

MÉRCIA DE PAULA LIMA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
TONINA SÍMILE A PARTIR DE PLACENTA DE HUMANO**

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

2005

Mércia de Paula Lima

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
TONINA SÍMILE A PARTIR DE PLACENTA DE HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

2005

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMA
TONINA SÍMILE A PARTIR DE PLACENTA DE HUMANO**

MÉRCIA DE PAULA LIMA


Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 15 de ABRIL de 2005, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ADRIANO MONTEIRO DE CASTRO PIMENTA



PROF. DR. FERNANDO MARCOS DOS REIS



PROF. DR. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE



PROF. DR. RONALDO DE CARVALHO ARAÚJO



PROF. DR. JORGE LUIZ PESQUERO
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 15 de ABRIL de 2005.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:13).

Obrigada Senhor, pela presença constante em todos os momentos desta caminhada, sejam eles, alegres ou tristes e, principalmente, pelo dom da perseverança no desenvolvimento deste trabalho.

Dedico com carinho este trabalho ao meu filho **Pedro**, que nasceu no momento inicial do mesmo e cresceu paralelamente ao seu desenvolvimento. Peço-lhe desculpas, pelos muitos momentos de ausência no transcorrer destes anos, mas saiba que você sempre foi à razão e o estímulo para o desenvolvimento deste estudo.

Amo muito você, meu filho!!!

Ao João, agradeço à presença e ajuda constantes nos momentos alegres, tristes ou difíceis. Seu apoio foi valioso para a conclusão deste trabalho.

Dedico este trabalho a minha família e, agradeço a constante ajuda, apoio, estímulo e carinho recebidos durante essa caminhada. Sem vocês esta conquista seria muito difícil ou quase impossível.

Amo vocês!!!

“A amizade nada pede em troca – apenas uma pequena manutenção”

Georges Brassens

Agradeço a todos os amigos que conquisei durante essa caminhada, especialmente, aqueles com quem tive a oportunidade de conviver diariamente, trocando experiências, sorrisos, lamentações e tantas coisas mais....

Um agradecimento especial, a todos os colegas do Laboratório de Biofísica. Foi muito bom conviver, crescer e compartilhar com vocês, os vários momentos dessa trajetória.

Agradeço as mulheres que colaboraram com a execução deste trabalho, doando de forma espontânea, a placenta após o parto. Sei que a maioria de vocês, talvez não tenha acesso ao resultado final deste trabalho, mas isto não me impede de deixar aqui meu agradecimento.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao professor Jorge Luiz Pesquero, pela orientação, amizade, confiança e oportunidade no desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ À Lizandra Aparecida Vaz de Amorim Camargo, pela amizade e valiosa ajuda na parte experimental e computacional deste trabalho.
- ❖ À Kátia de Moraes Costa Leite, pela sua disposição sempre em ajudar-me e principalmente pela amizade.
- ❖ Ao professor Edyr Rogana, pela atenção e disponibilidade de seu laboratório e equipamentos, sempre que necessário.
- ❖ Ao professor Ronaldo de Carvalho Araújo, pela amizade, ajuda sempre que necessária e, por ter me recebido de maneira tão carinhosa em seu laboratório, na etapa final de realização deste trabalho.
- ❖ À professora Audrey Heloísa Ivanenko Salgado pelo apoio recebido durante a realização deste trabalho.
- ❖ À professora Joana D'Árck Bernardes da Silva pelo estímulo e colaboração nas etapas iniciais deste trabalho.
- ❖ Aos amigos do Laboratório de Biofísica, por compartilharem comigo, momentos de alegrias, tristezas e dificuldades e, pelo estímulo e carinho: Antônio Carlos, Cristina Lúcia, Eliane, Eva, Ivan, José Geraldo, Juliana, Kátia, Lizandra, Marina, Natasha, Paula e Wânia.
- ❖ Ao funcionário Jamil, técnico do laboratório de Enzimologia, do Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos e disposição em ajudar.
- ❖

À professora Lindalva Carvalho Armond, pela amizade, apoio e colaboração para a conclusão deste trabalho.

- ❖ À professora Adriana Cristina de Oliveira, pela amizade e apoio em vários momentos difíceis.
- ❖ À amiga e companheira de curso, Ledna Bettcher, pelo estímulo, ajuda, carinho e amizade.
- ❖ Aos professores e colegas da Escola de Enfermagem, pelo apoio, estímulo e colaboração.
- ❖ À Maria Célia, secretária do Curso de Pós-Graduação, pelo carinho e assistência em todos os momentos.
- ❖ Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB pela convivência e oportunidade.
- ❖ A todos os amigos do Instituto de Ciências Biológicas/ICB com quem tive a oportunidade de conviver.
- ❖ Aos demais amigos, que mesmo de longe torceram e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Mémoria

*Amar o perdido
deixa confundido
êste coração*

*Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apêlo do não*

*As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão*

*Mas as coisas findas,
muito mais que lindas
essas ficarão.*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A existência do sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido demonstrada no trato reprodutivo feminino. Neste local este sistema poderia estar funcionando independentemente ou em consonância com o sistema circulante, participando da regulação de vários aspectos funcionais, inclusive, em situações de anormalidades evidenciadas durante a gestação. Todos os componentes do SRA, incluindo o receptor AT1 foram identificados em placenta de humano. A tonina é uma serinoproteinase presente em muitos tecidos de rato, capaz de hidrolisar tanto o angiotensinogênio como a angiotensina I e liberar o peptídeo vasoativo angiotensina II (Ang II). O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar enzima com atividade tonina de tecido placentário humano. Placentas de mulheres híidas foram obtidas em hospital público, após consentimento formal das pacientes. Logo após o parto, a placenta era colocada em saco plástico e mergulhada em gelo seco para o transporte e armazenamento a -80°C . No processamento, a placenta era descongelada e lavada com solução fisiológica em abundância para retirada do excesso de sangue. Fragmentos placentários eram homogeneizados em sacarose 0,25 M pH 7,0, contendo coquetel de inibidores. O homogenato bruto era tratado com sulfato de amônio a 25, 50 e 80% para precipitação das proteínas. Os precipitados eram ressuspensos em água, dialisados e a atividade liberadora de Ang II rastreada através de radioimunoensaio. A atividade liberadora de angiotensina II foi verificada na fração 50%. Alíquotas desta fração foram aplicadas em cromatografia em coluna Superdex HR-200. As frações ativas desta etapa foram reunidas, concentradas contra polietileno glicol 6000, submetidas à diálise exaustiva contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4. Esse material foi aplicado em coluna Q-Sepharose, eluída com este mesmo tampão (etapa inicial) e com gradiente de NaCl. A fração ativa obtida em 100 mM de NaCl foi aplicada em coluna Phenyl-Superose eluída com gradiente linear (1,7 a 0,0 M) de sulfato de amônio. A atividade liberadora de Ang II e o perfil de proteínas em eletroforese eram analisados em cada etapa de purificação. Testes de inibição das frações ativas em Q-Sepharose foram realizados na presença dos inibidores (PMSF a 10 mM; pepstatina A 1 e 10 μM e aprotinina 1 μM). Analisou-se também, a presença de atividade angiotensinásica e atividade liberadora de angiotensina I (Ang I). Foi identificada a presença de duas frações liberadoras de Ang II em tecido placentário humano; ambas, inibidas por PMSF, porém, não inibidas por pepstatina A e aprotinina. A atividade angiotensinásica e a atividade liberadora de Ang I não foram

detectadas. A massa molecular estimada para as duas frações ativas é de 52 kDa. A sequência N-terminal da proteína encontrada para a fração ativa 100 mM/NaCl foi EVQLVESGGGL.

ABSTRACT

The existence of a renin-angiotensin system (RAS) in the female reproductive organ has been demonstrated. In this tissue, RAS could be acting independently or in accord with the circulating system, participating in the regulation of some functional aspects, in situations of abnormalities also evidenced during the gestation. All the components of RAS, including AT1 receptor had been identified in human placenta. Tonin is one serineproteinase present in many rat tissues that is able to cleave angiotensin II (Ang II) from angiotensin I (Ang I) and directly from angiotensinogen. This work was developed with the objective to isolate and to characterize enzyme(s) with tonin simile activity from human placenta. Placenta from health women had been gotten in public hospital, after formal assent of the patient. The placenta was placed in dry ice for the transport and later stored at -80°C . For processing, the placenta was defrosted and washed with physiological solution in abundance for withdrawal of the blood excess. Placenta fragments were cut and homogenized in 0,25 M sucrose pH 7,0 containing enzymatic inhibitors. The crude homogenate was treated with ammonium sulphate to 25, 50 and 80% for precipitation of proteins. Each precipitated was resuspended in water, dialysed and the Ang II liberating activity measured by radioimmunoassay after incubation of the fractions with partially purified human angiotensinogen and the tetradecapeptide synthetic renin substrate (AG(1-14)). The Ang II liberating activity was found in the 50% ammonium sulphate fraction. Aliquots of this fraction were load in chromatography in Superdex HR-200 column. The active fractions from Superdex HR-200 column had been concentrated against polyethylene glycol 6000, submitted to dialysis against Tris-HCl 20 mM pH 8.4 buffer and load in Q-Sepharose column that was eluted with Tris buffer in an initial stage followed by NaCl gradient. The active fraction that eluted with 100 mM NaCl was load in Phenyl-Superose column. This column was eluted with a linear gradient (1.7 to 0.0 M) of ammonium sulphate. The Ang II liberating activity was determined at each stage of purification. In addition, to each stage, the active fractions were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis for identification of the molecular mass of the active component. Tests of inhibition with 10 mM PMSF, 1 and 10 mM pepstatin and 1 mM aprotinin had been carried out for active fractions eluted from Q-Sepharose. The presence of angiotensinase activity also was searched in these fractions, as well as the Ang I liberating activity. Our results show the presence of two Ang II liberating fractions from human placenta, both inhibited by PMSF.

This activity was not inhibited by pepstatin or by aprotinin. It was not detected angiotensinase activity and Ang I liberating activity on the active fractions. The molecular

mass estimated for the active fractions is around 52 kDa and the N-terminal sequence found for the protein was EVQLVESGGGL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias de formação de angiotensina II.....	22
Figura 2.	Sequência de aminoácidos da porção N-terminal de tonina e rSMT3.....	29
Figura 3.	Perfil de eluição em cromatografia de filtração em gel Superdex HR-200.....	46
Figura 4.	Perfil de eluição em cromatografia de troca iônica Q-Sepharose.....	47
Figura 5.	Perfil de eluição em cromatografia de fase reversa Phenyl-Superose	49
Figura 6.	Deslocamento da ¹²⁵ I-Ang II ligada ao anticorpo pela Ang II não radioativa.....	50
Figura 7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações ativas provenientes da cromatografia em Q-Sepharose.....	51
Figura 8.	Projeção gráfica dos parâmetros Rf (fator de retenção) x logaritmo da massa molecular de proteínas padrões.....	52
Figura 9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema de placa das frações ativas provenientes da eletroforese de disco.....	53
Figura 10.	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos fragmentos ativos provenientes da fração ativa da Phenyl-Superose.....	55
Figura 11.	Eletrotransferência da fração ativa 100 mM da Q-Sepharose para membrana de nitrocelulose.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Parâmetros de purificação da enzima com atividade liberadora de Ang II obtidos para 1,0 g de placenta de humano.....	48
Tabela II.	Curva padrão do radioimunoensaio.....	50
Tabela III.	Efeito do PMSF sobre a atividade liberadora de Ang II.....	57
Tabela IV.	Atividade liberadora de Ang II na ausência e presença de pepstatina A.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Angiotensinogênio
AG(1-14)	Tetradecapeptídeo sintético referente aos resíduos da porção N-terminal do AG
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
BSA	Soroalbuminabovina
cpm	Contagem por minuto
DEAE	Dietilaminoetil
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	“ <i>Fast protein liquid chromatography</i> ”
GSM	Glândula submandibular
HPLC	“ <i>High performance liquid chromatography</i> ”
LNE	Ligação não específica
PEG	Polietileno glicol
Pepstatina A	Isovaleril-L-valil-L-valil-estatil-L-alail-estatina
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PVDF	Difluoreto de Polivinilideno
Rf	Fator de retenção
RIE	Radioimunoensaio
rSMT3	Fração T3 de tonina da glândula submandibular de rato
rSMT4	Fração T4 de tonina da glândula submandibular de rato
SDS	Sulfato de dodecil sódico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato de dodecil sódico
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametilenodiamina
tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	21
Sistema renina-angiotensina uteroplacentário.....	23
..Sistema tonina-angiotensina.....	26
2- JUSTIFICATIVA	31
3- OBJETIVOS	33
3.1- Geral.....	33
3.2- Específicos	33
4- MATERIAL	34
4.1- Considerações éticas.....	34
4.2- Placenta de humano.....	34
4.3- Peptídeos.....	34
4.4- Reagentes.....	34
4.5- Resinas e géis.....	35
4.6- Tonina de glândula submandibular de rato.....	35
4.7- Anticorpos.....	35
5- MÉTODOS	35
5.1- Purificação da atividade liberadora de Ang II.....	35
5.2- Purificação do angiotensinogênio de humano.....	36
5.3- Caracterização da enzima.....	37
5.3.1- Determinação da atividade liberadora de Angiotensina II.....	37
5.3.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	38
5.3.2.1- Eletroforese em sistema descontínuo	38
5.3.2.1.1- Preparo das amostras.....	38
5.3.2.1.2- Coloração do gel.....	39
5.3.2.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema de disco.....	39
5.3.2.3- Extração de proteína de gel de poliacrilamida em sistema de placa.....	40
5.3.3- Dosagem de proteína.....	40
5.3.4- Testes de inibição.....	41
5.3.5- Radiomarcagem das angiotensinas I e II.....	41
5.3.6- Radioimunoensaio para angiotensinas.....	41
5.3.7- Determinação da concentração dos peptídeos.....	43
5.3.8- Atividade angiotensinase.....	43
5.3.9- Eletrotransferência.....	43
5.3.9.1- Membrana de nitrocelulose.....	43
5.3.9.2- Membrana de PVDF.....	44
5.3.10- Seqüenciamento da extremidade amino terminal da proteína.....	44
6- RESULTADOS	45
6.1- Purificação da enzima.....	45

6.1.1- Cromatografia de filtração molecular em coluna Superdex HR-200.....	45
6.1.2- Cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose.....	46
6.1.3- Cromatografia em coluna de fase reversa Phenyl-Superose.....	48
6.2- Caracterização da enzima.....	49
6.2.1- Determinação da atividade liberadora de angiotensina II.....	49
6.2.2- Determinação do grau de pureza e massa molecular.....	51
6.2.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema de disco.....	52
6.2.4- Extração da proteína do gel de poliacrilamida em sistema de placa.....	54
6.2.5- Eletrotransferência.....	55
6.3- Fatores de inibição.....	56
6.3.1- Atividade liberadora de Ang II em presença de PMSF.....	56
6.3.2- Atividade liberadora de Ang II em presença de pepstatina A.....	57
6.3.3- Atividade liberadora de Ang II em presença de aprotinina.....	58
6.4- Atividade liberadora de Ang I das frações ativas.....	58
6.5- Determinação da atividade angiotensinase	59
6.6- Seqüenciamento dos resíduos N-terminal.....	59
7- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	61
8 - CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS.....	86

1. Introdução

O controle da pressão arterial está relacionado com o débito cardíaco e a resistência vascular periférica e pode ser afetado por três fatores: sistema nervoso, fatores humorais e autoregulação. O sistema nervoso autônomo e os fatores humorais atuam no controle sistêmico, enquanto a autoregulação se dá a nível local (Mizutani e cols, 1996). O fator humoral é representado por hormônios peptídicos, os quais são produzidos em muitos locais do corpo e agem, sobretudo, no controle da circulação sangüínea. A bradicinina, o peptídeo natriurético atrial e opióides endógenos atuam como vasodilatadores, enquanto vasopressina, norepinefrina, epinefrina e a angiotensina II (Ang II) atuam como vasoconstritores, sendo esse último, o principal efector do sistema renina-angiotensina (SRA).

Além de sua potente ação vasoconstritora, a Ang II exerce também numerosas ações nos sistemas cardiovascular, renal e endócrino (Peach, 1981). Exerce ainda, ao longo prazo, efeito sobre o crescimento e a diferenciação celular. Estimula a angiogênese (Fernandez, e cols, 1985; Le Noble e cols, 1991), a hipertrofia de células musculares lisas vasculares (Geisterfer e cols, 1988), a hiperplasia (Orth e cols, 1995) e regula os efeitos de outros fatores de crescimento, como Fator I de crescimento Insulina-símile (Delafontaine e Lou, 1993). A angiotensina II, também é capaz de promover ações antiproliferativas, pois foi capaz de inibir a proliferação de células endoteliais (Stoll e cols, 1995) e também induzir a apoptose (Yamanda e cols, 1996). Realiza ainda um importante papel na proliferação de células mesangiais em nível do glomérulo, bem como, na síntese de matriz extracelular, tais como fibronectina e colágeno (Liang e cols, 2003).

No homem, as ações da Ang II são mediadas por pelo menos dois receptores, AT₁ e AT₂ (Curnow e cols, 1992; Timmermans e cols, 1993; Martin e Elton, 1995; Matsusaka e Ischikawa, 1997; Inagami, 1999; Ardaillou, 1999). O efeito vasoconstrictor e regulatório da Ang II sobre fatores de crescimento são mediados por receptores do tipo AT₁; já as ações antiproliferativas e apoptóticas são mediadas por receptores AT₂ (Nakajima e cols, 1995).

Uma nova visão do SRA tem sido descrita. Importantes ações autócrinas, parácrinas e intácrinas foram verificadas em vários tecidos tais como rim, cérebro, adrenal, coração, hipófise, glândulas salivares, vasos e órgãos sexuais (Brosnihan e cols, 1988; Dzau, 1988; Lindpainter e Ganten, 1991).

O SRA tecidual, independente do sistema circulante foi descrito por volta de 1970. Devido à capacidade de diversos órgãos sintetizarem renina e angiotensina de forma

independente da circulação (Ganten e cols, 1976; Brosnihan e cols, 1988), e também, por apresentarem múltiplos receptores para angiotensina (Timmermans e cols, 1993), vários estudos de investigação do SRA tecidual vêm ganhando destaque. Evidências mais convincentes da presença deste sistema tecidual têm sido obtidas através de técnicas de biologia molecular. Com a utilização de sondas para os RNAs mensageiros do angiotensinogênio e da renina (Campbel e Habener, 1986; Dzau e cols, 1986) foi possível mostrar a presença destes, numa variedade de tecidos extra-renais, demonstrando assim, que os componentes deste sistema apresentam uma expressão bem mais ampla que a admitida inicialmente.

Vários estudos têm demonstrado que diversos tecidos, incluindo vasos sanguíneos, cérebro, coração e adipócitos podem gerar Ang II diretamente do AG, independentemente da renina e da ECA (Rosenthal e cols, 1990; Baltatu e cols, 1997). Estes estudos indicam claramente o papel de outras enzimas na geração de Ang I e Ang II, porém, não se conhece a importância relativa destas vias, na liberação destes peptídeos. Entretanto, a conversão de Ang I para Ang II, independentemente da ECA tem sido mostrada em vários tecidos, incluindo o coração humano e músculo detrusor (Urata e Ganten, 1993; Lindberg e cols, 1994).

Enzimas semelhantes à renina, como por exemplo, a catepsina D, pepsina e outras aspartil-proteinases, são capazes de produzir Ang I a partir do AG. Outras enzimas, como a catepsina G e tonina são capazes de produzir Ang II diretamente do AG (figura 1).

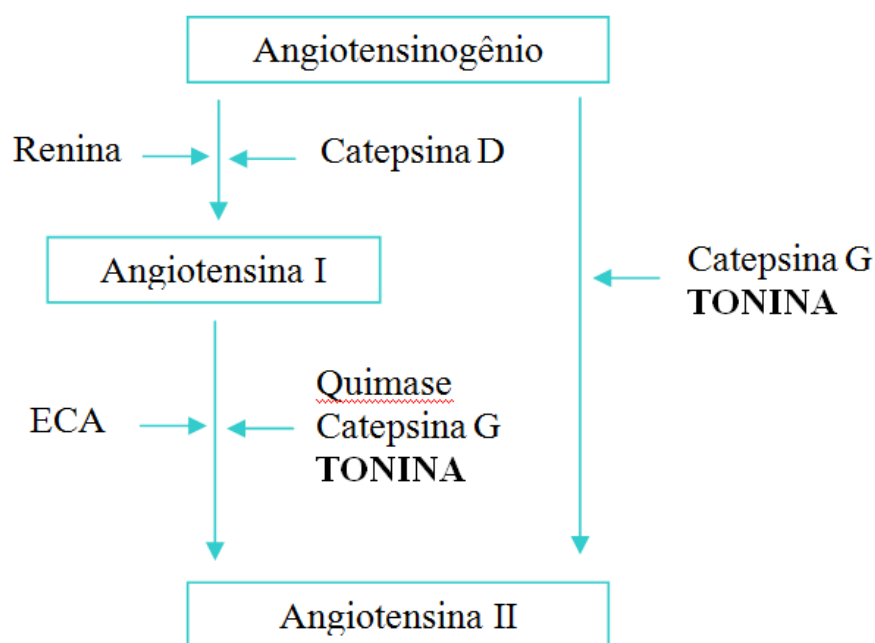


Figura 1. Vias de formação de angiotensina II.

Sistema renina-angiotensina uteroplacentário

O papel do sistema renina-angiotensina na regulação da pressão sanguínea arterial e na homeostase de água e eletrólitos já é bem conhecido. Há mais de três décadas, altas concentrações de renina foram detectadas em vários tecidos extra-renais, incluindo o trato reprodutivo feminino (Stakemann, 1960; Skinner e cols, 1968; Symonds e cols, 1968). A presença de um sistema renina-angiotensina no trato reprodutivo feminino tem sido aceite. Neste local, este sistema poderia funcionar independentemente ou em consonância com o sistema renina-angiotensina circulante e, participar na regulação autócrina e parácrina de vários aspectos funcionais dos tecidos. Existem evidências que mostram a presença de todos os componentes do sistema renina-angiotensina em um mesmo local, num mesmo compartimento, o que permitiria assim, a interação destes.

A presença de renina foi detectada em unidades uteroplacentárias de todas as espécies estudadas (Hagemann e cols, 1994), inclusive na espécie humana (Skinner e cols, 1968). Em humano, a maior concentração foi encontrada nas membranas fetais (córion e âmnio) e na decídua. Na unidade uteroplacentária humana, a renina, encontra-se em maior concentração na forma de prorenina, seu precursor biosintético, que quando clivado gera a renina ativa (Warren e cols, 1982; Kalenga e cols, 1996b; Poisner, 1988). A secreção de prorenina a partir da unidade uteroplacentária (Brar e cols, 1986; Lenz e cols, 1991) e do corpo lúteo (Derx e cols, 1987) poderia explicar o aumento da concentração de prorenina plasmática em mulheres grávidas, sendo essa, mais pronunciada no primeiro trimestre da gestação (Sealey e cols, 1982; Derx e cols, 1987). Contrariamente, em alguns animais, tais como o porco e a vaca, a concentração tecidual de renina é relativamente baixa, sendo a forma predominante a renina ativa (Hagemann e cols, 1993). Foi sugerido que a diferença na expressão de renina na unidade uteroplacentária que ocorre entre as espécies, seja devida, a diferença existente na arquitetura placentária. A presença de renina em tecido humano foi demonstrada por imunohistoquímica em células do epitélio glandular endometrial, células trofoblásticas e amnioblásticas e, em macrófagos (Poisner e cols, 1981; Poisner e cols, 1982; Unnikumar e cols, 1988; Raju e Lee, 1989; Hanssens e cols, 1995; Li e Ahmed, 1997). A expressão do RNAm da renina foi investigada e encontrada na decídua (córion-decídua) e no endométrio humano, não sendo detectada na lâmina basal coriônica, vilosidades placentárias, miométrio e âmnio (Ihara, e cols, 1987; Shaw e cols, 1989). Posteriormente, a presença do RNAm de renina foi verificado na placenta (Paul e cols, 1993).

O angiotensinogênio (AG) foi encontrado em altas concentrações em homogenatos de placenta de humano, âmnio, córion e endométrio (Johnson, 1980; Lenz e cols, 1989; Lenz e cols, 1993). Além disso, o angiotensinogênio foi detectado por imunohistoquímica na decídua e na placenta de humano (Metsärinne e cols, 1990). Entretanto, o RNAm do angiotensinogênio não foi detectado no córion, âmnio e na placenta (Ihara e cols, 1987). Estudos posteriores demonstraram por RT-PCR a amplificação do gene que codifica o angiotensinogênio, em placenta de humano (Paul e cols, 1993; Morgan e cols, 1997). Alguns autores sugerem que o angiotensinogênio possa ser seqüestrado da circulação sanguínea materna ou fetal, sendo isso, facilitado pela alta concentração plasmática desta proteína durante a gravidez (Skinner e cols, 1972). Outro aspecto interessante verificado está relacionado à existência de formas de angiotensinogênio de alta massa molecular, tanto no plasma de mulheres grávidas, quanto em extratos de placenta de humano (Tewsbury, 1996). Essas formas de angiotensinogênio de alta massa molecular podem representar complexos entre o angiotensinogênio, complemento C3dg e a pro forma da principal proteína do eosinófilo humano (Oxvig e cols, 1995).

Estudos da enzima conversora de angiotensina (ECA) mostram que ela apresenta alta atividade nas membranas fetais, placenta e útero (Lieberman e Sastre, 1983; Sim e Seng, 1984; Alhenc-Gelas e cols, 1984; Yagami e cols, 1994; Kalenga e cols, 1996b). A imunoreatividade da ECA mostra uma variação cíclica no endométrio humano e a mais alta expressão é verificada no final da fase secretora e no período menstrual (Li e Ahmed, 1997). Na placenta de humano, o aumento da atividade da ECA acompanha a evolução da gestação, enquanto, a expressão do RNAm da ECA mostra um aumento na fase inicial da gestação e uma diminuição, próximo ao termo (Yagami e cols, 1994).

Apesar da existência de todos os componentes do sistema renina-angiotensina na placenta necessários para a geração de Ang I e Ang II, alguns autores sugerem a participação de vias alternativas e independentes deste sistema, na liberação destes peptídeos neste local. O encontro de catepsina D (Sapolsky e Woessner, 1972) e quimase (Urata e cols, 1994) foram relatados no útero e na placenta (Contractor e cols, 1982). Outros estudos têm demonstrado a presença de Ang II e sua imunoreatividade em útero e placenta (Naruse e cols, 1985; De Silva e cols, 1988; Kalenga e cols, 1991a; Ahmed e cols, 1995; Li e Ahmed, 1996a, Li e Ahmed, 1996b). A imunoreatividade da Ang II parece promover mudanças cíclicas no endométrio humano. Na fase proliferativa, a imunoreatividade a Ang II foi observada no epitélio glandular e estroma, enquanto, na fase secretora, intensa imunoreatividade foi observada nas

células do estroma perivascular, em torno das arteríolas espirais do endométrio (Ahmed e cols, 1995).

Segundo alguns autores, a placenta é rica em proteinases, que são enzimas capazes de degradar a Ang II (Johnson e cols, 1984; Mizutani e cols, 1994; Neudeck e cols, 1996). Um aumento na expressão de angiotensinase A foi verificado na vilosidade trofoblástica, sugerindo um aumento da degradação de Ang II. Também foi verificada uma relação com o aumento da frequência do quadro de pré-eclâmpsia (Neudeck e cols, 1996). Porém, o significado destes achados, ainda não está bem estabelecido.

Quanto aos receptores de Ang II, os subtipos AT1 e AT2 foram encontrados na placenta e membranas fetais de humano, coelhos, ratos e cobaios (Kalenga e cols, 1996a). Posteriormente, os receptores foram também encontrados em placenta e membranas fetais de porca (Nielsen e cols, 1996; ovelha (Zheng e cols, 1997) e vaca (Schauser e cols, 1998). Na placenta de humano, os receptores predominantemente encontrados são do tipo AT1 (Kalenga e cols, 1991b; Knock e cols, 1994; Li e cols, 1998). Estes receptores foram localizados no citotrofoblasto e no sinciciotrofoblasto da placenta, no trofoblasto extraviloso, nos vasos sanguíneos e ao redor destes, nas vilosidades placentárias (Knock e cols, 1994; Li e cols, 1998). Uma pequena população de sítios de ligação não AT1/AT2 foram também identificados (Li e cols, 1998). A expressão de receptores de Ang II na membrana fetal é baixa e ambos, AT1 e AT2 apresentam níveis de expressão similares (Kalenga e cols, 1991b). Na placenta de humano, ambos, o receptor AT1 e o RNAm do receptor mostraram aumento no primeiro trimestre da gestação e alcançaram o nível mais alto, quando do termo (Petit e cols, 1996). Uma correlação positiva entre a concentração de Ang II e a presença do receptor AT1 foi observada na placenta de humano sugerindo que a primeira poderia regular a expressão do receptor AT1, nesse órgão (Kalenga e cols, 1991a). Kalenga e cols (1996c) verificaram que a progesterona diminuía a expressão do receptor AT1 em células trofoblásticas isoladas de placenta madura, enquanto, essa não era afetada pelo estradiol. A expressão destes receptores em placenta de outras espécies é marcadamente diferenciada da placenta de humano. No porco, o receptor AT2 é o tipo predominantemente encontrado e é distribuído por todas as partes da placenta e membranas fetais (Nielsen e cols, 1996). Na placenta desse animal, o receptor AT1 foi encontrado somente na primeira parte da gestação e, presente em baixa densidade. Já na placenta bovina, o receptor AT2 é o principal tipo encontrado no compartimento fetal, enquanto, o receptor AT1 é encontrado predominantemente no compartimento materno (Schauser e cols, 1998). Baixa densidade de

sítios de ligação não AT1/AT2 foram encontrados na parte materna da placenta. O padrão de distribuição dos receptores de Ang II não é alterado na placenta bovina durante a gestação. No útero humano, mais precisamente no endométrio, há uma predominância do receptor do tipo AT2 (Ahmed e cols, 1995; Saridogon e cols, 1996). A expressão do receptor do tipo AT1 é relativamente baixa e mostra mudanças cíclicas. Na fase proliferativa, a mais alta expressão do receptor AT1 é encontrada no epitélio glandular e estroma (Ahmed e cols, 1995). Na fase secretora, a expressão é mais evidente nas células do estroma perivascular, em volta das arteríolas espirais do endométrio (Ahmed e cols, 1995). Os receptores AT2 são predominantemente encontrados no miométrio uterino de mulheres não grávidas (Bing e cols, 1996; Saridogon e cols, 1996). Os níveis de RNAm do receptor AT2 e de sua respectiva proteína estão diminuídos durante a gravidez, sendo esses mediados, provavelmente, por esteróides sexuais (de Gasparo e cols, 1994; Mancina e cols, 1996; Cox e cols, 1996). O miométrio de mulheres não grávidas contém um nível baixo de receptor AT1. Uma vez que, nenhuma diminuição foi observada na expressão deste receptor durante a gravidez, a regulação do mesmo parece ser realizada de forma diferente daquela verificada para o receptor AT2 (de Gasparo e cols, 1994; Mancina e cols, 1996; Cox e cols, 1996). Em concordância verifica-se que a expressão do RNAm do receptor AT1 não é afetada pela gravidez (Matsumoto e cols, 1996). Os receptores de Ang II, também foram encontrados em útero de rata (de Gasparo e cols, 1990), ovelha (Cox e cols, 1993; Moeller e cols, 1996), porca (Nielsen e cols, 1997) e vaca (Schauer e cols, 1999).

A significância funcional da diferença relativa de expressão dos receptores AT1 e AT2 precisa ser mais bem investigada. Isto poderia explicar as ações fisiológicas da Ang II num determinado local. Múltiplas funções de um sistema renina-angiotensina uteroplacentário têm sido demonstradas e propostas, mas parece que o principal papel fisiológico deste sistema seja interagir com outros sistemas regulatórios e desta forma, modular vários aspectos funcionais dos tecidos e a presença de distúrbios nestas interações poderiam levar há diversas disfunções e doenças.

Sistema tonina-angiotensina

Enquanto a ECA é capaz de liberar Ang II pela hidrólise da ligação Phe.His da Ang I, convertendo Ang I em Ang II, tonina, além de promover esta conversão é capaz também de liberar Ang II pela hidrólise da ligação Phe.His, na seqüência do angiotensinogênio (Grisé e cols, 1981). Além disso, tonina é capaz de formar Ang II a partir de peptídeos sintéticos

correspondentes à porção tetradecapeptídica N-terminal do AG (AG(1-14)) (Schiller e cols, 1976; Pesquero e cols, 1982). Tonina difere-se da ECA em termos de especificidade, atividade catalítica, fatores de ativação e inibição (Boucher e cols, 1974).

Tonina foi descrita em 1972 por Boucher e colaboradores. Pertence à família das serinoproteinases, na qual está incluída ainda, a calicreína, tripsina, quimotripsina, a subunidade γ do fator de crescimento de nervos (γ -NGF), o fator de crescimento ligado a proteínas (EGF-BPs), o antígeno prostático específico (PSA) e outras proteinases menos caracterizadas. Foi demonstrado também, que além de liberar Ang II, tonina é capaz de hidrolisar proopiomelanocortina para produzir o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônios peptídicos beta-lipotróficos (Seidah e cols, 1979). É capaz ainda de degradar a substância P (Chrétien e cols, 1980; Pesquero e cols, 1982), hidrolisar ligações do tipo Arg.Xxx e Phe.Xxx demonstrando ser uma enzima com atividade triptica-quimotriptica.

Embora seja capaz de hidrolisar diferentes ligações envolvendo os resíduos de Phe ou Arg, tonina parece ser mais específica que a tripsina e quimotripsina, pois a hidrólise dessas ligações parece envolver fatores conformacionais. Pesquero e cols (1982) verificaram que a bradicinina não é inativada pela tonina e que a hidrólise da ligação Phe.His de peptídeos sintéticos correspondentes à porção tetradecapeptídica N-terminal do AG depende de uma seqüência mínima em torno desta ligação e envolve os resíduos Ile.His.Pro.Phe.His.Leu.

A atividade tonina encontra-se presente em diversos tecidos de rato, tais como testículos, fígado, medula e córtex renal, baço, cérebro, pulmões, glândulas parótidas, próstata, pâncreas e glândula submandibular (GSM), tecido esse no qual está presente em altos níveis (Boucher e cols, 1974; Johansen e cols, 1987; Woodley-Miller e cols, 1987; Araujo e cols, 1991). A tonina representa 8% do conteúdo protéico da glândula submandibular e é liberada desta para a saliva e corrente sanguínea (Garcia e cols, 1976 e 1983). Sua atividade nesse tecido varia em relação à idade e sexo, sendo maior no macho. A diferença em relação ao sexo torna-se mais evidente após 60-80 dias de idade (Lis e cols, 1977). O nível de tonina imunoreativa na GSM de rato diminui após castração e é restabelecida após tratamento com testosterona, demonstrando assim, ser esta enzima andrógeno-dependente (Shih e cols, 1986). Em estudo realizado em nosso laboratório por Lopes e cols (1997) foi verificado que a tonina é expressa em diferentes regiões do encéfalo de rato e que, a seqüência de bases do cDNA encontrado nesse tecido apresenta 100% de homologia com aquela descrita para a GSM de rato. Na espécie humana a atividade tonina parece estar presente na GSM (Gualberto e cols, 1992) e na próstata humana (Guimarães,

1995), mas até o momento, a seqüência do gene que codifica a enzima humana, ainda não foi determinada.

No plasma, a atividade tonina não pode ser determinada, devido ao fato da enzima estar ligada a um forte inibidor de natureza protéica (Boucher e cols, 1972 e 1974; Demassieux e cols, 1976; Garcia e cols, 1978 e 1979). Este inibidor foi isolado do plasma de rato (Trembley e cols, 1981) e a partir do soro de ratos (Lima, 1996). A massa molecular do inibidor estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de sódio é da ordem de 360 kDa, sugerindo ser esse uma α_2 -macroglobulina. Somente com o desenvolvimento de um ensaio imunorradiométrico, a atividade tonina pôde ser determinada a partir de plasma de rato (Johansen e cols, 1987).

Tonina tem sido purificada a partir de GSM de rato e tecido de humano por métodos convencionais (Demassieux e cols, 1976; Pesquero e cols, 1982; Araujo e cols, 1991, Gualberto e cols, 1992 e Guimarães, 1995), por cromatografia de afinidade (Ikeda e Arakawa, 1981; Ikeda e cols, 1981) e por cromatografia de enfoque isoelétrico (Cheng e Morris, 1982). A massa molecular da tonina determinada por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida é da ordem de 27 kDa. Esta enzima apresenta pH ótimo de atividade, em torno de 6,8. Além disso, não é inibida por EDTA ou pepstatina (Boucher e cols, 1974), mas apresenta forte inibição por inibidores de serinoproteinases (Thibault e cols, 1981). Em tecido de rato, tonina apresenta-se como uma proteína de cadeia polipeptídica simples contendo 272 aminoácidos e também, extensiva homologia com outras proteínas da família tripsina-quimotripsina.

Pouco se sabe sobre o papel fisiológico da tonina. Existem evidências que sugerem sua participação na patogênese da hipertensão do tipo 1 rim-1clip em rato (Garcia e cols, 1978). A presença de tonina foi observada em fluídos os quais a composição iônica variava em resposta a alterações no equilíbrio hidroeletrolítico, tais como nos ductos estriado e coletor da GSM e ductos coletores e túbulos distais do néfron, sugerindo assim, que essa enzima possa ter importância para a homeostase hidroeletrolítica dos líquidos corporais. A liberação de tonina para a saliva parece estar sob controle beta-adrenérgico (Garcia e cols, 1976). É sugerida a relação entre a tonina e eletrólitos na saliva e, o estímulo induz uma significativa alteração na concentração de eletrólitos na mesma (Yoshida e cols, 1967; Young e cols, 1971).

Kondo e cols (1980) observaram que a administração central de tonina no ventrículo lateral de ratos produzia aumento da ingestão de água e da pressão arterial, em ratos anestesiados. Estes efeitos foram abolidos por um antagonista de Ang II, a saralasin; o

mesmo não ocorreu quando da utilização de inibidor de ECA. Araújo e cols (2002) verificaram que a administração de tonina no III ventrículo cerebral de ratos acordados produzia efeito dipsogênico e apetite ao sal, sendo esse inibido pelo tratamento prévio com losartan intracerebroventricular. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de tonina a nível central, estar envolvida na liberação de Ang II e, conseqüentemente, relacionada a seus efeitos centrais.

Maiores informações a cerca do papel fisiológico da tonina vêm sendo obtidas a partir da caracterização de produtos de genes em diversos tecidos animais. Os genes da família da calicreína e tonina já caracterizados consistem em torno de 13 a 26 genes e estão ligados a cromossomos específicos no camundongo (Drinkwater e cols, 1987), no rato (Ashley e MacDonald, 1985a, b; Wines e cols, 1989) e no homem (Clements e cols, 2001). Algumas proteínas relacionadas a esses genes já foram isoladas e caracterizadas. Os genes rKLK1 e rKLK2 são os responsáveis pela síntese da calicreína e da tonina de GSM, respectivamente. A seqüência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene rKLK2 coincide com a seqüência descrita por Lazure e cols (1987) para a tonina descrita por Boucher e cols em 1972.

Araujo e cols (1991) purificaram duas enzimas tonina símiles a partir de glândula submandibular de rato, denominadas de rSMT3 e rSMT4 e, uma outra enzima a partir de próstata de rato, denominada como rPT1. As características físico-químicas verificadas para rSMT4 coincidem com as observadas e codificada pelo gene rKLK2, ou seja, com a tonina descrita por Boucher e cols (1972). A proteína rSMT3 difere da rSMT4 quanto à massa molecular, atividade específica, pH ótimo e sensibilidade aos inibidores de serinoproteinases. Entretanto, a seqüência de aminoácidos de sua porção N-terminal coincide em 38 dos 39 resíduos identificados, quando comparado à seqüência proposta para a rSMT4, diferindo apenas no resíduo da posição 27, na qual se verifica a inserção de um resíduo de serina. As seqüências obtidas para tonina e rSMT3 estão apresentadas na figura 2, abaixo.

tonina: I-V-G-G-Y⁵-K-C-E-K-N¹⁰-S-Q-P-W-Q¹⁵-V-A-V-I-N²⁰-E-Y-L-C-G²⁵-G-V-L-I-D³⁰-P-S-W-V-I³⁵-T-A-A-H...(Lazure e cols, 1987)

rSMT3: I-V-G-G-Y⁵-K-C-E-K-N¹⁰-S-Q-P-W-Q¹⁵-V-A-V-I-N²⁰-E-Y-L-C-G²⁵-G-S-V-L-I³⁰-D-P-S-W-V³⁵-I-T-A-A...(Araujo, 1994)

Figura 2. Seqüência de aminoácidos da porção N-terminal de tonina e rSMT3.

Recentemente, Borges e cols (2003) estudaram a participação da tonina no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em ratos induzida por isoproterenol. Estes autores monitorizaram a hipertrofia cardíaca através do índice cardíaco, ou seja, pela razão obtida entre o peso do coração e o peso corporal e, pela expressão do peptídeo natriurético atrial no ventrículo esquerdo. Após sete dias de tratamento com isoproterenol, os animais eram sacrificados e o coração era rapidamente removido. As estruturas cardíacas eram separadas; somente os átrios eram mantidos em conjunto, mas os ventrículos direito e esquerdo eram separados. A determinação da atividade tonina foi realizada nessas estruturas através do radioimunoensaio (RIE). A atividade específica da tonina foi significativamente maior para a estrutura atrial quando comparadas às estruturas ventriculares. Segundo esses autores, o aumento da atividade específica da tonina nos átrios estaria relacionado ao tratamento dos animais com isoproterenol, sendo o mesmo não foi verificado para as estruturas ventriculares. A atividade tonina total foi maior no ventrículo esquerdo. A expressão dos níveis de tonina nas estruturas atriais e no ventrículo esquerdo foi analisada através do ensaio de proteção a ribonuclease (RPA). A expressão de tonina nas estruturas cardíacas não foi detectável para o grupo de animais sem tratamento prévio com isoproterenol. O tratamento com isoproterenol induziu a expressão de tonina a nível detectável, somente na estrutura atrial. Além da análise de atividade e expressão de tonina nas estruturas cardíacas, os autores avaliaram a expressão de outros componentes do SRA nas estruturas. Verificaram que o gene responsável pelo AG apresenta maior expressão no tecido atrial em comparação ao tecido ventricular esquerdo e que, o tratamento com o isoproterenol torna essa expressão aumentada da ordem 1,8 vezes. A expressão do gene que codifica para renina não foi detectada nas estruturas cardíacas, nem mesmo no grupo de animais que sofreu indução da hipertrofia. O tratamento com isoproterenol também não acarretou mudanças significativas nos níveis de expressão de ECA, tanto nas estruturas atriais, como nas estruturas do ventrículo esquerdo. Estes autores sugerem que a tonina possa ser uma importante via de geração de Ang II no tecido cardíaco e dessa forma ocasionar alterações dinâmicas neste órgão, principalmente, no tocante ao efeito cronotrópico e inotrópico positivo e remodelamento do miocárdio.

Buscando elucidar o papel fisiológico da tonina, Cardoso (2002) promoveu a geração de animais transgênicos, ratos e camundongos que superexpressavam tonina de glândula submandibular de rato dirigida para o encéfalo. Foram obtidas duas linhagens de ratos e camundongos com a inserção do fragmento transgene nos genomas, portanto, consideradas positivas. Foi analisado nesses animais utilizando-se as técnicas de RT-PCR e RPA, o nível

de expressão gênica para tonina em vários órgãos e tecidos. Em ratos, os maiores níveis de expressão foram verificados no encéfalo e coração. No camundongo, o maior nível de expressão foi verificado no encéfalo, seguido do coração, rim e fígado. Apesar da verificação da expressão deste gene nos tecidos, isto não implica, necessariamente, a presença de atividade tonina nestes locais. Portanto, a determinação de atividade tonina foi realizada nessas estruturas. Em ratos, os maiores níveis de atividade específica para tonina foram encontrados na aorta, tecido adiposo, próstata e bexiga. Nas estruturas encefálicas, as maiores atividades foram encontradas em ordem crescente na hipófise, braistern, diencéfalo e cerebelo total. Nos camundongos, as maiores atividades para a enzima foram observadas no encéfalo, glândula submandibular, próstata, adrenal, tecido adiposo e aorta. Alguns parâmetros fisiológicos foram avaliados, mas nos ratos apenas os resultados referentes à redução de peso corporal e aumento no volume de água ingerido apresentaram diferença significativa estatisticamente, quando comparados ao grupo de animais controle. Já para os camundongos, apenas o volume de água ingerida apresentou diferença significativa estatisticamente. Também foram analisados os parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais. Verificou-se tanto para ratos como para camundongos, tendência para o aumento da pressão arterial, entretanto, nenhuma diferença foi verificada para os valores de frequência cardíaca, quando comparados aos grupos controle.

2. Justificativa

Como descrito anteriormente, todos os componentes do sistema renina-angiotensina incluindo prorenina, renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina, Ang II e receptores de Ang II foram identificados por meio de vários métodos na placenta de humano (Taira e cols, 1985; Kalenga e cols, 1991a, b; Sowers e cols, 1993). Hagemann e cols (1994) mostraram ter a placenta, um sistema renina-angiotensina intrinsecamente ativo, no qual a Ang II poderia atuar de forma autócrina e/ou parácrina.

Em nosso laboratório, vários estudos têm sido desenvolvidos com tonina. Esta enzima é capaz de hidrolisar tanto o angiotensinogênio, como a angiotensina I e liberar o peptídeo vasoativo, Ang II. Em tecido humano, atividade tonina parece estar presente na glândula submandibular (Gualberto e cols, 1992) e próstata (Guimarães, 1995). Resultados pilotos obtidos por nós mostraram que tonina está presente em tecido placentário humano. Poderia ela contribuir para a liberação de Ang II neste local? Além disso, a obtenção desta enzima a partir de tecido placentário poderia contribuir para novos estudos desta proteína em outros

tecidos humanos. A placenta é um anexo que é eliminado após o parto, sendo assim, mais fácil sua obtenção.

3. Objetivos

3.1. Geral

- ❖ Verificar a presença de enzima com atividade tonina símile em placenta de humano e desenvolver processo de purificação e caracterização da mesma.

3.2. Específicos

- ❖ Definir processo de isolamento, a partir de placenta de humano, de enzima com atividade tonina símile;
- ❖ Caracterizar alguns parâmetros físico-químicos da proteína;
- ❖ Determinar sua seqüência N-terminal.

4. Material

4.1. Considerações éticas

O projeto que deu origem a esta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas (Anexo I e II). As mulheres gestantes internadas na maternidade do Hospital das Clínicas eram informadas sobre o objetivo do estudo e convidadas a participar do mesmo. Aquelas que concordavam em doar a placenta, quando do parto, assinavam termo de consentimento autorizando a coleta da mesma (Anexo III). A coleta deste material biológico não oferecia danos e agravos à saúde das mulheres, uma vez que, a placenta é um órgão temporário que é eliminado logo após o parto.

4.2. Placenta de humano

Placentas de mulheres hípidas (n=8) foram obtidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, após consentimento formal da paciente. Estas eram oriundas de partos a termo, naturais ou cesáreas e foram coletadas logo após a dequitação e imediatamente colocadas em sacos plásticos que eram mergulhados em gelo seco para transporte. No laboratório, as placentas eram estocadas a -80° C e ali permaneciam até o momento do processamento.

4.3. Peptídeos

Ang I, Ang II e o substrato sintético da renina (AG(1-14)) foram fornecidos pelos professores ACM Paiva e L Juliano do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina).

4.4. Reagentes

O 125 I utilizado para radiomarcagem das angiotensinas era de procedência *Amersham Biosciences*. Os demais reagentes utilizados, de grau analítico eram de procedência *Merck* ou *Sigma*.

4.5. Resinas e géis

As colunas de filtração em gel *Superdex HR-200* e *Sephacryl S-200*, de troca iônica *Q-Sepharose fast flow* e *DEAE-celulose* e, de fase reversa *Phenyl-Superose* eram de procedência *Amersham*.

4.6. Tonina de glândula submandibular de rato

A tonina utilizada para os testes de atividade no processo de purificação do angiotensinogênio de humano foi obtida a partir de glândula submandibular de rato (GSM), conforme descrito por Araujo e cols (1992).

4.7. Anticorpos

Os anticorpos anti-Ang I e anti-Ang II utilizados no RIE apresentando títulos de 1/3000 e 1/4000, respectivamente, foram produzidos no laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, conforme método proposto por Lemos (1991). O anticorpo anti-tonina de rato, também foi produzido no laboratório utilizando-se tonina isolada de glândula submandibular de rato, conforme método proposto por Araujo e cols (1991).

5. Métodos

5.1. Purificação de frações com atividade liberadora de Ang II

Todo o processo era desenvolvido a 4° C. No momento do processamento, a placenta era descongelada e lavada com solução fisiológica em abundância para retirada do excesso de sangue. Previamente era preparada uma solução de sacarose 250 mM contendo os inibidores enzimáticos: ácido etilenodiamino tetra-acético (*EDTA*), dipiridil, orto-fenantrolina e tetrationato de sódio, todos na concentração de 10 mM. O pH da solução foi ajustado para 7,0. Fragmentos de placenta pesando aproximadamente 400 g eram homogeneizados em 1600 mL de solução de sacarose mantida a 4° C. O homogenato bruto obtido era então tratado com sulfato de amônio a 25, 50 e 80% para precipitação de proteínas e a cada etapa, centrifugado a 15.000xg por 30 minutos. Para a determinação da atividade liberadora de Ang II por meio de radioimunoensaio (RIE), o precipitado obtido em cada etapa anterior era ressuspensionado em

água e uma alíquota dialisada por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 75 mM contendo *EDTA* 1 mM (pH 6,8). Alíquotas de 10 mL da fração ativa foram aplicadas em cromatografia de filtração em coluna *Superdex HR-200* (1,6 x 35,0 cm), pré equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 75 mM contendo *EDTA* 1 mM e NaCl 150 mM (pH 6,8), num fluxo de 1 mL/min, com coleta de frações de 1,0 mL. A eluição dos componentes protéicos era acompanhada pela leitura da densidade óptica a 280 nm. Frações representativas de cada um dos picos de densidade óptica foram incubadas para identificação da atividade liberadora de Ang II. Os volumes das frações ativas desta cromatografia foram juntados e colocados para concentrar contra polietileno glicol 6000 e após, dialisado por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão tris-HCl 20 mM (pH 8,4). Este material foi aplicado, em coluna de troca iônica *Q-Sepharose* (1,5 x 2,0 cm), previamente equilibrada em tampão tris-HCl 20 mM (pH 8,4). Inicialmente, a coluna era eluída com este tampão até densidade óptica zero. Em seguida, as proteínas adsorvidas na coluna eram eluídas com tampão tris contendo concentrações crescentes de NaCl (100, 200, 300, 500 e 1000 mM). O fluxo era mantido a 1,0 mL/min e eram coletadas frações de 1,0 mL. A atividade liberadora de Ang II das frações era rastreada em todos os picos de densidade óptica. As frações ativas eram reunidas e após, dialisadas por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 50 mM contendo 1,7 M de sulfato de amônio (pH 7,0), denominado de tampão A. Após a diálise, a fração era aplicada em coluna de fase reversa *Phenyl-Superose* (0,5 x 5,0 cm) equilibrada previamente com o tampão A. Inicialmente, a coluna era eluída com 5 mL do tampão A e partir deste volume, a eluição das proteínas adsorvidas a coluna era realizada com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), denominado de tampão B, utilizando-se gradiente linear de 0-100% e um volume total de 25 mL. Em seguida, a coluna era eluída com 100% de tampão B por mais 50 mL. O fluxo era mantido em 1,0 mL/min e, coletadas frações de 1,0 mL. Frações representativas de cada um dos picos foram dialisadas por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) para posterior determinação da atividade liberadora de Ang II. Em cada etapa cromatográfica, as frações ativas eram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida para avaliação do processo de purificação.

5.2. Purificação do angiotensinogênio de humano

O angiotensinogênio utilizado como substrato para determinação da atividade liberadora de Ang II foi obtido a partir de plasma de humano empregando-se o método descrito por Gualberto e cols (1992). Um volume aproximado de 100 mL de sangue foi

coletado de indivíduo normotenso utilizando-se *EDTA* como anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação a 800xg por 30 min e, posteriormente, tratado com sulfato de amônio até 30% de saturação. O sal era adicionado ao plasma, lentamente, e após dissolução por completo, o material era mantido em banho de gelo com agitação lenta por 30 minutos. Este material era centrifugado a 15.000xg por 60 min. O sobrenadante obtido foi tratado com sulfato de amônio até 55% para precipitação de proteínas e após, centrifugado, como descrito na etapa anterior. Os sedimentos obtidos após as centrifugações eram ressuspensos em água e retiradas alíquotas de 1,0 mL que eram submetida à diálise por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 50 mM contendo 1 mM de *EDTA* (pH 6,8). Após diálise, alíquota de 50 µL de cada amostra era incubada com tonina isolada de glândula submandibular de rato e, a atividade liberadora de Ang II era determinada por RIE. A fração proteica precipitada a 55% mostrou-se com atividade e foi aplicada em coluna de filtração *Sephacryl S-200* equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 50 mM contendo *EDTA* 1 mM e NaCl a 300 mM (pH 6,8), num fluxo de 12 mL/h. Alíquotas de amostras representativas de cada um dos picos de densidade óptica foram incubadas com tonina de rato para identificação da atividade liberadora de Ang II. As frações ativas obtidas nesta cromatografia foram juntadas e colocadas para dialisar por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão tris-HCl 20 mM contendo *EDTA* 1 mM (pH 8,4). Após diálise, o material foi aplicado em cromatografia de troca iônica em coluna de *DEAE-celulose* (1,5 x 2,0 cm), inicialmente eluída com tampão tris-HCl num fluxo de 1,0 mL/min até densidade óptica zero. Em seguida, a coluna foi eluída com este mesmo tampão acrescido de concentrações crescentes de NaCl, a saber: 50, 75, 100, 150, 200 e 500 mM. Alíquotas de amostras representativas de cada pico cromatográfico foram incubadas com tonina da GSM de rato para determinação da atividade liberadora de Ang II. A atividade liberadora de Ang II foi verificada para as frações eluídas com NaCl a 100 mM.

5.3. Caracterização da enzima obtida de tecido da placenta de humano

5.3.1. Determinação da atividade liberadora de Ang II

Para a determinação da atividade liberadora de Ang II utilizou-se como substratos, o AG humano (parcialmente purificado) e AG(1-14) sintético. Alíquotas de amostras contendo 1 µg de proteína eram incubadas com 160 µg de AG humano, por 24 horas a 37°C, em presença de tampão fosfato-citrato 100 mM contendo *EDTA* 12 mM, dipiridil 25 mM, orto-

fenantrolina 10 mM e tetrionato de sódio 10 mM. Era adicionado azida sódica 3 mM, como conservante e, o pH era ajustado para 5,5. Quando foi utilizado como substrato AG(1-14), as alíquotas de amostras foram incubadas com 5 µg deste substrato, por 4 horas a 37°C, em presença de tampão fosfato 100 mM (pH 6,8). A reação catalítica era interrompida por adição de 5 µL de HCl 6 M. A Ang II liberada no meio era determinada por RIE (Gualberto e cols, 1992).

5.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese vertical era realizada em escala analítica empregando-se o método descrito por Laemmli (1970). A corrida eletroforética era efetuada à temperatura ambiente utilizando-se tampão tris-glicina 20 mM (pH 8,8), tanto para o ânodo como para o cátodo e, tensão constante de 100 V.

5.3.2.1. Eletroforese em sistema descontínuo

O gel de separação era constituído de uma solução de acrilamida-bisacrilamida a 10% (p/v) em tampão tris-HCl 375 mM (pH 8,8) contendo *SDS* 0,1% (p/v). Era acrescentado a esta mistura, uma solução de persulfato de amônio a 10% (p/v) e *TEMED* puro, agentes responsáveis pela polimerização, em quantidades suficientes para concentração final em torno de 1% (v/v). O gel de concentração era constituído a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida a 4% (p/v) preparado de forma idêntica ao anterior, porém, utilizando-se agora, tampão tris-HCl 125 mM (pH 6,8). Para a polimerização dos géis foram utilizadas placas de vidro nas dimensões de 10,5 cm (altura) por 10,2 cm (largura) e espessura de 1 mm. Ver maiores detalhes a respeito do preparo dos géis no anexo IV.

5.3.2.1.1. Preparo das amostras para aplicação nos géis

Alíquotas das frações ativas obtidas nas várias etapas do processo de purificação contendo de 5 a 50 µg de proteínas eram solubilizadas em tampão tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) contendo *SDS* 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v), na ausência de agentes redutores e desnaturantes e na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol 6,93% (v/v). As amostras de proteínas e os padrões de massa molecular conhecidos eram submetidos

à fervura por cinco minutos, rapidamente centrifugados e aplicados nas canaletas do gel de concentração.

5.3.2.1.2. Coloração do gel

Para coloração dos géis pela prata foi utilizado o método descrito por Tunon e Johansson (1984), parcialmente modificado. Todo o processo era efetuado com agitação lenta. Após a corrida de eletroforese, o gel era pré-fixado por 60 minutos, sequencialmente, em cada uma das soluções contendo metanol, ácido acético glacial e água deionizada, nas proporções de 100:15:85 e 10:15:175. Numa terceira etapa de fixação, o gel era imerso em solução de glutaraldeído a 10% (v/v), por 60 minutos. Após este tempo, o gel era lavado com água deionizada por 45 minutos, com sucessivas trocas de água, a cada intervalo de cinco minutos. Após o procedimento de lavagem, o gel era mergulhado em solução de nitrato de prata 0,4% (p/v) e aí permanecia por um período de 30 minutos. Ao término deste tempo, o gel era lavado com água deionizada por 15 minutos, com troca da mesma a intervalos de cinco minutos. Para revelação, o gel era submetido à solução de ácido cítrico $5,7 \times 10^{-4}$ M contendo 0,1% (v/v) de formaldeído. O processo de revelação era interrompido pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 1% (v/v).

5.3.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema de disco

Para a eletroforese de disco foi utilizado o sistema e método descritos por Gordon (1969). O gel de poliacrilamida era constituído a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida a 7,5% (p/v) em tampão tris-HCl 0,125 M (pH 9,0). A polimerização era realizada em tubos cilíndricos de 6 x 90 mm e era desencadeada pela adição de *TEMED* puro e solução de persulfato de amônio, suficientes para uma concentração final em torno de 1% (v/v). Uma alíquota contendo aproximadamente 50 µg de proteína, proveniente da fração ativa obtida da cromatografia em coluna *Q-Sepharose* foi misturada a tampão tris-HCl 0,25 M (pH 9,0) contendo glicerol a 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,025% (p/v). Após a mistura, o volume era aplicado na superfície do gel. A eletroforese era realizada na presença de tampão tris-glicina 0,025 M (pH 8,4), por aproximadamente 1 hora a 4°C, com voltagem fixada em 60 volts. Após a corrida de eletroforese, os géis foram retirados de cada um dos tubos do sistema e, recortados longitudinalmente, em fragmentos de 0,4 cm. Cada fragmento era colocado em tubo *ependorf* contendo 1,0 mL de tampão fosfato 20 mM com *EDTA* 1

mM (pH 6,8) e mantidos pernoite a 4°C. Posteriormente, os *eppendorfs* eram transferidos para um termoregulador a 37°C, sob agitação, por aproximadamente três horas. Após, os fragmentos de géis eram macerados com auxílio de um bastão de vidro e, o material centrifugado a 11.000xg, a 4°C, por 60 minutos. O sobrenadante de cada um dos tubos era separado e a atividade liberadora de Ang II rastreada por meio do RIE. Após a identificação das frações ativas, estas eram reunidas e concentradas em tubo Centricon YM10 e, uma alíquota do concentrado obtido contendo aproximadamente 5 µg de proteína era aplicado em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com o objetivo de identificar a banda de proteína responsável pela atividade.

5.3.2.3. Extração de proteína de gel de poliacrilamida em sistema de placa

Uma alíquota da fração ativa obtida da cromatografia em coluna *Phenyl-Superose* foi submetida à diálise por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 50 mM contendo *EDTA* 1 mM (pH 7,0) e após, aplicada em gel de poliacrilamida a 10% (p/v) em sistema de placa, na presença de *SDS* e, nas mesmas condições descritas no **ítem 5.3.2.1**. Após a corrida de eletroforese, o gel foi fatiado longitudinalmente em fragmentos de 1,0 cm e cada fragmento foi colocado em tubo *eppendorf* contendo 1,0 mL de água deionizada. Os *eppendorfs* foram mantidos a 4°C, pernoite e, transferidos para um termoregulador a 37° C, com agitação, por aproximadamente três horas. Em seguida, os fragmentos foram macerados com auxílio de um bastão de vidro e, o material foi centrifugado a 11.000xg, a 4°C, por 60 minutos. O sobrenadante foi separado e submetido à diálise por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão fosfato 20 mM contendo *EDTA* 1 mM e triton X-100 2,5% (v/v), (pH 6,8) para eliminação do *SDS*. Após a diálise era determinada a atividade liberadora de Ang II pelas frações. O sobrenadante da fração ativa foi então concentrado com a utilização de PEG 6000. Uma alíquota do concentrado com aproximadamente 2 µg de proteína foi aplicada em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (p/v) para identificação da banda proteica responsável pela atividade.

5.3.3. Dosagem de proteína

A concentração de proteína das amostras obtidas nas várias etapas do processo de purificação foi estimada por meio do método proposto por Bradford (1976). Como solução padrão foi utilizada soroalbumina bovina (*BSA*). Um volume de amostra que variava de 10-

100 μ L era pipetado em tubos de ensaio e o volume, nessa etapa, era ajustado para 100 μ L com água. Em seguida, era pipetado a cada tubo, 1,0 mL de uma solução contendo *Coomassie blue* G-250 0,01% (p/v) (anexo V). A mistura de cada um dos tubos era agitada em vórtex e após repouso de 20 minutos, a leitura era realizada a 595 nm utilizando-se um espectrofotômetro *Shimadzu* UV 160 A.

5.3.4. Testes de inibição

As frações ativas obtidas da cromatografia em coluna *Q-Sepharose* foram incubadas na presença de angiotensinogênio humano e AG(1-14), conforme descrito no ítem 5.3.1, na ausência e na presença dos seguintes inibidores: *PMSF* 10 mM, pepstatina A 1 μ M e 10 μ M e aprotinina 1 μ M. A Ang II liberada para a incubação foi determinada através da técnica de RIE.

5.3.5. Radiomarcção da angiotensina I e II

Para a radiomarcção da angiotensina I e angiotensina II utilizou-se o método proposto por Hunter e Greenwood (1962), adaptado por Nielsen e cols (1971), no qual se emprega a cloramina T como agente oxidante. Para cada 50 μ g de Ang II (ou Ang I) dissolvidas em 10 μ L de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,4, adicionava-se 1,0 mCi de 125 I e 50 μ g de cloramina T dissolvida em 500 μ L de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,4. Após um minuto de reação e agitação em vórtex, a reação era interrompida pela adição de 150 μ L de uma solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v). A purificação da Ang II (ou Ang I) monoiodada era realizada em coluna de fase reversa (*MinorPC*) em sistema *HPLC*. A coluna era eluída com uma solução de acetonitrila 25% (v/v) em TFA 0,1% (v/v), num fluxo de 1,0 mL por minuto. A radioatividade das frações coletadas era determinada por meio de um cintilador gama (minigama *LKB*). A partir desta determinação era realizada a verificação da capacidade de ligação das frações obtidas na cromatografia. Para isso, incubava-as com o anticorpo anti-Ang II (ou anti-Ang I) por um período de 18-24 horas à temperatura de 4°C. A capacidade de ligação era determinada pela relação B_0/T , sendo B_0 a radioatividade ligada ao anticorpo e T à radioatividade total utilizada na incubação. As frações que continham a angiotensina monoiodada apresentando capacidade de ligação entre 25 e 50% eram estocadas a -20°C e utilizadas posteriormente para a realização dos ensaios para a determinação da atividade liberadora de Ang II (ou Ang I).

5.3.6. Radioimunoensaio para angiotensina I e Angiotensina II

Utilizou-se para ambos os ensaios, soluções padrões estoques de Ang I e Ang II, na concentração de 10^{-3} M. Essas eram diluídas seriadamente, até uma faixa de concentração de 10^{-8} a 10^{-11} M, em tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo gelatina 0,1% (p/v), azida sódica 0,1% (p/v), NaCl 150 mM e EDTA 1 mM, com o pH ajustado para 7,4 (tampão RIE). As amostras eram ensaiadas em triplicatas e os padrões de angiotensina, em duplicata. O volume de angiotensina padrão pipetado a cada tubo da curva variava de 40 a 200 μ L. A angiotensina marcada (125 I-Ang II ou 125 I-Ang I) era inicialmente diluída em tampão RIE, de modo a ser obtido aproximadamente 8000 cpm em cada 100 μ L de solução. Desta solução era pipetado 100 μ L, em cada tubo do ensaio. A seguir, as amostras provenientes de incubação prévia como descrito anteriormente, eram pipetadas em triplicatas. Após, eram pipetados 100 μ L de anticorpo anti-angiotensina (diluído 1/4000 para Ang II e 1/3000 para Ang I), em todos os tubos do ensaio, exceto nos referentes ao LNE e total. Ao final, o volume de cada tubo era ajustado para 500 μ L com tampão RIE. Após agitação dos tubos, esses eram incubados a 4°C por 18-24 horas. Transcorrido este período era realizada a separação da angiotensina radioativa livre, daquela ligada ao anticorpo, por adsorção em uma suspensão de carvão-dextran, na relação de 0,625 g (carvão) e 0,0625 g (dextran T-70) para cada 100 mL de tampão RIE. Esta suspensão era mantida em banho de gelo com agitação e dela, era pipetado 1,0 mL em cada tubo do ensaio, exceto nos tubos referentes ao controle do total, nos quais era pipetado 1,0 mL de tampão RIE. Após agitação dos tubos, esses eram mantidos em repouso por 15 minutos, em banho de gelo e, então submetidos à centrifugação a 2.000xg, a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante era decantado e levado para contagem, em contador gama (minigama LKB). Os cálculos eram baseados na dependência do logito B/Bo e em função do logaritmo da concentração do padrão (Rodbard e cols, 1969), sendo B e Bo, as contagens obtidas referentes à angiotensina marcada ligada ao anticorpo, na presença e na ausência da angiotensina padrão, respectivamente.

A reação cruzada entre o substrato e o anticorpo anti-angiotensina, também era descontada por meio de curva padrão obtida somente para a interação entre o substrato e o anticorpo. No ensaio eram incluídos ainda, outros três tubos que continham somente a angiotensina marcada, para a determinação da ligação não específica, representada pela contagem registrada, na ausência do anticorpo anti-angiotensina.

5.3.7. Determinação da concentração dos peptídeos

A concentração da angiotensina I, angiotensina II e do substrato sintético da renina (AG(1-14)) era determinada espectrofotometricamente. Após a dissolução, a solução era filtrada em membrana *Millipore* (GSWP 01300) e a densidade óptica determinada a 275 nm. A concentração foi determinada utilizando-se $\epsilon = 1379 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a angiotensina I e angiotensina II e $\epsilon = 2758 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o AG(1-14), de acordo com Juliano e Paiva (1974).

5.3.8. Atividade angiotensinase

Para esse ensaio foi incubada uma solução padrão de Ang II, com concentração conhecida ($1,0 \times 10^{-7}\text{M}$), na ausência e na presença das frações ativas obtidas da cromatografia em coluna *Q-Sepharose*. A incubação foi realizada nas mesmas condições empregadas para incubação das amostras com o angiotensinogênio humano, parcialmente purificado. A concentração da Ang II remanescente no meio de incubação foi determinada através de RIE.

5.3.9. Eletrotransferência

5.3.9.1. Membrana de nitrocelulose

Inicialmente era realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, utilizando-se o método descrito por Laemmli (1970), na qual eram aplicadas amostras na ausência e na presença de 2-mercaptoetanol a 6,93% (v/v). A corrida de eletroforese era realizada conforme descrito no **item 5.3.2**. Após a corrida, a transferência das proteínas foi realizada para membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (*Amersham Pharmacia Biotech*), a 4°C, 24 volts, pernoite, com a voltagem sendo duplicada na última hora do processo. Após a transferência, o padrão de massa molecular pré-corado (*Invitrogen*) era recortado e o restante da membrana era incubada em tampão fosfato de sódio 35 mM contendo NaCl 0,85% (p/v) e *Tween* 0,3% (v/v), por 1 hora, à temperatura ambiente. Este tampão foi identificado como *PBST*. Após este procedimento, a membrana foi submetida a três lavagens consecutivas de cinco minutos cada, com *PBST* (*Tween* a 0,05%) e então, incubada com anti-soro anti-tonina, por duas horas, à temperatura ambiente. Após a incubação com o anti-soro, a membrana era novamente submetida a lavagem com *PBST* (*Tween* a 0,05%) e incubada com anti-IgG de

coelho conjugado à peroxidase, à temperatura ambiente, por 1 hora. Após esta etapa, a membrana era lavada por cinco vezes, sendo as três primeiras lavagens realizadas com *PBST* (*Tween* a 0,05%) e as duas últimas, somente utilizando tampão fosfato 35 mM contendo NaCl 0,85% (p/v). O processo de revelação era realizado na presença de diaminobenzidina 0,05% (p/v), cloronaftol 0,025% (p/v) e peróxido de hidrogênio 0,0125% (v/v).

5.3.9.2. Membrana de PVDF

A transferência de proteínas a partir de gel de eletroforese em poliacrilamida para membranas de polyvinylidene fluoride - *PVDF Hybond-P* (*Amersham Pharmacia Biotech*) foi utilizada para fazer a determinação da seqüência amino terminal da proteína de interesse. Primeiramente foi realizada uma corrida de eletroforese da amostra de interesse, como descrito no item 5.3.2. A transferência foi realizada como descrito por Matsudaira (1987). Utilizou-se como tampão de transferência, a solução de *CAPS* (ácido 3-ciclohexilamino-1-propano-sulfônico) a 10 mM contendo metanol a 10% (v/v) e o pH ajustado para 11,0. Este tampão era preparado no momento do uso. Antes da montagem do sanduíche para transferência, a membrana de *PVDF* era imersa em metanol por cerca de 10 segundos e em seguida, transferida para o tampão descrito acima. O cassete de transferência contendo o gel em contato direto com a membrana era mergulhado em tampão *CAPS*. A transferência era realizada pernoite, a 4°C, a 40 volts. Após transferência, a membrana era removida e lavada três vezes com água deionizada, com troca da mesma, a cada cinco minutos. A membrana era então mergulhada em solução de *Ponceau S* a 0,2% (p/v) em ácido acético a 1% (v/v). Após visualização das proteínas na membrana, a banda da proteína de interesse era recortada e encaminhada para determinação da seqüência amino terminal.

5.3.10. Seqüenciamento da extremidade amino terminal da proteína

O seqüenciamento da extremidade amino terminal da proteína de interesse foi realizado pelo Núcleo de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, sob a responsabilidade do Professor Marcelo Bemquerer com a partir da utilização de fragmentos das membranas de *PVDF*, previamente recortada. Para o sequenciamento da proteína de interesse utilizou-se o método descrito por Edman (1950).

6. Resultados

6.1. Purificação da enzima

Inicialmente era preparada solução para homogeneizar o tecido. A solução continha sacarose 0,25 M contendo os inibidores enzimáticos, *EDTA*, dipiridil, orto-fenantrolina e tetrionato de sódio, todos a 10 mM. Após dissolução de todos os sais, o pH era ajustado para 7,0. Para o processo de purificação foi utilizado aproximadamente 400 g de tecido de placenta de humano obtido como descrito no item 4.2. Este tecido foi homogeneizado com 1600 mL de solução de sacarose e submetido à centrifugação. O sobrenadante correspondente a 2050 mL apresentou conteúdo proteico estimado em 5,75 mg/mL ou 11,7 g de proteína total. A atividade específica liberadora de angiotensina II deste material foi determinada utilizando-se o angiotensinogênio humano, parcialmente purificado e o AG(1-14), como substratos, sendo os valores encontrados de $5,1 \times 10^{-12}$ e $5,2 \times 10^{-10}$ moles de Ang II/hora/mg de proteína, respectivamente. O sobrenadante obtido nesta fase foi tratado com sulfato de amônio a 25, 50 e 80%, para a precipitação de proteínas. Após foi centrifugado a 15.000xg, a 4°C, por 30 minutos, em cada uma das etapas. Como descrito em métodos, a atividade liberadora de Ang II foi avaliada no precipitado, de cada uma das etapas do processo. Para tanto, o mesmo era ressuspenso em tampão fosfato de sódio 75 mM contendo *EDTA* 1 mM (pH 6,8) e colocado para dialisar por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra este tampão. A atividade liberadora de angiotensina II foi verificada somente na fração correspondente ao tratamento com sulfato de amônio a 50%. Deste material foram realizadas alíquotas de frações de 10 mL (contendo aproximadamente 32 mg de proteína) que foram congeladas a -80°C, para posterior processamento em cromatografia, em coluna de filtração. As atividades específicas foram da ordem de $1,3 \times 10^{-11}$ e $1,8 \times 10^{-9}$ moles de angiotensina II liberados por hora por miligrama de proteína (moles Ang II/hora/mg prot) quando incubadas com angiotensinogênio humano e AG(1-14), respectivamente.

6.1.1. Cromatografia de filtração molecular em coluna *Superdex HR-200*

Foi utilizada uma coluna com dimensões de 1,6 cm x 35 cm, que estava acoplada no sistema *FPLC*. A cada cromatografia eram aplicados 16 mg de proteína, ou seja, uma alíquota de 5 mL do sobrenadante obtido da etapa anterior (precipitação com 50% de sulfato de amônio). A figura 3, abaixo, ilustra o perfil cromatográfico obtido nesta etapa de purificação. Frações representativas de cada pico de eluição foram analisadas quanto à atividade

liberadora de Ang II utilizando-se como substrato o AG(1-14). A Ang II liberada foi quantificada por meio de RIE. A atividade liberadora de Ang II foi verificada nas frações correspondentes ao primeiro pico de eluição.

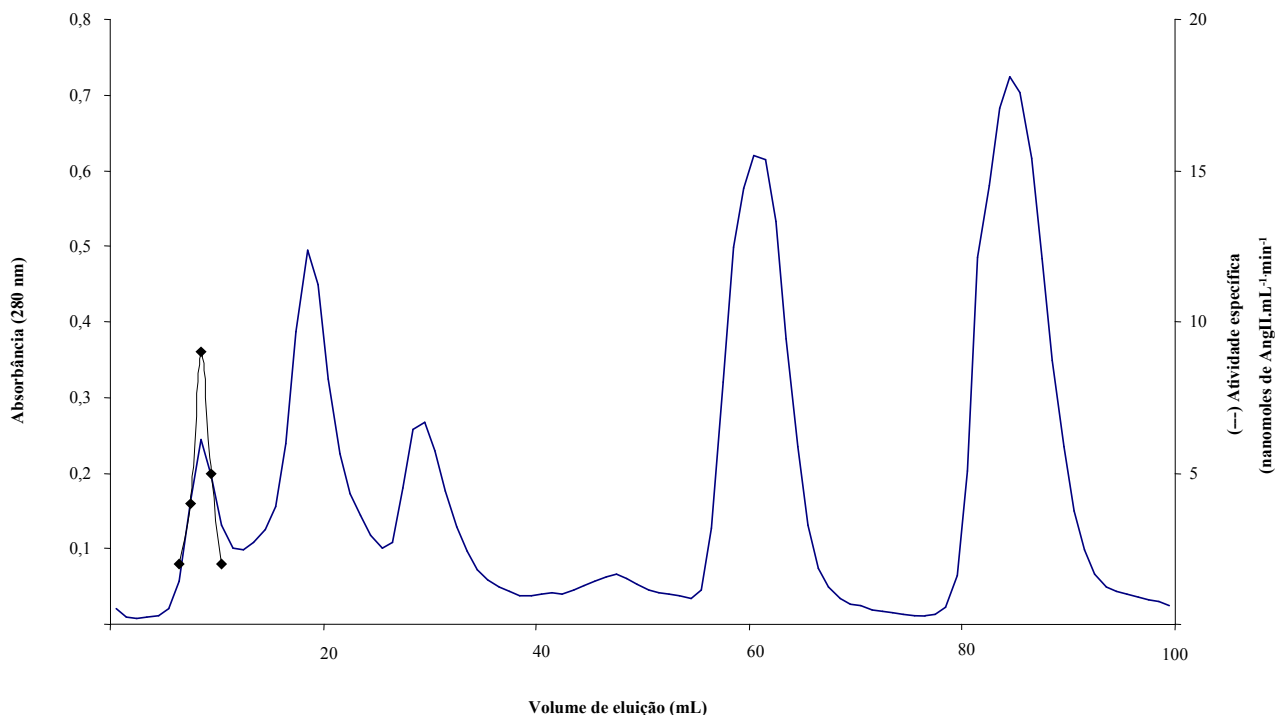


Figura 3 - Perfil de eluição do material proveniente do homogeneizado de placenta em coluna de filtração em gel Superdex HR-200 (1,6 x 35,0 cm) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 75 mM contendo EDTA 1 mM e NaCl 100 mM (pH 6,8), no fluxo 1 mL/min. Foram coletadas frações de 1,0 mL. O símbolo (♦) indica a atividade específica das frações utilizando-se AG(1-14) como substrato.

As frações ativas foram reunidas e resultou um volume final de 420 mL. Este volume de material foi colocado para concentrar contra polietilenoglicol 6000 e, em seguida, colocado para dialisar por 24 horas (com troca a cada seis horas) contra tampão tris-HCl 20 mM (pH 8,4) contendo EDTA 1 mM. O volume obtido após a diálise foi de 22,0 mL e a proteína total foi estimada em 14,6 mg. A atividade específica deste material foi de $3,9 \times 10^{-11}$ e $6,0 \times 10^{-9}$ moles Ang II/hora/mg proteína, utilizando-se respectivamente como substratos, angiotensinogênio e o AG(1-14).

6.1.2. Cromatografia de troca iônica em coluna *Q-Sepharose*

Foi utilizada uma coluna com dimensões de 1,6 cm x 2,0 cm, acoplada ao sistema FPLC, com controle de temperatura a 4°C. A fração ativa obtida da cromatografia anterior, ou seja, os 22,0 mL (14,6 mg de proteína) foram aplicados em coluna de troca iônica, previamente equilibrada com tampão tris-HCl 20 mM (pH 8,4) contendo EDTA 1 mM. As

proteínas adsorvidas a matriz da coluna foram eluídas num primeiro momento, somente com este tampão e, em seguida, com este tampão acrescido de NaCl nas concentrações de 100, 200, 300, 500 e 1000 mM. O perfil de eluição das proteínas obtido nesta cromatografia está apresentado na figura 4, abaixo.

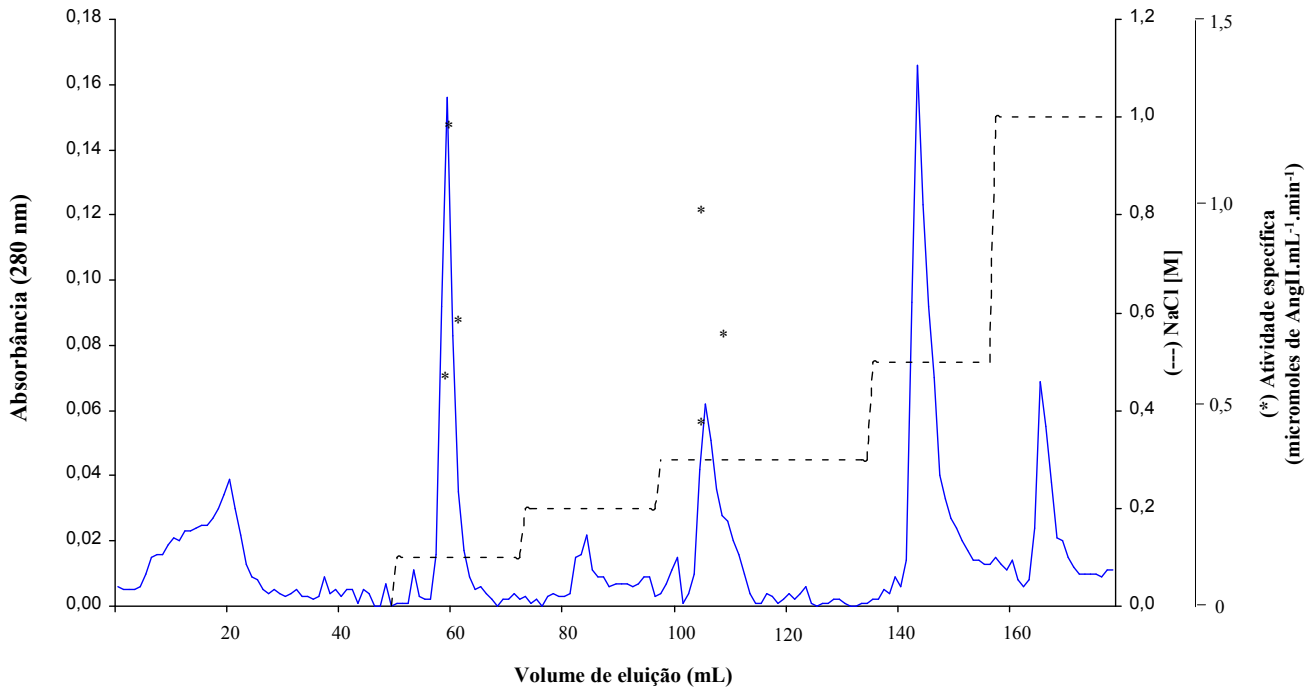


Figura 4 - Perfil de eluição do material proveniente da filtração em gel Superdex HR-200 obtido em coluna de troca iônica Q-Sepharose (1,6 cm x 2,0 cm) equilibrada e eluída com tampão tris-HCl 20 mM contendo EDTA 1 mM (pH 8,4), no fluxo 1 mL/min. Foram coletadas frações de 1,0 mL. O símbolo (*) indica a atividade específica das frações utilizando-se AG(1-14) como substrato.

A atividade liberadora de Ang II foi verificada para as frações correspondentes ao segundo e quarto picos dessa cromatografia, ou seja, frações eluídas com 100 mM e 300 mM de NaCl, respectivamente. As frações apresentando atividade liberadora de Ang II, de cada um destes picos foram reunidas e perfizeram um volume final de 3 mL, por fração. O conteúdo protéico foi estimado em 0,142 mg/mL (fração 100 mM) e em 0,125 mg/mL (fração 300 mM). Quanto a atividade específica esta foi da ordem de $6,0 \times 10^{-10}$ e $8,6 \times 10^{-7}$ moles Ang II/hora/mg proteína (fração 100 mM) quando incubada com o angiotensinogênio humano e o AG(1-14), respectivamente. Para a fração 300 mM, a atividade específica foi da ordem de $4,8 \times 10^{-10}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ moles Ang II/hora/mg proteína, quando incubada com angiotensinogênio humano e AG(1-14), respectivamente. Os demais parâmetros referentes a cada etapa do processo de purificação estão apresentados na tabela I, a seguir.

TABELA I

Parâmetros de purificação da enzima com atividade liberadora de Ang II obtidos para 1,0 g de placenta de humano.

ETAPA	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA*	ATIVIDADE TOTAL**	RENDIMENTO (%)	FATOR DE PURIFICAÇÃO
Sobrenadante do homogenato	29,5	0,52	15,3	100,0	1,0
Precipitado a 50%	2,2	1,8	3,8	24,8	3,0
Superdex HR-200	0,37	6,0	2,2	14,4	12,0
Q-Sepharose					
100 mM	0,0011	860	0,9	5,9	1720
300 mM	0,00094	750	0,7	4,6	1500

* Nanomoles de Ang II liberados por hora por miligrama de proteína, utilizando AG(1-14) como substrato.

** Nanomoles de Ang II liberados por hora.

6.1.3. Cromatografia em coluna de fase reversa *Phenyl-Superose*

As frações ativas eluídas em 100 mM de NaCl provenientes da cromatografia em Q-Sepharose foram reunidas e colocadas para concentrar em tubo Centricon YM10 (*Millipore*). Após concentração, um volume de 3,0 mL de amostra, contendo 300 µg de proteína foi dialisado contra tampão fosfato 50 mM contendo 1,7 M de sulfato de amônio, pH ajustado para 7,0 (tampão A) e aplicado em coluna de fase reversa *Phenyl-Superose* (1,6 x 2,0 cm), previamente equilibrada no mesmo tampão acima citado. A coluna foi inicialmente eluída com 5,0 mL de tampão fosfato 50 mM contendo 1,7 M de sulfato de amônio, pH 7,0 e a partir deste volume, a eluição das proteínas adsorvidas foi realizada com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 (tampão B), utilizando-se gradiente linear de 0-100% de B em volume de 25 mL. O fluxo era mantido em 1,0 mL por minuto e eram coletadas frações de 1,0 mL. O perfil de eluição obtido nesta cromatografia está representado na figura 5, a seguir.

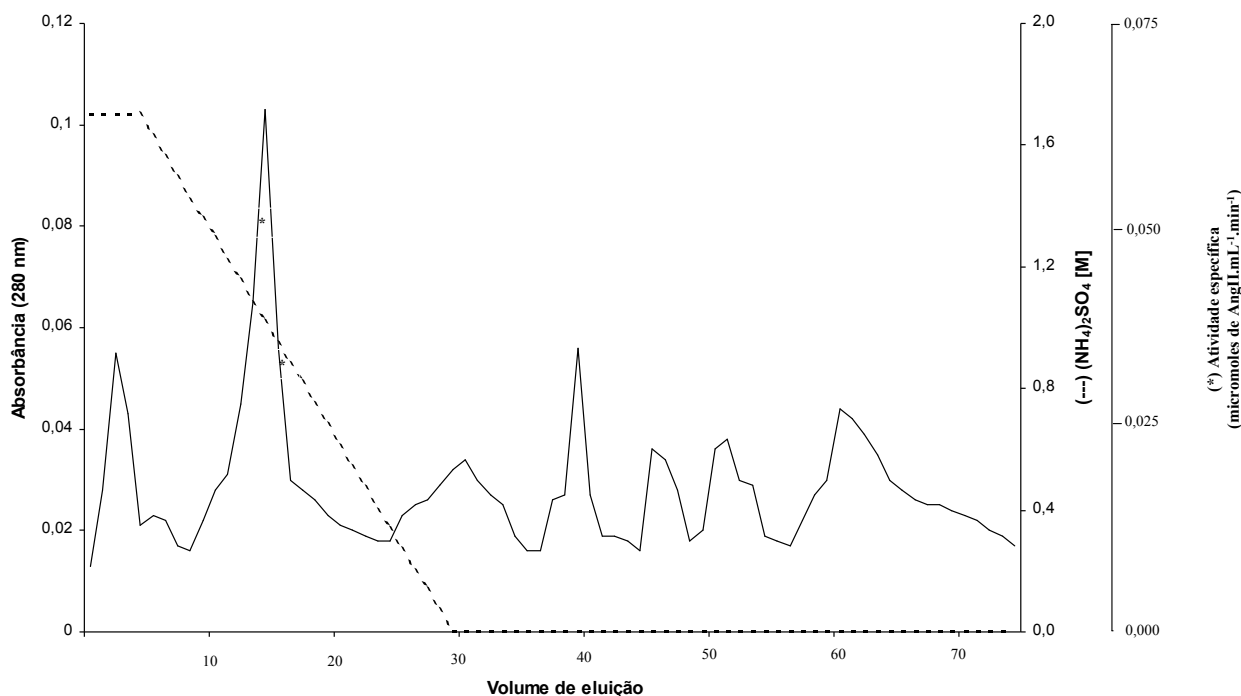


Figura 5 - Perfil de eluição do material proveniente da coluna de troca iônica Q-Sepharose, obtido em coluna Phenyl-Superose equilibrada com tampão fosfato 50 mM contendo 1,7 M de sulfato de amônio, pH 7,0 em fluxo 1,0 mL/min. Foram coletadas frações de 1,0 mL. Os símbolos (*) indicam a atividade específica das frações utilizando-se AG humano, como substrato.

Encontramos atividade liberadora de Ang II nas frações 15 e 16 eluídas com 1,02 e 0,95 mM de sulfato de amônio, respectivamente. As frações ativas foram juntadas, resultando um volume de 2 mL e conteúdo protéico estimado em 0,072 mg/mL. Quanto a atividade específica esta foi de $4,26 \times 10^{-10}$ moles liberados de Ang II/hora/mg de proteína quando incubada com o angiotensinogênio humano, sendo este valor encontrado da mesma ordem de grandeza do observado para a fração ativa proveniente da cromatografia em Q-Sepharose.

6.2. Caracterização da enzima

6.2.1. Determinação da atividade liberadora de angiotensina II

A Ang II liberada pela hidrólise do angiotensinogênio humano parcialmente purificado e/ou AG(1-14) em cada etapa do processo de purificação foi quantificada através de RIE. A atividade liberadora de Ang II era estimada em relação a uma curva padrão, conforme ilustrado na figura 6, seguinte.

TABELA II

Curva Padrão do Radioimunoensaio

[Ang II]	Contagem média X	B (X - LNE)	B/Bo (%)
$7,8 \times 10^{-11}$	2456	1931	91
$1,5 \times 10^{-10}$	2315	1790	84
$3,0 \times 10^{-10}$	2013	1488	70
$6,0 \times 10^{-10}$	1616	1091	51
$1,0 \times 10^{-9}$	1320	795	37
$2,5 \times 10^{-9}$	926	401	19
$5,0 \times 10^{-9}$	763	238	11
Bo	2649	2124	100
LNE	525	-	-
Total (T)	6301	5776	-

Nas condições experimentais utilizadas, a capacidade de ligação (Bo/T) e LNE/Total foram da ordem de 37% e 9%, respectivamente.

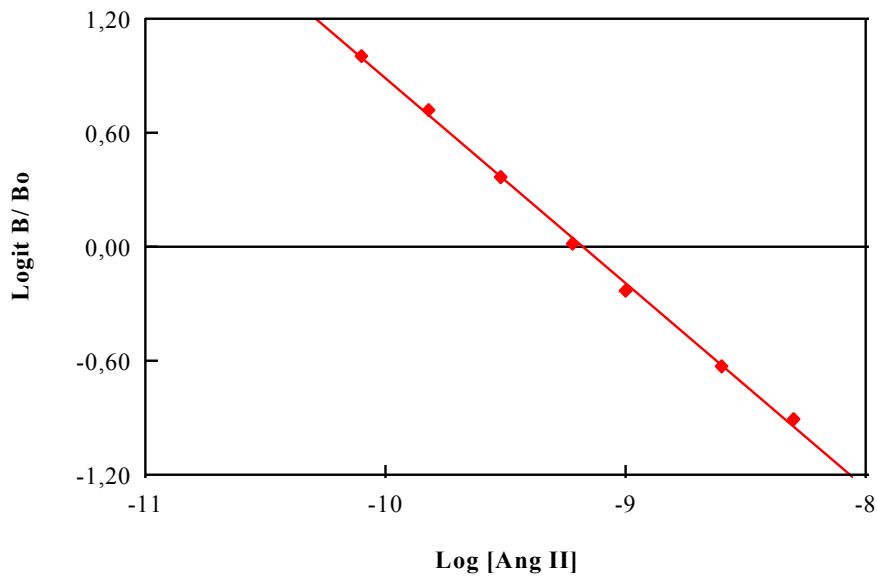


Figura 6 - Deslocamento da ^{125}I -Ang II ligada ao anticorpo pela Ang II não radioativa. Os parâmetros B, Bo e LNE estão definidos na seção 5.3.5 de Métodos.

6.2.2. Determinação do grau de pureza e massa molecular

As frações ativas obtidas na cromatografia de troca iônica foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em presença de SDS, em placa vertical, para determinação do grau de pureza e massa molecular. Após coloração pela prata para visualização das bandas, as massas moleculares foram estimadas através da projeção gráfica dos parâmetros fator de retenção (Rf) *versus* logaritmo das massas moleculares de proteínas padrões. As figuras 7 e 8 abaixo, ilustram, respectivamente, o resultado obtido no gel e uma destas projeções gráficas.

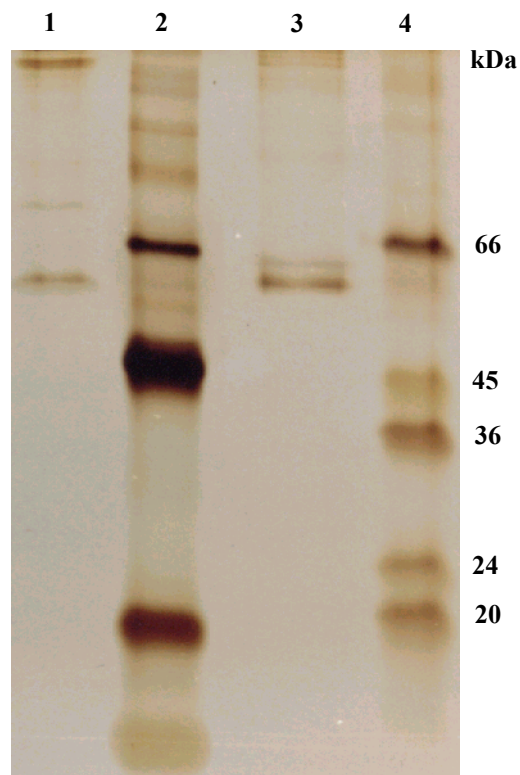


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS e corado com nitrato de prata. Nas raias 1 e 3 foram aplicadas as frações ativas 100 e 300 mM, respectivamente, provenientes da cromatografia em Q-Sepharose. Nas raias 2 e 4 foram aplicadas as proteínas padrões.

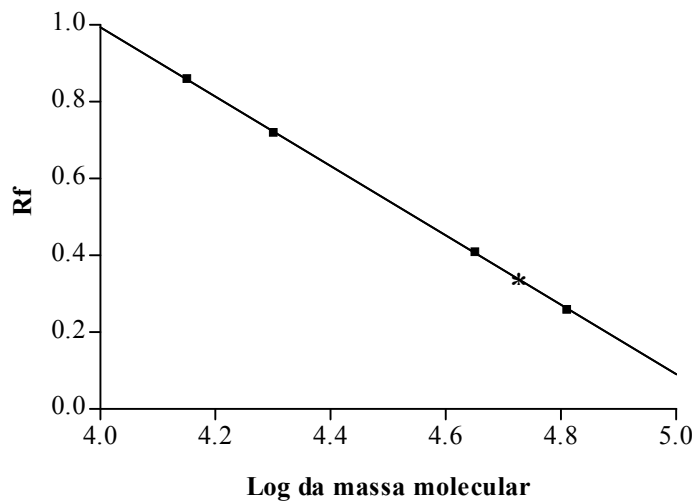


Figura 8 - Determinação da massa molecular das frações ativas obtidas através da projeção dos parâmetros Rf (fator de retenção) x logaritmo da massa molecular de proteínas padrões, obtidos em gel de poliacrilamida-SDS.

Identificamos, na fração 100 mM proveniente da Q-Sepharose, a presença de algumas bandas protéicas compondo a fração ativa. As massas moleculares de duas destas proteínas foram determinadas por projeção gráfica, sendo estas estimadas em aproximadamente 52 e 80 kDa. A massa molecular de uma terceira proteína não foi determinada, pois ultrapassa o limite de exclusão do gel de poliacrilamida. Esta banda pode ser devido à presença de inibidores de alta massa molecular encontrados no plasma. Outra possibilidade seria a agregação de proteínas de menor massa molecular. Verificamos a presença de uma banda de aproximadamente 52 kDa presente, também, na fração 300 mM o que sugere ser esta banda a responsável pela atividade.

6.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema de disco

A fração ativa obtida da cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose, fração 100 mM de NaCl foi submetida a eletroforese de disco em gel de poliacrilamida na ausência de agentes redutores e desnaturantes. Após a corrida, o gel era fatiado longitudinalmente em fragmentos de 0,4 cm e cada fragmento era colocado em presença de 1,0 mL de tampão fosfato 20 mM com EDTA 1 mM (pH 6,8) e mantidos pernoite a 4° C. Em seguida, os tubos contendo o material eram transferidos para termomixer a 37° C, sendo aí mantidos por 3 horas, sob agitação. Na etapa seguinte, os fragmentos eram macerados e o material obtido era centrifugado, como descrito no **item 5.3.2.2** de métodos. A atividade liberadora de Ang II era rastreada, através de RIE, em todos os sobrenadantes obtidos. Verificamos que a atividade

liberadora de Ang II estava presente nos sobrenadantes provenientes dos tubos 1 e 2, sendo as atividades específicas de $1,4 \times 10^{-9}$ e $0,95 \times 10^{-9}$ moles liberados de Ang II/hora/mg de proteína, respectivamente, utilizando-se AG como substrato. Os sobrenadantes dos tubos 1 e 2 foram juntados e concentrados em tubo Centricon YM10 (Millipore). Uma alíquota contendo aproximadamente 2 μ g de proteína foi aplicada em eletroforese de placa vertical em gel de poliacrilamida a 10%, em presença de SDS, visando visualizar e determinar a proteína responsável pela atividade liberadora de Ang II. O resultado obtido na eletroforese está ilustrado na figura 9, abaixo.

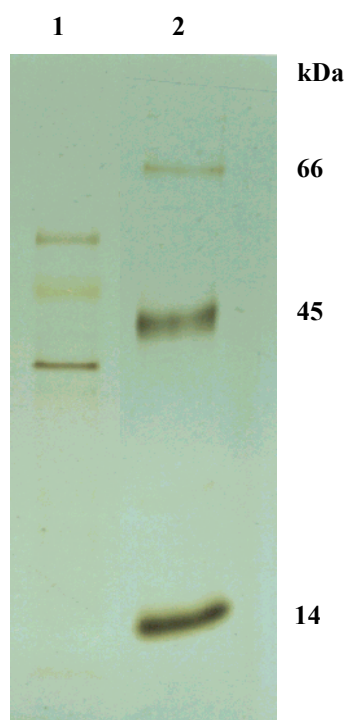


Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS, corado pelo nitrato de prata. A raia 1 refere-se ao sobrenadante dos fragmentos 1 e 2 obtidos da eletroforese de disco na ausência de agentes redutores e desnaturantes. Na canaleta 2 foram aplicadas as proteínas padrões.

Por esta figura podemos observar a presença de proteínas de massas moleculares em torno de 43, 47 e 52 kDa, sugerindo uma possível degradação dos componentes observados na fração 100 mM da cromatografia em Q-Sepharose. Pode-se observar na raia 1 da figura 9 a presença de fragmentos apresentando massa menor que 14 kDa.

6.2.5. Extração de proteína de gel de poliacrilamida em sistema de placa

Uma alíquota contendo aproximadamente 3,6 µg de proteína da fração ativa obtida da cromatografia em fase reversa em coluna Phenyl-Superose, foi submetida à diálise exaustiva contra tampão fosfato 50 mM contendo EDTA 1 mM (pH 7,0) e aplicada em gel de poliacrilamida a 10% (p/v) em presença de SDS, nas mesmas condições descritas no item 5.3.2.3. Após a corrida eletroforética, o gel foi fatiado verticalmente obedecendo-se as canaletas. Os fragmentos verticais foram fatiados horizontalmente em fragmentos de 1,0 cm, e estes transferidos para tubos eppendorfs contendo 1,0 mL de água deionizada. Os tubos foram guardados pernoite a 4° C. Posteriormente, eram transferidos e mantidos a 37° C por 3 horas num termomixer, sob agitação. Os fragmentos eram macerados, centrifugados e o sobrenadante era separado. Cada sobrenadante foi concentrado com PEG 6000 e dialisado contra tampão fosfato 20 mM contendo EDTA 1 mM e Triton X100 a 2,5% (v/v), (pH 6,8) e com o mesmo tampão na ausência do Triton. A atividade liberadora de Ang II foi rastreada em todos os sobrenadantes, através de RIE. Verificamos a presença de atividade liberadora de Ang II nos sobrenadantes dos fragmentos referentes aos recortes do gel equivalentes a 1, 2 e 4 cm, sendo a maior atividade liberadora de Ang II verificada no sobrenadante correspondente ao 4° segmento do gel, ou seja aos 4 cm.

As frações ativas obtidas conforme procedimento, descrito acima foram concentradas contra PEG 6000 para redução de volume, e alíquotas contendo aproximadamente 1 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% para identificação das proteínas e determinação das massas moleculares. O resultado obtido na eletroforese está ilustrado na **figura 10 B**.

Podemos verificar na canaleta 1, na qual foi aplicada a fração ativa correspondente ao fragmento 1, a presença de proteína com massa molecular da ordem de 52 kDa e ainda proteínas de alta massa molecular, cujos valores não puderam ser mensurados por extrapolar o limite de exclusão do gel. Este resultado mostra uma possível agregação da proteína ativa e mostra mais uma vez a degradação da mesma. Fragmentos menores, da ordem de 28 kDa foram observados pela primeira vez (canaleta 1, figura 10A). Novamente pode-se observar degradação e agregação da proteína ativa na figura 10B. Na canaleta 1, na qual foi aplicado o sobrenadante das frações ativas correspondentes ao fragmentos 1 e 2 da eletroforese, podemos verificar, além da presença da proteína de 52 kDa, proteínas apresentando massas moleculares elevadas e fragmentos em torno de 16 kDa.

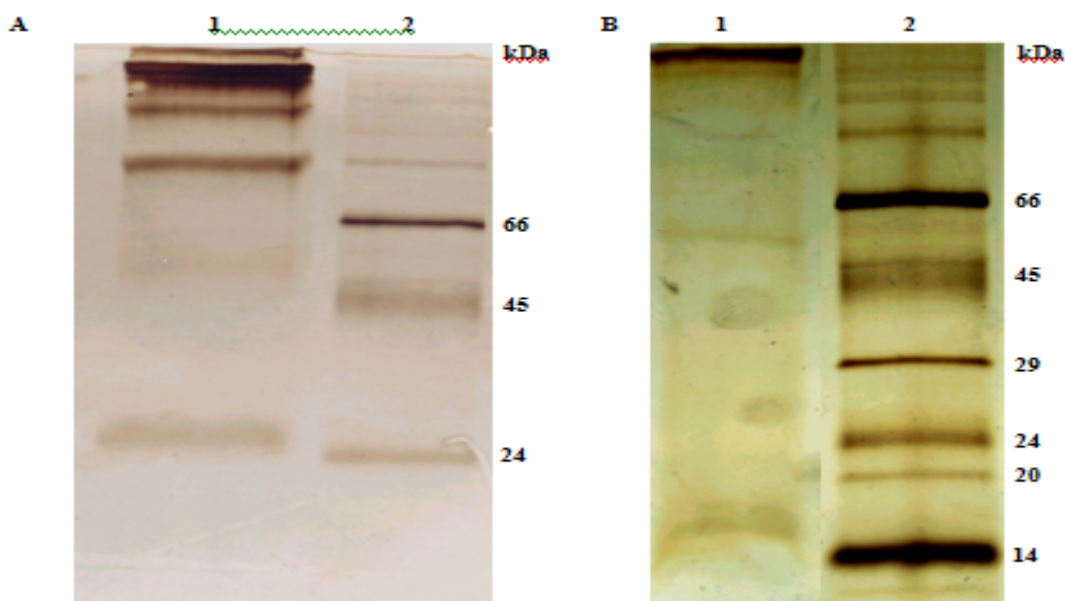


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS, corada pelo nitrato de prata. **A**, raia 1, fração ativa obtida da cromatografia em Phenyl-Superose. Na raia 2 foram aplicadas as proteínas padrões. **B**, raia 1, sobrenadante dos fragmentos 1A e 2A, respectivamente, provenientes da eletroforese de placa (descrito no item 6.2.5 de métodos) após Phenyl-Superose. Na raia 2 foram aplicadas as proteínas padrões.

6.2.6. Eletrotransferência

A fração ativa eluída em 100 mM de NaCl, proveniente da cromatografia em Q-Sepharose, na ausência e presença de beta-mercaptoetanol, foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8,5% em presença de SDS. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para reação com anticorpo policlonal anti-tonina obtido da imunização de coelhos com tonina proveniente da glândula submandibular de rato. A figura 11 mostra o resultado obtido da reação do complexo antígeno-anticorpo.

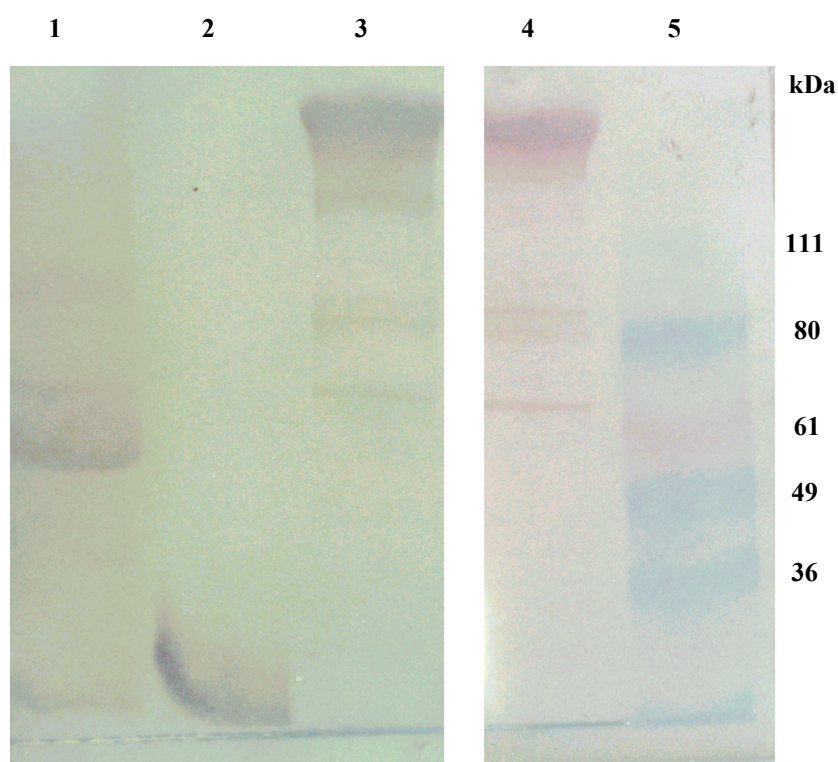


Figura 11 - Eletrotransferência realizada para membrana de nitrocelulose. Na raia 1 foi aplicada a fração 100 mM, tratada com β -mercaptoetanol. Na raia 2 foi aplicada tonina da GSM de rato. As raias 3 e 4, correspondem a fração 100 mM, na ausência de tratamento com β -mercaptoetanol. Na raia 5 foi aplicado padrão de massa molecular pré-corado.

Podemos verificar a presença de várias bandas que são reconhecidas pelo anticorpo. Na ausência de agente redutor, verificamos bandas que são reconhecidas pelo anticorpo com massas da ordem de 67, 86, 90 kDa e outras duas, de alta massa molecular para as quais a determinação da massa molecular não foi possível de ser realizada, devido ao limite de exclusão do gel. Já na fração tratada com agente redutor, encontramos bandas reconhecidas pelo anticorpo que apresentam massas da ordem de 25, 52 e 100 kDa.

6.3. Fatores de inibição

6.3.1. Atividade liberadora de Ang II em presença de PMSF

Para verificar se as frações ativas eluídas da cromatografia em coluna Q-Sepharose, frações correspondentes as concentrações de 100 e 300 mM de NaCl eram inibidas por PMSF, um inibidor de serinoproteinases, incubamos as amostras com angiotensinogênio humano e AG(1-14) na ausência (controle) e presença deste inibidor numa concentração final de 10 mM. Verificamos uma inibição para a fração 100 mM da ordem de 64 e 93%, quando a

mesma foi incubada com angiotensinogênio humano e AG(1-14), respectivamente. Para a fração 300 mM, a inibição foi de aproximadamente 84 e 95% quando incubada com angiotensinogênio humano e AG(1-14), respectivamente. Os valores de atividade, determinados para estas frações na ausência e presença de PMSF a 10 mM quando incubadas com os dois substratos estão apresentados na tabela III abaixo.

TABELA III

Efeito do PMSF sobre atividade liberadora de Ang II

Substrato	AG*		AG(1-14)**		
	Fração	Controle	PMSF	Controle	PMSF
100 mM		5,5	2,0	12,4	0,92
300 mM		7,9	1,3	13,7	0,63

*Valores de atividade expressos em picomoles de Ang II liberados/min. **Valores de atividade expressos em nanomoles de Ang II liberados/min.

Estes resultados mostram que a atividade liberadora de angiotensina II, como a tonina de rato, é uma enzima da família das serino proteinases.

6.3.2. Atividade liberadora de Ang II em presença de pepstatina A

As mesmas frações ativas descritas no item anterior foram incubadas com angiotensinogênio humano parcialmente purificado, na ausência e presença de pepstatina A em concentrações finais de 1 e 10 μ M. Os valores de atividade estão na tabela IV abaixo. Verificamos, para as duas frações, um aumento da atividade liberadora de angiotensina II quando incubadas na presença de pepstatina. Para a fração 100 mM a atividade liberadora de Ang II aumentou aproximadamente sete vezes enquanto que para a fração 300 mM o aumento foi de cerca de duas vezes.

TABELA IV

Atividade liberadora de Ang II na ausência e presença de pepstatina A.

Fração	Atividade*		
	Controle	pepstatina 1 μ M	pepstatina 10 μ M
100 mM	0,80	5,7	5,3
300 mM	0,71	1,6	1,3

*Valores expressos em nanomoles de Ang II liberados/hora.

6.3.3. Atividade liberadora de Ang II em presença de aprotinina

As frações ativas provenientes da cromatografia em Q-Sepharose foram incubadas utilizando-se como substrato angiotensinogênio humano parcialmente purificado na presença dos inibidores presentes no tampão de incubação como descrito no item 5.3.6 de métodos, na ausência e presença de aprotinina 1 μ M. Os valores de atividade encontrados para a fração ativa 100 mM foram $1,73 \pm 0,52 \times 10^{-12}$ e $2,60 \pm 0,65 \times 10^{-12}$ moles de Ang II liberados por minuto e por miligrama de proteína, na ausência e presença do inibidor, respectivamente. Para a fração ativa 300 mM, os valores de atividade encontrados foram $1,31 \pm 0,50 \times 10^{-12}$ e $1,61 \pm 0,45 \times 10^{-12}$ moles de Ang II liberados por minuto e por miligrama de proteína, na ausência e presença do inibidor, respectivamente.

6.4. Atividade liberadora de Ang I das frações ativas

As frações ativas 100 mM e 300 mM, obtidas da cromatografia em Q-Sepharose, foram incubadas com angiotensinogênio humano parcialmente purificado na ausência e presença de 10 μ M de pepstatina A. Os incubados foram aplicados em RIE para Ang I visando determinar, se estas frações seriam capazes de liberar este peptídeo. Nossos resultados mostraram não haver liberação de Ang I, quando incubamos as frações ativas com o angiotensinogênio humano, tanto na ausência como na presença de pepstatina A.

6.5. Determinação de atividade angiotensinase

Para verificar a possível presença de angiotensinases nas frações ativas obtidas da cromatografia em Q-Sepharose, incubamos uma solução padrão de Ang II em concentração conhecida ($1,0 \times 10^{-7}M$) na presença e ausência destas frações ativas. A incubação era realizada em presença de tampão fosfato-citrato 100 mM contendo 12 mM de EDTA, 25 mM de dipiridil, 10 mM de ortofenantrolina e 10 mM de tetrionato de sódio (pH 5,5) por 24 horas a $37^{\circ} C$, as mesmas condições empregadas para incubação das amostras com o angiotensinogênio humano parcialmente purificado. A concentração da Ang II remanescente no meio de incubação era determinada através de RIE. Os resultados encontrados sugerem a ausência de atividade angiotensinase junto às frações ativas obtidas na cromatografia de troca iônica. O percentual de deslocamento da Ang II verificado para o incubado contendo a fração ativa foi o mesmo verificado no incubado controle, no qual a Ang II estava em presença somente do tampão contendo inibidores.

6.6. Seqüenciamento N-terminal

Foram determinadas as seqüências dos resíduos N-terminais das bandas, correspondentes às massas moleculares 28 e 52 kDa. As seqüências obtidas foram às seguintes:

Proteína de 28 kDa - identificados 11 resíduos a saber: DIQMTQSPCCL

Proteína de 52 kDa - identificados 11 resíduos, a saber: EVQLVESGGGL

Estas seqüências foram alinhadas com as depositadas na base de dados do *Basic Local Alignment Search Tool* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e os seguintes resultados foram obtidos pelo alinhamento:

Proteína de 28 kDa - nenhuma proteína depositada alinha com os 11 resíduos. Entretanto 10 dos 11 resíduos correspondem a fragmento de cadeia kappa de gama imunoglobulina de humano.

Proteína de 52 kDa - verificamos homologia de 100% entre a seqüência analisada e cinco proteínas codificadas por genes descritos em 2004 por um grupo do Japão (*Helix Research*

Institute, Genomics Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812 e Department of Virology, Institute of Medical Science, University of Tokyo). Este grupo denominou os possíveis produtos destes genes como sendo “proteínas desconhecidas”, pois não se tem ainda informação a respeito dos produtos de expressão dos mesmos. Podemos dividir as cinco possíveis proteínas em dois grupos (I e II). O grupo I é formado por três proteínas que apresentam 91% de homologia nas suas seqüências de aminoácidos e por isso propriedades fisicoquímicas semelhantes. Denominamos estas proteínas como sendo P1, P2 e P3 e suas propriedades fisicoquímicas estimadas são as seguintes:

P1, número de aminoácidos: 475 Mr 50895,5 pI 6,77

P2, número de aminoácidos: 473 Mr 50924,5 pI 5,88

P3, número de aminoácidos: 473 Mr 50577,1 pI 6,34

As duas proteínas do grupo II apresentam 90% de homologia nas seqüências de aminoácidos e apresentam baixo grau de homologia com as seqüências das proteínas do grupo I. Denominamos estas proteínas como sendo P4 e P5 e suas propriedades fisicoquímicas estimadas são as seguintes:

P4, número de aminoácidos: 452 Mr 49423,8 pI 8,49

P5, número de aminoácidos: 455 Mr 49567,9 pI 8,37

O número de aminoácidos acima se refere, provavelmente, às proteínas maduras, pois o início da seqüência da proteína de 52 kDa coincide com o 19^o aminoácido destas proteínas como encontra-se na base de dados (BLAST). As seqüências de aminoácidos e demais informações a respeito destas proteínas como os números de acesso à base de dados estão no anexo VI. O alinhamento destas seqüências com a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato mostrou que, dos três resíduos do centro ativo das serino proteinases considerados importantes para a catálise, a saber, histidina³⁹, aspartico⁹⁴ e serina¹⁸⁷, dois, a serina e o aspártico estão em regiões com alto grau de homologia e nas mesmas posições relativas considerando-se os aminoácidos vizinhos para as proteínas do grupo I (P1, P2 e P3). Estes dados estão nos anexos VII a XI.

7. Discussão

O papel do SRA na regulação da pressão sanguínea arterial e na homeostase do sódio e água é bem conhecido. Mais recentemente, uma nova visão deste sistema tem sido descrita. Importantes ações autócrinas, parácrinas, intácrinas e justácrinas têm sido verificadas em vários tecidos tais como rim, cérebro, adrenal, coração, hipófise, glândulas salivares, vasos e órgãos sexuais (Brosnihan e cols, 1988; Dzau, 1988). Há mais de 30 anos, altas concentrações de renina foram detectadas em vários tecidos extrarenais, incluindo o sistema reprodutor feminino, primeiro sítio de prorenina extrarenal a ser identificado (Stakemann, 1960; Skinner e cols, 1968). O conceito de um sistema renina-angiotensina, atuando a nível local no sistema reprodutor feminino vem ganhado destaque (Nielsen e cols, 1995; Kalenga e cols, 1996; Vinson e cols, 1997; Poisner, 1998; Nielsen e cols, 2000). Neste local, o SRA poderia funcionar tanto independentemente, como, em associação com o SRA circulante e participar na regulação parácrina e autócrina de vários aspectos funcionais destes tecidos.

Mais recentemente todos os componentes do SRA, incluindo prorenina, renina, angiotensinogênio, enzima conversora de Ang II e os receptores de Ang II, têm sido localizados por vários métodos em placenta de humano a termo (Taira e cols, 1985; Kalenga e cols, 1991; Sowers e cols, 1993). Entretanto, a função da Ang II na unidade uteroplacentária é incerta. No rato, a angiotensina II é importante na decidualização do endométrio e para a implantação do blastocisto (Squires e Kennedy, 1992). Durante a implantação e placentação, processos tais como aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, hipertrofia e hiperplasia são essenciais para o desenvolvimento da placenta. A Ang II é capaz de mediar estes efeitos via receptor AT_1 (Chung, Stoll e Unger, 1996). Quanto ao receptor do subtipo AT_2 , sua densidade pode variar durante a gestação. Segundo de Gasparo e cols (1994), no miométrio ocorre uma diminuição dos receptores do subtipo AT_2 , resultando numa predominância do receptor do tipo AT_1 . Para Yamada e cols (1996), o receptor AT_2 exerceria um efeito anti-crescimento, através da indução de apoptose. Além disso, o receptor AT_2 exerceria um efeito antiproliferativo, neutralizando as ações de crescimento do receptor AT_1 (Nakajima e cols, 1995). Assim a Ang II, exerceria ações diferenciadas no crescimento dependendo da presença ou ausência do receptor do subtipo AT_2 .

Vários autores mostraram a existência de uma acentuada responsividade pressora à angiotensina II em mulheres apresentando hipertensão induzida pela gravidez quando comparadas à gestantes normotensas (Talledo e cols, 1968; Gant e cols, 1980; Symonds, 1988). Embora a patofisiologia da pré-eclâmpsia não seja completamente conhecida, certas

anormalidades tem sido bem evidenciadas, estando aí incluídas, marcantes alterações no sistema renina angiotensina. Existe consenso entre alguns autores de que a atividade renina plasmática seja menor (Chesley, 1978; Carr e Gant 1983; Broughton, 1988), ou esteja suprimida (Brown e cols, 1966; Skinner e cols, 1972; Weir e cols, 1973) no grupo de mulheres com DHEG. Por outro lado, Gordon e cols (1969) e Tapia e cols (1972), verificaram um aumento na atividade renina plasmática em mulheres que desenvolveram hipertensão na gravidez, no segundo trimestre de gestação. Existem controvérsias na literatura quanto à concentração de Ang II na circulação materna. Embora alguns autores não tenham conseguido demonstrar diferenças na concentração de angiotensina plasmática entre mulheres grávidas normotensas e hipertensas (Massani e cols, 1967; Gordon e cols, 1973); outros encontraram níveis elevados (Symonds e cols, 1975; Symonds e Broughton, 1978), assim como níveis reduzidos (Weir e cols, 1973; Weir, 1975). Existem também, evidências contraditórias quanto aos níveis plasmáticos do substrato da renina em mulheres com DHEG. Tanto altos níveis (Tapia e cols, 1972) como baixos níveis (Weir e cols, 1973) plasmáticos deste substrato foram encontrados. Tapias e cols em 1972 verificaram ainda, reduzidos níveis de angiotensinases na pré-eclâmpsia. Resultados obtidos por Mizutani e cols (1994) mostram a presença de enzima conversora de angiotensina em placenta humana. Também, mostraram que não havia diferença de atividade para esta enzima em soro materno de grávidas normotensas e com pré-eclâmpsia.

Outras vias alternativas para liberação de Ang II, independentes do SRA clássico, já foram descritas em unidade uteroplacentária. Uma enzima, denominada quimase, foi descrita em útero, por Urata e cols, 1994. A presença de catepsina D foi demonstrada em útero (Sapolsky e Woessner, 1972) e placenta de humano (Contractor e cols, 1982). Semelhante à renina, a catepsina D, uma aspartil-proteinase, é capaz de liberar Ang I a partir do AG. Já, enzimas como catepsina G e tonina são capazes de produzir Ang II diretamente do AG.

Tonina, uma serina proteinase, é capaz de clivar o peptídeo vasoativo Ang II, a partir do angiotensinogênio, do AG(1-14), bem como da angiotensina I. Apesar de hidrolisar substratos comuns, com a renina e a ECA, tonina, apresenta propriedades físico-químicas distintas (Boucher e cols, 1977). Existem evidências da participação da tonina no controle da pressão arterial através de diferentes mecanismos, dependendo do local onde ela atua (Garcia e cols, 1976; Garcia e cols, 1978). Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a enzima está presente também em tecido humano, sendo a mesma, descrita na glândula submandibular (Gualberto e cols, 1992) e na próstata (Guimarães, 1995). Desta forma, o

estudo da distribuição da tonina nos diferentes tecidos das espécies de mamíferos poderá apresentar uma contribuição relevante para a determinação do papel fisiológico desta enzima.

Avanços fundamentais no estudo dessas enzimas vêm sendo obtidos através de técnicas de clonagem gênica, seqüenciamento de proteínas, estudo de difração de raios X e síntese de substratos sintéticos que permitem o estudo da catálise enzimática e promovem a caracterização e diferenciação das diversas enzimas expressas em diferentes tecidos de várias espécies de mamíferos.

Existem na literatura, trabalhos direcionados à determinação de produtos de genes, ou seja, mRNAs relacionados as enzimas das famílias calicreína e tonina. Através de técnicas de biologia molecular, pôde-se observar a presença de tonina em diferentes tecidos de rato e também de humano (Ashley e MacDonald, 1985 a, b; Woodley-Miller e cols, 1987; Brady e cols, 1989; Clements, 1989; Wines e cols, 1991; Lomez e cols, 2000). Ficou demonstrado em tecido de rato, a existência de duas proteínas apresentando atividade tonina, mas com características físico-químicas diferenciadas.

Araújo e cols (1991) isolaram a partir de glândula submandibular e próstata de rato, enzimas que apresentavam atividade tonina. Duas enzimas, denominadas rSMT3 e rSMT4 foram isoladas da glândula submandibular. Outra enzima foi isolada a partir da próstata, sendo denominada de rPT1. Os parâmetros físico-químicos destas três enzimas mostraram-se diferentes, indicando existir uma família de enzimas apresentando atividade tonina em diversos tecidos de rato. Resultados preliminares obtidos por nós, no laboratório de Biofísica, mostraram que tonina está presente em tecido placentário humano. Poderia ela, contribuir para a liberação de Ang II neste local? Nossos resultados mostram que a placenta de humano contém duas enzimas com atividade liberadora de Ang II. As duas frações ativas foram obtidas basicamente, por processo de purificação envolvendo duas etapas cromatográficas, sendo a primeira em coluna de filtração em gel Superdex HR 200 e a segunda em coluna de troca iônica Q-Sepharose. Estas enzimas foram obtidas em diferentes forças iônicas, sendo denominadas como fração 100 e 300 mM, conforme eluição das mesmas da matriz da coluna. Estas duas etapas cromatográficas permitiram obter as duas frações ativas, em alto grau de pureza e em quantidades suficientes para dar início ao processo de caracterização físico-química. O fato das duas enzimas estarem ligadas a inibidores de origem protéica, presentes nas etapas iniciais do processo de purificação dificultou em muito o processo de purificação.

Embora o rendimento final do processo de purificação tenha sido baixo, ou seja, de 5,9% e 4,6% para as frações 100 e 300 mM, respectivamente, conseguimos manter um

rendimento final de 10,5%, valor este, obtido da soma dos rendimentos individuais obtidos para cada uma das frações ativas. Observamos uma perda menor de atividade nesta última etapa, quando comparada com as etapas anteriores. Verificamos um aumento da atividade específica da ordem de 1654 e 1442 vezes, para as frações 100 e 300 mM, em relação ao homogenato bruto. Ao compararmos os valores de atividade específica, encontrados entre as diferentes etapas do processo de purificação, verificamos um aumento da ordem de 143 e 125 vezes, para as frações 100 e 300 mM, respectivamente, entre as etapas de filtração em gel e troca iônica. Este aumento de atividade específica verificado poderia ser explicado pelo desligamento da enzima de seu inibidor protéico. Segundo alguns autores, a atividade tonina a nível plasmático não pode ser determinada, devido ao fato desta enzima estar ligada a um forte inibidor de natureza protéica (Boucher e cols, 1974; Garcia e cols, 1978). Tremblay e cols (1981) isolaram este inibidor do plasma de rato e estimaram, por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, uma massa molecular da ordem de 360 kDa para o mesmo, sugerindo ser uma α_2 -macroglobulina.

A α_2 -macroglobulina é na realidade uma glicoproteína tetramérica com massa molecular estimada em 720 kDa (Jones e cols, 1972), formada de dois dímeros com massa molecular da ordem de 360 kDa, unidos por ligação não covalente. Cada dímero por sua vez, seria, composto de duas subunidades idênticas de 180 kDa. Esta proteína apresenta amplo espectro de atividade inibitória sobre proteinases, sendo capaz de inibir enzimas das 4 classes catalíticas conhecidas (Hall e Roberts, 1978).

De acordo com vários autores, a ligação da proteinase ao inibidor é iniciada por uma proteólise restrita numa porção limitada da cadeia polipeptídica da α_2 -macroglobulina, denominado de sítio de hidrólise (Barret e cols, 1979; Sottrup-jensen e cols, 1981). Esta clivagem levaria a uma mudança conformacional na proteína, que criaria um sítio de ligação para proteinases, em cada metade da molécula do inibidor (Gonias e cols, 1982; Björk e cols, 1984). Por outro lado, a ligação da enzima a este sítio, de certa forma, contribui para a diminuição de sua atividade sobre substratos de alta massa molecular, mas mantêm sua atividade catalítica amplamente preservada sobre substratos menores (Harpel, 1973).

Na etapa inicial do processo de caracterização, procuramos determinar quais substratos, as enzimas seriam capazes de hidrolisar e liberar Ang II. Verificamos que as duas enzimas, eram capazes de hidrolisar o angiotensinogênio humano (parcialmente purificado), o AG(1-14), substrato sintético da renina e também a Ang I. Devido ao fato das duas enzimas

ativas serem capazes de hidrolisar todos os três substratos, consideramos estas atividades como sendo tonina símile. A atividade liberadora de Ang I a partir das frações 100 e 300 mM, também foi investigada. Nossos resultados mostram que, ambas as frações ativas para liberação de Ang II, não apresentaram nenhuma atividade liberadora de Ang I.

Devido a maior especificidade dos substratos AG(1-14) e angiotensinogênio, optamos por utilizá-los na caracterização das enzimas. Verificamos que a hidrólise da ligação Phe-His destes substratos ocorre em valores de pH distintos, sendo estes 5,5 e 6,8 para angiotensinogênio humano e AG (1-14), respectivamente. Só observamos hidrólise do angiotensinogênio humano parcialmente purificado a pH 5,5. Gualberto e cols (1992), encontraram um valor de pH ótimo 7,0 para incubação da fração (hSMT4), uma tonina símile, obtida da glândula submandibular de humano, quando incubada em presença de AG(1-14). Quanto a hidrólise do AG humano parcialmente purificado, o pH ótimo de 5,5 encontrado por nós, é idêntico aquele encontrado por Grisé e cols (1981), para hidrólise deste substrato por tonina obtida da glândula submandibular de rato. Nestas condições experimentais, podemos verificar que a hidrólise do AG(1-14), em termos de atividade específica, é cerca de 1075 e 1563 vezes maior, do que aquela observada para o angiotensinogênio humano, quando incubados com as frações 100 e 300 mM, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com outros dados obtidos previamente para outras toninas de rato e humano, para os quais o AG(1-14) mostrou-se melhor substrato (Araujo e cols, 1991; Gualberto e cols, 1992). Comparando-se a atividade específica das duas frações utilizando-se os substratos AG(1-14), e angiotensina I, verificamos ser o AG(-14) melhor substrato (dados não mostrados). Pesquero e cols (1982), demonstraram que o alongamento da cadeia peptídica da Ang I, que tem 10 resíduos de aminoácidos, até o AG(1-14), apresentando quatorze resíduos, têm importância primordial para a interação do substrato com o centro ativo da enzima. Um fator que poderia explicar a melhor eficiência do AG(1-14) como substrato para as enzimas da família seria a possível conformação adotada por este peptídeo, uma dobra β antiparalela que seria estabilizada por interações intramoleculares. A estabilização desta dobra seria, entre outros fatores, devido a interação entre os grupos imidazólicos das histidinas, o que ocorre a pH próximo de 7,0. Portanto, o segmento C-terminal do AG(1-14) parece ser importante para favorecer uma estrutura em dobra β , que provavelmente facilitaria a interação do substrato com o centro ativo da enzima, como proposto por Oliveira e cols (1977).

Com relação à hidrólise do AG humano, a atividade específica da ordem de picomoles, é semelhante às observadas para as toninas isoladas de outros tecidos humanos e de rato

(Gualberto e cols, 1992; Araujo e cols, 1991). A atividade específica obtida em termos de picomoles para este substrato deve estar relacionada com o tamanho do mesmo, o que dificultaria sua interação com o centro ativo da enzima.

As massas moleculares das frações ativas, 100 e 300 mM, apresentando alto grau de pureza, foram determinadas através da mobilidade relativa destas proteínas em eletroforese em gel de poliacrilamida, na ausência do agente redutor, β -mercaptoetanol. Utilizando-se da projeção gráfica dos parâmetros fator de retenção (Rf) e logaritmo das massas moleculares de proteínas padrões, determinamos as massas moleculares dos componentes protéicos existentes em cada fração. Observamos para a fração 100 mM, a presença de duas proteínas de massas moleculares da ordem de 52 kDa e 71 kDa. Outras duas proteínas apareceram no topo do gel. Estas duas proteínas não tiveram suas massas moleculares estimadas por ultrapassarem o limite de exclusão do gel. Para a fração 300 mM, verificamos a presença de uma proteína com mesma massa molecular (52 kDa), observada para fração 100 mM e uma outra proteína com massa molecular estimada em 59 kDa. Nossos resultados sugerem, que a proteína comum de 52 kDa, observada nestas duas frações ativas, seja responsável pela atividade liberadora de Ang II, verificada no meio de incubação. O fato de termos encontrado, duas atividades liberadoras de Ang II, distintas, isto é, eluídas em diferentes forças iônicas, sugere que estas proteínas possam ser isoformas, por apresentarem características físico-químicas bastante semelhantes, nas mesmas condições de ensaio.

A massa molecular de 52 kDa, anteriormente sugerida para as frações ativas 100 e 300 mM, também foi verificada, através de processo eletroforético realizado para a fração ativa, obtida de cromatografia em coluna de fase reversa Phenyl-Superose. A fração ativa (100 mM), obtida da cromatografia em coluna Q-Sepharose, foi submetida em cromatografia em coluna de fase reversa. A fração ativa obtida da coluna Phenyl-Superose foi então aplicada em eletroforese em gel de poliacrilamida, o qual foi fatiado e processado. As frações ativas foram então, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, visando a identificação da proteína responsável pela atividade liberadora de Ang II. Verificamos a presença de atividade liberadora de Ang II nos sobrenadantes referentes aos fragmentos identificados inicialmente como 1A, 2A. Nesta eletroforese, podemos observar na canaleta referente ao sobrenadante do fragmento 1A, a presença de uma nítida banda de proteína, cuja massa molecular foi estimada em 52 kDa. Verificamos também, uma segunda banda protéica mais tênue, apresentando uma massa molecular estimada em 78 kDa, assim como, visualizamos também, uma banda de alta massa molecular, localizada no início do gel de separação. Na outra canaleta referente ao

fragmento 2A, identificamos duas proteínas apresentando massas moleculares estimadas em 59 e 80 kDa e mais duas proteínas de alta massa molecular, cujas massas não foram determinadas.

Resultados obtidos na eletrotransferência, vêm corroborar com os outros dados, no tocante à interação inibidor-enzima e reafirmar a massa molecular de 52 kDa, estimada para as frações ativas, obtidas na etapa cromatográfica em coluna de troca iônica. Analisando o resultado obtido da eletrotransferência realizada para a fração ativa 100 mM, na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, podemos observar na canaleta, a presença de uma intensa banda de alta massa molecular e de outras bandas menos intensas com massas moleculares estimadas em 68, 86, 91 e 132 kDa, aproximadamente. Na presença de agente redutor, verificamos que a banda de alta massa molecular observada anteriormente, na ausência deste, desaparece e surge na canaleta, numa região mais baixa, a presença de uma nova banda apresentando uma intensidade expressiva, como a verificada para a banda de alta massa. A massa molecular desta nova banda foi estimada em 54 kDa, aproximadamente. Outras duas bandas com menor intensidade foram visualizadas e suas massas moleculares foram estimadas em 26 e 95 kDa. Estes resultados sugerem que, a banda de alta massa molecular observada para a amostra na ausência de agente redutor, seja devido a agregação da própria proteína. Na presença do agente redutor, β -mercaptoetanol, este agregado seria desfeito, levando ao surgimento de novas bandas, sendo estas referentes a enzima livre e de outras proteínas que eventualmente possam estar interagindo. Estas proteínas poderiam ser fragmentos originados a partir da hidrólise do inibidor plasmático que estaria ainda ligado a fração ativa, e que são produzidos pela clivagem da ligação tioéster presente na cadeia polipeptídica desta família de inibidores. Segundo alguns autores, os membros desta família possuem uma ligação tioéster, envolvendo os resíduos de Cys 949 e Glu 952, sendo esta importante para a função destas proteínas. Dados presentes na literatura mostram que, a interação da α_2 -macroglobulina com proteinases, leva à liberação de dois fragmentos da cadeia polipeptídica da proteína. Como a ligação peptídica hidrolisada estaria situada, nas proximidades da região central da cadeia da α_2 -macroglobulina, os dois fragmentos liberados apresentariam massas moleculares bastante semelhantes, cujo valor estaria estimado em torno de 85 kDa, aproximadamente. Lima (1996), estudando a interação da α_2 -macroglobulina com tonina proveniente da glândula submandibular do rato, também observou a presença de uma proteína de massa molecular em torno de 85 kDa, quando da reação de interação enzima-inibidor. Esta observação era mais evidente ainda, quando a incubação era processada em presença de agentes redutores e

dissociantes. Verificamos na fração tratada com agente redutor, a presença de uma proteína apresentando massa molecular compatível com aquela de 85 kDa, observada por outros autores, sugerindo deste modo, que a hidrólise promovida pela tonina no inibidor esteja numa região interna de uma ponte dissulfeto. Lima (1996) observou também, que a dissociação dos dímeros em unidades monoméricas parece ser dependente da presença da proteinase.

Outro resultado que vêm reforçar a massa molecular aproximada de 52 kDa, estimada para as frações ativas, advém da eletroforese realizada em sistema de disco. Nesta eletroforese as proteínas correm no gel pela relação massa/carga. Quando o sobrenadante da fração ativa foi reeletroforetado em gel de poliacrilamida em presença de *SDS*, observamos dentre as proteínas visualizadas no gel, a presença de uma banda apresentando uma massa molecular, compatível com aquela observada para as frações 100 e 300 mM, obtidas da cromatografia em coluna Q-Sepharose.

Nossos resultados, relacionados ao teste de inibição com *PMSF*, presente numa concentração de 10 mM no meio de incubação, mostram que a atividade liberadora de Ang II das frações 100 e 300 mM foi inibida em 64,0 e 84,0%, respectivamente, quando incubadas com AG humano. Quando incubadas com o AG(1-14), a inibição verificada foi de 93,0 e 95%, respectivamente. Estes dados sugerem, que ambas as frações, pertencem à família das serinoproteinases, como já verificado para outras enzimas desta família. Considerando-se que, estas frações encontram-se com alto grau de pureza e que suas massas moleculares foram estimadas em 52 kDa, procuramos então, determinar a relação molar aproximada inibidor/enzima para as condições utilizadas no ensaio. Os valores de relação molar encontrados foram $1,3 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ para as frações 100 e 300 mM, respectivamente. De acordo com Thibault e Genest (1981), a tonina é uma serinoproteinase que apresenta forte resistência à inibição por *PMSF*, e que somente em valores de concentração acima que $10^{-2}M$, deste inibidor, ou seja, em concentração na qual a relação inibidor/enzima ultrapassa o valor de 10.000 é que a inibição é observada. Resultados semelhantes de inibição foram obtidos por Araujo e cols (1991) e Gualberto e cols (1992) para as toninas da glândula submandibular de rato e de humano.

A atividade tonina das frações 100 e 300 mM foi também determinada na ausência e presença de pepstatina A, em concentrações de 1 e 10 μM , utilizando-se angiotensinogênio humano como substrato. Determinamos também, a atividade tonina na presença deste mesmo inibidor a 10 μM , porém, com adição de aprotinina a 1 μM . Nossos resultados, mostram um

aumento de aproximadamente 7 vezes na atividade tonina para fração 100 mM incubada na presença de 1 e 10 μ M de pepstatina A. Para a fração 300 mM, constatamos um aumento de aproximadamente 2 vezes, na atividade tonina, quando incubada na presença de pepstatina A à 1 e 10 μ M. O aumento de atividade tonina obtido para as duas frações, observado nas incubações em presença de pepstatina A, sugere que este inibidor possa estar atuando em alguma outra enzima presente no meio de incubação, sensível a este inibidor específico e que por sua vez, poderia estar interagindo com a enzima e diminuindo assim sua atividade catalítica. Outra hipótese é que a pepstatina A poderia interferir em interação de alguma proteína com o substrato da tonina símile. A pepstatina A é descrita como um potente inibidor de várias proteinases, como catepsina D, renina, pepsina, entre outras. De acordo com Boucher e cols (1974), pepstatina A não afeta a atividade tonina. Segundo estes autores, a atividade tonina, é fortemente inibida por inibidores de origem protéica existentes no plasma, mas estes inibidores, não apresentam nenhum efeito sobre a atividade da renina e da ECA.

Os valores de atividade tonina encontrados para as frações 100 e 300 mM, na ausência e presença de aprotinina 1 μ M, não mostraram diferenças consideradas significativas, sugerindo desta forma, que a presença deste inibidor no meio de incubação, não acarreta inibição da atividade tonina. Thibaut e Genest (1981) demonstraram que a tonina proveniente da glândula submandibular do rato, somente é fortemente inibida por *SBTI*, na presença de 200 μ g do inibidor. Já para a aprotinina, a ação inibitória dependia do lote utilizado do produto.

Embora a presença de atividade angiotensinásica tenha sido descrita na placenta (Johnson e cols, 1984; Mizutani e cols, 1994; Neudeck e cols, 1996), nossos resultados mostram que, nas condições de incubação das frações com angiotensina II, por um período de 24 horas a 37°C, a concentração da angiotensina II remanescente no meio de incubação foi à mesma que no início, ou seja, a angiotensina II não foi metabolizada. Escolhemos este tempo de incubação, pois esta é a condição de incubação das frações ativas, quando da utilização do angiotensinogênio humano como substrato. Nossos resultados sugerem a inexistência desta atividade nas frações ativas, ou que, houve proteção, devido aos inibidores presentes no tampão de incubação.

A banda de 52 kDa foi submetida a seqüenciamento N-terminal. A seqüência de aminoácidos da tonina de rato foi determinada por Lazure e cols (1984). Segundo esses autores a tríade catalítica His, Asp e Ser, presente no sítio ativo de todas as serinoproteinases

conhecidas e que é necessária ao processo catalítico, está presente na tonina de glândula submandibular de rato nas posições 39, 94 e 187, respectivamente. Resultados relativos ao seqüenciamento N-terminal, obtido da fração eluída a 100 mM mostraram inicialmente, que esta região apresenta 100% de homologia com quatro proteínas, prováveis produtos de genes descritos em 2004, por um grupo de japoneses quando da identificação de parte do genoma humano. O alinhamento da seqüência da tonina com as seqüências das cinco proteínas mostrou relativamente baixo grau de homologia, considerando que as enzimas da família das calicreínas, da qual faz parte a tonina, apresentam acima de 85% de homologia. Considerando-se a massa molecular esperada para estas proteínas, duas seriam mais prováveis, pois apresentam em torno de 470 aminoácidos e massa molecular estimada em torno dos 52 kDa. Estas mesmas duas proteínas, pelo alinhamento apresentam resíduos de aspártico 94 e serina 187, nas mesmas posições que a tonina de rato, embora, provavelmente com posições relativas diferentes. Assim também, deve ser o caso da histidina 39, que deve estar presente e completar a tríade catalítica do centro ativo, mas em posição relativa diferente.

Diante dos resultados obtidos por nós, existem fortes evidências de que as enzimas ativas, obtidas do processo de purificação, possam estar relacionadas aos genes descritos em 2004 pelo grupo de japoneses e cujos produtos até o momento não haviam sido identificados. Resposta conclusiva a este respeito seria possível através da utilização de ferramentas de biologia molecular, na qual poderíamos tentar expressar esta proteína em sistema de expressão apropriado e a partir desta, verificar a atividade biológica do produto obtido. Quanto aos outros parâmetros avaliados, estes indicam que as atividades encontradas para ambas as frações ativas, são compatíveis com aquelas observadas para a atividade tonina oriunda de outros tecidos de rato e humano, apesar do baixo grau de homologia observado na seqüência de aminoácidos.

8. Conclusões

- ❖ Nossos resultados sugerem a existência de duas proteínas apresentando atividade tonina em homogenato de placenta de humano;
- ❖ Estas enzimas foram isoladas em processo envolvendo duas etapas cromatográficas sendo ambas inibidas por PMSF a 10 mM;
- ❖ Ambas as proteínas obtidas não foram inibidas por pepstatina A a 1 e 10 μ M e aprotinina 1 μ M;
- ❖ Ambas as proteínas apresentam massa molecular estimada em 52 kDa e foram eluídas em concentrações distintas de sal, sugerindo ser isoformas;
- ❖ A seqüência N-terminal obtida para a proteína de 52 kDa apresenta 100% de homologia com a região N-terminal de cinco proteínas codificadas por genes descritos em 2004 por um grupo japonês (*Institute of Medical Science, University of Tokyo*);
- ❖ As frações ativas obtidas na cromatografia em Q-Sepharose não apresentaram atividade liberadora de angiotensina I quando incubadas na ausência ou presença de pepstatina A;
- ❖ As frações ativas obtidas na cromatografia em Q-Sepharose não apresentaram atividade angiotensinásica nas condições por nós utilizadas;

A atividade específica da ordem de picomoles verificada para a hidrólise do AG humano foi semelhante às observadas para as toninas isoladas de outros tecidos humanos e de rato.

REFERÊNCIAS

1. Ahmed A, Li XF, Shams M, Gregory J, Rollason T, Barnes NM, Newton JR. Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. *J Clin Invest* 96: 848-857, 1995.
2. Alhenc-Gelas F, Yasui T, Allegrini J, Pinet F, Acker GM, Corvol P, Menard J. Angiotensin I-converting enzyme in foetal membranes and chorionic cells in culture. *J Hypertension* 2: S247-S249, 1984.
3. Araujo GW, Pesquero JB, Lindsey CJ, Paiva ACM, Pesquero JL. Identification of serine proteinases with tonin-like activity in the rat submandibular and prostate glands. *Biochem Biophys Acta* 1047: 167-171, 1991.
4. Araujo GW. Caracterização de uma nova enzima tonina-símile da glândula submandibular de rato e a sua expressão em diferentes cepas, idade e estado hipertensivo do animal. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1994. 75p - Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular.
5. Araujo RC, Lima MP, Lomez ESL, Bader M, Pesquero JB, Sumitani M, Pesquero JL. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. *Physiol Behav* 6658: 1-7, 2002.
6. Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10: S30-S39, 1999.
7. Ashley PL, MacDonald RJ. Kallikrein-related mRNAs of the rat submaxillary gland: nucleotide sequences of four distinct types including tonin. *Biochemistry* 24: 4512-4520, 1985a.
8. Ashley PL, MacDonald RJ. Tissue-specific expression of kallikrein-related genes in the rat. *Biochemistry* 24: 4520-4527, 1985b.
9. Baltatu O, Nishimura H, Hoffman S, Stoltenburg G, Eaulica I, Lippoldt A, Ganten D, Urata H. High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary gland. *Brain Res* 759: 269-278, 1997.
10. Barret AJ, Brown MA, Sayers CA. The electrophoretically 'Slow' and 'Fast' forms of the α_2 -macroglobulin molecule. *Biochem J* 181: 401-418, 1979.
11. Bing C, Johnson IR, Broughton Pipkin F. Angiotensin receptors in myometrium and myometrial vessels from uteri of women during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle and in late pregnancy. *Clin Sci (Lond)* 90: 499-505, 1996.
12. Bjork I, Larsson LJ, Lindblom T, Raub E. Stoichiometry of reactions of α_2 -macroglobulin with trypsin and chymotrypsin. *Biochem J* 217: 303-308, 1984.

13. Borges JC, Silva Jr JA, Gomes MA, Lomez ES, Leite KM, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, Pesquero JL. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H 2263-2268, 2003.
14. Boucher R, Said M, Genest J. A new Angiotensin I converting enzyme system. In: *Hypertension* 72, edited by Genest J and Koiv E, Springer-Verlag, New York, pp. 521-523, 1972.
15. Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 34 (suppl I): I-203-212, 1974.
16. Boucher R, Demassieux S, Garcia R, Genest J. Tonin, angiotensin II system. *Circ Res* 41(suppl II): 26-29.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
18. Brady JM, Wines DR, McDonald RJ. Expression of two kallikrein gene family members in the rat prostate. *Biochemistry* 28: 5203-5210, 1989.
19. Brar HS, Do YS, Tam HB, Valenzuela GJ, Murray RD, Longo LD, Yonekura ML, Hsueh WA. Uteroplacental unit as a source of elevated circulating prorenin levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 155: 1223-1226, 1986.
20. Brosnihan KB, Santos RAS, Block CH, Schiavone MT, Weches WR, Chappel MC, Khosla MC, Greene LJ E Ferrario CM. Biotransformation of angiotensins in the central nervous system. *Therap Res* 9: 48-59, 1988.
21. Broughton Pipkin F. The renin-angiotensin system in normal and hypertensive pregnancies. In: Rubin PC, ed. *Hypertension in pregnancy*. Amsterdam: Elsevier, Amsterdam, 1988: 118-151.
22. Brown JJ, Doak PB, Davies DL, Lever AF, Robertson JIS, Trust P. Plasma renin concentration in the hypertensive diseases of pregnancy. *J Obst Gynaecol Brit Commonwealth* 73: 410-417, 1966.
23. Campbel DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissue of the rat. *J Clin Invest* 78: 31-39, 1986.
24. Cardoso CC. Geração e caracterização de ratos e camundongos transgênicos, apresentando superexpressão de tonina de rato. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2002. 80p - Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia.
25. Carr BR, Gant NF. The endocrinology of pregnancy-induced hypertension. *Clin Perinatol* 10: 737-761, 1983.
26. Cheng ESP, Morris BJ. A simple method of isolating tonin using chromatofocusing. *Anal Biochem* 126: 295-300, 1982.

27. Chesley LC. Hypertensive disorders in pregnancy. *Appleton-Century-Crofts*, New York, pp. 229-255, 1978.
28. Chrétien M, Lee CM, Sandberg-Beb, Iversen LL, Boucher R, Seidah NG, Genest J. Substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Biol Chem* 255: 401-407, 1980.
29. Chung O, Stoll M, Unger T. Physiologic and pharmacologic implications of AT₁ versus AT₂ receptors. *Blood Pressure* 5: Suppl. 2, 47-52, 1996.
30. Clements JA. The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endoc Rev* 10: 393-419, 1989.
31. Clements J, Hooper J, Dong Y, Harvey T. The expanded human kallikrein (KLK) gene family. Genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem* 382: 5-14, 2001.
32. Contractor SF, Mason RM, Oakey M. Purification and properties of human placental cathepsin D. *Placenta* 3: 45-56, 1982.
33. Cox BE, Ipson MA, Shaul PW, Kamm KE, Rosenfeld CR. Myometrial angiotensin II receptor subtypes change during ovine pregnancy. *J Clin Invest* 92: 2240-2248, 1993.
34. Cox BE, Word RA, Rosenfeld CR. Angiotensin II receptor characteristics and subtype expression in uterine arteries and myometrium during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metabol* 81: 49-58, 1996.
35. Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 6: 1113-1118, 1992.
36. De Gasparo M, Whitebread S, Mele M, Motani AS, Whitcombe PJ, Ramjouw HP, Kamber B. Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 16: s31-s35, 1990.
37. De Gasparo M, Whitebread S, Kalenga MK, de Hertogh R, Crevoisier P, Thomas K. Down regulation of the angiotensin II receptor subtype AT₂ in human myometrium during pregnancy. *Regulatory Peptides* 53: 39-45, 1994.
38. De Silva PE, Husain A, Smeby RR, Khairallah A. Measurement of immunoactive angiotensin peptides in rat tissues: some pitfalls in angiotensin II analysis. *Anal Biochem* 174: 80-87, 1988.
39. Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268: 16866-16870, 1993.
40. Demassieux S, Boucher R, Grisé C, Genest J. Purification and characterization of tonin. *Can J Biochem* 54: 788-795, 1976.

41. Derkx FH, Alberda AT, De Jong FH, Zeilmaker FH, Makovitz JW, Schalekamp MADH. Source of plasma prorenin in early and late pregnancy: observations in a patient with primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metabol* 65: 349-354, 1987.
42. Drinkwater CC, Evans BA, Richards RI. Mouse glandular kallikrein genes: identification and characterization of the genes encoding the epidermal growth factor binding proteins. *Biochemistry* 26: 6750-6756, 1987.
43. Dzau VJ, Ingelfinger PRE, Ellison KE. Identification of messenger RNA sequences in mouse and rat brains. *Hypertension* 8: 544-548, 1986.
44. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin-system. *Am J Physiol* 255: 563-573, 1988.
45. Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med* 105: 141-145, 1985.
46. Ganten D, Schelling P, Vicsei P, Ganten U. Isorenin of extrarenal origin. The tissue angiotensinase systems. *Am J Med* 60: 760-772, 1976.
47. Gant NF, Worley RJ, Everett RB, MacDonald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int* 18: 253-258, 1980.
48. Garcia R, Boucher R, Genest J. Tonin activity in rat saliva: effect of sympathomimetic and parasympathomimetic drugs. *Can J Physiol Pharmacol* 54: 443-445, 1976.
49. Garcia R, Boucher R, Gutkowska J, Kondo K, Demassieux S, Genest J. Effect of antitonin on blood pressure in the one-kidney hypertensive rat. *Clin Sci Mol Med* 54: 457-461, 1978.
50. Garcia R, Schiffrin EL, Gutkowska J, Boucher R, Genest J. Reduction of hypertension in one-kidney one-clip rabbits by immunization with tonin. *Proc Soc Exp Biol Med* 162: 245-248, 1979.
51. Garcia R, Thibault G, Gutkowska J, Genest J. Release of tonin and kallikrein by perfused rat submandibular gland. *Am J Physiol* 24 (Reg Integ Comp Physiol 13): R 228-R234, 1983.
52. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62: 7499-756, 1988.
53. Gonias SL, Reynolds JA, Pizzo SV. Physical properties of human α_2 -macroglobulin following reaction with methylamine and trypsin. *Biochim Biophys Acta* 705: 306-314, 1982.
54. Gordon AH. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. Work TS and Work T ed., North Holland Publishing Co, Amsterdam-London, 1969.

55. Gordon RD, Symonds EM, Wilmhurst EG, Pawsey CGK. Plasma renin activity, plasma angiotensin and plasma and urinary electrolytes in normal and toxæmic pregnancy, including a prospective study. *Clin Sci Mol Med* 45: 115-127, 1973.
56. Gris  C, Boucher R, Thibault G, Genest J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem* 59: 250-255, 1981.
57. Gualberto MP, Nunes RL, Beraldo WT, Pesquero JL. Tonin-like activity present in human submandibular gland. *Agents Actions Suppl* 38: 392-400, 1992.
58. Guimarães SE. Purifica o e caracteriza o parcial de uma enzima com atividade tonina-símile a partir de próstata humana. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1996. 48p - Disserta o de Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia.
59. Hagemann A, Dantzer V, Nielsen AH, Poulsen K. Renin and prorenin in reproductive tissues during gestation in pigs and cattle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 20: 41-50, 1993.
60. Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol* 102: 252-261, 1994.
61. Hall PK, Roberts RC. Physical and chemical properties of human plasma α_2 -macroglobulin. *Biochem J* 173: 27-38, 1978.
62. Hanssens M, Vercruysse L, Keirse MJNC, Pijnenborg R, Van Assche FA. Identification of 'renin'-containing cells in the choriodecidua. *Placenta* 16: 517-525, 1995.
63. Harpel PC. Studies on human plasma α_2 -macroglobulin-enzyme interactions. *J Exp Med* 138: 508-521, 1973.
64. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of 131-iodine labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond)* 194: 495-496, 1962.
65. Ihara Y, Taii S, Mori T. Expression of renin and angiotensinogen genes in the human placental tissues. *Endocrinol Jpn* 34: 887-896, 1987.
66. Ikeda M, Gutkowska J, Thibault G, Boucher R, Genest J. Purification of tonin by affinity chromatography. *Hypertension* 3: 81-86, 1981.
67. Ikeda M, Arakawa K. Purification of tonin by chromatography using soybean trypsin inhibitor coupled CH-sepharose 4B. *Jap Circ J* 45: 1083-1089, 1981.
68. Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol* 10: S2-S7, 1999.
69. Jikihara H, Poisner AM, Hirch R, Handwerger S. Human uterine decidual macrophages express renin. *J Clin Endocrinol Metabol* 80: 1273-1277, 1995.

70. Johansen L, Berg T, Bergundhaugen H, Nustad K, Scicli AG, Carretero OA. Excess antibody immunoassay for the measurement of tonin in rat tissues and plasma. *J Immunol Meth* 98: 257-265, 1987.
71. Johnson IR. Renin substrate, active and acid-activatable renin concentrations in human plasma and endometrium during menstrual cycles controlled by oral contraceptive preparations. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 883-888, 1980.
72. Johnson AR, Skidgel RA, Gafford JT, Erdös EG. Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ('enkephalinase'). *Peptides* 5: 789-796, 1984.
73. Jones JM, Creeth JM, Kekwick RA. Thiol reduction of human α_2 -macroglobulin: the subunit structure. *Biochem J* 127: 187-197, 1972.
74. Juliano L, Paiva ACM. Conformation of angiotensin II in aqueous solution. Titration of several peptide analogs and homologs. *Biochemistry* 13: 2445-2450, 1974.
75. Kalenga MK, de Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, de Gasparo M. Distribution of the concentrations of angiotensin-II, angiotensin-II receptors, hPL, prolactin, and steroids in the human placenta, amnion, and chorion. *Revue Francaise Gynécologie et d' Obstétrique* 86: 585-591, 1991a.
76. Kalenga MK, de Gasparo M, de Hertogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K. Angiotensin II receptors in the human placenta are type AT₁. *Reproduction, Nutrition, Développement* 31: 257-267, 1991b.
77. Kalenga MK, de Gasparo M, Thomas K, de Hertogh R. Angiotensin II and its different receptor subtypes in placenta and foetal membranes. *Placenta* 17: 103-110, 1996a.
78. Kalenga MK, Thomas K, de Gasparo M, de Hertogh R. Determination of renin, angiotensin converting enzyme and angiotensin II levels in human placenta, chorion and amnion from women with pregnancy induced hypertension. *Clin Endocrinol* 44: 429-433, 1996b.
79. Kalenga MK, de Gasparo M, Thomas K, de Hertogh R. Down-regulation of angiotensin AT₁ receptor by progesterone in human placenta. *J Clin Endocrinol Metabol* 81: 998-1002, 1996c.
80. Knock GA, Sullivan MHF, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT₁) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1007-1015, 1994.
81. Kondo K, Garcia R, Boucher R, Genest J. Effects of intracerebroventricular administration of tonin on water intake and blood pressure in the rat. *Brain Res* 200: 437-441, 1980.
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680-685, 1970.
83. Lazure C, Leduc R, Seidah NG, Thibault G, Genest J, Chrétien M. The complete amino acid sequence of rat submandibullary gland tonin does contain the aspartic acid at the

- active site: confirmation by protein sequence analyses. *Biochem Cell Biol* 65: 321-337, 1987.
84. Le Noble FAC, Hekking JWM, Van straaten HWM, Slaaf DW, Boudier HAJ. Angiotensin-II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Eur J Pharmacol* 195: 305-306, 1991.
 85. Lemos LHS. Modulação iônica da atividade tonina. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1991. 53p - Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia.
 86. Lenz T, Sealey JE, August P, James GD, Laragh JH. Tissue levels of active and total renin, angiotensinogen, human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone in human placentas from different methods of delivery. *J Clin Endocrinol Metabol* 69: 31-37, 1989.
 87. Lenz T, James GD, Laragh JH, Sealey JE. Prorenin secretion from human placenta perfused in vitro. *Am J Physiol* 260: E876-E882, 1991.
 88. Lenz T, Sealey JE, Tewksbury DA. Regional distribution of the angiotensinogens in human placentas. *Placenta* 14: 695-699, 1993.
 89. Li X-F, Ahmed A. Expression of angiotensin II and its receptor subtypes in endometrial hyperplasia: a possible role in dysfunctional menstruation. *Lab Invest* 75: 137-145, 1996a.
 90. Li X-F, Ahmed A. Dual role of angiotensin II in the human endometrium. *Human Reprod* 11: 95-108, 1996b.
 91. Li X-F, Ahmed A. Compartmentalization and cyclic variation of immunoreactivity of renin and angiotensin converting enzyme in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reprod* 12: 2804-2809, 1997.
 92. Li X, Shams M, Zhu J, Khaling A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, Ahmed A. Cellular localization of AT₁ receptor mRNA and Protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. *J Clin Invest* 101: 442-454, 1998.
 93. Lieberman J, Sastre A. Angiotensin-converting enzyme activity in postmortem human tissues. *Lab Invest* 48: 711-717, 1983.
 94. Lima MP. Purificação e caracterização de α_2 -macroglobulina a partir do soro de rato e estudo de sua interação com a tonina. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1996. 58p - Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia.

95. Lindberg BF, Nilsson LG, Hedlund H, Stahl M, Andersson KE. Angiotensin I is converted to angiotensin II by a serine protease in human detrusor smooth muscle. *Am J Physiol* 266: R1861-R1867, 1994.
96. Lindpainter K, Ganten D. Tissue renin-angiotensin Systems and their modulation: the heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition. *Cardiology* 9: 32-44, 1991.
97. Lis M, Boucher R, Chrétien M, Genest J. Dependence of tonin activity in rat submaxillary gland on growth hormone and testosterone. *Am J Physiol* 232: 522-525, 1977.
98. Lomez, ESL, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB, Pesquero JL. Tonin and kaliikrein in the brain of transgenic rat line expressing human tissue kallikrein. *Hypertension* 39: 229-232, 2002.
99. Lopes ES, Sumitani M, Juliano L, Beraldo WT, Pesquero JL. Distribution of tonin - and kallikrein-like activities in rat brain. *Brain Research* 769: 152-157, 1997.
100. Mancina R, Susini T, Renzetti A, Forti G, Razzoli E, Serio M, Maggi M. Sex steroid modulation of AT₂ receptors in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metabol* 81: 1753-1757, 1996.
101. Martin MM, Elton TS. The sequence and genomic organization of the human type 2 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 554-562, 1995.
102. Massani ZM, Sanguinetti R, Gallegos R, Raimondi D. Angiotensin blood levels in normal and toxemic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 99:313-317,1967.
103. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262: 10035-10038, 1987.
104. Matsumoto T, Sagawa N, Mukoyama M, Tanaka I, Itoh H, Goto M, Itoh H, Horiuchi M, Dzau VJ, Mori T, Nakao K. Type 2 angiotensin II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metabol* 81: 4366-4372, 1996.
105. Matsusaka T, Ischikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Ann Rev Physiol* 59: 395-412, 1997.
106. Metsärinne KP, Pekonen F, Fyhrquist FY. Localization of renin substrate in fetoplacental tissue. *Acta Endocrinologica (Kopenhagen)* 123: 113-117, 1990.

107. Mizutani S, Goto K, Safwat M, Itakura A, Kurauchi O, Kikkawa F, Tomoda Y. Initiating enzymes of angiotensin II degradation in human placenta and pregnancy serum. *Med Sci Res* 22: 537-544, 1994.
108. Mizutani S, Tomoda Y. Effects of placental proteases on maternal and fetal blood pressure in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens* 9: 591-597, 1996.
109. Moeller I, Chai SY, MacGregor DP, Aldred GP, Mendelsohn FAO. Localization and quantitation of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in the pregnant and non-pregnant sheep uterus. *Regul Pept* 61: 213-218, 1996.
110. Morgan T, Craven C, Lalouel JM, Ward K. Angiotensinogen T235 expression is elevated in decidual spiral arteries. *J Clin Invest* 100: 1406-1415, 1997.
111. Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 32: 683-687, 1998.
112. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10663-10667, 1995.
113. Naruse M, Naruse K, Kurimoto F, Sakurai H, Yoshida S, Toma H, Ishii T, Obana K, Demura H, Inagami T. Evidence for the existence of des-Asp¹-angiotensin II in human uterine and adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metabol* 61: 480-483, 1985.
114. Neudeck H, Schuster C, Hildebrandt R, Öney T, Stiemer B, Hopp H, Graf R. Histochemical evaluation of placental angiotensinase A in pre-eclampsia: enzyme activity in villous trophoblast indicates an enhanced likelihood of gestational proteinuric hypertension. *Placenta* 17: 155-163, 1996.
115. Nielsen AH, Hagerman A, Svenstrup B, Nielsen J, Poulsen K. Regulation of angiotensin II receptor expression in ovarian follicles. In *Tissue Renin-angiotensin Systems* (Ed.) Mukhopadhyay AK & Raizaid MK, pp. 407-410, 1995. New York: Plenum Press.
116. Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. High densities of Angiotensin II subtype 2 (AT₂) receptors in the porcine placenta and fetal membranes. *Placenta* 17: 147-153, 1996.

117. Nielsen AH, Schauser K, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Angiotensin II receptors and renin in the porcine uterus: myometrial AT₂ and endometrial AT₁ receptors are down-regulated during gestation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 309-314, 1997.
118. Nielsen AH, Schauser KH, Poulsen K. The Uteroplacental Renin-Angiotensin System. *Placenta* 21: 468-477, 2000.
119. Nielsen MD, Jorgensen M, Giese J. ¹²⁵I-Labeling of angiotensin I and II. *Acta Endocrinologica* 8 (kbh) 67: 104-116, 1971.
120. Okubo S, Ichikawa I. Role of angiotensin: insight from gene targeting studies. *Kidney Int Suppl* 63: S7-S9, 1997.
121. Oliveira MCF, Juliano L, Paiva ACM. Conformations of synthetic tetradecapeptide renin substrate and of angiotensin I in aqueous solution. *Biochemistry* 16 (12): 2606-2611, 1977.
122. Orth SR, Weinreich T, Bönisch S, Weih M, Ritz E. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp Nephrol* 3: 23-33, 1995.
123. Oxvig C, Haaning J, Kristensen L, Wagner JM, Rubin I, Stigbrand T, Gleich GJ, Sottrup-jensen L. Identification of angiotensinogen and complement C3dg as novel proteins binding the proform of eosinophil major basic protein in human pregnancy serum and plasma. *J Biol Chem* 270: 13645-13651, 1995.
124. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 91: 2058-2064, 1993.
125. Peach MJ. Molecular actions of angiotensin. *Biochem Pharmacol* 30: 2745-2751, 1981.
126. Pesquero JL, Boschov P, Oliveira MFC, Paiva ACM. Effect of substrate size on tonin activity. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 1441-1446, 1982.
127. Petit A, Geoffroy P, Bélisle S. Expression of angiotensin II type-1 receptor and phospholipase C-linked Gαq/11 protein in the human placenta. *J Soc Gynecol Invest* 3: 316-321, 1996.
128. Poisner AM, Wood GW, Poisner R, Inagami T. Localization of renin in trophoblasts in human chorion laeve at term pregnancy. *Endocrinology* 109: 1150-1155, 1981.

129. Poisner AM, Wood GW, Poisner R, Inagami T. Renin and inactive renin in human amnion at term pregnancy. *Proc Soc Exp Biol Med* 169: 4-6, 1982.
130. Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol* 19: 232-252, 1998.
131. Raju GC, Lee YS. Immunohistochemical demonstration of renin in the endometrium. *Ann Acad Med (Singapore)* 18: 345-347, 1989.
132. Rodbard D, Bridson W, Rayford PL. Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J Lab Clin Med* 74: 770-777, 1969.
133. Rosenthal J, Thurnreiter M, Plasche M, Geyer M, Reiter W, Dahlheim H. Renin-like enzymes in human vasculature. *Hypertension* 15: 848-853, 1990.
134. Sapolsky AI, Woessner JF. Multiple forms of cathepsin d from bovine uterus. *J Biol Chem* 247: 2069-2076, 1972.
135. Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, Demetroulis C, Dawda R, Hall AJ, Vinson GP. Type 1 angiotensin II receptors in human myometrium. *Mol Human Reprod* 2: 659-664, 1996.
136. Schauser KH, Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Autoradiographic localization and characterization of angiotensin II receptors in the bovine placenta and fetal membranes. *Biol Reprod* 59: 684-692, 1998.
137. Schauser KH, Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Dominance of type 1 angiotensin II receptor in the nonpregnant and pregnant bovine uterus. *J Reprod Fert* 116: 403-413, 1999.
138. Schiller PW, Demassieux S, Boucher R. Substrate specificity of tonin from rat submaxillary gland. *Circ Res* 39: 629-632, 1976.
139. Sealey JE, Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Laragh JH. Changes in active and inactive renin throughout normal pregnancy. *Clin Exp Hypertension* A4: 2373-2384, 1982.
140. Seidah NG, Chan JSD, Mardini G, Benjannet S, Chrétien M, Boucher R, Genest J. Specific cleavage of beta-LPH and ACTH by tonin: release of an opiate-like peptide beta LPH (61-78). *Biochem Biophys Res Commun* 86: 1002-1013, 1979.

141. Shaw KJ, Do YS, Kjos S, Anderson PW, Shinagawa T, Dubeau L, Hsueh WA. Human decidua is a major source of renin. *J Clin Invest* 83: 2085-2092, 1989.
142. Shih HC, Chao L, Chao J. Age and hormonal dependence of tonin levels in rat submandibular gland as determined by a new direct radioimmunoassay. *Biochem J* 238: 145-149, 1986.
143. Sim MK, Seng KM. Development of angiotensin converting enzyme in fetal lung and placenta of the rat and human. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11: 497-501, 1984.
144. Skinner SL, Lumbers ER, Symonds EM. Renin concentration in human fetal and maternal tissues. *Am J Obstet Gynecol* 101: 529-533, 1968.
145. Skinner SL, Lumbers ER, Symonds EM. Analysis of changes in the renin-angiotensin system during pregnancy. *Clin Sci* 42: 479-488, 1972.
146. Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Magnusson S. Mechanism of proteinase complex formation with α_2 -macroglobulin. *FEBS Lett* 127(2): 167-173, 1981.
147. Sowers JR, Eggena P, Kowal DK, Simpson L, Zhu J-H, Barrett JD. Expression of renin and angiotensinogen genes in preeclamptic and normal human placental tissue. *Hypertens Preg* 12: 163-171, 1993.
148. Squires PM, Kennedy TG. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. *J Reprod Fertil* 95: 791-802, 1992.
149. Stakemann G. A renin-like pressor substance found in the placenta of the cat. *Acta Pathol Microbiol Scand* 50: 350-354, 1960.
150. Stoll M, Steckelings M, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-657, 1995.
151. Symonds EM, Stankey MA, Skinner SL. Production of renin by in vitro cultures of human chorion and uterine muscle. *Nature* 217: 1152-1153, 1968.
152. Symonds EM, Broughton Pipkin F, Craven DJ. Changes in the renin-angiotensin system in primigravidae with hypertensive disease of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 82: 643-650, 1975.

153. Symonds EM, Broughton Pipkin F. Pregnancy hypertension, parity, and the renin-angiotensin system. *Am J Obstet Gynecol* 132: 473-479,1978.
154. Symonds E M. Renin and reproduction. *Am J Obstet Gynecol* 158(4): 754-761, 1988.
155. Taira H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y. Angiotensin I-converting enzyme in human placenta. *Placenta* 6: 543-549, 1985.
156. Talledo OE. Renin-angiotensin system in normal and toxæmic pregnancies. Inactivation of angiotensin in toxæmic pregnancy. *Am J Obstetrics Gynaecology* 191: 254-256, 1968.
157. Tapias HR, Johnson CE, Strong CG. Renin-angiotensin system in normal and in hypertensive disease of pregnancy. *Lancet* 21: 847-850, 1972.
158. Tewksbury DA. Quantification of five forms of high molecular weight angiotensinogen from human placenta. *Am J Hypertension* 9: 1029-1034, 1996.
159. Thibault GE, Genest J. Tonin, an esteroprotease from submaxillary glands. *Biochem Biophys Acta* 660: 23-29, 1981.
160. Timmermans PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 206-42, 1993.
161. Tremblay J, Thibault G, Gutkowska J, Boucher R, Genest J. Purification and partial characterization of plasma inhibitor of tonin. *Can J Biochem* 59: 256-261, 1981.
162. Tunon P, Johansson KE. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. *J Biochem Biophys Meth* 9: 171-179, 1984.
163. Unnikumar KR, Wegmann R, Panigel M. Immunohistochemical profile of the human placenta. Studies on localization of prolactin, human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, renin and oxytocin. *Cell Mol Biol* 34: 697-710, 1988.
164. Urata H, Ganten D. Cardic angiotensin II formation: the angiotensin-I-converting enzyme and human chymase. *Eur Heart J* 14: 177-182, 1993.
165. Urata H, Strobel F, Ganten D. Widespread tissue distribution of human chymase. *J Hypertension* 12: S17-S22, 1994.
166. Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, Djahanbakhch. Tissue renin-angiotensin system and reproduction. *Human Reprod* 12: 651-662, 1997.
167. Warren AY, Craven DJ, Symonds EM. Production of active and inactive renin by cultured explants from the human female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol* 89: 628-632, 1982.

168. Weir RJ, Brown JJ, Fraser R, Kraszewski A, Lever AF, McIlwaine GM, Morton JJ, Robertson, JIS, Tree, M. Plasma renin, renin substrate, angiotensin II and aldosterone in hypertensive disease of pregnancy. *Lancet* I: 291-294, 1973.
169. Weir RJ. Vasopressor substances in normal and abnormal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 5: 75-85, 1975.
170. Wines DR, Brady JM, Pritchett DB, Roberts JL, MacDonald RJ. Organization and expression of the rat kallikrein gene family. *J Biol Chem* 264: 7653-7662, 1989.
171. Wines DR, Brady JM, Southard EM, MacDonald RJ. Evolution of the rat kallikrein gene family: gene conversion leads to functional diversity. *J Mol Evol* 32: 476-492, 1991.
172. Woodley-Miller C, Chao J, Chao L. Identification of tonin in brain and exocrine tissues and in the cell-free translation products encoded by the mRNA of these tissues. *Biochem J* 248: 477-481, 1987.
173. Yagami H, Kurauchi O, Murata Y, Okamoto T, Mizutani S, Tomoda Y. Expression of angiotensin-converting enzyme in human placenta and its physiologic role in the fetal circulation. *Obstet Gynecol* 84: 453-457, 1994.
174. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 156-160, 1996.
175. Yoshida Y, Sprecher RL, Schneyer CA, Schneyer LH. Role of beta-receptors in sympathetic regulation of electrolytes in rat submaxillary saliva. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 912-916, 1967.
176. Young JA, Martins CJ, Weber FD. The effect of a sympathomimetic and a parasympathomimetic drug on the electrolyte concentration of primary and final saliva of the rat submaxillary gland. *Pflugers Arch* 327: 285-303, 1971.
177. Zeng J, Vagnoni KE, Bird IM, Magness RR. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. *Biol Reproduction* 56: 1189-1197, 1997.

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

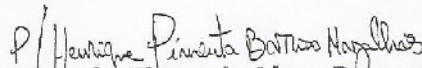
Parecer nº. ETIC 324/04

Interessado: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero
Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 24 de novembro de 2004, após ter atendido as solicitações á diligência o projeto de pesquisa intitulado « **Purificação e Caracterização de Tonina Símile de Placenta de Humano** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto, O Comitê recomenda entretanto, a inclusão no TCLE do nº do telefone dos pesquisadores e do COEP.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 27 de dezembro de 2004.

PROCESSO N° 066/04.

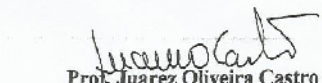
TÍTULO: "Purificação e caracterização de tonina símile de placenta de humano".

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico Financeira de Projetos de Pesquisa sobre o mesmo e sua aprovação pelo COEP/UFMG em 24/11/2004, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.

Solicitamos enviar à DEPE relatório parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,


Prof. Juarez Oliveira Castro
Diretor da DEPE/HC-UFMG

Ao
Prof. Jorge Luiz Pesquero
Laboratório Biofísica
ICB/UFMG

Termo de Consentimento Informado

Projeto: Purificação e caracterização de tonina símile de placenta de humano

O Prof. Jorge Luiz Pesquero (Prof. adjunto) e Mércia de Paula Lima (aluna de doutorado), ambos da Universidade Federal de Minas Gerais, estão desenvolvendo projeto de pesquisa com objetivo de isolamento de tonina, uma enzima capaz de liberar Angiotensina II, um potente agente vasoconstritor, que pode levar ao quadro de hipertensão arterial. Pouco se sabe sobre a ação desta enzima em tecido humano. Visamos, com o desenvolvimento deste trabalho, ampliar os estudos sobre essa enzima em tecido de humano. Como a placenta é descartada logo após o nascimento, optamos por estudar esta enzima neste tecido, uma vez que não traria riscos e agravos à saúde das participantes da pesquisa. Para tanto, precisamos obter placentas de mulheres híginas, em idade fértil, que queiram contribuir de forma espontânea para a elaboração desta pesquisa.

CONSENTIMENTO

Em razão de estar internada para realização do parto, estou sendo perguntada, se eu poderia participar desta pesquisa doando a placenta no momento da realização do parto. Concordando, assinarei este termo de consentimento, autorizando a coleta da placenta. Estou ciente de que não pagarei nada para participar deste estudo e que isto não acarretará nenhum dano a minha saúde. Estou ciente também que, caso opte em não participar do estudo, não serei prejudicada quanto ao atendimento e garantia dos serviços prestados pela instituição hospitalar. Ciente destas informações, concordo em participar deste estudo e autorizo aos pesquisadores a coleta de minha placenta para os devidos fins. Sei que poderei obter uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo, caso queira.

COMENTÁRIO FINAL DO ENTREVISTADOR

Obrigado pelo interesse em participar deste estudo, autorizando a coleta de sua placenta. Conforme esclarecido anteriormente, sua identidade permanecerá no anonimato.

NOME COMPLETO DA PACIENTE

ASSINATURA DO PACIENTE

COEP: (31) 3499.4592
Pesquisadores: (31) 34992942

Preparação de géis para eletroforese (SDS-PAGE)

	Gel de separação (10%)	Gel de concentração (6%)
Água	2,0 mL	1,1 mL
Solução de acrilamida a 30%	1,7 mL	0,4 mL
Tampão tris-HCl 1,5 M com SDS 0,4% (pH 8,8)	1,3 mL	-
Tampão tris-HCl 0,5 M com SDS 0,4% (pH 6,8)	-	0,5 mL
Solução de persulfato de amônio a 10%	0,100 mL	0,050 mL
TEMED	0,016 mL	0,015 mL
Volume total	5,160 mL	2,065 mL

Dosagem de proteína pelo método Bradford (1976)

Reagentes	Curva padrão (μg)				Amostra
	1	2	5	10	
BSA (0,1 mg/mL)	10 (μL)	20 (μL)	50 (μL)	100 (μL)	1 – 100 (μL)
Tampão (μL)	90 (μL)	80 (μL)	50 (μL)	0 (μL)	0 – 100 (μL)
Reagente de cor (μL)	1000 (μL)	1000 (μL)	1000 (μL)	1000 (μL)	1000 (μL)

Agitação instantânea, repouso por 20 min

Leitura a 595 nm

Proteína 1

BAB55072. (unnamed protein p). [gi:14042015].

DEFINITION: unnamed protein product [Homo sapiens].

ACCESSION: BAB55072;VERSION: BAB55072.1 GI:14042015; DBSOURCE: accession AK027379.1

REFERENCE: 1

AUTHORS: Ota,T., Suzuki,Y., Nishikawa,T., Otsuki,T., Sugiyama,T., Irie,R., e cols.

TITLE: Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.

JOURNAL: Nat. Genet.36 (1), 40-45 (2004). PUBMED 14702039.

REFERENCE: 2

AUTHORS: Isogai,T., Ota,T., Hayashi,K., Sugiyama,T., Otsuki,T., Suzuki,Y., e cols.

TITLE: NEDO human cDNA sequencing project.

JOURNAL: Unpublished.

REFERENCE: 3 (residues 1 to 494).

AUTHORS: Isogai,T. and Otsuki,T.

TITLE: Direct Submission.

JOURNAL: submitted (10-MAY, 2001).Takao Isogai, Helix Research Institute, Genomics Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan (E-mail:genomics@hri.co.jp, Tel:81-438-52-3975, Fax:81-438-52-3986).

COMMENT: NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan; cDNA full insert sequencing: Research Association for Biotechnology; cDNA library construction, 5'- & 3'-end one pass sequencing and clone selection: Helix Research Institute (supported by Japan Key Technology Center etc.) and Department of Virology, Institute of Medical Science, University of Tokyo.

Source: 1 - 494; db xref taxon: 9606; clone: MAMMA1001080; tissue type: mammary gland; clone lib: MAMMA1; note: cloning vector: pME18SFL3.

Protein: 1 – 494; name: unnamed protein product.

CDS: 1 – 494; coded by: AK027379.1:77.1561. db xref: IMGT/LIGM:AK027379

```

1 melglrwvfl vaflegvqce vqlvesgggl vkpggslrls caasglfst yamnwvrqap
61 gkglewvssi srsdyiyyr dsvkgrftis rdnaknsllyl qmnslrddt avyyeardsc
121 ngaicygfsp wgqgtlvts sasptspkvf plslcstqpd gnvviaclvq gffpqpelsv
181 twsesggvt arnfppsda sgdlytssq ltlpatqcla gksvtchvk ytnpsqdv
241 pcpvpstppt pspstptps pschprlsl hrpaledlll gseanltct tglrdasgvt
301 ftwtpssgks avqppperdl gcycsvssvl pgcaepwnhg kftctaayp esktpatl
361 sksgntfrpe vhlpppsee lalnelvtlt clargfspkd vlvrwlqgsq elprekyltw
421 asrqepsqgt ttfavtsilr vaaedwkkgd tfscmvghea lplaftqkti drlagkpthv
481 nvsvvmaevd gtecy

```

Proteína 2

BAC87503.(unnamed protein p). [gi:34536000].

LOCUS: BAC87503; 492 aa; linear PRI 19 – FEB, 2004.

DEFINITION: unnamed protein product [Homo sapiens].

ACCESSION: BAC87503

VERSION: BAC87503.1 GI:34536000 DBSOURCE: accession AK128565.1

REFERENCE: 1

AUTHORS: Kanehori,K., Ishibashi,T., Chiba,Y., Fujimori,K., Hiraoka,S., e cols.

TITLE: NEDO human cDNA sequencing project.

JOURNAL: Unpublished.

REFERENCE: 2 (residues 1 to 492).

AUTHORS: Isogai,T. and Yamamoto,J.

TITLE: Direct Submission.

JOURNAL: submitted (15-JUL, 2003). Takao Isogai, FLJ Project (HRI Team); 2-6-7 Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan (E-mail:genomics@hri.co.jp, Tel:81-438-52-3975, Fax:81-438-52-3986).

COMMENT: NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan; cDNA full insert sequencing: Research Association for Biotechnology (RAB); cDNA library construction: Helix Research Institute (HRI) (supported by Japan Key Technology Center etc.); 5'- & 3'-end one pass sequencing: RAB, HRI, and Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation; clone selection for full insert sequencing: HRI and RAB; annotation: Reverse Proteomics Research Institute, HRI and RAB.

db xref taxon:9606; clone: TRACH3018907; tissue type: trachea; clone lib: TRACH3; note: cloning vector: pME18SFL3.

Protein: 1 - 492; name: unnamed protein product.

CDS: 1 - 492; coded by: AK128565.1:81.1559.

```
1 melglswifl laikgvqce vqlvesgggl vqpgprlrls caasgftfdy yamhwvrqap
61 gkglewvsgi twnsgdmgya dsvkgrftis rdiaknsllyl qmnsdraedt alyycakdqq
121 qlfdfsfdiwg qgtmvtvssa sptspkvfpl slcstqpdgn vviaclvqgf fpqeplsvtw
181 sesgqgvtar nfppsqdasg dlyttssqlt lpatqclagk svtchvkhyt npsqdvtpc
241 pvpstppts pstpptsps cchprlslhr paledlllgs eanltctltg lrdasgvtft
301 wtpssgksav qgppdrdlcg cysvssvlpg caepwnhgkt ftctaaypes ktpltatlsk
361 sgntfrpevh llpppseela lneltlcl argfspkdvl vrwlqgsqel prekyltwas
421 rpepsqgttt favtsilrva aedwkkgdtf scmvghealp laftqktidr lagkpthvrv
481 svvmaevdgt cy
```

Proteína 3

BAC87456.(unnamed protein p). [gi:34535864].

LOCUS: BAC87456; 492 aa; linear PRI 19 - FEB, 2004.

ACCESSION: BAC87456; VERSION: BAC87456.1 GI:34535864; DBSOURCE accession: AK128476.1

REFERENCE: 1

AUTHORS: Kanehori,K., Ishibashi,T., Chiba,Y., Fujimori,K., Hiraoka,S., e cols.

TITLE: NEDO human cDNA sequencing project.

JOURNAL: Unpublished

REFERENCE: 2 (residues 1 to 492)

AUTHORS: Isogai,T. and Yamamoto,J.

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: submitted (15-JUL, 2003). Takao Isogai, FLJ Project (HRI Team); 2-6-7 Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan (E-mail:genomics@hri.co.jp, Tel:81-438-52-3975, Fax:81-438-52-3986)

COMMENT: NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan; cDNA full insert sequencing: Research Association for Biotechnology (RAB); cDNA library construction: Helix Research Institute (HRI) (supported by Japan Key Technology Center etc.); 5'- & 3'-end one pass sequencing: RAB, HRI, and Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation; clone selection for full insert sequencing: HRI and RAB; annotation: Reverse Proteomics Research Institute, HRI and RAB.

Source: 1 – 492; db xref taxon:9606; clone: TLUNG2001445; tissue type: lung, tumor tissue; clone lib: LUNG2; note: cloning vector: pME18SFL3.

Protein: 1 – 492; name: unnamed protein product.

CDS: 1 – 492; coded by: AK128476.1:80.1558.

```
1 melglswvfl vailkgvqce vqlvesgggl vqpggsrrls caasaftvs nnyvswvrqap
61 gkglewvsii ysagdtyyad svkgrftisr dskntllhlq mnslraddta iyycarmggg
121 flgnafeiwg qgtlmtvssa sptspkvfpl slestqpdgn vviaclvqgf fpqeplsvtw
181 sesgqgytar nfppsdaqg dlyttssqlt lpatqclagk svtchvkhyt npsqdvtpc
241 pvpstppts pstpptsps cchprlslhr paledlllgs eanltctltg lrdasgvftf
301 wtpssgksav qgpperdlcg cysvssvlpg caepwnhgkt ftctaaypes ktpltatlsk
361 sgntfirpevh llppseela lneltlcl argfspkdvl vrwlqgsqel prekyltwas
421 rqepsqgtt favtsilrva aedwkkgtf scmvghealp laftqktidr lagkpthvny
481 svvmaevdgt cy
```

Proteína 4

BAC86968.(unnamed protein p). [gi:34534315].

LOCUS: BAC86968; 471 aa; linear PRI 19 - FEB, 2004.

ACCESSION: BAC86968

VERSION: BAC86968.1 GI:34534315; DBSOURCE accession: AK127415.1

REFERENCE: 1

AUTHORS: Kawakami,B., Sugiyama,A., Takemoto,M., Sugiyama,T., Irie,R., e cols.

TITLE: NEDO human cDNA sequencing project.

JOURNAL: Unpublished.

REFERENCE: 2 (residues 1 to 471).

AUTHORS: Isogai,T. and Yamamoto,J.

TITLE: Direct Submission.

JOURNAL: submitted (15-JUL, 2003). Takao Isogai, FLJ Project (HRI Team); 2-6-7 Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan (E-mail:genomics@hri.co.jp, Tel:81-438-52-3975, Fax:81-438-52-3986).

COMMENT: NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan; cDNA full insert sequencing: Research Association for Biotechnology (RAB); cDNA library construction: Helix Research Institute (HRI) (supported by Japan Key Technology Center etc.); 5'- & 3'-end one pass sequencing: RAB, HRI, and Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation; clone selection for full insert sequencing: HRI and RAB; annotation: Reverse Proteomics Research Institute, HRI and RAB.

Source: 1 – 471; db xref taxon: 9606; clone: BRTHA2020721; tissue type: thalamus; clone lib: BRTHA2; note: cloning vector pME18SFL3.

Protein: 1 – 471; name: unnamed protein product.

CDS: 1 – 471; coded by: AK127415.1:80.1495.

```
1 melglrwvfl vallegvhce vqlvesgggl vkpggslrls caasgfsfsy ytmnwvvrqap
61 gkglewvssi tisstylysa dsvkgrftis rdnaknvlyl hmnsrvedt avyyctrdrv
121 vagsdpnfdy wgpghtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq tyicvnhkp sntkvdkkve
241 pkscdkthtc ppcpapellg gpsvflfppk pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn
301 wyvdgvevhn aktkpreeqy nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk alpapiekti
361 skakgqprep qvytlppsrđ eltknqvslđ clvkgfypsd iavewesngq pennyktpp
421 vldsdsfffl yskltvdkwr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg k
```

Proteína 5

BAC05186.(unnamed protein p). [gi:21757752].

LOCUS: BAC05186; 474 aa; linear PRI 30 - JAN, 2004.

ACCESSION: BAC05186; VERSION: BAC05186.1 GI:21757752; DBSOURCE accession: AK097859.1.

REFERENCE: 1

AUTHORS: Ota,T., Suzuki,Y., Nishikawa,T., Otsuki,T., Sugiyama,T., Irie,R., e cols.

TITLE: Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs.

JOURNAL: Nat. Genet. 36 (1), 40-45 (2004). PUBMED: 14702039.

REFERENCE: 2

AUTHORS: Ninomiya,K., Wagatsuma,M., Kanda,K., Kondo,H., Yokoi,T., e cols.

TITLE: NEDO human cDNA sequencing project.

JOURNAL: Unpublished.

REFERENCE: 3 (residues 1 to 474).

AUTHORS: Isogai,T. and Yamamoto, J.

TITLE: Direct Submission.

JOURNAL: submitted (04-JUL, 2002). Takao Isogai, FLJ Project (HRI Team); 2-6-7 Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan (E-mail:genomics@hri.co.jp, Tel:81-438-52-3975, Fax:81-438-52-3986).

COMMENT: NEDO human cDNA sequencing project supported by Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan; cDNA full insert sequencing: Research Association for Biotechnology (RAB); cDNA library construction: Helix Research Institute (HRI) (supported by Japan Key Technology Center etc.); 5'- & 3'-end one pass sequencing: RAB, HRI, and Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation; clone selection for full insert sequencing: HRI and RAB; annotation: HRI and RAB.

Source: 1 – 474; db xref taxon: 9606; clone: THYMU1000554; tissue type: thymus; clone lib: THYMU1; note: cloning vector pME18SFL3.

Protein: 1 – 474; name: unnamed protein product.

CDS: 1 - 474; coded by: AK097859.1:84.1508.

```
1 melglcwvfl vaikgvqce vqlvesgggl vppggslls cavsgffsn yelnwvrqap
61 gkglewlsyi stgasqlya dpvkgrftis rdsgknsllf hmgsbraedt avyycargys
121 taaaakynw fdswgqgtlv tvssastkqp svfplapssk stsggtaalv clvkdyfpep
181 vtvswnsgal tsgvhtfpav lqssglysls svvtvpsssl gtqtyicnvn hkpsntkvdK
241 rvepkscdkt htcppepape llggpsvflf ppkpkdtlmi srtpvctcvv vdvshedpev
301 kfnwyvdgve vhnaktkpre eqynstyrvv svltvlhqdw lngkeykckv snkalpapie
361 ktiskakgqp repqvylpp sreemtknqv sltclvkgfy psdiavewes ngqpennykt
421 tppvldsdgs fflyskltvd ksrwqqgnvf scsvmhealth nhytqksll spgk
```

Alinhamento obtido para a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato e a proteína P1

Sequence 1: UserSeq1, (235 residues)

Sequence 2: UserSeq2, (475 residues)

1. 62.5% identity in 8 residues overlap; Score: 32.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K T P

UserSeq2, 222 P C P V P S T P

2. 53.8% identity in 13 residues overlap; Score: 31.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 183 C A G D S G G P L I C D G

UserSeq2, 96 C A R D S C N G A I C Y G

3. 71.4% identity in 7 residues overlap; Score: 28.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 T C L A S G W

UserSeq2, 371 T C L A R G F

4. 28.6% identity in 28 residues overlap; Score: 27.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 113 I D L P T K E P K V G S T C L A S G W G S T N P S E M V

UserSeq2, 192 L T L P A T Q C L A G K S V T C H V K H Y T N P S Q D V

5. 45.5% identity in 11 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 118 K E P K V G S T C L A

UserSeq2, 405 Q E P S Q G T T T F A

6. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 186 D S G G P L I C D G

UserSeq2, 6 E S G G G L V K P G

7. 50.0% identity in 8 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K T P

UserSeq2, 230 P T P S P S T P

8. 43.8% identity in 16 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 80 V T N D T E Q P V H D H S N D L

UserSeq2, 170 V T A R N F P P S Q D A S G D L

9. 30.4% identity in 23 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 126 C L A S G W G S T N P S E M V V S H D L Q C V

UserSeq2, 148 C L V Q G F F P Q E P L S V T W S E S G Q G V

10. 66.7% identity in 6 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 T C L A S G

UserSeq2, 21 S C A A S G

11. 33.3% identity in 15 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 205 A T P C A K P K T P A I Y A K

UserSeq2, 196 A T Q C L A G K S V T C H V K

12. 33.3% identity in 9 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 209 A K P K T P A I Y
UserSeq2, 123 A S P T S P K V F

13. 50.0% identity in 6 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 180 K D T C A G
UserSeq2, 98 R D S C N G

14. 40.0% identity in 10 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 198 Q G I T S G G A T P
UserSeq2, 168 Q G V T A R N F P P

15. 23.5% identity in 17 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 128 A S G W G S T N P S E M V V S H D
UserSeq2, 424 A E D W K K G D T F S C M V G H E

16. 40.0% identity in 15 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 59 P F A Q R R L V R Q S F R H P
UserSeq2, 111 P W G Q G T L V T V S S A S P

17. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 25 G G V L I D P
UserSeq2, 8 G G G L V K P

18. 75.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 208 C A K P
UserSeq2, 314 C A E P

19. 50.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 11 S Q P W
UserSeq2, 315 A E P W

20. 30.8% identity in 13 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 166 V T D V M L C A G E M E G
UserSeq2, 130 V F P L S L C S T Q P D G

Alinhamento obtido para a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato e a proteína P2

Sequence 1: UserSeq1, (235 residues)

Sequence 2: UserSeq2, (473 residues)

1. 62.5% identity in 8 residues overlap; Score: 32.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 PCAKPKTP

UserSeq2, 220 PCVPSTP

2. 71.4% identity in 7 residues overlap; Score: 28.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 TCLASGW

UserSeq2, 369 TCLARGF

3. 28.6% identity in 28 residues overlap; Score: 27.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 113 IDLPTKEPKV GSTCLASGW GSTNPSMV

UserSeq2, 190 LTLPATQCLAGKSVTCHV KHYTNPSQDV

4. 45.5% identity in 11 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 118 KEPKV GSTCLA

UserSeq2, 403 QEPSQGTTF A

5. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 186 DSGGP LICDG

UserSeq2, 6 E SGGGLVQPG

6. 19.2% identity in 26 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 130 GWGSTNPSM VVSHDLQCVNIHLLSN

UserSeq2, 59 GYADSVKGRFTISRDI AKNSLYLQMN

7. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 TCLASGW

UserSeq2, 21 SC AASGF

8. 50.0% identity in 8 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 5 YKCEKNSQ

UserSeq2, 94 YYCAKDQQ

9. 43.8% identity in 16 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 80 VTNDTEQ PVHDH SNDL

UserSeq2, 168 VTARNFP SQDASGDL

10. 50.0% identity in 8 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 PCAKPKTP

UserSeq2, 228 PTPSPSTP

11. 30.4% identity in 23 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 126 CLASGWGSTNPSM VVSHDLQCV

UserSeq2, 146 CLVQGFFPQEP LSVTWS ESGQGV

12. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 25 **G G V L I D P**
UserSeq2, 8 **G G G L V Q P**

13. 33.3% identity in 15 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 205 **A T P C A K P K T P A I Y A K**
UserSeq2, 194 **A T Q C L A G K S V T C H V K**

14. 33.3% identity in 9 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 209 **A K P K T P A I Y**
UserSeq2, 121 **A S P T S P K V F**

15. 23.5% identity in 17 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 128 **A S G W G S T N P S E M V V S H D**
UserSeq2, 422 **A E D W K K G D T F S C M V G H E**

16. 40.0% identity in 10 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 198 **Q G I T S G G A T P**
UserSeq2, 166 **Q G V T A R N F P P**

17. 30.8% identity in 13 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 166 **V T D V M L C A G E M E G**
UserSeq2, 128 **V F P L S L C S T Q P D G**

18. 23.5% identity in 17 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 183 **C A G D S G G P L I C D G V L Q G**
UserSeq2, 134 **C S T Q P D G N V V I A C L V Q G**

19. 50.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 11 **S Q P W**
UserSeq2, 313 **A E P W**

20. 75.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 208 **C A K P**
UserSeq2, 312 **C A E P**

Alinhamento obtido para a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato e a proteína P3

Sequence 1: UserSeq1, (235 residues)

Sequence 2: UserSeq2, (473 residues)

1. 62.5% identity in 8 residues overlap; Score: 32.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K T P

UserSeq2, 220 P C P V P S T P

2. 71.4% identity in 7 residues overlap; Score: 28.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 T C L A S G W

UserSeq2, 369 T C L A R G F

3. 28.6% identity in 28 residues overlap; Score: 27.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 113 I D L P T K E P K V G S T C L A S G W G S T N P S E M V

UserSeq2, 190 L T L P A T Q C L A G K S V T C H V K H Y T N P S Q D V

4. 45.5% identity in 11 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 118 K E P K V G S T C L A

UserSeq2, 403 Q E P S Q G T T T F A

5. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 186 D S G G P L I C D G

UserSeq2, 6 E S G G G L V Q P G

6. 55.6% identity in 9 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 37 A A H C Y S N N Y

UserSeq2, 25 S A F T V S N N Y

7. 28.6% identity in 7 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 223 F T S W I K K

UserSeq2, 33 Y V S W V R Q

8. 50.0% identity in 8 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K T P

UserSeq2, 228 P T P S P S T P

9. 30.4% identity in 23 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 126 C L A S G W G S T N P S E M V V S H D L Q C V

UserSeq2, 146 C L V Q G F F P Q E P L S V T W S E S G Q G V

10. 43.8% identity in 16 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 80 V T N D T E Q P V H D H S N D L

UserSeq2, 168 V T A R N F P P S Q D A S G D L

11. 33.3% identity in 9 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 209 A K P K T P A I Y

UserSeq2, 121 A S P T S P K V F

12. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 25 **G G V L I D P**
UserSeq2, 8 **G G G L V Q P**

13. 33.3% identity in 15 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 205 **A T P C A K P K T P A I Y A K**
UserSeq2, 194 **A T Q C L A G K S V T C H V K**

14. 23.5% identity in 17 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 128 **A S G W G S T N P S E M V V S H D**
UserSeq2, 422 **A E D W K K G D T F S C M V G H E**

15. 40.0% identity in 10 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 198 **Q G I T S G G A T P**
UserSeq2, 166 **Q G V T A R N F P P**

16. 50.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 11 **S Q P W**
UserSeq2, 313 **A E P W**

17. 23.5% identity in 17 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 183 **C A G D S G G P L I C D G V L Q G**
UserSeq2, 134 **C S T Q P D G N V V I A C L V Q G**

18. 33.3% identity in 15 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 141 **V S H D L Q C V N I H L L S N**
UserSeq2, 69 **I S R D N S K N T L H L Q M N**

19. 36.4% identity in 11 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 **T C L A S G W G S T N**
UserSeq2, 21 **S C A A S A F T V S N**

20. 75.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 208 **C A K P**
UserSeq2, 312 **C A E P**

Alinhamento obtido para a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato e a proteína P4

Sequence 1: UserSeq1, (235 residues)

Sequence 2: UserSeq2, (452 residues)

1. 26.9% identity in 26 residues overlap; Score: 29.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 210 **KPK**TPA IYAKLI KF **TSWIKK VMKENP**

UserSeq2, 251 **KPK**DTLMI SRTPEV **TCVVVDVSHEDP**

2. 45.5% identity in 11 residues overlap; Score: 28.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 121 **KVGS****TCLASGW**

UserSeq2, 367 **QVSL****TCLVKGF**

3. 25.0% identity in 12 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 90 **DHSNDLMLLHLS**

UserSeq2, 73 **DNAKNVLYLHMN**

4. 36.4% identity in 11 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 112 **VIDLPTKEPKV**

UserSeq2, 268 **VVDVSHEDPEV**

5. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 210 **KPKTPAIY**

UserSeq2, 347 **QPREPQVY**

6. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 186 **DSSGGLICDG**

UserSeq2, 6 **ESSGGGLVKPG**

7. 44.4% identity in 9 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 5 **YKCEKNSQP**

UserSeq2, 203 **YICNVNHKP**

8. 24.5% identity in 49 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 35 **ITA**AHCYSNNYQVL L **GR**NNLFKDE P F AQRRLVRQ**SFRHPDYI** PL I V **TND**

UserSeq2, 51 **ITI** SS TYLS YADSV **KGR** FT I SRDN AKN V LY**LHMNSLRVEDTAVYYC** **TRD**

9. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 **TCLASGW**

UserSeq2, 21 **SCAASGF**

10. 35.7% identity in 14 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 105 **DITGGVKVIDLPTK**

UserSeq2, 238 **ELLGGPSVFLFPK**

11. 33.3% identity in 24 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 134 **TNPSEM**VVSHDLQ **CVNIHLLSNEK**

UserSeq2, 192 **TVPS**SSL GTQTYI **CNVNHKPSNTK**

12. 66.7% identity in 6 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 8 E K N S Q P
UserSeq2, 387 E S N G Q P

13. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 5 Y K C E K N S Q
UserSeq2, 324 Y K C K V S N K

14. 62.5% identity in 8 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 74 D Y I P L I V T
UserSeq2, 153 D Y F P E P V T

15. 57.1% identity in 7 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 25 G G V L I D P
UserSeq2, 8 G G G L V K P

16. 46.2% identity in 13 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 110 V K V I D L P T K E P K V
UserSeq2, 118 V T V S A S S T K G P S V

17. 50.0% identity in 6 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K
UserSeq2, 233 P C P A P E

18. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 41 Y S N N Y Q V L
UserSeq2, 301 Y N S T Y R V V

19. 31.2% identity in 16 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 129 S G W G S T N P S E M V V S H D
UserSeq2, 420 S R W Q Q G N V F S C S V M H E

20. 100.0% identity in 4 residues overlap; Score: 21.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 201 T S G G
UserSeq2, 140 T S G G

Alinhamento obtido para a seqüência da tonina de glândula submandibular de rato e a proteína P5

Sequence 1: UserSeq1, (235 residues)

Sequence 2: UserSeq2, (455 residues)

1. 26.9% identity in 26 residues overlap; Score: 29.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 210 **KPK**TPA I YAK LIKF **TSWIKKVMKENP**
UserSeq2, 254 **KPK**DTLM IS RTPEV **TCVVVDVSHEDP**

2. 45.5% identity in 11 residues overlap; Score: 28.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 121 **KVGS****TCLAS**GW
UserSeq2, 370 **QVSL****TCLVK**GF

3. 41.7% identity in 12 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 25 **GGV**LI**DP**SWVI**T**
UserSeq2, 8 **GGG**LV**QPG**SL**T**

4. 36.4% identity in 11 residues overlap; Score: 26.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 112 **VI****DL**PT**KEPK**V
UserSeq2, 271 **VVD**V**SHEDPE**V

5. 66.7% identity in 6 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 50 **GRN**NL**F**
UserSeq2, 75 **GKN**SL**F**

6. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 210 **KPK**T**PAI**Y
UserSeq2, 350 **QPRE****PQVY**

7. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 25.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 186 **D****SGGP**LI**CDG**
UserSeq2, 6 **ESGG**GL**VQPG**

8. 44.4% identity in 9 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 5 **YK****CEKNS**Q**P**
UserSeq2, 206 **YI****CNVN**HK**P**

9. 35.7% identity in 14 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 105 **DIT****GGVK**VI**DLPTK**
UserSeq2, 241 **ELL****GGPS**V**FLFPK**

10. 50.0% identity in 10 residues overlap; Score: 24.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 179 **GKD****TCA**G**DSG**
UserSeq2, 66 **GRF****TISR****DSG**

11. 62.5% identity in 8 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 74 **DYI**PLI**VT**
UserSeq2, 156 **DY**FP**EPVT**

12. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 5 Y K C E K N S Q
UserSeq2, 327 Y K C K V S N K

13. 36.4% identity in 11 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 125 T C L A S G W G S T N
UserSeq2, 21 S C A V S G F T F S N

14. 33.3% identity in 24 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 134 T N P S E M V V S H D L Q C V N I H L L S N E K
UserSeq2, 195 T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K

15. 66.7% identity in 6 residues overlap; Score: 23.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 8 E K N S Q P
UserSeq2, 390 E S N G Q P

16. 42.9% identity in 14 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 213 T P A I Y A K L I K F T S W
UserSeq2, 102 T A A A A I K Y N W F D S W

17. 37.5% identity in 8 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 41 Y S N N Y Q V L
UserSeq2, 304 Y N S T Y R V V

18. 35.7% identity in 14 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 188 G G P L I C D G V L Q G I T
UserSeq2, 15 G G S L T L S C A V S G F T

19. 46.2% identity in 13 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 110 V K V I D L P T K E P K V
UserSeq2, 121 V T V S S A S T K G P S V

20. 50.0% identity in 6 residues overlap; Score: 22.0; Gap frequency: 0.0%

UserSeq1, 207 P C A K P K
UserSeq2, 236 P C P A P E

Ata da defesa de Tese de Doutorado de MERCIA DE PAULA LIMA D-62
do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - FZ 205-1
siologia e Farmacologia. No dia 15 de abril de 2005, às
13:30 horas, na Sala G3-357, do Depto de Farmacologia
do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em Belo Horizonte,
MG, realizou-se a sessão para defesa da tese de
Mércia de Paula Lima. A presidência da sessão coube ao
Prof. Jorge Luiz Lesquero, diretor do Instituto de Ciências Bio-
lógicas - UFMG, orientador. Inicialmente fez-se a apresentação
da Banca Examinadora assim constituída: Prof. Adriano Mon-
teiro de Castro Pimenta, Doutor, do Instituto de Ciências Biológicas -
UFMG; Prof. Fernando Marcos dos Reis, Doutor, da Faculdade de Medi-
cina - UFMG; Prof. Luiz Guilherme Dias Heneme, Doutor, da Fundação
Eszequiel Dias - FUNED; Prof. Ronaldo de Carvalho Fraujo, Doutor, da
Universidade de Mogi das Cruzes e Prof. Jorge Luiz Lesquero, orienta-
dor. Em seguida a candidata fez uma exposição sobre o tra-
balho que constitui sua Tese, intitulada "PURIFICAÇÃO E CARAC-
TERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMA TONINA SIMILAR A PARTIR DE PLACENTA DE
HUMANO". Após a exposição passou-se a arguição da candidata pela
Banca Examinadora. Em seguida a Banca reuniu-se e decidiu
considerar **APROVADA** a Tese defendida por Mércia de Paula
Lima. Esta ata foi lavrada a presente ata que depois
de aprovada, será assinada pela Banca
Examinadora. Belo Horizonte, 15 de Abril de 2005.

