037-1043, Jan 25 1987.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N. *et al.* **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** *Circ Res*, v. 87, n. 5, p. E1-9, Sep 1 2000.

DUSSAULE, J. C.; STEFANSKI, A.; BEA, M. L.; RONCO, P. e ARDAILLOU, R. **Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex.** Am J Physiol, v. 264, n. 1 Pt 2, p. F45-52, Jan 1993.

DZAU, V. J.; ELLISON, K. E.; BRODY, T.; INGELFINGER, J. e PRATT, R. E. **A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues.** Endocrinology, v. 120, n. 6, p. 2334-2338, Jun 1987.

DZAU, V. J.; GONZALEZ, D.; KAEMPFER, C.; DUBIN, D. e WINTROUB, B. U. **Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin.** Circ Res, v. 60, n. 4, p. 595-601, Apr 1987.

ERDOS, E. G. e SKIDGEL, R. A. **Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones.** FASEB J, v. 3, n. 2, p. 145-151, Feb 1989.

**The angiotensin I-converting enzyme.** Lab Invest, v. 56, n. 4, p. 345-348, Apr 1987.

FDA. FDA Public Health Advisory. *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (ACE inhibitor) Drugs and Pregnancy*, 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/CDER/drug/advisory/ACEI.htm>>. Acesso em: 11/12/2008.

FERRARIO, C. M. **Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research.** J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, v. 7, n. 1, p. 3-14, Mar 2006.

FERREIRA, S. H. **A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca.** Br J Pharmacol Chemother, v. 24, p. 163-169, Feb 1965.

FIORDALISO, F.; LI, B.; LATINI, R.; SONNENBLICK, E. H.; ANVERSA, P.; LERI, A. *et al.* **Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent.** Lab Invest, v. 80, n. 4, p. 513-527, Apr 2000.

FRITZ, L. C.; ARFSTEN, A. E.; DZAU, V. J.; ATLAS, S. A.; BAXTER, J. D.; FIDDES, J. C. *et al.* **Characterization of human prorenin expressed in mammalian cells from cloned cDNA.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 83, n. 12, p. 4114-4118, Jun 1986.

FURUYA, K.; YAMAGUCHI, E.; ITOH, A.; HIZAWA, N.; OHNUMA, N.; KOJIMA, J. *et al.* **Deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene as a genetic risk factor for sarcoidosis.** *Thorax*, v. 51, n. 8, p. 777-780, Aug 1996.

GARCIA-SAINZ, J. A.; MARTINEZ-ALFARO, M.; ROMERO-AVILA, M. T. e GONZALEZ-ESPINOSA, C. **Characterization of the AT1 angiotensin II receptor expressed in guinea pig liver.** *J Endocrinol*, v. 154, n. 1, p. 133-138, Jul 1997.

GE, J.; ZHAO, G.; CHEN, R.; LI, S.; WANG, S.; ZHANG, X. *et al.* **Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy.** *Eur J Heart Fail*, v. 8, n. 3, p. 284-289, May 2006.

GENAIN, C.; BOUHNİK, J.; TEWKSBURY, D.; CORVOL, P. e MENARD, J. **Characterization of plasma and cerebrospinal fluid human angiotensinogen and des-angiotensin I-angiotensinogen by direct radioimmunoassay.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 59, n. 3, p. 478-484, Sep 1984.

GRAF, K.; KOEHNE, P.; GRAFE, M.; ZHANG, M.; AUCH-SCHWELK, W. e FLECK, E. **Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells.** *Hypertension*, v. 26, n. 2, p. 230-235, Aug 1995.

GRAY, M. O.; LONG, C. S.; KALINYAK, J. E.; LI, H. T. e KARLINER, J. S. **Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts.** *Cardiovasc Res*, v. 40, n. 2, p. 352-363, Nov 1998.

GREENE, L. J.; SPADARO, A. C.; MARTINS, A. R.; PERUSSI DE JESUS, W. D. e CAMARGO, A. C. **Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II.** *Hypertension*, v. 4, n. 2, p. 178-184, Mar-Apr 1982.

GRIENGLING, K. K.; MINIERI, C. A.; OLLERENSHAW, J. D. e ALEXANDER, R. W. **Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.** *Circ Res*, v. 74, n. 6, p. 1141-1148, Jun 1994.

HACKENTHAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D. e TAUGNER, R. **Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion.** *Physiol Rev*, v. 70, n. 4, p. 1067-1116, Oct 1990.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J. e VAN GOOR, H. **Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis.** *J Pathol*, v. 203, n. 2, p. 631-637, Jun 2004.



HATSUZAWA, K.; HOSAKA, M.; NAKAGAWA, T.; NAGASE, M.; SHODA, A.; MURAKAMI, K. *et al.* **Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells.** J Biol Chem, v. 265, n. 36, p. 22075-22078, Dec 25 1990.

HAYWOOD, G. A.; GULLESTAD, L.; KATSUYA, T.; HUTCHINSON, H. G.; PRATT, R. E.; HORIUCHI, M. *et al.* **AT1 and AT2 angiotensin receptor gene expression in human heart failure.** Circulation, v. 95, n. 5, p. 1201-1206, Mar 4 1997.

HEALY, D. P. e WILK, S. **Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II.** Brain Res, v. 606, n. 2, p. 295-303, Mar 26 1993.

HEIN, L.; BARSH, G. S.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. e KOBILKA, B. K. **Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice.** Nature, v. 377, n. 6551, p. 744-747, Oct 26 1995.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, R.; SOSA-CANACHE, B.; VELASCO, M.; ARMAS-HERNANDEZ, M. J.; ARMAS-PADILLA, M. C. e CAMMARATA, R. **Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension.** J Hum Hypertens, v. 16 Suppl 1, p. S93-99, Mar 2002.

HIROSE, S.; KIM, S.; MIYAZAKI, H.; PARK, Y. S. e MURAKAMI, K. **In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate.** J Biol Chem, v. 260, n. 30, p. 16400-16405, Dec 25 1985.

HIRSCH, A. T.; TALSNESS, C. E.; SCHUNKERT, H.; PAUL, M. e DZAU, V. J. **Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure.** Circ Res, v. 69, n. 2, p. 475-482, Aug 1991.

HOFFMANN, S. **Cardiac-specific overexpression of angiotensin II type 1 receptor in transgenic rats.** Methods Mol Med, v. 112, p. 389-403, 2005.

HOFFMANN, S.; KRAUSE, T.; VAN GEEL, P. P.; WILLENBROCK, R.; PAGEL, I.; PINTO, Y. M. *et al.* **Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy.** J Mol Med, v. 79, n. 10, p. 601-608, Oct 2001.

HOKIMOTO, S.; YASUE, H.; FUJIMOTO, K.; YAMAMOTO, H.; NAKAO, K.; KAIKITA, K. *et al.* **Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction.** *Circulation*, v. 94, n. 7, p. 1513-1518, Oct 1 1996.

HOLTZ, J. **Role of ACE inhibition or AT1 blockade in the remodeling following myocardial infarction.** *Basic Res Cardiol*, v. 93 Suppl 2, p. 92-100, 1998.

HOLUBARSCH, C.; HASENFUSS, G.; SCHMIDT-SCHWEDA, S.; KNORR, A.; PIESKE, B.; RUF, T. *et al.* **Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions.** *Circulation*, v. 88, n. 3, p. 1228-1237, Sep 1993.

HOOPER, N. M. **Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions.** *Int J Biochem*, v. 23, n. 7-8, p. 641-647, 1991.

HORI, H.; YOSHINO, T.; ISHIZUKA, Y.; YAMAUCHI, T. e MURAKAMI, K. **Role of N-linked oligosaccharides attached to human renin expressed in COS cells.** *FEBS Lett*, v. 232, n. 2, p. 391-394, May 23 1988.

HORIUCHI, M.; LEHTONEN, J. Y. e DAVIET, L. **Signaling Mechanism of the AT2 Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 Receptors in Cell Growth.** *Trends Endocrinol Metab*, v. 10, n. 10, p. 391-396, Dec 1999.

HSUEH, W. A.; DO, Y. S. e WANG, P. H. **Observations on the renal processing and sorting of prorenin.** *Can J Physiol Pharmacol*, v. 69, n. 9, p. 1327-1330, Sep 1991.

HUANG, L.; SEXTON, D. J.; SKOGERSON, K.; DEVLIN, M.; SMITH, R.; SANYAL, I. *et al.* **Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2.** *J Biol Chem*, v. 278, n. 18, p. 15532-15540, May 2 2003.

HUANG, X. R.; CHEN, W. Y.; TRUONG, L. D. e LAN, H. Y. **Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease.** *J Am Soc Nephrol*, v. 14, n. 7, p. 1738-1747, Jul 2003.

HUANG, Y.; NOBLE, N. A.; ZHANG, J.; XU, C. e BORDER, W. A. **Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells.** *Kidney Int*, v. 72, n. 1, p. 45-52, Jul 2007.

HUANG, Y.; WONGAMORNTHAM, S.; KASTING, J.; MCQUILLAN, D.; OWENS, R. T.; YU, L. *et al.* **Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms.** *Kidney Int*, v. 69, n. 1, p. 105-113, Jan 2006.

HUBER, K.; CHRIST, G.; WOJTA, J. e GULBA, D. **Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001.** *Thromb Res*, v. 103 Suppl 1, p. S7-19, Sep 30 2001.

IBRAHIM, M. M. **RAS inhibition in hypertension.** *J Hum Hypertens*, v. 20, n. 2, p. 101-108, Feb 2006.

ICHIKI, T.; LABOSKY, P. A.; SHIOTA, C.; OKUYAMA, S.; IMAGAWA, Y.; FOGO, A. *et al.* **Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor.** *Nature*, v. 377, n. 6551, p. 748-750, Oct 26 1995.

IHARA, M.; URATA, H.; KINOSHITA, A.; SUZUMIYA, J.; SASAGURI, M.; KIKUCHI, M. *et al.* **Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta.** *Hypertension*, v. 33, n. 6, p. 1399-1405, Jun 1999.

IMAI, Y.; KUBA, K.; RAO, S.; HUAN, Y.; GUO, F.; GUAN, B. *et al.* **Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure.** *Nature*, v. 436, n. 7047, p. 112-116, Jul 7 2005.

ITO, T.; EGGENA, P.; BARRETT, J. D.; KATZ, D.; METTER, J. e SAMBHI, M. P. **Studies on angiotensinogen of plasma and cerebrospinal fluid in normal and hypertensive human subjects.** *Hypertension*, v. 2, n. 4, p. 432-436, Jul-Aug 1980.

JACKSON, T. R.; BLAIR, L. A.; MARSHALL, J.; GOEDERT, M. e HANLEY, M. R. **The mas oncogene encodes an angiotensin receptor.** *Nature*, v. 335, n. 6189, p. 437-440, Sep 29 1988.

JOHNSON, A. R.; ASHTON, J.; SCHULZ, W. W. e ERDOS, E. G. **Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells.** *Am Rev Respir Dis*, v. 132, n. 3, p. 564-568, Sep 1985.

JUTRAS, I. e REUDELHUBER, T. L. **Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells.** *FEBS Lett*, v. 443, n. 1, p. 48-52, Jan 22 1999.

KAMBAYASHI, Y.; BARDHAN, S.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, S.; INUI, H.; HAMAKUBO, T. *et al.* **Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition.** J Biol Chem, v. 268, n. 33, p. 24543-24546, Nov 25 1993.

KAMITANI, A.; RAKUGI, H.; HIGAKI, J.; OHISHI, M.; SHI, S. J.; TAKAMI, S. *et al.* **Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis.** Hypertension, v. 25, n. 5, p. 950-953, May 1995.

KANESHIRO, Y.; ICHIHARA, A.; SAKODA, M.; TAKEMITSU, T.; NABI, A. H.; UDDIN, M. N. *et al.* **Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats.** J Am Soc Nephrol, v. 18, n. 6, p. 1789-1795, Jun 2007.

KANG, J. X.; LI, Y. e LEAF, A. **Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 94, n. 25, p. 13671-13676, Dec 9 1997.

KATSUYA, T.; KOIKE, G.; YEE, T. W.; SHARPE, N.; JACKSON, R.; NORTON, R. *et al.* **Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease.** Lancet, v. 345, n. 8965, p. 1600-1603, Jun 24 1995.

KERR, M. A. e KENNY, A. J. **The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border.** Biochem J, v. 137, n. 3, p. 477-488, Mar 1974.

KIM, S. e IWAO, H. **Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases.** Pharmacol Rev, v. 52, n. 1, p. 11-34, Mar 2000.

KIM, W. S.; HATSUZAWA, K.; ISHIZUKA, Y.; HASHIBA, K.; MURAKAMI, K. e NAKAYAMA, K. **A processing enzyme for prorenin in mouse submandibular gland. Purification and characterization.** J Biol Chem, v. 265, n. 11, p. 5930-5933, Apr 15 1990.

KLINGBEIL, A. U.; SCHNEIDER, M.; MARTUS, P.; MESSERLI, F. H. e SCHMIEDER, R. E. **A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension.** Am J Med, v. 115, n. 1, p. 41-46, Jul 2003.

KOHLSTEDT, K.; BRANDES, R. P.; MULLER-ESTERL, W.; BUSSE, R. e FLEMING, I. **Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells.** Circ Res, v. 94, n. 1, p. 60-67, Jan 9 2004.

- KOHLSTEDT, K.; SHOGHI, F.; MULLER-ESTERL, W.; BUSSE, R. e FLEMING, I. **CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane.** *Circ Res*, v. 91, n. 8, p. 749-756, Oct 18 2002.
- KORNFELD, S. **Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.** *Annu Rev Biochem*, v. 61, p. 307-330, 1992.
- KRAMKOWSKI, K.; MOGIELNICKI, A. e BUCZKO, W. **The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production.** *J Physiol Pharmacol*, v. 57, n. 4, p. 529-539, Dec 2006.
- KURTZ, A. e WAGNER, C. **Cellular control of renin secretion.** *J Exp Biol*, v. 202, n. Pt 3, p. 219-225, Feb 1999.
- LECKIE, B. J. e MCGHEE, N. K. **Reversible activation-inactivation of renin in human plasma.** *Nature*, v. 288, n. 5792, p. 702-705, Dec 25 1980.
- LERI, A.; CLAUDIO, P. P.; LI, Q.; WANG, X.; REISS, K.; WANG, S. *et al.* **Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell.** *J Clin Invest*, v. 101, n. 7, p. 1326-1342, Apr 1 1998.
- LEWIS, E. J.; HUNSICKER, L. G.; BAIN, R. P. e ROHDE, R. D. **The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group.** *N Engl J Med*, v. 329, n. 20, p. 1456-1462, Nov 11 1993.
- LEWIS, E. J.; HUNSICKER, L. G.; CLARKE, W. R.; BERL, T.; POHL, M. A.; LEWIS, J. B. *et al.* **Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes.** *N Engl J Med*, v. 345, n. 12, p. 851-860, Sep 20 2001.
- LI, Q.; FEENSTRA, M.; PFAFFENDORF, M.; EIJSMAN, L. e VAN ZWIETEN, P. A. **Comparative vasoconstrictor effects of angiotensin II, III, and IV in human isolated saphenous vein.** *Cardiovasc Pharmacol*, v. 29, n. 4, p. 451-456, Apr 1997.
- LI, W.; MOORE, M. J.; VASILIEVA, N.; SUI, J.; WONG, S. K.; BERNE, M. A. *et al.* **Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.** *Nature*, v. 426, n. 6965, p. 450-454, Nov 27 2003.

LI, Y. D.; BLOCK, E. R. e PATEL, J. M. **Activation of multiple signaling modules is critical in angiotensin IV-induced lung endothelial cell proliferation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 283, n. 4, p. L707-716, Oct 2002.

LIBBY, P.; BONOW, R. O.; MANN, D. L. e ZIPES, D. P. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.** Filadelfia: Saunders, 2007.

LIJNEN, P. e PETROV, V. **Antagonism of the renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v. 21, n. 5, p. 363-374, Jun 1999.

LOCHARD, N.; THIBAUT, G.; SILVERSIDES, D. W.; TOUYZ, R. M. e REUDELHUBER, T. L. **Chronic production of angiotensin IV in the brain leads to hypertension that is reversible with an angiotensin II AT1 receptor antagonist.** *Circ Res*, v. 94, n. 11, p. 1451-1457, Jun 11 2004.

LOJDA, Z. e GOSSRAU, R. **Study on aminopeptidase A.** *Histochemistry*, v. 67, n. 3, p. 267-290, 1980.

LOPEZ-SENDON, J.; SWEDBERG, K.; MCMURRAY, J.; TAMARGO, J.; MAGGIONI, A. P.; DARGIE, H. *et al.* **Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology.** *Eur Heart J*, v. 25, n. 16, p. 1454-1470, Aug 2004.

MAIER, L. A.; RAYNOLDS, M. V.; YOUNG, D. A.; BARKER, E. A. e NEWMAN, L. S. **Angiotensin-1 converting enzyme polymorphisms in chronic beryllium disease.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 159, n. 4 Pt 1, p. 1342-1350, Apr 1999.

MALHOTRA, R.; SADOSHIMA, J.; BROSIUS, F. C., 3RD e IZUMO, S. **Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro.** *Circ Res*, v. 85, n. 2, p. 137-146, Jul 23 1999.

MANGIAPANE, M. L.; RAUCH, A. L.; MACANDREW, J. T.; ELLERY, S. S.; HOOVER, K. W.; KNIGHT, D. R. *et al.* **Vasoconstrictor action of angiotensin I-convertase and the synthetic substrate (Pro11,D-Ala12)-angiotensin I.** *Hypertension*, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 857-860, Jun 1994.

MARSHALL, R. P.; WEBB, S.; BELLINGAN, G. J.; MONTGOMERY, H. E.; CHAUDHARI, B.; MCANULTY, R. J. *et al.* **Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is**

**associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 166, n. 5, p. 646-650, Sep 1 2002.

MASCHIO, G.; ALBERTI, D.; JANIN, G.; LOCATELLI, F.; MANN, J. F.; MOTOLESE, M. *et al.* **Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group.** *N Engl J Med*, v. 334, n. 15, p. 939-945, Apr 11 1996.

MENG, Q. C. e OPARIL, S. **Purification and assay methods for angiotensin-converting enzyme.** *J Chromatogr A*, v. 743, n. 1, p. 105-122, Aug 30 1996.

MERCURE, C.; JUTRAS, I.; DAY, R.; SEIDAH, N. G. e REUDELHUBER, T. L. **Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex.** *Hypertension*, v. 28, n. 5, p. 840-846, Nov 1996.

MORGAN, L.; BROUGHTON PIPKIN, F. e KALSHEKER, N. **Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology.** *Int J Biochem Cell Biol*, v. 28, n. 11, p. 1211-1222, Nov 1996.

MORRIS, B. J. **Activation of human inactive ("pro-") renin by cathepsin D and pepsin.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 46, n. 1, p. 153-157, Jan 1978.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R. E. e DZAU, V. J. **Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors.** *J Biol Chem*, v. 268, n. 33, p. 24539-24542, Nov 25 1993.

MULLER, D. N.; DECHEND, R.; MERVAALA, E. M.; PARK, J. K.; SCHMIDT, F.; FIEBELER, A. *et al.* **NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats.** *Hypertension*, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 193-201, Jan 2000.

MULLER, D. N.; FISCHLI, W.; CLOZEL, J. P.; HILGERS, K. F.; BOHLENDER, J.; MENARD, J. *et al.* **Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake.** *Circ Res*, v. 82, n. 1, p. 13-20, Jan 9-23 1998.

MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W.; GRIENDLING, K. K.; RUNGE, M. S. e BERNSTEIN, K. E. **Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor.** *Nature*, v. 351, n. 6323, p. 233-236, May 16 1991.

MUSTAFA, T.; LEE, J. H.; CHAI, S. Y.; ALBISTON, A. L.; MCDOWALL, S. G. e MENDELSON, F. A. **Bioactive angiotensin peptides: focus on angiotensin IV**. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 2, n. 4, p. 205-210, Dec 2001.

NAHMIAS, C. e STROSBURG, A. D. **The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function**. *Trends Pharmacol Sci*, v. 16, n. 7, p. 223-225, Jul 1995.

NEVES, F. A.; DUNCAN, K. G. e BAXTER, J. D. **Cathepsin B is a prorenin processing enzyme**. *Hypertension*, v. 27, n. 3 Pt 2, p. 514-517, Mar 1996.

NGUYEN, G.; BURCKLE, C. A. e SRAER, J. D. **Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance**. *Curr Hypertens Rep*, v. 6, n. 2, p. 129-132, Apr 2004.

NGUYEN, G. e DANSER, A. H. **Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents**. *Exp Physiol*, v. 93, n. 5, p. 557-563, May 2008.

NGUYEN, G.; DELARUE, F.; BURCKLE, C.; BOUZHIR, L.; GILLER, T. e SRAER, J. D. **Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin**. *J Clin Invest*, v. 109, n. 11, p. 1417-1427, Jun 2002.

OZONO, R.; WANG, Z. Q.; MOORE, A. F.; INAGAMI, T.; SIRAGY, H. M. e CAREY, R. M. **Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney**. *Hypertension*, v. 30, n. 5, p. 1238-1246, Nov 1997.

PAGLIARO, P. e PENNA, C. **Rethinking the renin-angiotensin system and its role in cardiovascular regulation**. *Cardiovasc Drugs Ther*, v. 19, n. 1, p. 77-87, Jan 2005.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A. e KREUTZ, R. **Physiology of local renin-angiotensin systems**. *Physiol Rev*, v. 86, n. 3, p. 747-803, Jul 2006.

PAUL, M.; STOLL, M.; KREUTZ, R. e FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. **The cellular basis of angiotensin converting enzyme mRNA expression in rat heart**. *Basic Res Cardiol*, v. 91 Suppl 2, p. 57-63, 1996.



- PAUL, M.; WAGNER, D.; METZGER, R.; GANTEN, D.; LANG, R. E.; SUZUKI, F. *et al.* **Quantification of renin mRNA in various mouse tissues by a novel solution hybridization assay.** *J Hypertens*, v. 6, n. 3, p. 247-252, Mar 1988.
- PAUL, M.; WAGNER, J. e DZAU, V. J. **Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction.** *J Clin Invest*, v. 91, n. 5, p. 2058-2064, May 1993.
- PERSSON, P. B. **Renin: origin, secretion and synthesis.** *J Physiol*, v. 552, n. Pt 3, p. 667-671, Nov 1 2003.
- PETERS, J.; FARRENKOPF, R.; CLAUSMEYER, S.; ZIMMER, J.; KANTACHUVESIRI, S.; SHARP, M. G. *et al.* **Functional significance of prorenin internalization in the rat heart.** *Circ Res*, v. 90, n. 10, p. 1135-1141, May 31 2002.
- PETRIE, M. C.; PADMANABHAN, N.; MCDONALD, J. E.; HILLIER, C.; CONNELL, J. M. e MCMURRAY, J. J. **Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease.** *J Am Coll Cardiol*, v. 37, n. 4, p. 1056-1061, Mar 15 2001.
- PFEFFER, M. A.; SWEDBERG, K.; GRANGER, C. B.; HELD, P.; MCMURRAY, J. J.; MICHELSON, E. L. *et al.* **Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme.** *Lancet*, v. 362, n. 9386, p. 759-766, Sep 6 2003.
- PHILLIPS, M. I. e SCHMIDT-OTT, K. M. **The Discovery of Renin 100 Years Ago.** *News Physiol Sci*, v. 14, p. 271-274, Dec 1999.
- PHILLIPS, M. I.; SPEAKMAN, E. A. e KIMURA, B. **Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems.** *Regul Pept*, v. 43, n. 1-2, p. 1-20, Jan 22 1993.
- PINTO, Y. M.; BUIKEMA, H.; VAN GILST, W. H.; SCHOLTENS, E.; VAN GEEL, P. P.; DE GRAEFF, P. A. *et al.* **Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats.** *J Mol Med*, v. 75, n. 5, p. 371-377, May 1997.
- PITARRESI, T. M.; RUBATTU, S.; HEINRIKSON, R. e SEALEY, J. E. **Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin.** *J Biol Chem*, v. 267, n. 17, p. 11753-11759, Jun 15 1992.

PITT, B. "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther*, v. 9, n. 1, p. 145-149, Feb 1995.

POKHAREL, S.; VAN GEEL, P. P.; SHARMA, U. C.; CLEUTJENS, J. P.; BOHNEMEIER, H.; TIAN, X. L. *et al.* **Increased myocardial collagen content in transgenic rats overexpressing cardiac angiotensin-converting enzyme is related to enhanced breakdown of N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro and increased phosphorylation of Smad2/3.** *Circulation*, v. 110, n. 19, p. 3129-3135, Nov 9 2004.

POOL, J. L. **Direct renin inhibition: focus on aliskiren.** *J Manag Care Pharm*, v. 13, n. 8 Suppl B, p. 21-33, Oct 2007.

PRATT, R. E.; CARLETON, J. E.; RICHIE, J. P.; HEUSSER, C. e DZAU, V. J. **Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 22, p. 7837-7840, Nov 1987.

RAHUEL, J.; RASETTI, V.; MAIBAUM, J.; RUEGER, H.; GOSCHKE, R.; COHEN, N. C. *et al.* **Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin.** *Chem Biol*, v. 7, n. 7, p. 493-504, Jul 2000.

RAMSER, J.; ABIDI, F. E.; BURCKLE, C. A.; LENSKI, C.; TORIELLO, H.; WEN, G. *et al.* **A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor.** *Hum Mol Genet*, v. 14, n. 8, p. 1019-1027, Apr 15 2005.

REAUX, A.; DE MOTA, N.; ZINI, S.; CADEL, S.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P. *et al.* **PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III.** *Neuroendocrinology*, v. 69, n. 5, p. 370-376, May 1999.

REAVES, B. J.; VAN ITALLIE, C. M.; MOORE, H. H. e DANNIES, P. S. **Prolactin and insulin are targeted to the regulated pathway in GH4C1 cells, but their storage is differentially regulated.** *Mol Endocrinol*, v. 4, n. 7, p. 1017-1026, Jul 1990.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; FIELITZ, J.; DREYSSE, R.; HILDEBRANDT, A. G. e FLECK, E. **Angiotensin receptor type 1 mRNA in human right ventricular endomyocardial biopsies: downregulation in heart failure.** *Cardiovasc Res*, v. 35, n. 1, p. 99-105, Jul 1997.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; FRIEDEL, N.; HEYMANN, A.; BAUER, P.; NEUSS, M.; ROLFS, A. *et al.* **Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts.** *Circulation*, v. 91, n. 5, p. 1461-1471, Mar 1 1995.

RIBEIRO, A. B. e PLAVNIK, F. L. **Atualização em Hipertensão Arterial - Clínica, Diagnóstica e Terapêutica.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

RICE, G. I.; THOMAS, D. A.; GRANT, P. J.; TURNER, A. J. e HOOPER, N. M. **Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism.** *Biochem J*, v. 383, n. Pt 1, p. 45-51, Oct 1 2004.

RICHARD, V.; HUREL-MERLE, S.; SCALBERT, E.; FERRY, G.; LALLEMAND, F.; BESSOU, J. P. *et al.* **Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries.** *Circulation*, v. 104, n. 7, p. 750-752, Aug 14 2001.

RIGAT, B.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, F.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P. e SOUBRIER, F. **An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.** *J Clin Invest*, v. 86, n. 4, p. 1343-1346, Oct 1990.

ROQUES, B. P.; NOBLE, F.; DAUGE, V.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C. e BEAUMONT, A. **Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology.** *Pharmacol Rev*, v. 45, n. 1, p. 87-146, Mar 1993.

ROTHWELL, V.; KOSOWSKI, S.; HADJILAMBRIS, O.; BASKA, R. e NORMAN, J. **Glycosylation of active human renin is necessary for secretion: effect of targeted modifications of Asn-5 and Asn-75.** *DNA Cell Biol*, v. 12, n. 4, p. 291-298, May 1993.

RUILOPE, L. M.; ROSEI, E. A.; BAKRIS, G. L.; MANCIA, G.; POULTER, N. R.; TADDEI, S. *et al.* **Angiotensin receptor blockers: therapeutic targets and cardiovascular protection.** *Blood Press*, v. 14, n. 4, p. 196-209, 2005.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; KONIG, S.; WITTIG, B. e EGIDO, J. **Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms.** *Circ Res*, v. 86, n. 12, p. 1266-1272, Jun 23 2000.

SADOSHIMA, J.; XU, Y.; SLAYTER, H. S. e IZUMO, S. **Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro.** *Cell*, v. 75, n. 5, p. 977-984, Dec 3 1993.

SAMPAIO, W. O.; SOUZA DOS SANTOS, R. A.; FARIA-SILVA, R.; DA MATA MACHADO, L. T.; SCHIFFRIN, E. L. e TOUYZ, R. M. **Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways.** *Hypertension*, v. 49, n. 1, p. 185-192, Jan 2007.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. e ANDRADE, S. P. **Angiotensin-(1-7): an update.** *Regul Pept*, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 28 2000.

SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I. *et al.* **Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, Jul 8 2003.

SARIS, J. J.; DERKX, F. H.; DE BRUIN, R. J.; DEKKERS, D. H.; LAMERS, J. M.; SAXENA, P. R. *et al.* **High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 280, n. 4, p. H1706-1715, Apr 2001.

SARIS, J. J.; T HOEN, P. A.; GARRELD, I. M.; DEKKERS, D. H.; DEN DUNNEN, J. T.; LAMERS, J. M. *et al.* **Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II.** *Hypertension*, v. 48, n. 4, p. 564-571, Oct 2006.

SARIS, J. J.; VAN DEN EIJDEN, M. M.; LAMERS, J. M.; SAXENA, P. R.; SCHALEKAMP, M. A. e DANSER, A. H. **Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II.** *Hypertension*, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 573-577, Feb 2002.

SASAKI, K.; YAMANO, Y.; BARDHAN, S.; IWAI, N.; MURRAY, J. J.; HASEGAWA, M. *et al.* **Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor.** *Nature*, v. 351, n. 6323, p. 230-233, May 16 1991.

SAYED-TABATABAEI, F. A.; OOSTRA, B. A.; ISAACS, A.; VAN DUIJN, C. M. e WITTEMAN, J. C. **ACE polymorphisms.** *Circ Res*, v. 98, n. 9, p. 1123-1133, May 12 2006.

SCAMMELL, J. G.; BURRAGE, T. G. e DANNIES, P. S. **Hormonal induction of secretory granules in a pituitary tumor cell line.** *Endocrinology*, v. 119, n. 4, p. 1543-1548, Oct 1986.

SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; KHOSLA, M. C. e FERRARIO, C. M. **Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 85, n. 11, p. 4095-4098, Jun 1988.

SCHMIDT, R.; SCHMIDT, H.; FAZEKAS, F.; LAUNER, L. J.; NIEDERKORN, K.; KAPPELLER, P. *et al.* **Angiotensinogen polymorphism M235T, carotid atherosclerosis, and small-vessel disease-related cerebral abnormalities.** Hypertension, v. 38, n. 1, p. 110-115, Jul 2001.

SEALEY, J. E.; GLORIOSO, N.; ITSKOVITZ, J. e LARAGH, J. H. **Prorenin as a reproductive hormone. New form of the renin system.** Am J Med, v. 81, n. 6, p. 1041-1046, Dec 1986.

SEALEY, J. E.; WHITE, R. P.; LARAGH, J. H. e RUBIN, A. L. **Plasma prorenin and renin in anephric patients.** Circ Res, v. 41, n. 4 Suppl 2, p. 17-21, Oct 1977.

SEHL, P. D.; TAI, J. T.; HILLAN, K. J.; BROWN, L. A.; GODDARD, A.; YANG, R. *et al.* **Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury.** Circulation, v. 101, n. 16, p. 1990-1999, Apr 25 2000.

SENBONMATSU, T.; ICHIHARA, S.; PRICE, E., JR.; GAFFNEY, F. A. e INAGAMI, T. **Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload.** J Clin Invest, v. 106, n. 2, p. R1-5, Jul 2000.

SIELECKI, A. R.; HAYAKAWA, K.; FUJINAGA, M.; MURPHY, M. E.; FRASER, M.; MUIR, A. K. *et al.* **Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution.** Science, v. 243, n. 4896, p. 1346-1351, Mar 10 1989.

SIGMON, D. H. e FRAY, J. C. **Chemiosmotic control of renin release from isolated renin granules of rat kidneys.** J Physiol, v. 436, p. 237-256, May 1991.

STAESSEN, J. A.; KUZNETSOVA, T.; WANG, J. G.; EMELIANOV, D.; VLIETINCK, R. e FAGARD, R. **M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk.** J Hypertens, v. 17, n. 1, p. 9-17, Jan 1999.

STANTON, A. **Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders.** Am J Cardiovasc Drugs, v. 3, n. 6, p. 389-394, 2003.

SUN, Y. e WEBER, K. T. **Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat.** J Lab Clin Med, v. 127, n. 1, p. 94-101, Jan 1996.

SUZUKI, F.; HAYAKAWA, M.; NAKAGAWA, T.; NASIR, U. M.; EBIHARA, A.; IWASAWA, A. *et al.* **Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation.** J Biol Chem, v. 278, n. 25, p. 22217-22222, Jun 20 2003.

TAKAI, S.; JIN, D.; NISHIMOTO, M.; YUDA, A.; SAKAGUCHI, M.; KAMOSHITA, K. *et al.* **Oral administration of a specific chymase inhibitor, NK3201, inhibits vascular proliferation in grafted vein.** Life Sci, v. 69, n. 15, p. 1725-1732, Aug 31 2001.

TAKAI, S.; YUDA, A.; JIN, D.; NISHIMOTO, M.; SAKAGUCHI, M.; SASAKI, S. *et al.* **Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins.** FEBS Lett, v. 467, n. 2-3, p. 141-144, Feb 11 2000.

TAUGNER, R.; BUHRLE, C. P.; NOBILING, R. e KIRSCHKE, H. **Coexistence of renin and cathepsin B in epithelioid cell secretory granules.** Histochemistry, v. 83, n. 2, p. 103-108, 1985.

TAUGNER, R.; KIM, S. J.; MURAKAMI, K. e WALDHERR, R. **The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment.** Histochemistry, v. 86, n. 3, p. 249-253, 1987.

THOMAS, W. G. **Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function.** Regul Pept, v. 79, n. 1, p. 9-23, Jan 1 1999.

THOMAS, W. G.; MOTEL, T. J.; KULE, C. E.; KAROOR, V. e BAKER, K. M. **Phosphorylation of the angiotensin II (AT1A) receptor carboxyl terminus: a role in receptor endocytosis.** Mol Endocrinol, v. 12, n. 10, p. 1513-1524, Oct 1998.

THURMAN, J. M. e SCHRIER, R. W. **Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on blood pressure and the kidney.** Am J Med, v. 114, n. 7, p. 588-598, May 2003.

TIGERSTEDT, R. e BEGMAN, P. **Niere und Kreislauf.** Arch Physiol, v. 8, p. 223-271, 1898.

TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J. *et al.* **Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.** *Pharmacol Rev*, v. 45, n. 2, p. 205-251, Jun 1993.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G. e TURNER, A. J. **A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.** *J Biol Chem*, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, Oct 27 2000.

TIRET, L.; RIGAT, B.; VISVIKIS, S.; BREDI, C.; CORVOL, P.; CAMBIEN, F. *et al.* **Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels.** *Am J Hum Genet*, v. 51, n. 1, p. 197-205, Jul 1992.

TONG, P. Y.; GREGORY, W. e KORNFELD, S. **Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding.** *J Biol Chem*, v. 264, n. 14, p. 7962-7969, May 15 1989.

TONG, P. Y. e KORNFELD, S. **Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor.** *J Biol Chem*, v. 264, n. 14, p. 7970-7975, May 15 1989.

TROUGHTON, R. W.; FRAMPTON, C. M.; YANDLE, T. G.; ESPINER, E. A.; NICHOLLS, M. G. e RICHARDS, A. M. **Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations.** *Lancet*, v. 355, n. 9210, p. 1126-1130, Apr 1 2000.

TSUTSUMI, Y.; MATSUBARA, H.; MASAKI, H.; KURIHARA, H.; MURASAWA, S.; TAKAI, S. *et al.* **Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation.** *J Clin Invest*, v. 104, n. 7, p. 925-935, Oct 1999.

TURNER, A. J.; TIPNIS, S. R.; GUY, J. L.; RICE, G. e HOOPER, N. M. **ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors.** *Can J Physiol Pharmacol*, v. 80, n. 4, p. 346-353, Apr 2002.

URATA, H. e GANTEN, D. **Cardiac angiotensin II formation: the angiotensin-I converting enzyme and human chymase.** *Eur Heart J*, v. 14 Suppl I, p. 177-182, Nov 1993.

URATA, H.; HEALY, B.; STEWART, R. W.; BUMPUS, F. M. e HUSAIN, A. **Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts.** *Circ Res*, v. 66, n. 4, p. 883-890, Apr 1990.

URATA, H.; KINOSHITA, A.; MISONO, K. S.; BUMPUS, F. M. e HUSAIN, A. **Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart.** J Biol Chem, v. 265, n. 36, p. 22348-22357, Dec 25 1990.

VAN DEN EIJNDEN, M. M.; SARIS, J. J.; DE BRUIN, R. J.; DE WIT, E.; SLUITER, W.; REUDELHUBER, T. L. *et al.* **Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 21, n. 6, p. 911-916, Jun 2001.

VAN KATS, J. P.; CHAI, W.; DUNCKER, D. J.; SCHALEKAMP, M. A. e DANSER, A. H. **Adrenal angiotensin: origin and site of generation.** Am J Hypertens, v. 18, n. 8, p. 1104-1110, Aug 2005.

VAN KATS, J. P.; DANSER, A. H.; VAN MEEGEN, J. R.; SASSEN, L. M.; VERDOUW, P. D. e SCHALEKAMP, M. A. **Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions.** Circulation, v. 98, n. 1, p. 73-81, Jul 7 1998.

VAN KESTEREN, C. A.; DANSER, A. H.; DERKX, F. H.; DEKKERS, D. H.; LAMERS, J. M.; SAXENA, P. R. *et al.* **Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells.** Hypertension, v. 30, n. 6, p. 1389-1396, Dec 1997.

VAN KESTEREN, C. A.; VAN HEUGTEN, H. A.; LAMERS, J. M.; SAXENA, P. R.; SCHALEKAMP, M. A. e DANSER, A. H. **Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts.** J Mol Cell Cardiol, v. 29, n. 8, p. 2147-2157, Aug 1997.

VAUGHAN, D. E.; LAZOS, S. A. e TONG, K. **Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis.** J Clin Invest, v. 95, n. 3, p. 995-1001, Mar 1995.

VENIANT, M.; MENARD, J.; BRUNEVALL, P.; MORLEY, S.; GONZALES, M. F. e MULLINS, J. **Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver.** J Clin Invest, v. 98, n. 9, p. 1966-1970, Nov 1 1996.

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J. *et al.* **Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase.** J Biol Chem, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, Apr 26 2002.



VON LUTTEROTTI, N.; CATANZARO, D. F.; SEALEY, J. E. e LARAGH, J. H. **Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence.** *Circulation*, v. 89, n. 1, p. 458-470, Jan 1994.

WALTER, R.; SIMMONS, W. H. e YOSHIMOTO, T. **Proline specific endo- and exopeptidases.** *Mol Cell Biochem*, v. 30, n. 2, p. 111-127, Apr 18 1980.

WANG, P. H.; DO, Y. S.; MACAULAY, L.; SHINAGAWA, T.; ANDERSON, P. W.; BAXTER, J. D. *et al.* **Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme.** *J Biol Chem*, v. 266, n. 19, p. 12633-12638, Jul 5 1991.

WEBER, K. T. e SUN, Y. **Recruitable ACE and tissue repair in the infarcted heart.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 1, n. 4, p. 295-303, Dec 2000.

WEI, C. C.; TIAN, B.; PERRY, G.; MENG, Q. C.; CHEN, Y. F.; OPARIL, S. *et al.* **Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 282, n. 6, p. H2254-2258, Jun 2002.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P. e CLAUSER, E. **The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active.** *J Biol Chem*, v. 266, n. 14, p. 9002-9008, May 15 1991.

WHARTON, J.; MORGAN, K.; RUTHERFORD, R. A.; CATRAVAS, J. D.; CHESTER, A.; WHITEHEAD, B. F. *et al.* **Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart.** *J Pharmacol Exp Ther*, v. 284, n. 1, p. 323-336, Jan 1998.

WIDDOP, R. E.; JONES, E. S.; HANNAN, R. E. e GASPARI, T. A. **Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype?** *Br J Pharmacol*, v. 140, n. 5, p. 809-824, Nov 2003.

WINKELMANN, B. R.; RUSS, A. P.; NAUCK, M.; KLEIN, B.; BOHM, B. O.; MAIER, V. *et al.* **Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease.** *Am Heart J*, v. 137, n. 4 Pt 1, p. 698-705, Apr 1999.

WOLNY, A.; CLOZEL, J. P.; REIN, J.; MORY, P.; VOGT, P.; TURINO, M. *et al.* **Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart.** *Circ Res*, v. 80, n. 2, p. 219-227, Feb 1997.

---

WONG, J.; PATEL, R. A. e KOWEY, P. R. **The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors.** *Prog Cardiovasc Dis*, v. 47, n. 2, p. 116-130, Sep-Oct 2004.

WRIGHT, J. W. e HARDING, J. W. **Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system.** *Brain Res Brain Res Rev*, v. 25, n. 1, p. 96-124, Sep 30 1997.

YAMADA, T.; HORIUCHI, M. e DZAU, V. J. **Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 1, p. 156-160, Jan 9 1996.

YAN, Y.; CHEN, R.; PITARRESI, T.; SIGMUND, C. D.; GROSS, K. W.; SEALEY, J. E. *et al.* **Kidney is the only source of human plasma renin in 45-kb human renin transgenic mice.** *Circ Res*, v. 83, n. 12, p. 1279-1288, Dec 14-28 1998.

ZHANG, J.; NOBLE, N.; BORDER, P. W.; OWENS, R. T. e HUANG, Y. **Receptor-dependent prorenin activation and induction of PAI-1 expression in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v., Jul 29 2008.

ZHUO, J.; MOELLER, I.; JENKINS, T.; CHAI, S. Y.; ALLEN, A. M.; OHISHI, M. *et al.* **Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors.** *J Hypertens*, v. 16, n. 12 Pt 2, p. 2027-2037, Dec 1998.

ZINI, S.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; CHAUVEL, E.; ROQUES, B. P.; CORVOL, P. e LLORENS-CORTES, C. **Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 21, p. 11968-11973, Oct 15 1996.

ZINI, S.; MASDEHORS, P.; LENKEI, Z.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; ROQUES, B. P.; CORVOL, P. *et al.* **Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats.** *Neuroscience*, v. 78, n. 4, p. 1187-1193, Jun 1997.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO A - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I

#### A.1 Pró-renina selvagem (*wild type*)

**TABELA 10**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina WT secretada no meio de cultura sem catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)
0,620	4,280	4,900
0,536	5,634	6,170
0,076	0,824	0,900
0,049	0,471	0,520
0,630	7,630	8,260
0,192	2,198	2,390
0,500	9,150	9,650
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
0,372 $\pm$ 0,097	4,312 $\pm$ 1,268	4,684 $\pm$ 1,351

**TABELA 11**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina WT secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)
3,140	5,860	9,000
1,720	4,780	6,500
4,400	15,660	20,060
1,860	9,140	11,000
2,700	23,350	26,050
8,500	80,000	88,500
2,820	22,200	25,020
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
3,591 $\pm$ 0,884	22,999 $\pm$ 9,906	26,590 $\pm$ 10,729

**TABELA 12**

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina WT secretada no meio de cultura com e sem catepsina B.

<b>Pró-renina WT sem catepsina B</b> (%)	<b>Pró-renina WT com catepsina B</b> (%)
12,653	34,889
8,687	26,462
8,444	21,934
9,423	16,909
7,627	10,365
8,033	9,605
5,181	11,271
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
8,579 $\pm$ 0,846	18,776 $\pm$ 3,597

**TABELA 13**

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina WT secretada no meio de cultura sem catepsina B (controle) *versus* renina WT com catepsina B.

<b>Pró-renina WT sem catepsina B</b>	<b>Pró-renina WT com catepsina B</b>
(%)	(%)
100,000	275,735
100,000	304,604
100,000	259,747
100,000	179,443
100,000	135,893
100,000	119,556
100,000	217,530
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
100,000 ± 0,000	213,215 ± 26,875

## A.2 Mutações N-terminais no pró-segmento da pró-renina

### A.2.1 Mutante -3(M/A)

**TABELA 14**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina -3(M/A) secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)
1,100	22,800	23,900
0,380	2,310	2,690
3,180	46,020	49,200
4,390	78,690	83,080
3,700	43,100	46,800
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
2,550 $\pm$ 0,772	38,584 $\pm$ 12,746	41,134 $\pm$ 13,475

## A.2.2 Mutante -2(K/A)

TABELA 15

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina -2(K/A) secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)
0,740	6,020	6,760
1,240	28,820	30,060
1,720	22,740	24,460
7,340	109,260	116,600
2,950	48,350	51,300
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
2,798 $\pm$ 1,193	43,038 $\pm$ 17,886	45,836 $\pm$ 19,066

## A.2.3 Mutante -1(R/A)

**TABELA 16**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina -1(K/A) secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/ $\mu$ L de meio/hora)
0,740	6,020	6,760
1,240	28,820	30,060
1,720	22,740	24,460
2,950	48,350	51,300
<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>	<b>Média <math>\pm</math> EPM</b>
2,890 $\pm$ 0,841	18,795 $\pm$ 8,565	21,685 $\pm$ 9,403



## A.2.4 Porcentagens de angiotensina I formada a partir de pró-renina mutantes

TABELA 17

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina mutante secretada no meio de cultura com catepsina B.

<b>WT s/ catepsina</b>	<b>WT c/ catepsina</b>	<b>-3(M/A)</b>	<b>-2(K/A)</b>	<b>-1(R/A)</b>
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
12,653	34,889	—	—	—
8,687	26,462	—	10,947	23,344
8,444	21,934	4,603	4,125	—
9,423	16,909	14,126	7,032	21,678
7,627	10,365	6,463	—	—
8,033	9,605	5,284	6,295	11,090
5,181	11,271	7,906	5,750	12,121
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
8,579 ± 0,846	18,776 ± 3,597	7,676 ± 1,707	6,830 ± 1,135	17,058 ± 3,173

**TABELA 18**

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina WT e mutantes secretadas no meio de cultura com catepsina B *versus* renina WT sem catepsina B (controle).

Pró-renina WT (%)		Pró-renina mutante (%)		
S/ catepsina B	C/ catepsina B	-3(M/A)	-2(K/A)	-1(R/A)
100,000	275,735	—	—	—
100,000	304,604	—	126,010	268,716
100,000	259,747	54,503	48,850	—
100,000	179,443	149,913	74,624	230,056
100,000	135,893	84,743	—	—
100,000	119,556	65,776	78,360	138,046
100,000	217,530	152,585	110,984	233,939
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
100,000 ± 0,000	213,215±26,875	101,504±20,880	87,766±13,743	217,689±27,934

### A.3 Mutações em sítios de glicosilação (resíduos de asparagina) da pró-renina

#### A.3.1 Mutante +5(N/A)

**TABELA 19**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina +5(N/A) secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/μL de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/μL de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/μL de meio/hora)
2,370	22,280	24,650
2,280	3,650	5,930
5,490	24,740	30,230
6,750	43,160	49,910
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
4,223 ± 1,125	23,458 ± 8,081	27,680 ± 9,050

## A.3.2 Mutante +75(N/A)

**TABELA 20**

Resultados dos ensaios de geração de angiotensina I a partir da renina +75(N/A) secretada no meio de cultura com catepsina B. Os ensaios de geração de angiotensina I foram realizados diretamente com a incubação do meio de cultura (pré-tripsina) e uma hora após a pré-incubação com tripsina (pós-tripsina).

<b>Angiotensina I pré-tripsina</b> (ng/μL de meio/hora)	<b>Angiotensina I pós-tripsina</b> (ng/μL de meio/hora)	<b>Angiotensina I total</b> (ng/μL de meio/hora)
0,430	6,130	6,560
0,096	0,904	1,000
0,712	5,768	6,480
0,760	3,150	3,910
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
0,500 ± 0,153	3,988 ± 1,224	4,488 ± 1,315

## A.3.4 Porcentagens de angiotensina I formada a partir de pró-renina mutantes

TABELA 21

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina mutante secretada no meio de cultura com catepsina B.

<b>WT s/ catepsina</b>	<b>WT c/ catepsina</b>	<b>+5(N/A)</b>	<b>+75(N/A)</b>
(%)	(%)	(%)	(%)
8,444	21,934	9,615	6,555
9,423	16,909	38,449	9,600
7,627	10,365	18,161	10,988
8,033	9,605	13,524	19,437
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
8,382 ± 0,385	14,703 ± 2,915	19,937 ± 6,413	11,645 ± 2,757

TABELA 22

Resultados das porcentagens da geração de angiotensina I a partir da renina WT e mutantes secretadas no meio de cultura com catepsina B *versus* renina WT sem catepsina B (controle).

<b>WT s/ catepsina</b>	<b>WT c/ catepsina</b>	<b>+5(N/A)</b>	<b>+75(N/A)</b>
(%)	(%)	(%)	(%)
100,000	259,747	113,857	77,624
100,000	179,443	408,026	101,878
100,000	135,893	238,108	144,060
100,000	119,556	168,350	241,954
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
100,000 ± 0,000	173,660 ± 31,356	232,085 ± 63,921	141,379 ± 36,226

ANEXO B - RESULTADOS DA TAXA DE ATIVAÇÃO DO GENE REPÓRTER BNP-  
LUCIFERASE EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS NEONATOS

**B.1 Pró-renina selvagem (*wild type*)**

**TABELA 23**

Resultados das leituras da intensidade luminosa, em URL, emitida pela reação enzimática da luciferase, cuja transcrição foi regulada pelo promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937</b> (URL)	<b>U937-ProWT</b> (URL)	<b>AGT + U937</b> (URL)	<b>AGT + U937- ProWT</b> (URL)	<b>AII</b> (URL)
0,230	1,350	2,293	4,396	2,455
0,082	0,501	2,810	3,720	2,084
0,079	0,000	0,460	285,100	81,480
0,274	0,030	0,705	157,300	73,190
0,034	0,000	0,974	139,100	74,100
1,624	0,465	1,649	4,944	21,860
1,064	0,618	1,269	5,675	27,970
1,169	0,808	0,900	4,951	7,382
0,673	1,643	4,589	13,850	12,899
0,527	2,899	4,013	11,700	12,681
0,533	4,728	4,389	8,956	11,677
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
0,572 ± 0,157	1,186 ± 0,440	2,186 ± 0,465	58,154 ± 28,396	29,798 ± 9,297

**TABELA 24**

Resultados da taxa de ativação (adimensional) da transcrição gênica da luciferase regulada pelo promotor do BNP presente em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937</b>	<b>U937-ProWT</b>	<b>AGT + U937</b>	<b>AGT + U937- ProWT</b>	<b>AII</b>
1,000	5,870	9,970	19,113	10,674
1,000	6,110	34,268	45,366	25,,415
1,000	0,000	5,823	3608,861	1031,392
1,000	0,109	2,573	574,088	267,117
1,000	0,000	28,647	4091,176	2179,412
1,000	0,286	1,015	3,044	13,461
1,000	0,581	1,193	5,334	26,288
1,000	0,691	0,770	4,235	6,315
1,000	2,441	6,819	20,579	19,166
1,000	5,501	7,615	22,201	24,063
1,000	8,871	8,235	16,803	21,908
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
1,000 ± 0,000	2,769 ± 0,969	9,721 ± 3,399	764,618 ± 463,816	329,565 ± 206,559

**B.2 Mutantes de pró-renina mutante (-1-2 e +5)****TABELA 25**

Resultados das leituras da intensidade luminosa, em URL, emitida pela reação enzimática da luciferase, cuja transcrição foi regulada pelo promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937 (URL)</b>	<b>AGT + U937- ProWT (URL)</b>	<b>AGT + U937- Pro-1-2 (URL)</b>	<b>AGT + U937- Pro+5 (URL)</b>	<b>AII (URL)</b>
0,079	285,100	0,579	2,568	81,480
0,274	157,300	1,167	4,553	73,190
0,034	139,100	1,849	4,914	74,100
1,624	4,944	0,641	3,624	21,860
1,064	5,675	0,882	4,064	27,970
1,169	4,951	1,133	4,169	7,382
0,673	13,850	4,859	2,900	12,899
0,527	11,700	3,817	4,667	12,681
0,533	8,956	6,102	5,922	11,677
0,457	6,021	1,178	1,833	8,331
0,392	4,713	1,437	1,676	8,532
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
0,621 ± 0,146	58,392 ± 28,351	2,149 ± 0,569	3,717 ± 0,404	30,918 ± 8,991



**TABELA 26**

Resultados da taxa de ativação (adimensional) da transcrição gênica da luciferase regulada pelo promotor do BNP presente em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937</b>	<b>AGT + U937- ProWT</b>	<b>AGT + U937- Pro-1-2</b>	<b>AGT + U937- Pro+5</b>	<b>AII</b>
1,000	3608,861	7,329	32,506	1031,392
1,000	574,088	4,259	16,617	267,117
1,000	4091,176	54,382,	144,529	2179,412
1,000	3,044	0,395	2,232	13,461
1,000	5,334	0,829	3,820	26,288
1,000	4,235	0,969	3,566	6,315
1,000	20,579	7,220	4,309	19,166
1,000	22,201	7,243	8,856	24,063
1,000	16,803	11,448	11,111	21,908
1,000	13,175	2,578	4,011	18,230
1,000	12,023	3,666	4,276	21,765
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
1,000 ± 0,000	761,047 ± 464,383	9,120 ± 4,644	21,439 ± 12,596	329,920 ± 206,503

### B.3 Pró-renina e tratamento farmacológico (captopril ou losartan)

**TABELA 27**

Resultados das leituras da intensidade luminosa, em URL, emitida pela reação enzimática da luciferase, cuja transcrição foi regulada pelo promotor do BNP em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937</b> (URL)	<b>AGT +</b> <b>U937-</b> <b>ProWT</b> (URL)	<b>AGT +</b> <b>U937-Pro-</b> <b>WT + Cap</b> (URL)	<b>AGT +</b> <b>U937-</b> <b>ProWT +</b> <b>Los</b> (URL)	<b>AII + Los</b> (URL)	<b>AII</b> (URL)
0,230	4,396	1,160	4,718	1,848	2,455
0,082	3,720	2,400	3,478	1,990	2,084
0,074	3,340	1,501	4,080	1,723	1,626
0,079	285,100	19,070	—	—	81,480
0,274	157,300	13,900	—	—	73,190
0,034	139,100	8,110	—	—	74,100
1,624	4,944	1,669	—	—	21,860
1,064	5,675	2,142	—	—	27,970
1,169	4,951	1,492	—	—	7,382
0,673	13,850	4,040	—	—	12,899
0,527	11,700	4,172	—	—	12,681
<b>Média ±</b> <b>EPM</b>	<b>Média ±</b> <b>EPM</b>	<b>Média ±</b> <b>EPM</b>	<b>Média ±</b> <b>EPM</b>	<b>Média ±</b> <b>EPM</b>	<b>Média ±</b> <b>EPM</b>
0,530 ± 0,163	57,643 ± 28,489	5,423 ± 1,788	4,092 ± 0,358	1,854 ± 0,077	28,884 ± 9,518

**TABELA 28**

Resultados da taxa de ativação (adimensional) da transcrição gênica da luciferase regulada pelo promotor do BNP presente em cardiomiócitos de ratos neonatos.

<b>U937</b>	<b>AGT + U937- ProWT</b>	<b>AGT + U937- Pro-WT + Cap</b>	<b>AGT + U937- ProWT + Los</b>	<b>AII + Los</b>	<b>AII</b>
1,000	19,113	5,043	20,513	8,035	10,674
1,000	45,366	29,268	42,415	24,268	25,415
1,000	45,135	20,284	55,135	23,284	21,973
1,000	3608,861	241,392			1031,392
1,000	574,088	50,730			267,117
1,000	4091,176	238,529			2179,412
1,000	3,044	1,028			13,461
1,000	5,334	2,013			26,288
1,000	4,235	1,276			6,315
1,000	20,579	6,003			19,166
1,000	22,201	7,917			24,063
<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>	<b>Média ± EPM</b>
1,000 ±	767,194 ±	54,862 ±	39,354 ±	18,529 ±	329,570 ±
0,000	463,408	27,966	10,111	5,255	206,558