

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**BASES MOLECULARES DA ATIVAÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA
DE ANGIOTENSINA I (ECA) NA HIPERTROFIA CARDÍACA NO
RATO**

EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO KRIEGER

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

1999

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **José Eduardo Krieger**, pela forma sempre objetiva, criteriosa e segura com que conduziu o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Sérgio**, pela paciência e estímulo à minha vida profissional e aos meus familiares que sempre estiveram presentes, compartilhando e apoiando em todos os momentos da minha formação acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e do Lab. de Experimentação (Prof. Dr. **Krieger** e Prof.a Dra. **Maria Cláudia**) do InCor, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, **MEU MUITO OBRIGADA**.

Esta tese foi realizada no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração em São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP e Fundação E. J. Zerbini.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Hipertrofia cardíaca.....	2
1.2 - Sistema Renina-Angiotensina	9
1.3 - Sistema Renina-Angiotensina Local	10
1.4 - Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco.....	11
1.5 - Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)	12
1.6 - OBJETIVOS DO TRABALHO	18
2 – MATERIAL	19
2.1 - Drogas	20
2.2 – Reagentes.....	20
2.3 – Kits.....	21
2.4 – Outros	21
2.5 - Equipamentos.....	21
2.6 - Animais Experimentais	21
3 – MÉTODOS	22
3.1 - Padronização do ensaio fluorimétrico para determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos	22
3.1.1 - Obtenção das amostras de soro e tecidos.....	22
3.1.2 - Determinação da atividade da ECA.....	22

3.1.3 - Validação do ensaio fluorimétrico para medida da atividade da ECA.....	23
3.1.3.1 - Influência dos homogeneizados na fluorescência do produto	23
3.1.3.2 - Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio.....	24
3.1.3.3 - Influência das dipeptidases sobre o produto da reação.....	24
3.1.4 - Demonstração da validade do ensaio enzimático para a ECA	25
3.1.4.1 - Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação.....	25
3.1.4.2 - Linearidade entre a velocidade de liberação do produto e a quantidade da “enzima”	25
3.1.5 - Demonstração da especificidade do ensaio para determinação da atividade da ECA em tecidos.....	25
3.1.6 - Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA em tecido.....	25
3.1.7 - Determinação da concentração de proteínas teciduais	25
3.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol.....	26
3.2.1 - Animais experimentais	26
3.2.2 - Medida Direta da Pressão Arterial	26
3.2.3 - Preparação das amostras.....	27
3.2.4 - Análises Bioquímicas	27
3.2.4.1 - Dosagem da atividade da ECA	27
3.2.4.2 - Medida da atividade da renina plasmática.....	27
3.2.4.3 - Determinação da proteína.....	27
3.2.4.4 - Determinação da expressão do gene da ECA e ANF.....	28
3.2.4.4.1 - Extração do RNA total.....	28
3.2.4.4.2 - Soluções utilizadas para Northern blot	28

3.2.4.4.3 - Northern blot	28
3.2.5 - Análises morfológicas e morfométricas	29
3.2.5.1 - Morfologia cardíaca.....	29
3.2.5.2 - Morfometria cardíaca.....	29
3.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA em ventrículo de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol	30
3.3.1 - Construção dos plasmídios	30
3.3.1.1 - Mutantes	31
3.3.1.2 - Sequenciamento dos mutantes.....	32
3.3.1.3 - Purificação do DNA.....	33
3.3.2 - Injeção do DNA recombinante <i>in vivo</i>	33
3.3.3 - Determinação da expressão gênica através da atividade da luciferase e da β -galactosidase.....	34
3.3.4 - Identificação do tipo celular cardíaco que internaliza "naked DNA".....	34
3.3.5 - Apresentação dos resultados.....	35
3.4 - Análise estatística.....	35
4 - RESULTADOS	36
4.1 - Padronização do ensaio fluorimétrico para determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos	37
4.1.1 - Validação do ensaio fluorimétrico.....	37
4.1.1.1 - Influência dos homogeneizados sobre a fluorescência do produto.....	37
4.1.1.2 - Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio.....	38
4.1.1.3 - Influência das dipeptidases sobre o produto.....	39
4.1.2 - Demonstração da validade do ensaio enzimático.....	43

4.1.2.1 - Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação.	
Curva de Tempo	43
4.1.2.2.1 - Linearidade entre a velocidade de liberação do produto e a quantidade de “enzima. Curva de Proteína.....	43
4.1.3 - Demonstração da especificidade do ensaio para determinação da atividade da ECA em tecidos	46
4.1.4 - Comparação entre a atividade da enzima na presença de diferentes tampões.....	46
4.1.5 - Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA nos homogeneizados de tecidos	47
4.1.6 - Determinação da atividade da ECA em tecidos de ratos Wistar e SHR.....	48
4.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol	49
4.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA no VE de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol.....	61
4.3.1 - Localização da célula que incorpora o “naked de DNA”	63
4.3.2 - Identificação das seqüências regulatórias do gene da ECA	66
5 – DISCUSSÃO	72
5.1 - Determinação fluorimétrica da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos	73
5.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol	81
5.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA no VE de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol.....	88
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio	39
Tabela 2 - Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA nos homogeneizados de tecidos.....	48
Tabela 3 - Pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	50
Tabela 4 - Efeitos dos diferentes tratamentos sobre o peso das câmara cardíacas e o peso corporal dos animais	52
Tabela 5 - Atividade da ECA no soro e no homogeneizado de diferentes tecidos de ratos...	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação do protooncogenes. Classe 1. Fatores de crescimento (mitógenos). Classe 2. Receptores de membrana dos fatores de crescimento.....	6
Figura 2 - Estrutura e conformação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) derivada do plasma (A), células somáticas (B) e testículo (C), mostrando os sítios catalíticos, os sítios de ligação do zinco, as extremidades amino (NH ₂) e carboxi-terminais (COOH)	14
Figura 3 - Influência dos homogeneizados de tecidos sobre a fluorescência do dipeptídeo His-Leu.....	38
Figura 4 - Atividades dipeptidásicas para amostras de tecidos de ratos Wistar (A) e SHR (B), incubados com 31 nMol de His-Leu em tampão borato.....	40

Figura 5 - Curva de PCMB (p-cloro mercuribenzoato)	41
Figura 6 - Atividade dipeptidásica determinada na presença de tampão borato (A) e tampão fosfato (B) com 62 nmoles de His-Leu.	42
Figura 7 - Curva de tempo. Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação.....	44
Figura 8 - Curva de proteína	45
Figura 9 - Demonstração da especificidade do ensaio para ECA em diferentes tecidos. Os resultados são expressos como percentual de inibição com MK-422 (enalaprilato) na concentração de 3 μ M.....	46
Figura 10 - Atividade da ECA em diferentes tampões.....	47
Figura 11 - Determinação da atividade da ECA em diferentes tecidos para ratos Wistar e SHR.....	49
Figura 12 - Medida direta da Pressão Arterial Média (PAM).....	50
Figura 13 - Peso corporal dos animais	51
Figura 14 - Medida da atividade da renina plasmática.....	53
Figura 15 - Medida da atividade da ECA no soro.....	54
Figura 16 - Medida da atividade da ECA no VE	54
Figura 17 - Medida da atividade da ECA no Pulmão	55
Figura 18 - Medida da atividade da ECA no Rim.....	55
Figura 19 . Correlação entre a hipertrofia e a atividade da ECA no VE.....	57
Figura 20 . Fotografia de uma região do VE de rato mostrando o diâmetro de miócitos isolados.....	58
Figura 21 : Expressão e quantificação do RNAm do gene da ECA no VE de ratos.....	59
Figura 22 : Expressão e quantificação do RNAm do gene do ANF (Fator Natriurético Atrial) no VE de ratos	60

Figura 23. Região 5' do gene da ECA de rato WKY	62
Figura 24A. Injeção do CRETK-LUC	63
Figura 24B. Injeção do MMTV-LUC	64
Figura 25. Ensaio para β -galactosidase.....	65
Figura 26A. Injeção do vetor W/Luc.....	66
Figura 26B. Expressão do vetor W/Luc	67
Figura 27A. Representação esquemática das deleções progressivas do vetor W/Luc	68
Figura 27B. Expressão dos fragmentos do vetor.....	69
Figura 28A. Representação esquemática do promotor da ECA (W/Luc) contendo a mutação no CRE (W5J)	70
Figura 28B. Mutação no CRE (Elemento Responsivo a AMPc).....	71

RESUMO

Neste trabalho demonstramos que seqüências regulatórias contidas na região promotora do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) participam da ativação do gene durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no rato. Para determinar a atividade da ECA no plasma e em diferentes tecidos na hipertrofia cardíaca foi necessário padronizar uma metodologia para medida da atividade da enzima em diversos tecidos de ratos. Isoproterenol (0,3 mg/Kg/dia, sc, 1 semana) resultou em hipertrofia cardíaca (36%) com aumento da expressão (58%) e da atividade da ECA (67%) no ventrículo esquerdo. O sistema de gene *reporter* baseado na luciferase foi utilizado para identificar as seqüências regulatórias do gene da ECA associadas a esta resposta. O desenvolvimento de hipertrofia se acompanhou de ativação da luciferase (3,5X) numa construção contendo 1273 pb do promotor da ECA indicando, assim, a presença de seqüências que ativam o gene no fragmento estudado. O mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA associada a ativação do gene foi feita através da análise de uma série de mutantes contendo deleções progressivas do promotor (-1089, -477, -385, -252, -199, e -94 pb). Os dados obtidos sugerem que seqüências regulatórias importantes para ativação do gene da ECA durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca estão localizados no intervalo entre -1089 e -477 pb do promotor. Nesta região existem várias seqüências regulatórias que potencialmente poderiam participar desta resposta. Baseado em dados prévios do laboratório a seqüência "CRE-like" que responde a estimulação por AMPc foi analisada. Estudos envolvendo mutagênese sítio dirigida desta seqüência, entretanto, excluíram esta possibilidade. Em conjunto, os resultados demonstram que seqüências regulatórias contidas no intervalo -1089 a -477 pb do promotor causam o aumento de expressão da ECA durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca no rato.

ABSTRACT

In the present report we demonstrated that regulatory sequences contained within the angiotensin-converting enzyme (ACE) promoter lead to the activation of the ACE gene during the development of the rat cardiac hypertrophy. To determine the activity of ACE in the plasma and different tissues during the isoproterenol induced hypertrophy, it was necessary to standardize the assay for determination of tissue ACE activity in rats tissues. Then, to gain insight on the molecular mechanisms underlying the activation of the ACE gene, we used a reporter gene system based on the luciferase gene. A 5'ACE-luciferase construct containing -1273 bp and deletion fragments -1089, -477, -385, -252, -199 and -94 bp upstream of the transcription initiation site of the rat ACE gene fused to the luciferase gene reporter were injected directly into the left ventricle wall to characterize promoter function. The isoproterenol treatment induced hypertrophy (36%) and increased significantly luciferase expression (3,5X) in animals injected with fragments promoter containing -1273 bp indicating the presence of regulatory sequences in this fragment. To map the regulatory regions within the promoter a series of deletion mutants were investigated. The data suggested that regulatory regions contained within the interval -477 and -1089 bp participate of the activation of the gene during the development of hypertrophy. A CRE-like sequence contained in this interval became a potential candidate to be investigated. Site directed mutagenesis of this sequence excluded this sequence as a player associated with ACE activation. Taken together, these results give important information regarding the molecular mechanisms underlying ACE gene activation during the development of hypertrophy in rats.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hipertrofia cardíaca constitui um dos principais mecanismos de adaptação do coração frente a uma sobrecarga de trabalho. É notório o fato de que a presença de hipertrofia cardíaca acompanha-se do aumento de risco de morbimortalidade, fato que justifica o empenho em estudos visando elucidar os mecanismos responsáveis pela sua gênese e manutenção.

1.1 - Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca pode ser definida como o aumento de massa (e de peso) do miocárdio por aumento de volume e/ou do número de seus componentes. A avaliação da hipertrofia é feita macroscopicamente pela medida da espessura da câmara e pela avaliação do peso do coração (global ou dissecado, com separação dos átrios, da parede do ventrículo direito, ficando o septo como componente do ventrículo esquerdo) em relação ao peso corporal. É importante avaliar a cavidade por medida do seu volume, embora seja mais difícil, ou por medida dos seus eixos, o que nos permite avaliar o grau de dilatação, principalmente dos ventrículos.

Utilizando esses métodos de avaliação, as hipertrofias têm sido consideradas como concêntricas ou excêntricas em resposta a uma sobrecarga de pressão ou volume, respectivamente. Essas observações foram inicialmente sugerida por Grossman et al., 1975 e comprovadas histologicamente por Weber e Brilla, 1991. Nas hipertrofias concêntricas há aumento de espessura da parede ventricular em direção ao eixo central da câmara, que fica reduzida. Nesse tipo de hipertrofia os miócitos respondem com um aumento em paralelo nas proteínas contráteis. As hipertrofias são do tipo excêntricas quando a cavidade se dilata, e a parede tem espessura pouco aumentada devido ao crescimento para fora do eixo central da massa ventricular, nesse caso a hipertrofia é bem evidenciada pelo aumento de peso do coração. Os miócitos respondem com um aumento em série nas proteínas contráteis. (Frohlich et al., 1992; Pereira, 1993; Zarco, 1996; Opie, 1998; Weber et al., 1998).

A hipertrofia cardíaca na vida adulta pode ser induzida em três condições basicamente. A primeira, pelo aumento na atividade cardíaca em consequência do aumento da necessidade de bombear mais sangue para a periferia, como acontece no exercício físico dinâmico, nos estados de anemia crônica e nas fístulas arteriovenosas. Nessas condições

ocorre hipertrofia predominantemente por aumento no volume dos cardiomiócitos, que se acompanha de um aumento proporcional dos componentes do estroma (representados pelos fibroblastos e fibras colágenas, pelas células endoteliais e pelas células musculares lisas das paredes vasculares), permitindo assim uma adaptação adequada às novas exigências. O processo é limitado compatível com um estado funcional adequado. O estroma sofre apenas modificações proporcionais ao aumento da superfície dos fibroblastos, parecendo não ocorrer grandes alterações nas trocas entre os cardiomiócitos, o interstício e o espaço vascular. O que é mais importante é que não ocorrem alterações das propriedades mecânicas do estroma, portanto não há tendência para insuficiência funcional do coração. Este é um tipo de hipertrofia adaptativa ou fisiológica. A segunda, por sobrecarga de pressão e/ou volume, conforme pode ser observado na hipertensão arterial, na estenose ou insuficiência valvular e coarctação da aorta, induz hipertrofia por aumento no volume dos cardiomiócitos, acompanhado de aumento dos componentes do estroma, que geralmente apresentam-se de forma desproporcional à resposta dos miócitos. Essa hipertrofia, embora possa ser a princípio considerada como adaptativa, assume características de hipertrofia patológica porque o crescimento desproporcional do estroma leva a um funcionamento inadequado do músculo cardíaco. A terceira, alterações intrínsecas dos cardiomiócitos (e/ou nos mecanismos que regulam a sua atividade), é responsável por hipertrofias idiopáticas, nas quais não há sobrecarga evidente de volume ou de pressão. É o que ocorre na cardiopatia hipertrófica primária, onde os cardiomiócitos, excessivamente hipertrofiados, apresentam desarranjo na sua arquitetura fascicular (Pereira, 1993; Zarco, 1996; Opie, 1998; Weber et al., 1998). Existem várias alterações genéticas associadas a este quadro incluindo alguns defeitos identificados em genes de proteínas do aparato de construção.

O crescimento dos miócitos na hipertrofia cardíaca se dá através da síntese de novos componentes, com aumento da espessura das miofibrilas, do seu número e/ou do seu comprimento. Também ocorrem modificações nas proporções dos diferentes tipos de actina e miosina produzidos, visando adequar a velocidade e a força de contração necessárias ao processo de adaptação frente ao estímulo que gerou a hipertrofia (Morgan et al., 1987; Morgan e Baker, 1991).

Alguns aspectos são fundamentais para que se conheça a resposta de hipertrofia cardíaca, tais como: os fatores que desencadeiam essa resposta (fatores hemodinâmicos, neuro-humorais e primário ou genético); quais as vias de transdução de sinais que estão sendo

ativadas frente a um determinado estímulo; e quais seriam os componentes da reprogramação gênica que levariam às transformações do coração (hipertrofia cardíaca).

Os sinais que desencadeiam a resposta hipertrofica são de várias origens, incluindo fatores físicos associados às transformações hemodinâmicas, tais como a distensão e o aumento de estresse da parede do ventrículo submetido a um aumento de pós-carga; fatores neuro-humorais que incluem a ativação do sistema simpático e do sistema renina angiotensina; ou ainda de origem genética, como o que ocorre na cardiopatia hipertrófica, em que um ou mais genes parecem estar acometidos.

É importante salientar que diferentes sinais (mecânico, neuro-humoral, etc.) são traduzidos no interior da célula como alterações bioquímicas que levam a ativação de segundos (citosólicos) e terceiros (nucleares) mensageiros que irão agir no núcleo da célula, interagindo com o DNA promovendo a reprogramação da atividade celular.

A sobrecarga de trabalho é considerada o fator mais frequentemente envolvido na hipertrofia cardíaca e age pelo estiramento ou deformação dos miócitos, os quais respondem aumentando a força de contração hipertrofiando-se. A utilização de cultura de miócitos isolados em meio semi-sólido ou aderidos à placa de cultura por filmes de laminina tem possibilitado demonstrar que aplicação de forças sobre as células induzindo estiramento ou deformação é capaz de produzir uma série de alterações no sarcolema, que geram sinais necessários à ativação das proteínas reguladoras da atividade dos genes controladores da síntese das proteínas necessárias à hipertrofia. Tem sido demonstrado que o estiramento é capaz de ativar canais de Ca^{2+} , de Na^+ e canais de troca Na/H ; inativar canais de K^+ ; ativar adenilciclase e fosfolipase C (Morgan et al., 1987). As modificações induzidas pela ativação dos canais iônicos do sarcolema levam a variações da concentração iônica intracelular, o que pode representar um estímulo inicial para ativação de proteínas quinases envolvidas na ativação de proteínas reguladoras da atividade gênica (fatores de transcrição). O Ca^{2+} , via calmodulina, pode ativar a proteína quinase C, a qual não é responsável somente pela fosforilação de proteínas reguladoras de genes, como também ativa a troca Na/H , aumentando o pH, o que favorece direta e indiretamente a síntese de DNA e RNA durante os processos de crescimento de diferentes células, sendo possível esse efeito também nos miócitos (Moolenaar, 1987). Sistema de segundo mensageiro como a ativação da via inositol fosfato (IP) parece estar envolvida, pois a deformação miocárdica foi associada com acúmulo de inositóis de fosfato (von Harsdorf et al., 1989).

Portanto a hipertrofia cardíaca não deve ser considerada somente como uma resposta adaptativa a uma sobrecarga ventricular. Ocorrem também outras alterações biológicas tais como indução da expressão de “protooncogenes” e outros genes que regulam o crescimento e diferenciação celular (Chien et al., 1991; Frohlich et al., 1992; Brand et al., 1993; Krieger, 1994, 1995).

Os protooncogenes (Figura 1) são assim denominados porque possuem sequências similares a oncogenes (produto de vírus que ao infectarem uma célula fazem com que este passe a proliferar de modo incontrolado) ou porque ao sofrerem mutações tornam-se oncogenes (Zarco, 1996). Os protooncogenes são de três classes. A primeira classe corresponde aos fatores de crescimento PDGF (fator de crescimento dependente de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidérmico), IGF (fator de crescimento similar a insulina) e TGF- β (fator de crescimento transformador- β), atualmente denominados de mitógenos. A segunda classe corresponde aos receptores de membrana dos fatores de crescimento (*H-ras*, *mas*, *src*, são componentes de sinalização transmembrana que dão origem a uma cascata de proteínas quinases). A Ang II, através do receptor de membrana AT₁, estimula a fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidil inositol bifosfato da membrana formando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). O DAG estimula a proteína quinase C (PKC) que vai ativar os fatores de transcrição, particularmente o *c-fos*. No miocárdio, a Ang II também ativa tirosina quinases e MAP quinases (proteínas ativadas por mitógenos) (Izumo et al., 1988; Sadoshima e Izumo, 1993). A terceira classe corresponde as proteínas nucleares que são fatores de transcrição, atualmente denominados de genes de resposta imediata (*c-myc*, *c-myb*, *c-fos* e *c-jun*), esses podem se ligar diretamente ao DNA ou codificar proteínas que ligam ao DNA regulando a expressão de um determinado gene (Frohlich et al., 1992; Neyses e Pelzer, 1995; Zarco, 1996), resultando em maior ou menor produção de proteínas que irão alterar o fenótipo celular, como ocorre na hipertrofia cardíaca. O protooncogene *erb A* é um receptor nuclear para a tiroxina que atravessa livremente a membrana celular. É possível que o efeito direto da tiroxina na produção da hipertrofia cardíaca esteja relacionado a essa capacidade de agir diretamente no núcleo (Morgan et al., 1987). Portanto, hormônios como a tiroxina e a Ang II podem produzir hipertrofia cardíaca, através da ação direta sobre os mecanismos reguladores de transcrição ou por ação indireta sobre a atividade cardíaca, aumentando o trabalho dos cardiomiócitos.

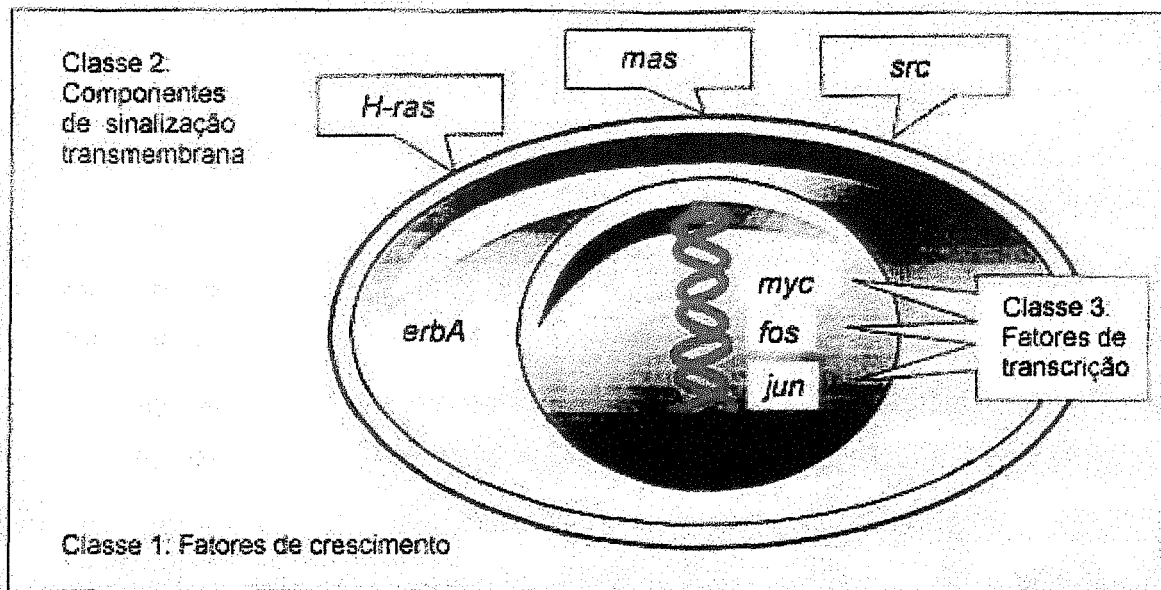


Figura 1. Classificação do protooncogenes. Classe 1. Fatores de crescimento (mitógenos). Classe 2. Receptores de membrana dos fatores de crescimento. Classe 3. Proteínas nucleares (fatores de transcrição, atualmente denominados genes de resposta imediata). Figura modificada de Frohlich et al., 1992.

A hipertrofia cardíaca também tem sido demonstrada através de fatores neurais. São inúmeras as demonstrações de que estímulos do sistema simpático ou a estimulação dos receptores adrenérgicos pelos neurotransmissores naturais ou por agonistas sintéticos, como por ex. isoproterenol podem induzir à hipertrofia cardíaca. Tanto a estimulação dos receptores alfa-1 como dos receptores beta-1 pode induzir hipertrofia cardíaca (Rockman et al., 1997).

A estimulação dos receptores α -1 resulta na regulação de sistemas efetores, com a primeira via de transdução de sinal envolvendo a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelular, através da ativação da fosfolipase C pela ação da proteína Gq. A hidrólise dos fosfatidil inosítois da membrana resulta na geração de dois segundo mensageiros, o DAG e IP3. O IP3 estimula a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares via receptores específicos para IP3 localizados na membrana do retículo sarcoplasmático. Já o DAG é um potente ativador da PKC. A estimulação da PKC com esteres de forbol (PMA) em cultura de miócitos neonatal pode induzir a várias características morfológicas e moleculares de hipertrofia cardíaca (Dunmon et al., 1990; Shubeita et al., 1992). Estudos utilizando camundongos

transgênicos que super expressam constitutivamente o receptor adrenérgico α -1b demonstraram um aumento do peso do coração em relação ao peso corporal e do diâmetro dos miócitos, associado com aumento na expressão do ANF (fator natriurético atrial) no ventrículo. Estes resultados estabelecem firmemente que a estimulação α -1 adrenérgica *in vivo* induz a um fenótipo de hipertrofia cardíaca (Milano et al., 1994a).

Os receptores β -adrenérgicos são membros de uma família de receptores que se acoplam a proteína Gs mediando os efeitos das catecolaminas. Pelo uso de técnicas de biologia molecular foram identificados três sub-tipos de receptores β -adrenérgicos (β 1, β 2, β 3) que exercem diversas funções fisiológicas. No Sistema Circulatório os receptores β 1 mediam a estimulação cardíaca, β 2 mediam o relaxamento do músculo liso dos vasos periféricos e sistema respiratório, enquanto os β 3 apresentam importante papel no tecido adiposo ativando a lipólise. Todos os três receptores estimulam a adenilciclase através da interação com a proteína Gs elevando os níveis do AMPc no citoplasma, o que ativa proteínas quinases A, que fosforilam proteínas miocárdicas envolvidas na resposta inotrópica e cronotrópica positiva do coração. No ventrículo esquerdo embora os receptores β 1 e β 2 sejam encontrados, os receptores β 1 são predominantes atingindo 75-80% do total dos receptores β -adrenérgicos (Rockman et al., 1997). Estudos com animais transgênicos que super expressam receptores β 2 no coração mostraram um aumento na contratilidade e relaxamento do miocárdio, esse estímulo não foi aumentado pelo tratamento com isoproterenol. Estes dados sugerem que, *in vivo*, uma super expressão de receptores β 2 pode resultar em uma via de sinalização que já está maximamente ativada (Milano et al., 1994b; Rockman et al., 1997). Porém, estudos com camundongos “knockout” para receptores β 2 mostraram que os animais apresentam frequência cardíaca de repouso e pressão sanguínea normal, mostrando uma resposta cronotrópica normal quando estimulados com isoproterenol (Chruscinski et al., 1999). Por outro lado, estudos com camundongos “knockout” para receptores β 1 sugerem que esse receptor é crítico para o desenvolvimento do animal, uma vez que aproximadamente 70% dos animais morrem na vida intra uterina (Rohrer et al., 1996). Mas os que sobrevivem apresentam um fenótipo cardiovascular semelhante ao animais normais. Estes dados apontam para o papel essencial dos receptores β 1 na cardiogênese e sugerem que esse poderia ser um gene suscetível à mutações congênitas levando à mortalidade embrionária. A frequência cardíaca foi similar a observada nos animais normais e o aumento de frequência que se observa frente ao tratamento com isoproterenol foi totalmente abolida nos animais

“knockout”. Ainda foi demonstrada uma menor densidade de receptores β_2 nesses animais. Portanto parece que o receptor β_1 é o mediador da resposta cronotrópica e inotrópica positiva induzida pela estimulação por catecolaminas como o (isoproterenol), sendo o responsável pela hipertrofia cardíaca (Rohrer et al., 1996; Rockman et al, 1997; Chruscinski et al., 1999). O uso de animais geneticamente modificados está sendo muito útil para estudos da função cardíaca e vias de sinalização intracelular, frente a diferentes estímulos, gerando respostas fisiológicas ou patológicas como hipertrofia cardíaca.

A hipertrofia dos miócitos é um processo complexo na sua patogênese, envolvendo a geração de sinais do sarcolema, que origina os mensageiros que irão regular a atividade gênica necessária ao crescimento da célula. Os vários fatores que causam a hipertrofia agem por ação direta e também por mecanismos indiretos sobre os cardiomiócitos de tal forma que fatores mecânicos, neurais e hormonais são desencadeados simultaneamente ou em seqüência, na indução da hipertrofia cardíaca.

Alguns aspectos relacionados com a resposta hipertrófica são semelhantes às etapas em que ocorre o desenvolvimento do coração durante o período fetal ou perinatal sendo por isso denominadas de “reprogramação fetal”. São observados em animais experimentais padrões de expressão gênica característicos do período fetal, como o reaparecimento de miosina de cadeia pesada do tipo beta (β -MCP) e actina alfa esquelética (α -actina esquelética). Mudanças na composição das proteínas contráteis do coração determinam alterações na capacidade contrátil do miocárdio, podendo levar à diminuição na velocidade de encurtamento observada no miocárdio hipertrofiado. O relaxamento do ventrículo com hipertrofia também é alterado e caracteriza-se por um aumento na duração do relaxamento e alterações no metabolismo do cálcio (Nadal-Ginard e Mahdavi, 1989; Parker e Schneider, 1990; Chien et al., 1991). Além da indução de proteínas contráteis a hipertrofia cardíaca é também caracterizada por alterações na expressão de genes de proteínas não contráteis. Um gene de proteína não contrátil melhor caracterizado e que aumenta a sua expressão na hipertrofia cardíaca é o ANF. Durante o desenvolvimento embrionário, o gene que codifica o ANF é expresso tanto no átrio como no ventrículo. Logo após o nascimento a expressão do ANF é diminuída no ventrículo, permanecendo o átrio como o sítio primário de síntese do ANF no miocárdio adulto. Em resposta a uma variedade de estímulos (hormonal, sobrecarga de pressão e volume, hipertensão, genéticos, etc) que induzem hipertrofia do ventrículo ocorre a re-expressão do ANF nas células ventriculares, o que representa a reprogramação de

um gene embriogênico na hipertrofia cardíaca. A expressão do gene do ANF e outros marcadores genéticos embrionários pode ser considerado um entre vários critérios que podem distinguir estímulos que são simplesmente tróficos (aceleram o crescimento normal) de estímulos que são fundamentalmente hipertróficos, indicando o começo de uma resposta patológica. Portanto supõe-se que o ANF pode participar da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia, embora o significado fisiológico deste aumento de expressão do ANF no ventrículo ainda permaneça desconhecido (Izumo et al., 1988; Chien et al., 1991; Krieger, 1994). Este conjunto de alterações está se tornando uma característica do quadro de hipertrofia cardíaca determinando as modificações morfológicas, estruturais, bioquímicas e genéticas do miocárdio hipertrofiado.

A hipertrofia cardíaca ocorre como resultado de sobrecarga de trabalho, de pressão ou volume imposta ao coração em determinadas condições. Este aumento de massa ocorre como resposta fisiológica normal devido a sobrecarga de trabalho imposta pelo exercício físico dinâmico realizado de forma crônica ou em condições fisiopatológicas tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio ou de hiperatividade simpática. Um dos aspectos que tem sido descrito como comum nestas diversas situações patológicas é o aumento de atividade do SRA local do miocárdio.

1.2 - Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrólítica do organismo (Menard, 1993). Classicamente o SRA é entendido como um sistema endócrino cuja substância ativa, angiotensina II (Ang II) é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados.

O primeiro componente da cascata bioquímica do SRA é a renina. A renina é uma enzima proteolítica sintetizada e estocada nas células justaglomerulares localizadas nas arteríolas aferentes renais. Os principais estímulos para a liberação desta enzima são a hipoperfusão renal, produzida por hipotensão ou depleção de volume, o aumento da atividade simpática e a queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa. A renina é altamente específica pelo seu substrato, o angiotensinogênio, uma α_2 -globulina sintetizada principalmente no fígado. Do fígado este substrato é liberado para a circulação para ser clivado pela renina, gerando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). Este, por perda de dois aminoácidos terminais (His-Leu), é posteriormente convertido em um octapeptídeo, a

angiotensina II (Ang II). Esta conversão ocorre pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA), presente principalmente nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar.

A ligação da Ang II a seus receptores, localizados na membrana plasmática das células dos órgãos-alvo, é então responsável por uma série de eventos biológicos. As duas ações clássicas da Ang II atuam no sentido de inverter a hipovolemia e hipotensão, que são os mais usuais deflagradores da liberação de renina. Primeiro a Ang II promove retenção renal de sódio e água causando conseqüentemente expansão do volume plasmático. Este efeito é mediado tanto pelo aumento da secreção de aldosterona pelo córtex adrenal como pela estimulação direta da reabsorção tubular de sódio, ou ainda pelo seu potente efeito dipsogênico. Segundo a Ang II produz vasoconstrição arteriolar, elevando a resistência vascular sistêmica, podendo então levar a um aumento da pressão sanguínea. Além destas ações, este peptídeo promove ainda a liberação de catecolaminas pela medula adrenal e estimula a secreção de hormônio antidiurético (ADH) e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

Deve ser ressaltado entretanto que apesar da Ang II ser indiscutivelmente a substância ativa mais importante do SRA, os seus metabólitos são também responsáveis por algumas ações específicas. Entre os produtos de degradação mais bem caracterizados até o momento incluem-se a Angiotensina III (Ang III), Angiotensina IV (Ang IV) e Angiotensina (1-7) (Ang 1-7).

Essa visão clássica do SRA, onde o sistema seria essencialmente dependente da existência do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos, vem sofrendo profundas modificações na última década. Hoje, o SRA é visto de forma mais ampla, onde a multiplicidade de funções do sistema é produto também da ação "parácrina" e "autócrina" da Ang II e de alguns de seus metabólitos produzidos localmente em vários tecidos (Dzau, 1988a, 1988b e Unger, et al., 1991).

1.3 - Sistema Renina-Angiotensina Local

A utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular permitiram evidenciar a existência de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais mRNAs destes componentes (angiotensinogênio, renina, enzima conversora e receptores de Ang II) em vários tecidos como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro deram suporte à existência de SRA locais (Griendling et al,

1993).

Algumas controvérsias existem ainda hoje em relação à definição de SRA locais. Para alguns autores o termo “SRA local” apenas se justifica quando todos os componentes são sintetizados “in situ”. Somente nestas condições o sistema poderia ser considerado como operando de forma independente do sistema endócrino (Danser e Schalekamp, 1996). Entretanto a definição de SRA local não necessariamente depende da síntese dos componentes do sistema na mesma célula (Paul et al, 1992). Alguns desses componentes podem ser provenientes da circulação desde que significantes passos regulatórios ocorram localmente.

Desta forma a tendência hoje é aceitar que os componentes circulantes possam ser absorvidos pelos tecidos, mas que os compartimentos dentro destes tecidos têm também a capacidade de gerar Ang II com concentrações de substrato e cinéticas diferentes e ainda desconhecidas (Dzau, 1988a).

1.4 - Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco

O coração pode formar Ang I localmente e convertê-la em Ang II, a qual pode chegar a atingir concentrações duas a três vezes superiores às encontradas no plasma (Danser e Schalekamp, 1996).

Evidências importantes para a existência de um SRA local no coração foi a demonstração de ACE (Cohen e Kurz, 1982; Lindpainter et al., 1987), a atividade de renina (Dzau e Re, 1987) e mRNA para renina e angiotensinogênio (Dzau et al, 1987) em células cardíacas.

Do ponto de vista histológico o miocárdio é composto de miócitos cardíacos circundados por interstício e de não-miócitos, os quais incluem diferentes tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, células da musculatura lisa vascular e células endoteliais. Os não-miócitos compreendem dois terços da população de células do miocárdio e são específicos e separadamente controlados (Weber e Brilla, 1991). O interstício cardíaco é constituído por uma rede de elastina e por colágeno, que é produzido pelos fibroblastos (Eghbali et al., 1988; Eghbali et al., 1989). O colágeno é essencial para o alinhamento dos miócitos cardíacos durante o ciclo cardíaco e também para a transmissão da força gerada pelos miócitos para as câmaras ventriculares (Weber et al., 1988).

A presença de Ang I, Ang II e de receptores para Ang II já foi identificada em fibroblastos e miócitos de ratos neonatais (Dostal et al, 1992). É evidente que as ações locais

dependem da presença de quantidades relevantes destes receptores, aos quais a Ang II se liga, levando às ações fisiológicas ou fisiopatológicas. Um conjunto de evidências sugere ainda que a Ang II no coração pode agir como um fator de crescimento (Yamazaki et al., 1996), aumentando a produção de uma variedade de proteínas que estão relacionadas com a hipertrofia cardíaca (Miyata e Haneda, 1994). O hormônio mostrou promover uma resposta hipertrófica em células musculares lisas (Geisterfer et al., 1988) e miócitos, além de uma resposta mitogênica (hiperplásica) em fibroblastos cardíacos de ratos (Sadoshima e Izumo, 1993; Schorb et al., 1993). Nestas células a Ang II promove um aumento na expressão de fibronectina (Iwai et al., 1996), bem como de colágeno dos tipos I, III e IV (Chapman et al., 1990).

Muitos mecanismos podem ser considerados responsáveis por este efeito proliferativo da Ang II no coração: (1) ativação de proteínas quinases, que freqüentemente resultam no crescimento celular; (2) estimulação de vários proto-oncogenes, o que leva a um aumento da responsividade das células a muitos fatores de crescimento, e (3) a expressão de fatores de crescimento tais como PDGF, FGF e TGF- β 1 (Naftilan et al., 1989; Gibbons et al., 1992).

Como foi visto até agora, diversos tipos celulares relacionados com o sistema cardiovascular expressam um ou mais dos componentes do SRA. A regulação da expressão desses genes, assim como o controle da secreção destes produtos, pode ser feito por vários fatores sistêmicos de origem neuro-humoral e físico-químicos locais. Neste sentido, a utilização das técnicas de biologia molecular associadas a abordagens fisiológicas clássicas está permitindo que aspectos fundamentais da regulação do SRA possam ser esclarecidos (Krieger e Dzau, 1991).

1.5 - Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

A Enzima Conversora de Angiotensina I (EC 3.4.15.1) é uma dipeptidil dipeptidase carboxi-terminal cujos substratos principais são Ang I e bradicinina, mas também hidrolisa outros peptídeos, como a substância P. A enzima, ao clivar o dipeptídeo carboxi-terminal de seus dois principais substratos, leva à formação da Ang II, um potente vasoconstritor e inativa o vasodepressor bradicinina levando à formação de peptídios inativos. A enzima apresenta um baixo Km para a bradicinina (0,2 mmol/L) e alto para a Ang I (16 mmol/L).

O cDNA desta enzima consiste de 4142 nucleotídeos que codificam para 1313 aminoácidos (Koike, et al., 1994). A ECA é uma glicoproteína integral de membrana ancorada na bicamada lipídica através de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos (17

amino-ácidos), localizados na extremidade C-terminal. A orientação da enzima na membrana ocorre de tal forma que seus sítios catalíticos, presentes na porção amino-terminal, estão expostos na superfície extracelular (Erdős e Skidgel, 1987; Hooper et al., 1987; Soubrier et al., 1988). A principal característica observada ao analisar a seqüência de aminoácidos da enzima é o alto grau de homologia interna, com a presença de dois sítios ativos, sugerindo uma possível duplicação de um gene ancestral durante a evolução (Soubrier et al., 1993).

Em mamíferos a ECA é encontrada na forma de duas isoenzimas distintas. A isoenzima endotelial (aproximadamente 180.000 daltons) está presente em todo o organismo e é composta de dois domínios altamente similares, cada um mantendo um sítio catalítico funcional (Soubrier et al., 1988). A outra isoenzima (aproximadamente 110.000 daltons) é encontrada exclusivamente no testículo e com exceção de mais ou menos 67 amino-ácidos no N-terminal, é idêntica ao domínio C-terminal endotelial (Lattion et al., 1989). Através de experimentos utilizando técnicas de Southern blot e clonagem gênica, foi demonstrado que o RNAm para a ECA somática e germinal são transcritos de um único gene (Hubert et al., 1991).

Uma característica que parece comum a todas as enzimas conversoras purificadas é a presença de um átomo-grama de zinco por mol de enzima (Soffer, 1981; Ondetti e Cushman, 1982). A dependência funcional de anions monovalentes, especialmente de íons cloro, também é uma característica de todas as enzimas conversoras, embora a magnitude do efeito ativador do cloro dependa do pH e do substrato utilizado para o ensaio (Soffer, 1981; Shapiro et al., 1983).

Existem grandes evidências de que a ECA circulante seja derivada da forma ancorada à membrana pela perda da extremidade hidrofóbica C-terminal (Wei et al., 1991). Trabalhos recentes demonstram que este processo de clivagem e secreção envolve a presença de uma metaloprotease denominada ACE-secretase. Esta enzima encontra-se ancorada na membrana plasmática e sua ativação, *in vitro*, ocorre em resposta ao tratamento com ésteres de forbol (ativação de proteína quinase C), o que sugere a existência de mecanismos celulares de regulação da conversão da proteína ancorada em sua forma solúvel (Beldent et al., 1995; Ramchandran et al., 1996; Williams et al., 1997). Embora a ECA seja encontrada no plasma, a concentração da enzima neste compartimento corresponde a uma pequena fração daquela encontrada nos diferentes tecidos. (Figura 2). Entre os diversos componentes do SRA, a ECA parece particularmente importante como mediadora e reguladora da produção de Ang II no coração na medida em que possui um amplo espectro de expressão no endotélio de todos os

vasos sanguíneos deste órgão, bem como em miócitos e fibroblastos cardíacos.

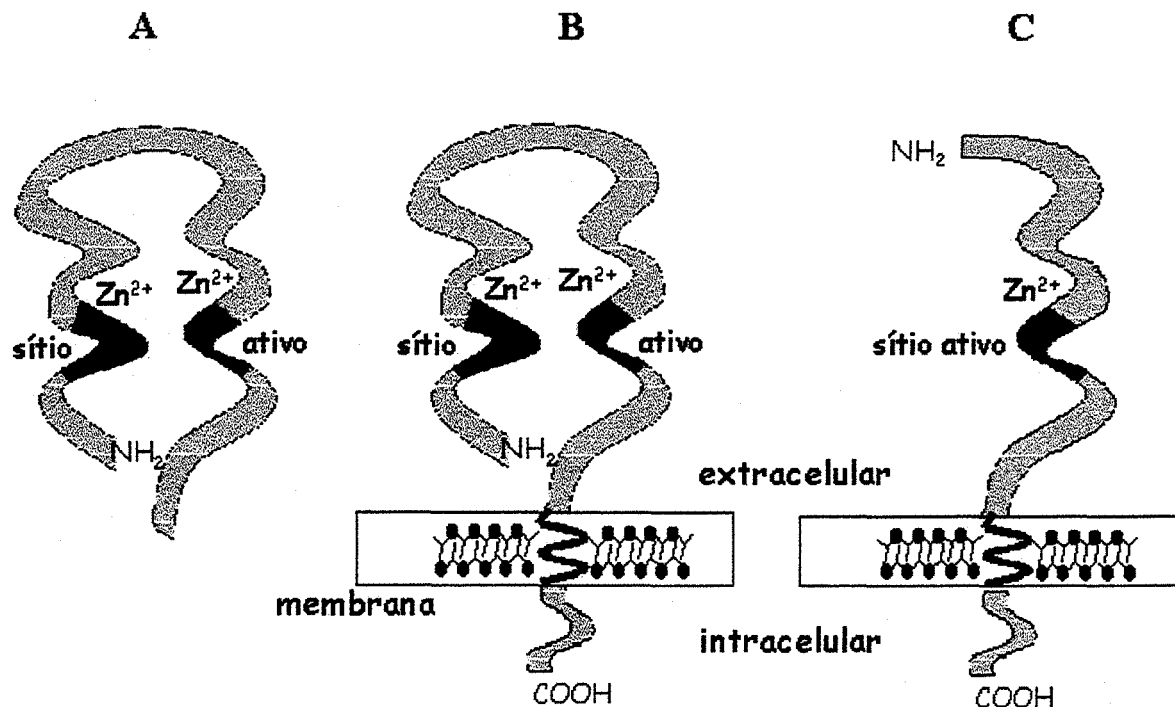


Figura 2. Estrutura e conformação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) derivada do plasma (A), células somáticas (B) e testículo (C), mostrando os sítios catalíticos, os sítios de ligação do zinco, as extremidades amino (NH_2) e carboxi-terminais ($COOH$).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o aumento crônico da expressão e da atividade da ECA dentro da faixa fisiológica (2 a 3 vezes) poderia resultar num aumento paralelo da produção de Ang II tecidual (Okamura et al., 1986). Da mesma forma o aumento na expressão da ECA cardíaca, secundário a uma sobrecarga pressórica, está associado a um aumento da conversão de Ang I em Ang II na microcirculação intramiocárdica (Schunkert et al., 1990). A Ang II seria então translocada para o interstício e se ligaria a receptores do tipo AT_1 localizados em miócitos e fibroblastos, principalmente (Schorb et al., 1993; Matsubara et al., 1994). Como já citado anteriormente, a ligação da Ang II a receptores nos miócitos resultaria num aumento da contratilidade e da resposta hipertrófica, enquanto que em fibroblastos seria desencadeada uma resposta de hiperplasia associada a um fenótipo secretor

de colágeno (Baker e Aceto, 1990; Sadoshima e Izumo, 1993; Crabos et al., 1994). Estes efeitos podem ser amplificados pela capacidade da Ang II estimular a secreção de catecolaminas das terminações nervosas, levando a potenciação da resposta inotrópica e hipertrófica (Xiang et al., 1984).

A ECA, tem sido bem estudada em coração de ratos, principalmente através da atividade enzimática. Estudos autoradiográficos em ratos, utilizando inibidores da ECA marcados radioativamente, revelaram a expressão da enzima em diferentes áreas cardíacas tais como válvulas, vasos coronários, átrios e ventrículos, sendo os níveis de expressão maiores nos átrios que nos ventrículos. Os níveis no átrio direito são maiores em relação ao átrio esquerdo (Yamada et al., 1991; Pinto et al., 1991). Também foram encontradas concentrações mais altas de Ang II no átrio direito que no esquerdo (Lindpaintner et al., 1987). Evidências recentes sugerem que a ECA estaria presente também em células miocárdicas, além de sua localização na microcirculação. O aumento da expressão da ECA cardíaca parece responder a estímulos múltiplos envolvendo fatores físicos (ex. aumento de tensão superficial da parede ventricular) e neuro-endócrinos (ex. estimulação simpática) levando a um aumento da Ang II tecidual e, subsequente, remodelagem cardíaca. O aumento da síntese de Ang II ocorreria no endotélio da microcirculação, ou nas células intramiocárdicas, resultando na ativação de miócitos com subsequente expressão de fatores de crescimento autócrino e parácrino. Esta seqüência de eventos favoreceria a formação de tecido conjuntivo pelos fibroblastos e demais células mesenquimais. Além disso alguns estudos têm demonstrado que a expressão da ECA não é estática mas, ao contrário, dinamicamente regulada de maneira tecido-específica. Assim, fatores dependentes da fase de desenvolvimento (Grima et al., 1990), de regulação hormonal (Krulowitz et al., 1984), bem como fatores genéticos (Rigat et al., 1990), poderiam influenciar na síntese e/ou na liberação da enzima.

Recentes estudos utilizando camundongos “knockout” e com diferente número de cópias do gene da ECA tem investigado o papel do gene da ECA em diferentes tecidos, mas principalmente no controle da homeostase cardiovascular e da regulação da pressão arterial (Krege et al., 1995; Tian et al., 1997). Resultados da literatura (Tian et al., 1997) assim como dados do nosso laboratório (Oliveira et al., 1999) mostram que a atividade da ECA nos diferentes tecidos de animais “knockout” para o gene da ECA é praticamente inexistente e aumenta linearmente no soro com o aumento no número de cópias do gene. Já nos tecidos a atividade da ECA tende a entrar em “steady-state” nos animais com quatro cópias do gene da

ECA. Para os animais que não expressam o gene da ECA foi demonstrado aumento na expressão da renina renal e do angiotensinogênio do fígado, o que pode significar que adaptações compensatórias estão presentes nestes animais e que podem estar sendo responsáveis por tentar manter a normalização da pressão arterial nos animais “knockout”. Por outro lado o aumento no número de cópias do gene da ECA não está associado com aumento na pressão arterial. Significativa redução na pressão arterial foi observada nos animais que não expressam o gene do angiotensinogênio (Kim et al., 1995a), para receptores AT₁ (Ito et al., 1995) e também para ECA (Krege et al., 1995). Esses dados confirmam a fundamental importância dos genes do SRA no controle da pressão arterial.

A clonagem do cDNA, assim como do gene da ECA, vem permitindo que algumas destas questões sejam abordadas de forma sistemática. Neste sentido há algum tempo já foram identificadas na região promotora do gene da ECA de diferentes espécies (camundongos, ratos, coelhos e humanos) regiões que potencialmente podem estar associadas a respostas a glicocorticóides, AMP cíclico e proteína quinase C, entre outros (Shai et al., 1990; Hubert et al., 1991; Testut et al., 1993; Brooz et al., 1994).

Trabalhos do nosso laboratório demonstraram que a atividade da ECA aumenta em fibroblastos cardíacos tratados com dexametasona e experimentos subsequentes estão sendo realizados com o objetivo de dissecar os mecanismos moleculares responsáveis por essa resposta (Barreto-Chaves et al., 1997). Dados obtidos recentemente mostram que o AMPcíclico e o isoproterenol também aumentam a expressão da ECA em células endoteliais de aorta de coelho (REC). Nesse trabalho foi demonstrada a via de sinalização intracelular que regula a atividade do promotor da ECA através de um estímulo β -adrenérgico. Os resultados mostraram que proteínas nucleares da REC são capazes de se ligar a uma sequência consenso para CRE (elemento responsivo a AMPc) do promotor sugerindo que o mecanismo CRE regula o promotor da ECA em células endoteliais da aorta de coelho (Xavier-Neto et al., 1999). Por outro lado o aumento de cálcio intracelular mediado pela AngII ou ionóforo de cálcio (A23187) parece estar envolvido numa diminuição da atividade da ECA em células endoteliais e renais e esta resposta possivelmente é mediada a nível transcricional (Carmona et al., 1997).

É importante salientar que até o momento procuramos integrar as respostas do SRA, nos diversos tecidos, sob diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas, com os possíveis mecanismos moleculares responsáveis por estas respostas. Porém, estudos realizados em uma condição de maior complexidade, como no organismo como um todo, são importantes para

caracterizar a expressão gênica e a síntese proteica dos componentes do SRA, nos vários tecidos e nas diferentes situações. São necessários estudos em situações patológicas como hipertrofia cardíaca, onde a ativação do SRA local parece desempenhar importante papel na patogênese do processo.

1.6 - OBJETIVOS DO PROJETO

Caracterizar a regulação do SRA local e sistêmico durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol em ratos Wistar. Para isso foi necessário padronizar uma metodologia para medir a atividade da ECA em diferentes tecidos de rato.

Caracterizar os elementos do promotor que conferem resposta à expressão do gene da ECA na hipertrofia induzida por isoproterenol em ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAL

2.1 - Drogas

Forma diácida do maleato de N-(s)-1-(etoxycarbonyl)-3-phenylpropyl-L-alanyl-L-prolina (MK-422) (Merck). Benzoil-glicil-L-histidil-L-leucina (Hip-His-Leu), L-histidil-L-leucina (His-Leu), *o*-ftaldialdeído, *p*-cloro mercuribenzoato (PCMB), ampicilina e Isoproterenol foram obtidos da **Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA**. Tiopental sódico, pentobarbital e ketamine.

2.2 - Reagentes

- Sigma Chemical Company S/A, St Louis, MO, EUA

Ácido bórico, fosfato de sódio mono e di básico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), sacarose, triton X-100, Denhardt's (ficoll, polivinilpirroridona-PVP, albumina de soro bovino-BSA), ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), acetato de sódio, brometo de etídio, cloreto de céσιο, cloreto de lítio, Sephadex G-50 medium, SDS, SSC, PBS, TBE, TE.

- Merck S/A, Ind. Quim., RJ, Brasil

Citrato de sódio, cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, álcool isoamílico, metanol, isopropanol, etanol absoluto, ácido acético, cloreto de magnésio, formaldeído, glutaraldeído.

- Gibco BRL/Life technologies, Grand Island, NY, EUA

X-Gal (5-bromo-4cloro-3 indolil- β -d-galactosídeo, dNTPs, Tris-HCl, triptona, extrato de levedura, glicerol, Tris-Base, uréia, MOPS, Bacto-ágar, agarose, cloreto de céσιο, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amônio (APS), Trizol.

- Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA

DNA de esperma de salmão.

- Ultra Chem, Ind. Bras.

Fenol c/ 8-hidroxiquinolina (destilado e saturado), pH 8,0 (para DNA) e pH 5,0 (para RNA).

- Tropix, Bedford, MA, USA.

Galacton™, Emerald™ (Green Chemiluminescence Amplifier).

- Promega Corporation, Madison, WI, USA.

Cell culture lysis reagent 5X

2.3 - Kits

- Kit para radioimunoensaio da Angiotensina I (REN-CT2) para medida da atividade da renina plasmática foi obtido da CIS bio international, Fraça.
- Ready To Go-DNA Labelling Kit (α 32 P-dCTP) Pharmacia.
- Kit Cicumvent Thermal cycle dideoxy DNA sequencing ® (New England-Biolabs).
- Luciferase assay system (Promega).

2.4 - Outros

Membrana de nylon (Biobyne-PALL), placa de Petri (92 x 17 mm-Nunc), tubo de polietileno PE-50 e PE-100, filme de raio-X kodak.

Todos os demais reagentes utilizados eram de pureza analítica e as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada.

2.5 - Equipamentos

Espectrofotômetro Pharmacia UV/VIS, Espectrofluorímetro Aminco, Luminômetro (Analytical luminescence laboratory 2010-Monolight), Centrífugas SORVALL® SUPER T 21 e SORVALL® RT 7, Centrífugas Eppendorf (modelo 5402 refrigerada e 5415C), Balança Mettler Toledo, pH metro Beckman, Sistema de água Milli-Q Plus da Millipore CO, secador de gel acoplado à sistema de vácuo Heto Dry GD-I, banho-maria Precision (modelo 182), banho-seco Fisher Scientific, cubas para eletroforese Sistema OWL, fontes Fisher Scientific (FB 600-90) e Gibco BRL/ Life Technologies (modelo 250), Estufa de cultura bacteriológica Fabbe-primar (modelo 216), Incubadoras com agitação New Brunswick Scientific, UV Cross linker Stratagene, Sistema de imagem Eagle Eye™ II Stratagene, Criostato (Leica-JUNG CM 1800), transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham), amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.), Gateway 2000 (4DX2, 66V), Quantimet 500 + Image Processing and Analysis System-Leica, Cambridge Ltd, England), lupa Leica, freezer (-20 e -80°C), geladeiras e pipetass automáticas reguláveis (Gilson).

2.6 - Animais Experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar e SHR (ratos espontaneamente hipertensos)

com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de USP e também do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura controlada e um ciclo de claro/escuro de 12 horas. Os ratos foram alimentados com ração e água "ad libitum".

3. MÉTODOS

3.1 - Padronização do ensaio fluorimétrico para determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos.

Para a determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) foi utilizado o método descrito por Santos et al. (1985) para soro e plasma de ratos. Esta metodologia foi adaptada e padronizada para tecidos de ratos Wistar e SHR com modificações e testes que serão descritos a seguir.

3.1.1 - Obtenção das amostras de soro e tecidos

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado sem anticoagulante, mantido em gelo e rapidamente centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C e o soro separado e armazenado a -20°C e -80°C. Os tecidos (pulmões, córtex e medula renal, átrios, ventrículos, adrenais, fígado e aorta torácica) foram coletados e homogeneizados em tampão borato (ácido bórico 0,4M contendo NaCl 0,9M e sacarose 0,34M, pH 7,2) e tampão fosfato (tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,3M e sacarose 0,34M, pH 7,2) na proporção de 1g de tecido:10 ml de tampão. Alguns tecidos também foram homogeneizados em Tampão borato com Triton X-100 0,1%. Os tecidos após serem homogeneizados eram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C, os sobrenadantes separados e armazenados a -20°C e -80°C até as amostras serem processadas.

3.1.2 - Determinação da atividade da ECA

A atividade da ECA foi determinada no soro e em homogeneizado de tecidos. Foram incubados 10 µl de soro e 20 µl do sobrenadante do homogeneizado de tecidos com 490 ou

480 µl de Hip-His-Leu 5mM em tampão borato (ácido bórico 0,4M contendo NaCl 0,9M, pH 8,3) ou tampão fosfato (tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,3M pH 8,0), por 15 (pulmão, aorta e soro) ou 30 (demais tecidos) minutos, a 37°C. Alguns tecidos também foram incubados em tampão borato com Triton X-100 0,1%. O tempo de incubação e a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação foram escolhidos, após a padronização da metodologia, de modo a assegurar a linearidade da formação do produto. A reação foi interrompida pela adição, sob agitação, de 1,2 ml de solução de NaOH 0,34N. A seguir acrescentava-se, sob agitação e protegido da luz, 100 µl da solução de o-phtaldialdeído (2% em metanol) e após 10 minutos em temperatura ambiente esta reação foi paralisada pela adição de 200 µl de HCl 3N. Logo após os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga clínica. O sobrenadante era submetido a leitura da intensidade de fluorescência no espectrofluorímetro que permitia a passagem de luz em comprimento de onda 365nm para excitação e 495nm para emissão.

Todas as amostras foram ensaiadas em triplicata, sendo que a fluorescência intrínseca da amostra foi corrigida através de brancos onde o material enzimático era adicionado logo após a reação ser paralisada com NaOH 0,34M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas.

Para cada ensaio foi feita uma curva padrão, relacionando-se a intensidade da fluorescência com quantidades determinadas do produto (His-Leu).

A atividade específica foi expressa em nmol de His-Leu/min/ml para o soro e nmol His-Leu/min/mg de proteína para os tecidos.

3.1.3 - Validação do ensaio fluorimétrico para medida da atividade da ECA

Para validar o ensaio de medida da atividade da ECA em diferentes tecidos foi realizada uma avaliação dos fatores que podem afetar a medida da fluorescência do produto.

3.1.3.1 - Influência dos homogeneizados na fluorescência do produto

A influência dos homogeneizados dos tecidos na fluorescência do produto foi avaliada comparando-se a fluorescência do dipeptídeo His-Leu (1,875; 3,905; 7,81; 15,62; 31,24; 62,48 nMoles), diluído em tampão borato, na ausência e presença de 20 µl de amostra de

tecidos de ratos Wistar e SHR. Os resultados foram analisados comparando-se as inclinações das curvas padrão obtidas na ausência e presença da amostra. Uma vez que os homogeneizados de pulmão e córtex e medula renal modificavam a inclinação da curva padrão essas amostras foram diluídas dez vezes, em tampão borato, antes de ser realizado o experimento.

3.1.3.2 - Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio

Amostras de tecidos (20 μ l) foram incubadas com 480 μ l de tampão borato por 1 hora a 37°C. Após procedeu-se a medida da fluorescência conforme descrito acima. A intensidade da fluorescência foi comparada com a obtida sem incubação (tempo zero), tanto para ratos Wistar quanto SHR.

3.1.3.3 - Influência das dipeptidases sobre o produto da reação.

Para determinar a possível presença de atividades dipeptidásicas nas amostras de tecido, foram incubados 20 μ l do homogeneizado com 480 μ l de His-Leu (31nMoles) em tampão borato por 30 minutos, a 37°C, para ratos Wistar e SHR. Comparou-se a intensidade de fluorescência do produto incubado com a obtida no tempo zero da incubação (a reação era paralisada com NaOH antes de ser colocada a amostra). Nas amostras onde houve a presença de atividades dipeptidásicas o experimento foi repetido em presença de PCMB (p-cloro mercuribenzoato) 100 μ M, um inibidor de proteases. Esse experimento foi repetido em presença de tampão fosfato e borato com 62 nMoles de His-Leu em presença e ausência de PCMB.

A concentração de PCMB que produzia maior inibição da atividade dipeptidásica sem alterar a atividade da ECA foi determinada variando a sua concentração de 0 a 2,0 mM. Esse experimento foi realizado com homogeneizado de fígado em presença de tampão fosfato.

3.1.4 - Demonstração da validade do ensaio enzimático para a ECA

3.1.4.1 - Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação

Os ensaios foram realizados incubando-se 20 µl de amostra com 480 µl de Hip-His-Leu 5mM em tampão borato por 120 minutos (córtes e medula renal), 90 minutos (figado), 60 minutos (ventrículo e adrenal) e 30 minutos (aorta, pulmão e átrio) a 37°C. As demais etapas do ensaio permaneceram inalteradas como descrito acima.

3.1.4.2 - Linearidade entre a velocidade de liberação do produto e a quantidade da “enzima”

As amostras de tecidos de ratos Wistar e SHR foram incubadas nas seguintes concentrações: 30-600 µg (5-100 µl) para pulmão, 40-800 µg (5-100 µl) para córtex e medula renal, 20-200 µg (5-50 µl) para ventrículo, 20-400 µg (5-100 µl) para átrio, 20-200 µg (5-50 µl) para adrenal, 5-100 µg (5-100 µl) para aorta e 5-25 µg (5-25 µl) para figado. Os homogeneizados foram incubados em tempos diferentes e as demais etapas do ensaio permaneceram inalteradas.

3.1.5 - Demonstração da especificidade do ensaio para determinação da atividade da ECA em tecidos

A especificidade do ensaio foi determinada por inibição da atividade da ECA em todos os tecidos com enalaprilato (MK-422). As amostras de tecidos (20 µl) foram incubadas com 480 µl do substrato em tampão borato com 3µM de MK-422, a 37°C. Nos controles a solução de inibidor foi substituída por igual volume de água. Os homogeneizados foram incubados em tempos diferentes e as demais etapas do ensaio permaneceram inalteradas.

3.1.6 - Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA em tecidos

A atividade da enzima nos homogeneizados de tecidos foi determinada no dia da coleta das amostras (To, tempo zero) e após 7 e 30 dias de estocagem a -20°C e -80°C.

3.1.7 - Determinação da concentração de proteínas teciduais

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

3.2.1 - Animais experimentais

Para estudarmos o Sistema Renina Angiotensina tecidual (SRA local) e sistêmico no modelo de hipertrofia induzida por isoproterenol utilizamos ratos machos Wistar, pesando entre 200-250g. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos com n=6 para cada grupo.

- Grupo 1: Controle
- Grupo 2: Isoproterenol
- Grupo 3: Sal
- Grupo 4: Sal mais isoproterenol
- Grupo 5: Enalapril
- Grupo 6: Enalapril mais isoproterenol

O grupo controle foi tratado com óleo de oliva (veículo) uma vez por dia, por 7 dias. No grupo 2, os animais foram tratados com injeção subcutânea de 0,3 mg/Kg de isoproterenol diluído em óleo de oliva, por 7 dias, uma vez por dia. O grupo 3 foi tratado com dieta rica em sal (1% de NaCl na água de beber) por 2 semanas. O grupo 4 recebeu o tratamento com sal 7 dias antes de começar o tratamento concomitante com isoproterenol. O grupo 5 foi tratado com enalapril (60 mg/L na água de beber) por 2 semanas. O último grupo recebeu o tratamento com enalapril 7 dias antes de começar o tratamento concomitante com isoproterenol. Após o tratamento foi realizada em todos os grupos a medida direta da pressão arterial (PA).

3.2.2 - Medida Direta da Pressão Arterial

Para medida direta da pressão arterial com os animais sob anestesia (tiopental sódico, 100 mg/Kg, intraperitoneal), foi inserida uma cânula (PE-50) na artéria carótida. As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico e a extremidade externa ocluída. Para facilitar o manuseio com o animal acordado, os cateteres eram dirigidos pelo tecido subcutâneo por meio de um trocáter e exteriorizados no dorso do animal.

Para o registro da PA os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas quais permaneceram pelo menos por 24 horas antes de iniciar o experimento. A cânula era

conectada a um tubo de polietileno (PE 100) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.). O sinal analógico da pressão arterial era convertido para digital (Stemtech, Inc.), registrado em tempo real em microcomputador (Gateway 2000, 4DX2, 66V) e analisado através do programa AT/CODAS com uma frequência de amostragem de 100Hz por canal. A partir deste programa obtinha-se, batimento-a-batimento, os valores de pressão sistólica (PS), diastólica (PD) e média (PAM).

3.2.3 - Preparação das amostras

Após a medida da PA os animais foram pesados e sacrificados por decapitação, as câmaras cardíacas foram pesadas para determinação do aumento da massa cardíaca e amostras de tecidos, soro e plasma foram guardados para as análises morfológicas e bioquímicas.

Amostras de sangue foram coletadas com (EDTA 3,8%) e sem anticoagulante mantidas no gelo e rapidamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C. Os tecidos foram rapidamente removidos em seguida as amostras de soro, plasma e tecidos foram mantidas a -80°C até serem analisadas.

3.2.4 - Análises Bioquímicas

3.2.4.1 - Dosagem da atividade da ECA

Para determinarmos a atividade da ECA os tecidos foram homogeneizados em tampão borato 0,4M contendo NaCl 0,9M e sacarose 0,34M, pH 7,2, na proporção de 1g tecido : 10 ml de tampão. Os homogeneizados foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm a 4 °C e o sobrenadante utilizado para o ensaio fluorimétrico da medida de atividade da ECA, conforme descrito no item 3.1.2.

3.2.4.2 - Medida da atividade da renina plasmática

A atividade da renina plasmática foi determinada por radioimunoensaio (REN-CT2, Cis bio international) para determinação de Ang I, em plasma coletado com EDTA. Este ensaio permite uma medida indireta da atividade da renina plasmática. Os resultados são expressos como ng de Ang I liberados por ml por hora (ng de AngI/ml/h).

3.2.4.3 - Determinação da proteína

Mesma metodologia utilizada no item 3.1.7.

3.2.4.4 - Determinação da expressão do gene da ECA e ANF (Fator Natriurético Atrial)

A expressão da enzima conversora de angiotensina I e do fator natriurético atrial no coração foram determinados por técnica de Northern blotting de acordo com método descrito por Chomczynski e Sacchi (1987), conforme descrito abaixo:

3.2.4.4.1 - Extração do RNA total.

Todo o procedimento foi realizado com a utilização de luvas, materiais e soluções autoclavados que foram reservados para extração de RNA.

Aproximadamente 0,20 g do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em 10 ml de uma solução 6M de uréia e 3M de LiCl. As amostras foram mantidas sob agitação, *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, essas amostras foram centrifugadas (15000 rpm, 4°C, por 30 min) e o precipitado ressuspense em 300 µl de uma solução 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0,5 % de SDS. As etapas seguintes da extração e purificação do RNA foram feitas com o reagente Trizol (Gibco), conforme instruções do fabricante. A dosagem do RNA foi feita por espectrofotometria com leitura em 260nm.

3.2.4.4.2 - Soluções utilizadas para Northern blot

- 10X Running buffer: 0,20 M MOPS; 0,08 M acetato de sódio e 0,01 M EDTA.
- 20X SSC: 0,3 M citrato trissódico 2-hidratado e 3,0 M NaCl.
- Sample buffer: 2,0 µl de 10X running buffer; 3,5 µl de formaldeído em solução 37%; 10 µl de formamida e 2,5 µl de água.
- 50X Denhardt's: 25 µM Ficoll; 27,7 µM Polivinilpirroridona (PVP) e 5g/500ml albumina sérica bovina.

3.2.4.4.3 - Northern blot

Uma quantidade de 20 µg de RNA de cada amostra foi desnaturada em *sample buffer* e corrido em gel de agarose (1,5 %) com formaldeído 37% (6,3 ml) em 1X *running buffer*, portanto, em condições desnaturante. O RNA foi transferido para uma membrana de nylon (Biobyne-PALL) através de força iônica (10X SSC), e fixado à membrana através de irradiação de luz ultra-violeta (UV Cross linker Stratagene). A membrana foi pré-hibridizada em 5X Denhardt's, 6X SSC, 50 % de formamida, 0,5 % de SDS e 10 mg/ml de esperma de

salmão, à 42°C por pelo menos 2 horas. Procedeu-se a hibridização nas mesmas condições da pre-hibridização, porém com ausência do Denhardt's, por no mínimo 18 horas. Como sondas foram utilizados segmentos de cDNA da ECA e ANF de rato com aproximadamente 700 pb e 850 pb respectivamente. As membranas foram re-hibridizadas com um fragmento de cDNA de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As sondas foram marcadas através do método de primers aleatórios utilizando-se o kit comercial (Ready To Go-DNA Labelling Kit (α 32 P-dCTP) da Pharmacia). $1,0 \times 10^6$ cpm/ml da sonda foi adicionado à solução de hibridização. A lavagem das membranas foi feita em 2X SSC e 0,1 % de SDS, 10-15 min à temperatura ambiente e em 0,2X SSC e 0,1 % de SDS, 10-15 min à 65°C. As membranas foram expostas em filme de raio-X (Kodak) à -70°C de 1 à 15 dias e os autorradiogramas quantificados por densitometria (Eagle-Eye, Stratagene). Os resultados foram normalizados pela expressão da GAPDH para corrigir eventuais diferenças na quantidade de RNA total de cada amostra.

3.2.5 - Análises morfológicas e morfométricas

3.2.5.1 - Morfologia cardíaca

Após os animais serem decapitados o coração foi removido da cavidade torácica e dissecado para separarmos o VE (parede livre do ventrículo esquerdo e septo), VD (ventrículo direito) e átrios (átrio direito e esquerdo). As câmaras foram pesadas separadamente e a hipertrofia foi determinada pela razão entre o peso da câmara cardíaca e o peso corporal do animal. O valores obtidos foram multiplicados por 1000 para os resultados serem expressos em mg/g.

3.2.5.2 - Morfometria cardíaca

Um outro grupo de animais foi tratado com óleo (controle; n=6) e isoproterenol (n=6) para as análises morfológicas. O ventrículo esquerdo foi fixado em formaldeído 6% e após a inclusão em parafina foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura, na posição da base do músculo papilar. Posteriormente foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para visualização das estruturas celulares. Dois cortes de cada animal foram selecionados aleatoriamente para visualização em microscópio óptico utilizando objetiva de imersão com aumento de 400X. Os miócitos selecionados para determinação do diâmetro apresentavam núcleo bem visível e membrana celular intacta. A imagem do cardiomiócito era obtida na tela

do computador e o diâmetro transversal de cada miócitos cardíaco isolado era traçado manualmente utilizando-se o *mouse* do computador. A linha traçada atravessava o centro do núcleo do miócitos e com a imagem digitalizada o computador calculava a área traçada (Quantimet 500; Cambridge Instruments). O diâmetro dos miócitos foi determinado em aproximadamente 20 campos visuais para cada corte histológico.

3.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA em ventrículo de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

A região promotora do gene da ECA foi clonada, anteriormente, em nosso laboratório, a partir de uma biblioteca genômica de Fígado de rato Wistar Kyoto. Com o objetivo de mapear e caracterizar os elementos regulatórios, positivos e negativos do gene da ECA, foi desenvolvido um sistema de expressão utilizando o gene *reporter* da luciferase. Nesse sistema as seqüências investigadas estão ligadas diretamente ao cDNA da luciferase (vetor pGL2, Promega). Desta forma a síntese de luciferase é dirigida exclusivamente pela seqüência que está sendo estudada. A luciferase é um ótimo marcador porque é uma enzima que não é produzida pelas células de organismos superiores. Portanto, pode ser quantificada de maneira específica e com alta sensibilidade, através de um ensaio utilizando substrato quimioluminescente.

3.3.1 - Construção dos plasmídios

O fragmento contendo 1273 pares de base do promotor da ECA (W/Luc) foi clonado no vetor de expressão da luciferase (pGL2).

A estratégia utilizada para identificar as regiões do promotor que contém as seqüências regulatórias importantes para expressão da ECA consistiu em utilizar uma série de vetores com deleções progressivas da seqüência completa de 1.3 Kilobases do promotor (-1089, -477, -385, -252, -199 e -94 pb). Estes mutantes foram produzidos, anteriormente, em nosso laboratório utilizando as enzimas Nhe-I, Pst-I, BstX-I, Hae III e Sac-I, respectivamente (Junqueira e Krieger, 1995).

O gene *reporter* Lac Z que pode ser quantificado pela atividade da β -galactosidase (β -gal) por ensaio de quimioluminescência. O vetor contendo o gene Lac Z dirigido pelo promotor viral LTR (Long Terminal Repeat) foi utilizado para normalizar a eficiência de transfecção, uma vez que existe variação na taxa de eficiência entre as diferentes

transfecções, que não é controlável, o que poderia dificultar a compreensão dos resultados.

Para verificar se este sistema de expressão, baseado no gene *reporter* da luciferase, poderia ser utilizado de maneira específica no coração de ratos foram realizados dois controles. Primeiro injetamos um vetor contendo um promotor heterólogo (TK-timidina kinase), ligado as seqüências que conferem responsividade a ativação por AMPc que foram subclonados no vetor da luciferase pGL2. Este vetor, CRETK-LUC, contém 4 repetições (TGACGTCA) em seqüência do elemento de resposta ao AMPc (CRE) do gene da Somatostatina fundidos ao promotor do gene da Timidina Quinase (TK) do HSV (Human Simian Virus). O segundo controle injetamos um vetor contendo o promotor SV40 (Simian Virus 40 early promotor) ligado a seqüências que respondem a glicocorticóides (TGTTCT) do MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) que foram subclonados no vetor da luciferase pGL2. Quatro grupos de animais foram transfectados. Dois grupos controles transfectados com os vetores TK-LUC ou SV40-LUC receberam injeção diária de veículo. Dois grupos experimentais transfectados com as seqüências CRE-LUC ou MMTV-LUC foram tratados com isoproterenol ou dexametasona, respectivamente. Os animais (n=6 em cada grupo) receberam injeção diária de veículo, isoproterenol ou dexametaxona com o objetivo de ativar a expressão da luciferase.

3.3.1.1 - Mutantes

Após identificarmos a região responsável pelo aumento da expressão no promotor da ECA e que essa região apresentava um elemento responsivo a estimulação com AMPc (CRE), injetamos na parede do VE um plasmídeo contendo mutação neste sítio. Neste experimento foram comparados quatro grupos de animais: W/Luc, W5J (veículo) e W/Luc, W5J (isoproterenol).

Este plasmídeo foi construído em nosso laboratório com uma mutação no sítio que confere responsividade à estimulação por AMPc (CRE) localizado dentro da região em que estava aumentando a expressão (mutante distal - AGATCTAG - W5J). Esta mutação foi produzida por mutagênese sítio dirigida utilizando *primers* desenhados com um sítio de restrição à endonuclease Bgl II. Este plasmídeo contém a mutação e o sítio de restrição Bgl II que foi incorporado através dos *primers*. Tal estratégia possibilita identificar se a mutação foi inserida antes mesmo de fazer o sequenciamento do DNA.

3.3.1.2 - Seqüenciamento dos mutantes

Antes de utilizarmos esse plasmídeo fizemos o seqüenciamento do DNA para demonstrar a presença da mutação. O seqüenciamento foi realizado com kit *Cicumvent Thermal cycle dideoxy DNA sequencing*®, que se baseia no método de Sanger et al., (1977).

A reação de seqüenciamento foi submetida à eletroforese para separação por tamanho, dos fragmentos de DNA. A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida 6% em tampão TBE (Tris 0,89 M; Borato 0,98 M e EDTA 20 mM) e Uréia 8 M, em aparelho da USA-Scientific, utilizando placas 33 X 40 cm com espaçadores e pentes de 0,4 mm. A eletroforese foi realizada com potência constante de 70 W e voltagem variável de 1600 a 2500 V. O tempo de corrida variou com o tamanho do fragmento a ser analisado. As seqüências foram analisadas após exposição do gel seco em filme de raio X, sem intensificador, por no mínimo 16 horas à temperatura ambiente.

3.3.1.3 - Purificação do DNA

Os DNAs recombinantes já haviam sido clonados, transformados em bactéria competente *Escherichia coli* (JM 109) e congelados a -80°C em alíquotas de 1 ml, contendo 15% de glicerol. Neste trabalho produzimos esses DNAs em uma escala maior através de uma técnica denominada “Maxi-preparação de DNA plasmidial” (Maniatis et al., 1989). Para isso uma pequena amostra do estoque de glicerol era plaqueada por espriamento em placa de Petri (92 x 17 mm – Nunc), contendo meio LB sólido (Peptona, Extrato de levedura e NaCl) com o antibiótico ampicilina (50 mg/ml – Sigma) para seleção de colônias transformadas. A placa de Petri foi incubada por 14 a 16 horas em estufa a 37°C . A partir de uma colônia isolada era feito um pré-inóculo em tubo de ensaio estéril contendo 3 a 5 ml de meio LB com ampicilina, submetido à incubação sob agitação a 37°C , por 14 a 16 horas. Após, 500 μl do caldo bacteriano foi inoculado em 500 ml de meio LB contendo 500 μl de ampicilina (50 mg/ml), e mantido sob agitação a 37°C , por 14 a 18 horas. Em seguida a cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C , com a finalidade de se recolher o precipitado bacteriano e proceder-se à lise alcalina das bactérias. O material obtido nesta preparação foi dissolvido em 4 ml de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8.0) e em seguida utilizado para a purificação do DNA circular.

Para a obtenção de DNA de alta pureza para os experimentos de transfecção *in vivo*, o DNA obtido no processo de maxi-preparação, foi purificado em gradiente de cloreto de céσιο

(Maniatis et al., 1989). Esta purificação consistiu em dissolver 4,4 g de CsCl₂ em 4 ml da preparação de DNA anteriormente descrita e adição de 320 µl de brometo de etídio (10 mg/ml). Após centrifugação a 8000 rpm o sobrenadante foi transferido para tubo de ultracentrifugação (13 X 51 mm). O tubo foi fechado conforme instruções do fabricante e a purificação foi realizada a 77000 rpm por 3,5 horas à temperatura ambiente em ultracentrífuga Beckmann.

Depois de retirada da centrífuga a banda de DNA foi extraída por perfuração do tubo com agulha e seringa. Cerca de 2 a 3 ml de material foi retirado e lavado com uma solução saturada (em água) de isobutanol, até não mais existirem traços de brometo de etídio (evidenciado por coloração rósea). O DNA foi então precipitado em solução contendo 3 volumes de água deionizada estéril e 2 volumes de etanol absoluto por no mínimo 16 horas. Após centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos, o material foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em cerca de 500 µl de água Milli-Q estéril. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, em luz ultravioleta. A qualidade da preparação foi verificada em gel de agarose a 1%. Além disso, 1 µg de cada DNA foi digerido com a endonuclease respectiva e confirmado pelo tamanho do inserto através do gel de agarose a 1%.

3.3.2 - Injeção do DNA recombinante *in vivo*

Os animais foram anestesiados com 20 mg/Kg de pentobarbital, i.p. e 60 mg/Kg de ketamine, i.m., foram intubados e ventilados com um respirador (rodent ventilator Model 683-Harvard) com um volume de 2,5 ml/min e frequência de 70 batimentos/min. Uma toractomia lateral esquerda foi feita para expor o coração para a injeção do “nacked” de DNA plasmidial. As moléculas recombinadas contendo os fragmentos do promotor da ECA ligado ao gene da luciferase foram injetadas diretamente na parede do ventrículo esquerdo de ratos. Foram administrados 140 µg de DNA em 100 µl de solução com 20% de sacarose através de uma simples injeção. Os vetores contendo deleções progressivas do promotor da ECA ligados ao gene da luciferase foram co-transfectados com o vetor contendo o gene da β-gal, que é dirigido pelo promotor viral LTR (Long Terminal Repeat), numa proporção de 2:1, para normalizar a eficiência de transfecção.

Os animais injetados com o DNA foram tratados com óleo ou isoproterenol (0,3 mg/Kg/dia, sc). Após 7 dias de tratamento, amostras pesando aproximadamente 0,5 - 1,0 g de

tecidos eram coletadas do local da injeção (controle positivo) e do ventrículo direito (controle negativo). As amostras eram armazenadas a -80°C até serem analisadas, quando foram homogeneizadas e o sobrenadante utilizado para a atividade da luciferase e β -gal.

3.3.3 - Determinação da expressão gênica através da atividade da luciferase e da β -galactosidase

As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de lise para células, eram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante separado para medida das atividades enzimáticas.

A atividade da luciferase é determinada através da medida da produção de luz após a adição de luciferina e ATP. Uma alíquota de 20 μl do sobrenadante foi adicionada à 100 μl do reagente de ensaio da luciferase (Promega) e a emissão de luz foi integrada por 10 segundos em luminômetro (Analytical luminescence laboratory 2010 – Monolight). Os resultados foram expressos em unidades relativa de luz (URL). Com base nestes valores foram determinados a expressão do promotor do gene da ECA.

Para controle da variação da eficiência de transfecção foi feita a co-transfecção com um vetor de expressão contendo o gene da β -galactosidase, sob controle de promotor viral LTR. A β -galactosidase foi determinada por medida da produção de luz, após adição do substrato (Tropix) em luminômetro. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias da atividade de luciferase, dividida pela atividade de β -galactosidase.

3.3.4 - Identificação do tipo celular cardíaco que internaliza “naked DNA”

Outro grupo de animais foi transfectado com o gene *reporter* da β -galactosidase (β -gal) para determinarmos o tipo celular que estava captando o DNA injetado. Para isso utilizamos uma metodologia de acordo com Kato et al., 1991. No vetor pSV- β -galactosidase (Promega) que estamos utilizando, o cDNA da β -gal é dirigido por um promotor do Simian Virus, o que o torna ativo na maior parte das células de eucariotos, sendo por isso denominado de “promíscuo”.

As amostras para o ensaio colorimétrico da β -galactosidase foram coletadas 7 dias após a transfecção do vetor pSV β -gal na parede do ventrículo esquerdo. Os animais foram sacrificados e os corações removidos e congelados em *tissue teck* com isopentano gelado com nitrogênio líquido e armazenados até serem feitos os cortes histológicos. Posteriormente

foram feitos os cortes de 5 μm em criostato (Leica) e fixados em lâmina de vidro organociladas. Os cortes histológicos foram fixados com formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% em PBS (NaCl; KCl; Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 – pH 7.4) por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 2X com PBS e deixadas *overnight* em solução contendo X-gal, o substrato da reação (X-gal 0,1%; ferricianeto de potássio 5 mM; ferrocianeto de potássio 2 mM; MgCl_2 2 mM; em PBS). As lâminas foram lavadas 2X com PBS, coradas com HE e montadas para observação em microscópio óptico utilizando objetiva de imersão com aumento de 400X. Amostras de coração não transfectados (controles negativos) foram processadas da mesma forma. Os cortes histológicos foram fotografados com uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio.

3.3.5 - Apresentação dos resultados

Em todos os experimentos os resultados foram normalizados pela expressão do β -gal, portando são expressos em unidades arbitrárias que representam a razão da expressão da luciferase pela da β -gal (Luc/ β -gal). Além disso os níveis de atividade (*background*) da luciferase e β -gal foram determinados no ventrículo direito e subtraídos das amostras do ventrículo injetado com o DNA recombinante. Para facilitar a visualização, os resultados foram normalizados para a expressão do vetor mais curto, cuja expressão foi considerada igual a 1.

3.4 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram analisados por análise de variância de duas vias (ANOVA), complementada pelo teste de Turkey.

A atividade da ECA nos tecidos foi analisada calculando-se o percentual da diferença entre os valores encontrados nos animais tratados e os encontrados nos controles.

A correlação entre a atividade da ECA e o grau de hipertrofia foi obtido através de análise de regressão linear simples, utilizando-se o coeficiente de *Pearson* (r) para verificar a significância estatística entre as variáveis. O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Padronização do ensaio fluorimétrico para determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos.

Na parte inicial deste estudo realizamos a padronização do método para determinação da atividade da ECA em diferentes tecidos.

4.1.1 - Validação do ensaio fluorimétrico

Foi realizada uma avaliação dos fatores que podem alterar a medida da fluorescência do produto His-Leu durante o tempo de incubação das amostras para medida da atividade enzimática.

4.1.1.1 - Influência dos homogeneizados sobre a fluorescência do produto

Para verificar se os componentes do homogeneizado de tecidos poderiam estar influenciando significativamente na detecção do produto His-Leu, comparamos a fluorescência do dipeptídeo em presença e ausência da amostra de tecidos de ratos Wistar e SHR. Os resultados apresentados na Figura 3 mostram que a presença dos homogeneizados de pulmão, córtex e medula renal alteram significativamente a intensidade de fluorescência do produto. Para corrigir esta alteração as amostras destes tecidos foram diluídas dez vezes em tampão borato, antes de serem realizados os experimentos. A partir destes resultados as amostras foram diluídas dez vezes antes de serem incubadas para medida da atividade da ECA. Para os demais tecidos a presença do homogeneizado na curva padrão não alterava a intensidade de fluorescência do produto.

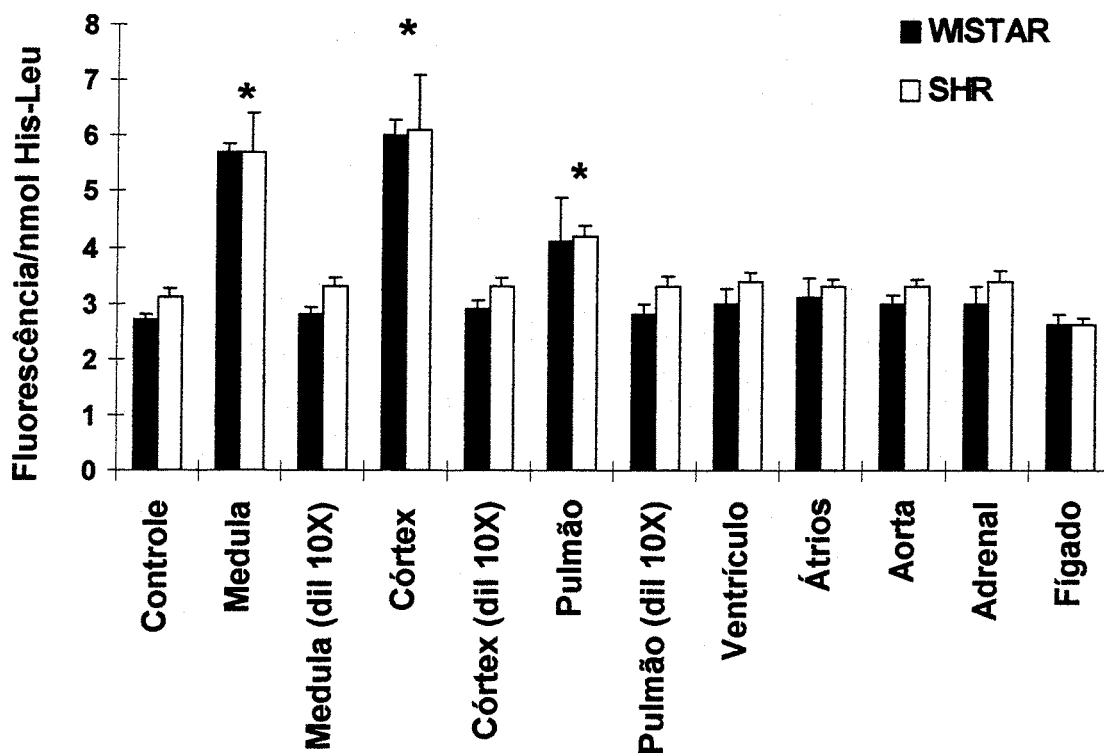


Figura 3. Influência dos homogeneizados de tecidos sobre a fluorescência do dipeptídeo His-Leu. A fluorescência do dipeptídeo His-Leu foi comparada em presença e ausência do homogeneizado (25 μ l). Os resultados são expressos como fluorescência /nmol de His-Leu. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos diferentes para ratos Wistar e SHR. ($p < 0,001$)

4.1.1.2 - Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio

Para a validação do ensaio fluorimétrico também procuramos avaliar a estabilidade das amostras nas condições que seriam utilizadas para medida da atividade da enzima conversora. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que os homogeneizados de tecidos quando incubados separadamente com tampão borato nas condições do ensaio para determinação da atividade da ECA, não formam produtos que apresentem fluorescência após a reação com *o*-ftaldialdeído.

Tabela 1. Estabilidade do homogeneizado nas condições do ensaio

Tecidos	Fluorescência Relativa			
	W i s t a r		S H R	
	Controle (To)	Incubado (1h)	Controle (To)	Incubado (1h)
Medula renal	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,005	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,005
Córtex renal	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,008
Pulmão	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,008
Ventrículo	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,33 ± 0,025
Aorta	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,005
Átrio	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,025
Adrenal	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,005
Fígado	0,82 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,87 ± 0,008

Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados conforme descrito no ítem 3.1.3.2.

4.1.1.3 - Influência das dipeptidases sobre o produto

Para completar a validação do ensaio fluorimétrico para a enzima conversora procuramos avaliar um dos pontos críticos, neste ensaio, que é a possibilidade da hidrólise do produto His-Leu por atividades dipeptidásicas presentes na amostra. Esta é uma investigação extremamente importante, uma vez que a fluorescência dos aminoácidos histidina e leucina livres é mínima nas condições do ensaio (Santos et al., 1985), portanto podendo subestimar os resultados. Os resultados apresentados na Figura 2 mostram que para as amostras de ratos Wistar (Figura 4A) e SHR (Figura 4B), incubadas com 31 nMoles de His-Leu em tampão borato, a atividade dipeptidásica estava presente somente no homogeneizado de fígado e foi parcialmente bloqueada com 100 µM de PCMB.

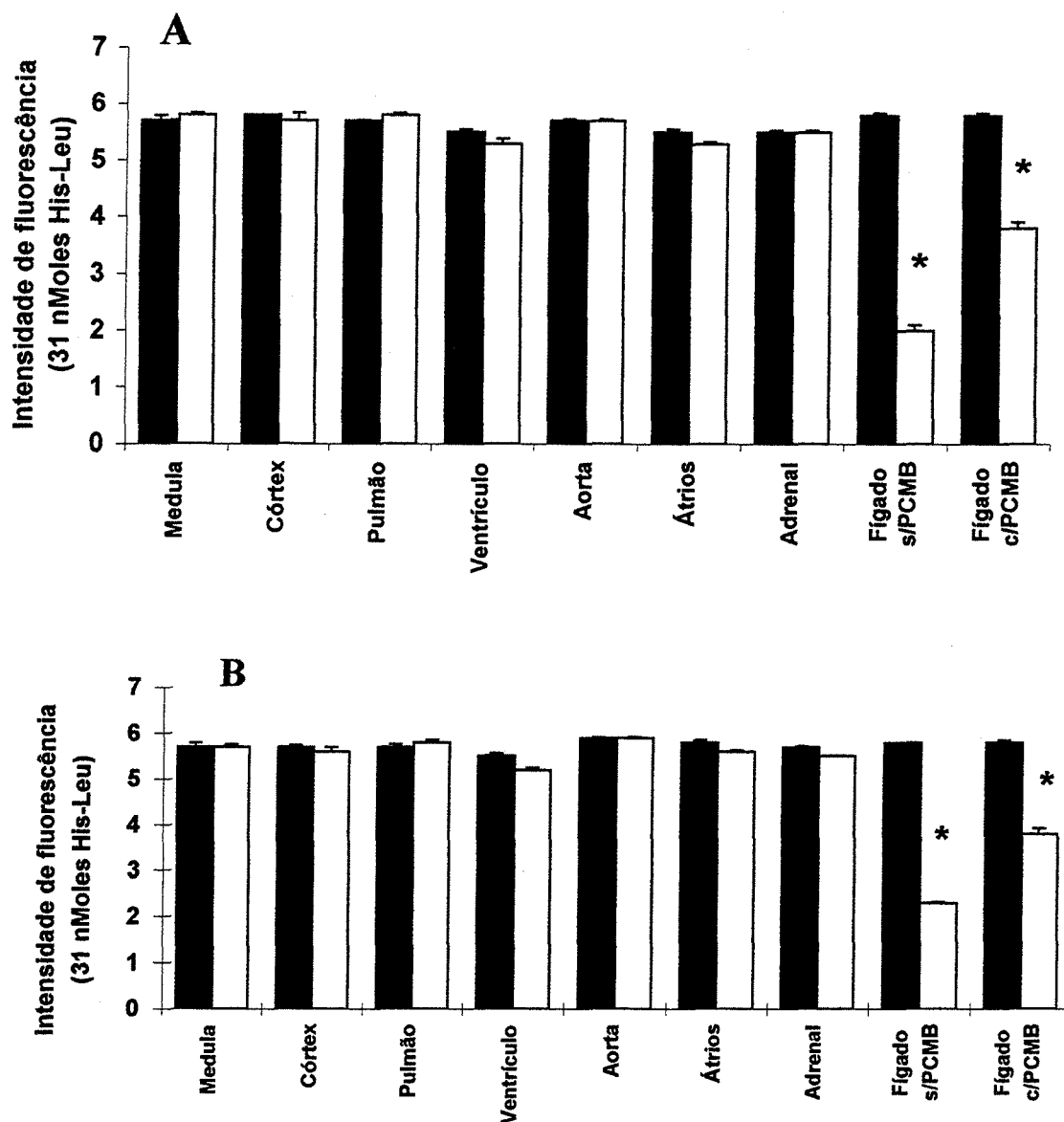


Figura 4. Atividades dipeptidásicas para amostras de tecidos de ratos Wistar (A) e SHR (B), incubados com 31 nMol de His-Leu em tampão borato. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência. Cada valor representa a média±desvio padrão de 3 experimentos diferentes para ratos Wistar e SHR. ■ Controle (To); □ Incubado (H-L). (p<0,001)

A concentração de PCMB utilizada acima foi determinada variando-se as concentrações de 0 a 2,0 mM. Os resultados mostrados na Figura 5 indicam que a concentração de 100 μ M foi a que produziu a maior inibição da atividade dipeptidásica sem inibir a atividade da ECA.

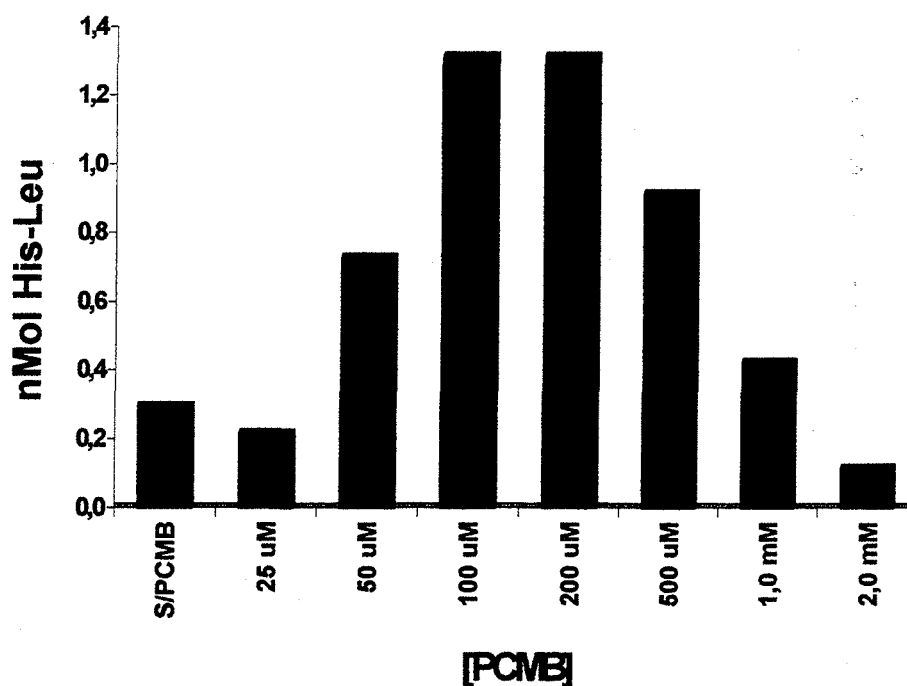


Figura 5. Curva de PCMB (p-cloro mercuribenzoato). Este experimento foi realizado com homogeneizado de fígado em presença de tampão fosfato como descrito na metodologia. Cada valor representa a média de 3 experimentos e o desvio padrão não foi maior do que 5% do valor.

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram as atividades dipeptidásicas observadas na presença de tampão borato (Figura 6A) e tampão fosfato (Figura 6B) com 62 nMoles de His-Leu. Na presença de tampão borato a atividade dipeptidásica foi detectada somente no homogeneizado de fígado, onde 75% do His-Leu foi hidrolisado. Na presença de PCMB 38% dessa hidrólise foi bloqueada, sendo parcialmente inibida a atividade dipeptidásica. Na presença de tampão fosfato a atividade dipeptidásica detectada foi de 50% no rim, 8% no ventrículo, 5% no soro e 65% no fígado. A hidrólise nestes tecidos foi totalmente bloqueada na presença de PCMB.

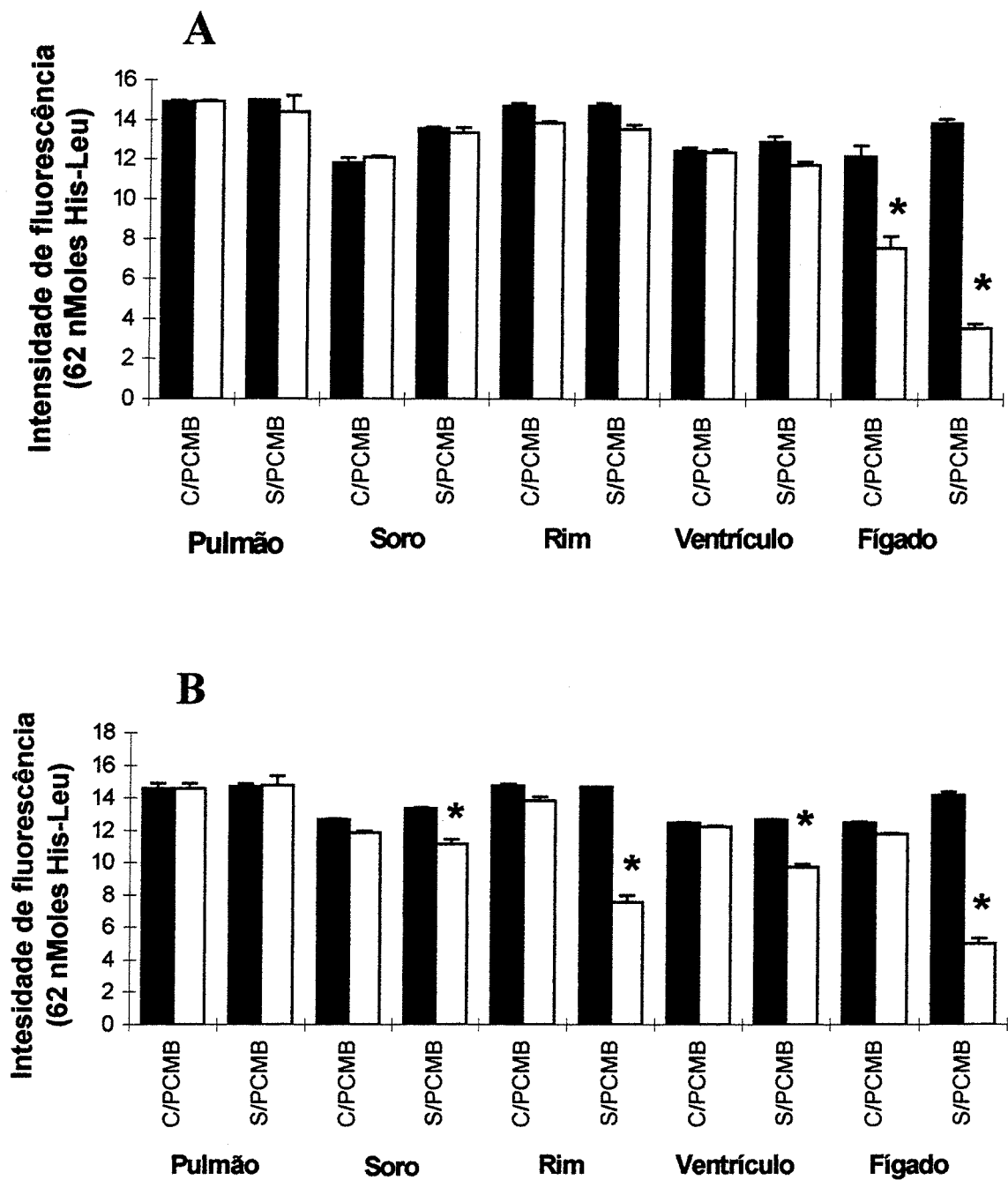


Figura 6. Atividade dipeptidásica determinada na presença de tampão borato (A) e tampão fosfato (B) com 62 nmoles de His-Leu. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos diferentes para ratos Wistar e SHR. ■ Controle (To); □ Incubado (H-L). ($p < 0,001$).

Estes resultados mostram que a atividade da ECA em homogeneizado de fígado pode ser subestimada quando a enzima for incubada na presença de tampão borato. Assim como para homogeneizados de rim, ventrículo, fígado e soro na presença de tampão fosfato.

4.1.2 - Demonstração da validade do ensaio enzimático

4.1.2.1 - Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação.

Curva de Tempo

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que a quantidade de His-Leu liberada em função do tempo de incubação das amostras foi linear até 90 minutos para córtex e medula renal e fígado (com PCMB), 60 min para ventrículo e adrenal e 30 minutos para aorta, pulmão e átrio. Estes resultados são os mesmos tanto para ratos Wistar quanto para SHR.

4.1.2.2 - Linearidade entre a velocidade de liberação do produto e a quantidade de "enzima". Curva de Proteína

A relação entre a velocidade de liberação do produto e as quantidades crescentes de homogeneizado das amostras está apresentada na Figura 8. Os resultados mostram que a reação é linear pelo menos por 30 min para todos os tecidos.

Baseado nos resultados apresentados na demonstração da validade do ensaio enzimático, adotamos incubar 20µl de homogeneizado para todos os tecidos por 15 minutos para pulmão e aorta e os demais tecidos por 30 minutos para o ensaio da ECA com Hip-His-Leu 5mM em 480 µl de tampão borato 0,4M, contendo NaCl 0,9M, pH 8,3 a 37 °C.

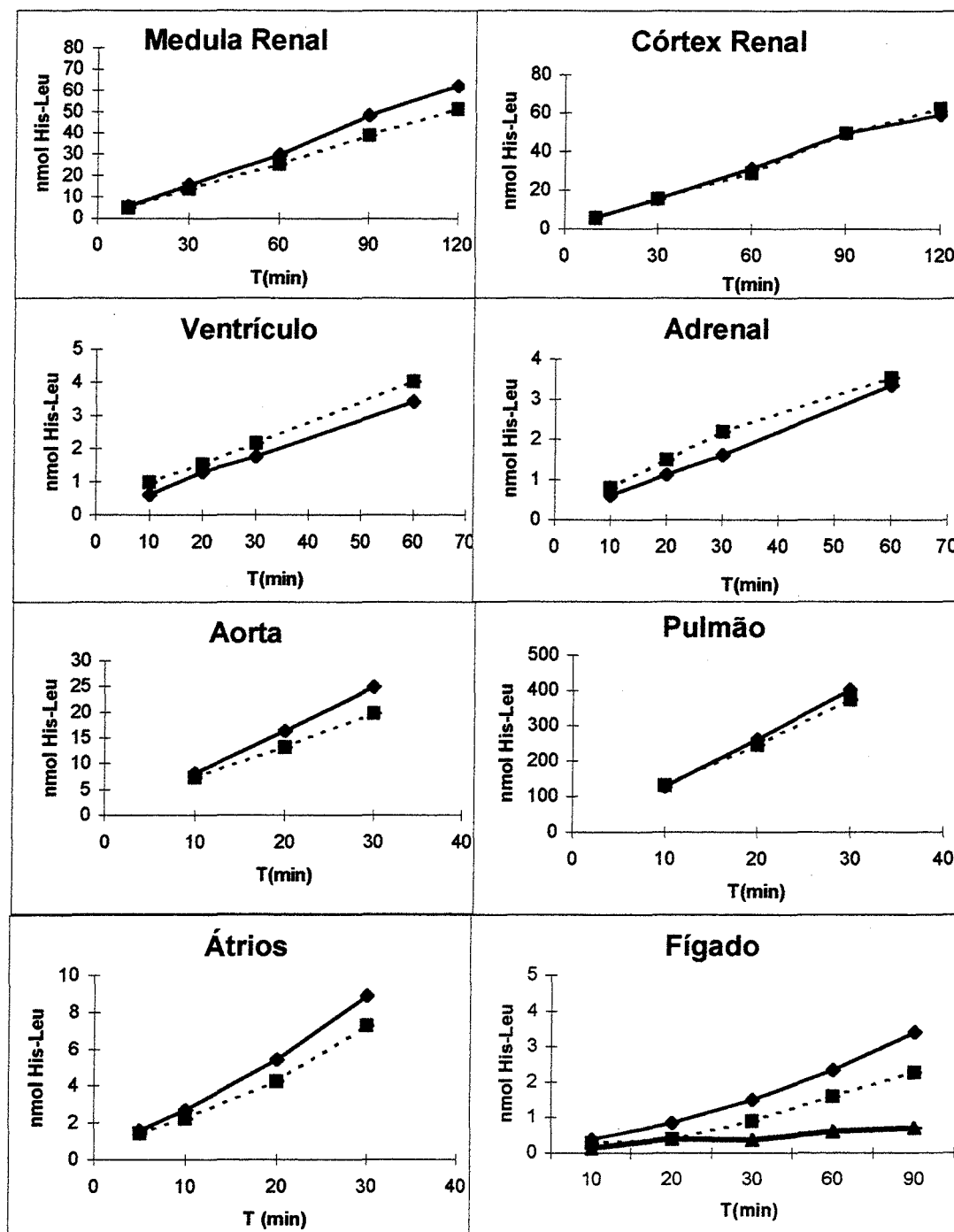


Figura 7. Curva de tempo. Linearidade da liberação do produto em função do tempo de incubação. Cada valor representa a média de 3 experimentos e o desvio padrão não foi maior do que 10% do valor. (♦) Wistar; (■) SHR; (▲) Fígado sem PCMB.

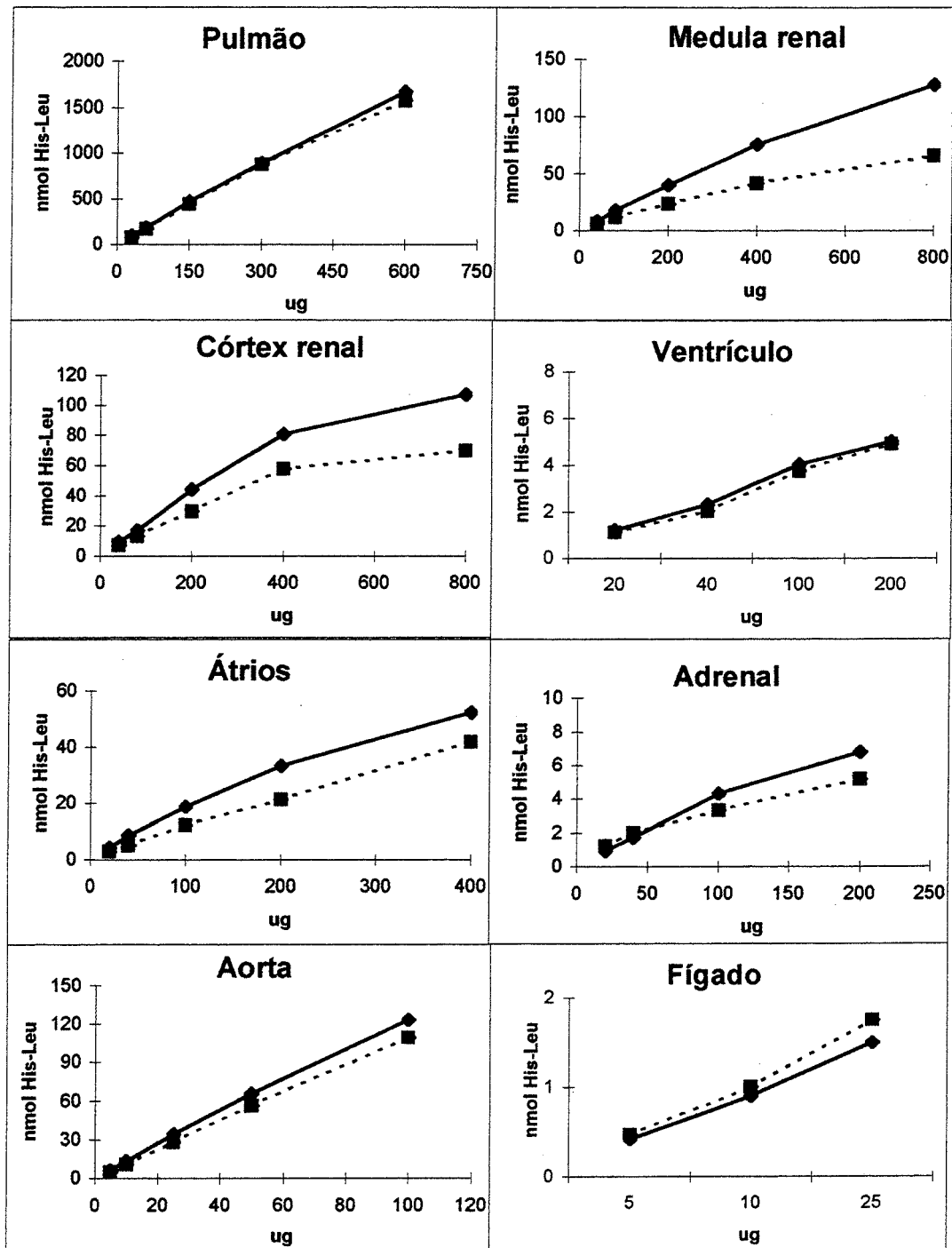


Figura 8. Curva de proteína. Linearidade da liberação do produto em função da concentração de proteína. Cada valor representa a média de 3 experimentos e o desvio padrão não foi maior do que 10% do valor. (♦) Wistar; (■) SHR.

4.1.3 - Demonstração da especificidade do ensaio para determinação da atividade da ECA em tecidos

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram o percentual de inibição do MK-422 (enalaprilato) sobre a atividade da ECA nas amostras dos diferentes tecidos. O enalaprilato numa concentração de 3 μM produziu uma inibição de 98% na atividade da enzima.

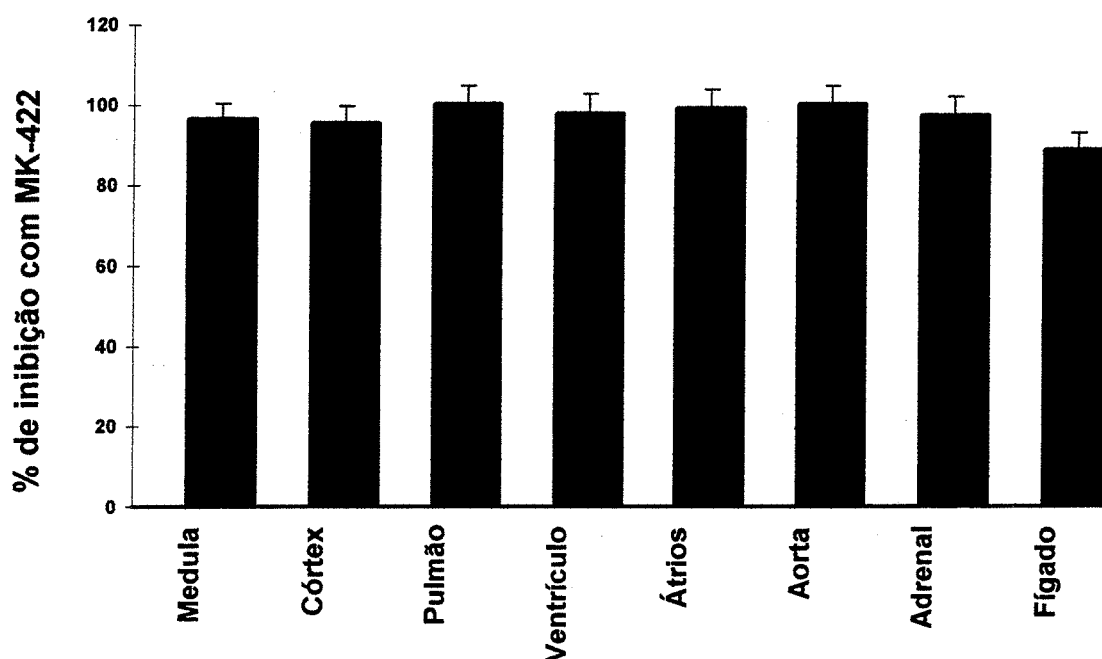


Figura 9. Demonstração da especificidade do ensaio para ECA em diferentes tecidos. Os resultados são expressos como percentual de inibição com MK-422 (enalaprilato) na concentração de 3 μM . Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos diferentes para ratos Wistar

4.1.4 - Comparação entre a atividade da enzima na presença de diferentes tampões

Os resultados apresentados na Figura 10, mostram que os valores obtidos para a atividade da ECA foram maiores quando a enzima era incubada com Hip-His-Leu na presença de tampão borato que os valores obtidos na presença de tampão fosfato. A presença de Triton X-100 (0,1%) aumentou a atividade da ECA em 20% somente para o homogeneizado de pulmão ($p < 0,05$)

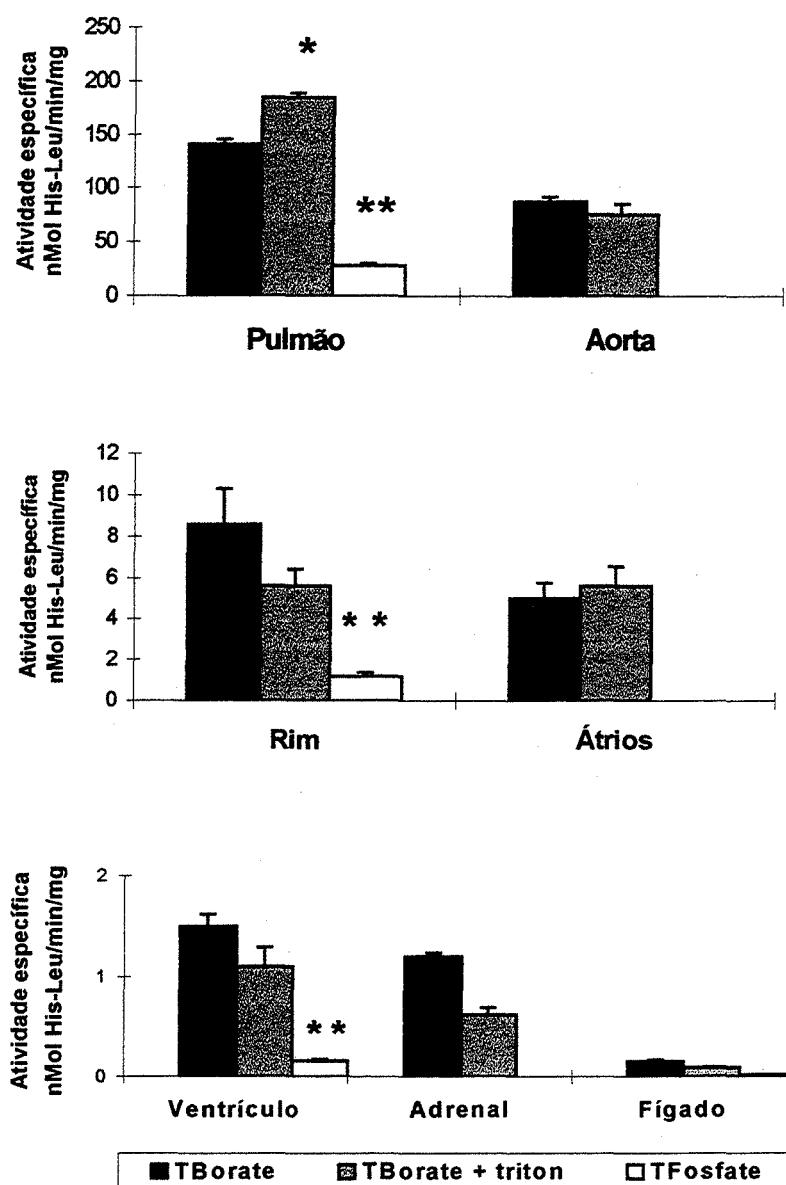


Figura 10. Atividade da ECA em diferentes tampões. Tampão borato, tampão borato com triton X-100, 0,1% (*) $p < 0.05$ e tampão fosfato (**) $p < 0.05$. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos diferentes para ratos Wistar

4.1.5 - Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA nos homogeneizados de tecidos

As atividades da ECA nos homogeneizados de tecidos estocados -20°C e -80°C por 7 e 30 dias são apresentados na Tabela 2. Os resultados não apresentaram diferenças significativas na atividade da enzima, mostrando que os homogeneizados são estáveis por um período de pelo menos 30 dias em ambas as temperaturas.

Tabela 2. Influência do tempo de estocagem sobre a atividade da ECA nos homogeneizados de tecidos.

Tecidos	To	7 dias		30 dias	
		-20°C	-80°C	-20°C	-80°C
Medula renal	8,6 ± 1,0	6,6 ± 1,1	7,0 ± 1,0	6,8 ± 0,3	6,1 ± 0,9
Córtex renal	7,1 ± 0,3	7,0 ± 1,6	6,3 ± 1,0	6,4 ± 0,5	6,4 ± 0,8
Pulmão	172,4 ± 6,1	186,7 ± 10,7	179,3 ± 22,9	170,3 ± 11,9	162,1 ± 8,3
Ventrículo	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Aorta	121,8 ± 5,5	115,0 ± 11,4	107,6 ± 7,8	110,5 ± 7,9	104,0 ± 4,8
Átrio	10,2 ± 1,6	10,7 ± 2,3	10,0 ± 1,4	10,9 ± 1,7	10,2 ± 1,6
Adrenal	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Fígado	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados conforme descrito no item 3.1.6

4.1.6 - Determinação da atividade da ECA em tecidos de ratos Wistar e SHR

A atividade da enzima foi comparada entre diferentes tecidos de ratos Wistar e SHR. Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a atividade da ECA foi menor no córtex renal, ventrículo, átrio e soro; não apresentaram diferenças significativas na medula renal, adrenal, fígado e maior no pulmão e aorta quando amostras de tecidos de ratos Wistar foram comparadas com SHR.

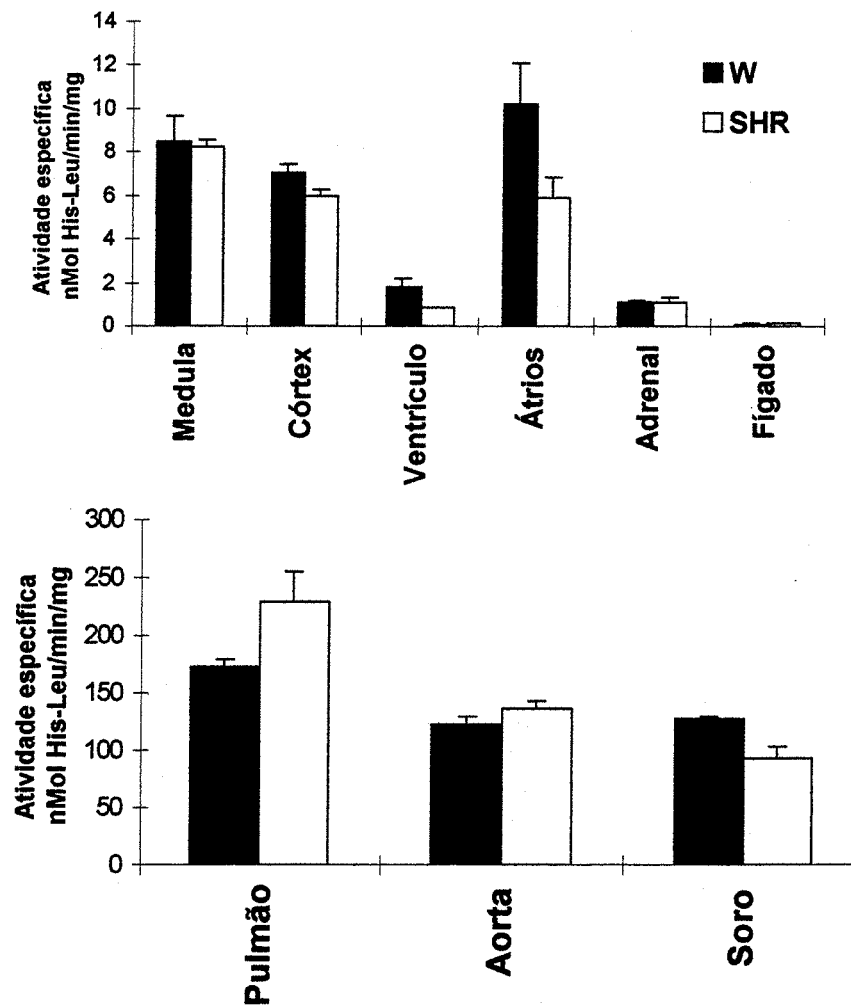


Figura 11. Determinação da atividade da ECA em diferentes tecidos para ratos Wistar e SHR. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos diferentes. Os resultados para o soro são expressos em nMol His-Leu/min/ml.

4.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

A medida direta da pressão arterial mostrou diferenças significativas na pressão arterial média (PAM) no grupo de animais tratados com enalapril mais isoproterenol quando comparados ao grupo controle. Os valores obtidos para PS, PD, PAM e FC (frequência cardíaca) dos grupos realizados estão apresentados na Tabela 3. É importante salientar que a queda de PA nos animais tratados com Iso e inibidor da ECA (enalapril) foi muito importante inviabilizando não só a sua utilização para testar a hipótese principal, uma vez que fatores hemodinâmicos *per se* influenciam as alterações tróficas cardíacas, como também pelo estado geral destes animais que não era adequado. Desta forma daqui para frente só serão

considerados os 4 grupos iniciais.

Tabela 3. Pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Tratamento	PS	PD	PAM	FC
Controle	133,0 ± 13,6	98,3 ± 16,1	114,3 ± 15,1	334,3 ± 25,3
Isoproterenol	131,0 ± 13,7	96,8 ± 11,0	107,3 ± 14,8	315,3 ± 12,7
Sal	137,8 ± 15,9	95,5 ± 15,9	113,8 ± 16,4	323,8 ± 11,6
Sal + Iso	128,2 ± 4,7	97,2 ± 8,8	106,5 ± 4,3	341,0 ± 32,4
Enalapril	125,3 ± 10,2	96,1 ± 8,8	105,7 ± 11,7	328,6 ± 15,9
Enalapril + Iso	99,3 ± 14,3 *	73,7 ± 12,9 *	85,1 ± 13,2 *	343,3 ± 33,5 *

Os valores representam a média ± DP (desvio padrão) para n=6 em cada grupo. *p<0,05. Para FC *p<0,05, quando comparado com grupo tratado com isoproterenol. Os dados das Pressões são expressos em mmHg e FC em bpm.

Os resultados não mostram diferenças significativas para PA entre os 4 grupos de animais estudados, que vamos dar continuidade no nosso trabalho (Figura 12).

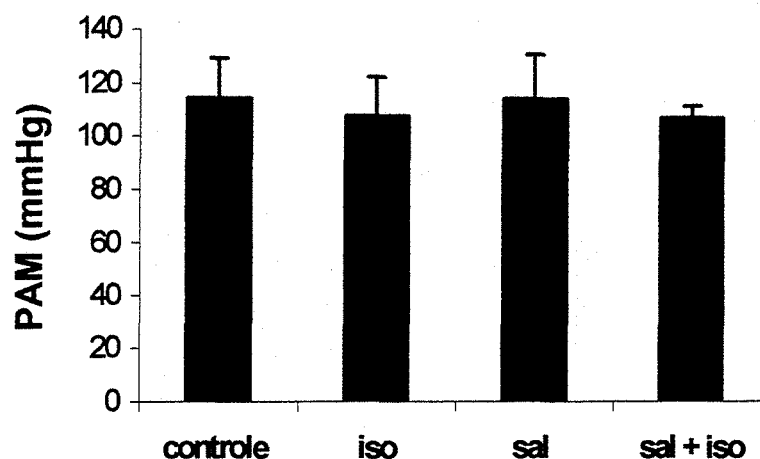


Figura 12. Medida direta da Pressão Arterial Média (PAM). As medidas foram realizadas após os 7 dias de tratamento. Cada valor representa a média ± desvio padrão para n=6 em cada grupo.

Os resultados apresentados na Figura 13 e Tabela 4 mostram que todos os grupos de animais mantiveram o peso corporal após o tratamento com isoproterenol, dieta hipersódica ou associação dos dois tratamentos. Como o peso corporal foi utilizado para o cálculo do índice de hipertrofia é importante que os animais não tenham perda de peso durante o tratamento.

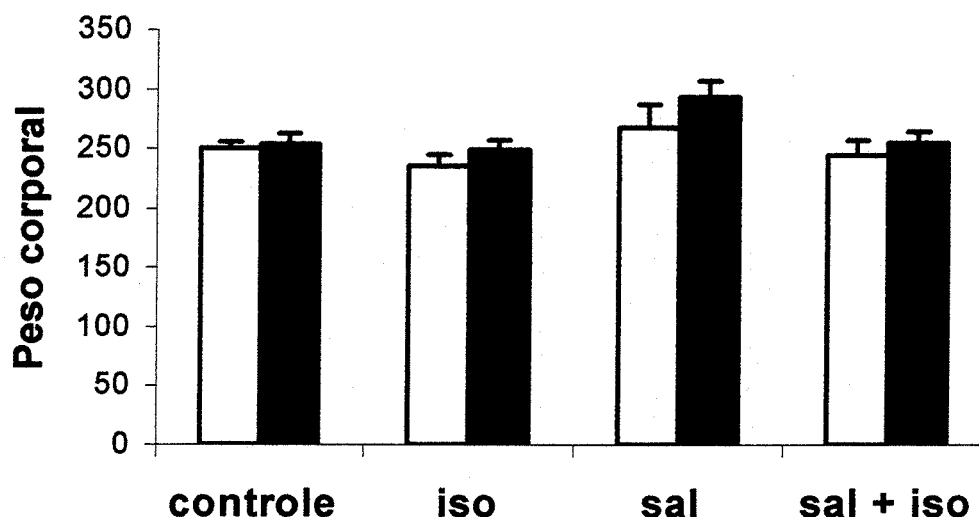


Figura 13. Peso corporal dos animais. (□) antes; (■) após o tratamento com isoproterenol. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo.

O índice de hipertrofia cardíaca foi obtido pela razão entre o peso das câmaras e o peso corporal do animal (P_{corp}/P_{cor}). Os índices de hipertrofia para VE, VD e átrios são apresentados na Tabela 4. Estes resultados mostram um grau significativo de hipertrofia de 36 %, 22 % e 29 % para VE, VD e átrios, respectivamente, para o grupo de animais tratados com isoproterenol quando comparado ao grupo controle. Ao compararmos o grupo controle com o grupo tratado com dieta hipersódica não foram observadas diferenças significativas. Foi observado um grau de hipertrofia de 35 %, 29 % e 18 % para VE, VD e átrios, respectivamente, para o grupo de animais tratados com sal mais isoproterenol quando comparados com o grupo controle. Portanto, mesmo quando o sistema renina angiotensina circulante foi inibido pela dieta hipersódica, o tratamento com isoproterenol induziu hipertrofia nas três câmaras cardíaca, que foi semelhante a obtida somente com o tratamento com isoproterenol.

Tabela 4. Efeitos dos diferentes tratamentos sobre o peso das câmara cardíacas e o peso corporal dos animais.

Tratamento	Átrios	VD	VE	P corporal
Controle	0,17 ± 0,03	0,59 ± 0,07	2,40 ± 0,15	253 ± 6,9
Isoproterenol	0,22 ± 0,03 *	0,72 ± 0,07 *	3,27 ± 0,32 *	249 ± 7,5
Sal	0,14 ± 0,01	0,59 ± 0,09	2,25 ± 0,11	294 ± 12,1
Sal + Iso	0,20 ± 0,04 *	0,76 ± 0,08 *	3,24 ± 0,11 *	256 ± 8,6
Enalapril	0,17 ± 0,03	0,58 ± 0,05	2,36 ± 0,15	261 ± 10,2
Enalapril + Iso	0,18 ± 0,03	0,77 ± 0,06 *	2,69 ± 0,14 *	256 ± 14,0

Os valores representam a média ± DP (desvio padrão) para n=6 em cada grupo. Os índices de hipertrofia para átrios, VD e VE são expressos em mg/g e o peso corporal em g. *p<0,05 quando comparados ao grupo controle.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram, conforme esperado, que a atividade da renina plasmática aumentou 130 % quando os animais foram tratados com isoproterenol. Em contraste a atividade da renina plasmática foi inibida pela dieta hipersódica e o tratamento com isoproterenol não foi suficiente para aumentá-la. Os resultados obtidos para a atividade da renina plasmática em ng de Ang I/ml/h foram de 0,6 ± 0,22; 1,4 ± 0,37; 0,035 ± 0,007 e 0,044 ± 0,008 para os grupos controle,

, Sal e Sal mais Iso, respectivamente. Estes resultados mostram que o tratamento com dieta hipersódica inibiu o sistema renina angiotensina circulante e a adição de isoproterenol não foi suficiente para ativá-lo.

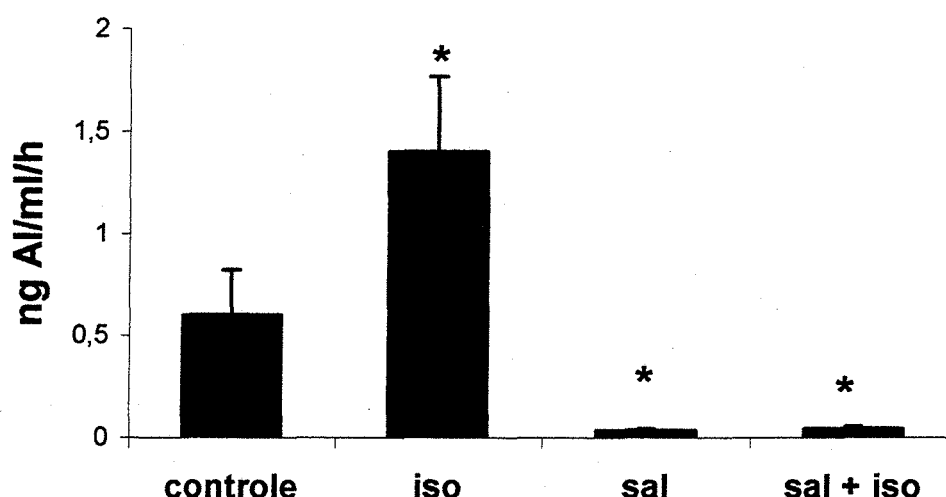


Figura 14. Medida da atividade da renina plasmática. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo.

Conforme pode ser observado na Figura 15 a atividade da ECA circulante não foi modificada em nenhum dos 4 grupos estudados.

O tratamento com Iso resultou em aumento significativo da atividade da ECA no VE (67 %, $p<0,05$), pulmão (49 %, $p<0,05$) e no rim (46 %, $p<0,05$). O tratamento com sal diminui a atividade da ECA no VE (31%, $p<0,05$), aumenta no rim (28%, $p<0,05$) e não modificou a atividade da enzima no pulmão. O tratamento concomitante da dieta hipersódica com Iso resultou em aumento da atividade da ECA no VE (37%, $p<0,05$), no pulmão (31%, $p<0,05$) e permaneceu o mesmo aumento no rim (28%, $p<0,05$), quando estes resultados foram comparados com o grupo controle. Ao compararmos o grupo tratado com dieta hipersódica e o grupo tratado com sal mais Iso observamos um aumento na atividade da ECA somente no VE (95%, $p<0,05$), enquanto que para o pulmão e o rim não foram observadas alterações na atividade da enzima. Os resultados da atividade da ECA nos diferentes tecidos são mostrados na Figura 16 para o VE, na Figura 17 para o pulmão e na Figura 18 para o rim. Os resultados para atividade da ECA para os 6 grupos de tratamento estão apresentados na Tabela 5.

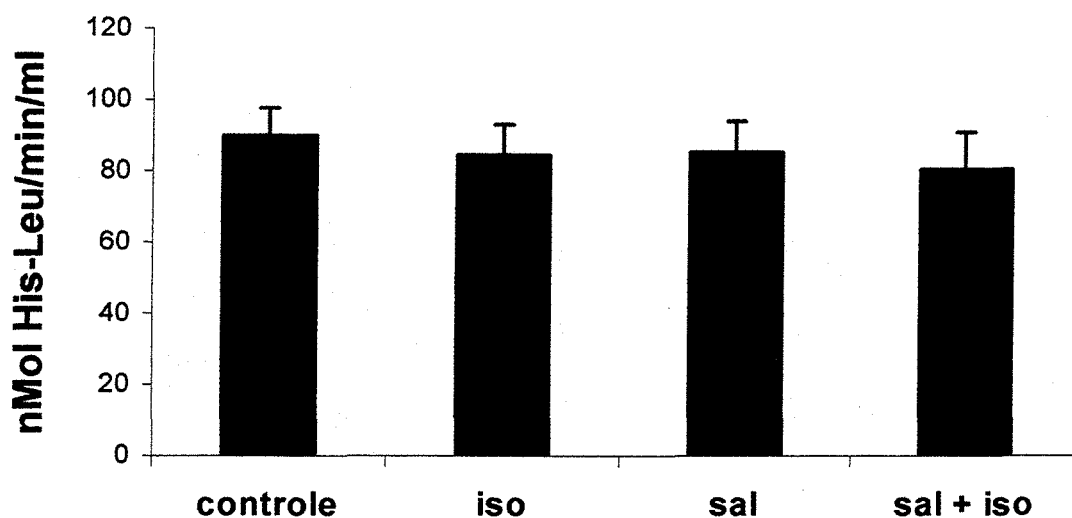


Figura 15. Medida da atividade da ECA no soro. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo.

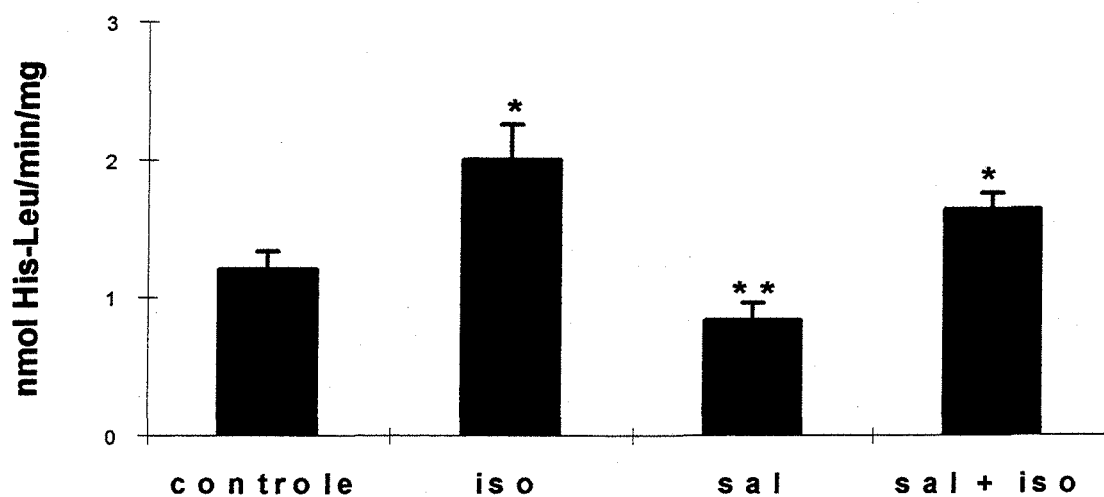


Figura 16. Medida da atividade da ECA no VE. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo. (*) aumenta em relação ao controle; (**) diminui em relação ao controle. $P < 0,05$.

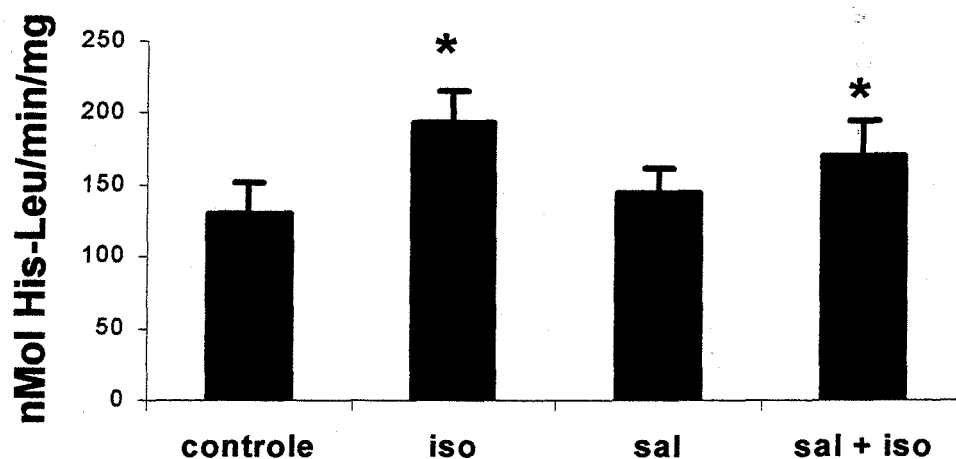


Figura 17. Medida da atividade da ECA no Pulmão. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo. * $p<0,05$.

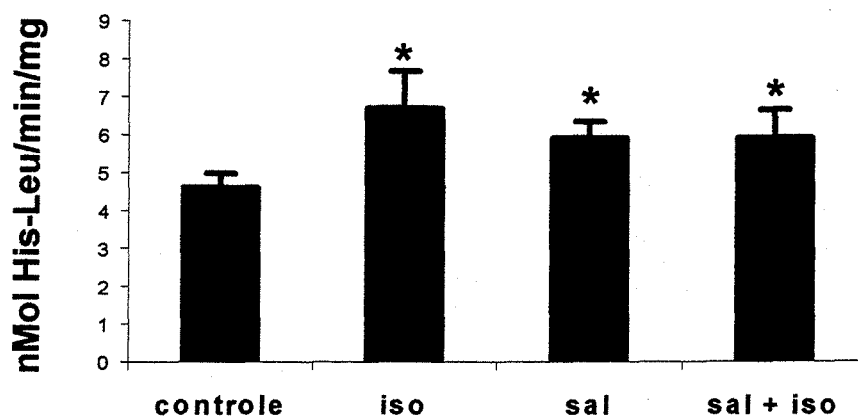


Figura 18. Medida da atividade da ECA no Rim. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=6$ em cada grupo. * $p<0,05$.

Tabela 5. Atividade da ECA no soro e no homogeneizado de diferentes tecidos de ratos.

Tratamento	Soro	Pulmão	VE	Rim
Controle	90,0 ± 7,5	129,8 ± 22,0	1,2 ± 0,13	4,6 ± 0,39
Isoproterenol	84,5 ± 8,5	193,4 ± 22,6 *	2,0 ± 0,26 *	6,7 ± 0,97 *
Sal	85,5 ± 8,5	144,4 ± 17,3	0,83 ± 0,13 *	5,9 ± 0,44 *
Sal + Iso	80,5 ± 10,4	170,6 ± 24,3 *	1,64 ± 0,12 *	5,9 ± 0,75 *
Enalapril	72,5 ± 12,2 *	108,5 ± 10,6 *	0,79 ± 0,16 *	4,8 ± 0,78
Enalapril + Iso	70,3 ± 6,3 *	101,2 ± 15,2 *	1,2 ± 0,25	4,1 ± 0,92

Os valores representam a média ± DP (desvio padrão) para n=6 em cada grupo. A atividade da ECA foi expressa em nMol His-Leu/min/mg de proteína para os tecidos e em nMol His-Leu/min/ml para o soro. *p<0,05 quando comparados ao grupo controle.

É importante salientarmos que a atividade da ECA no VE (Figura 19A) foi proporcional à hipertrofia observada no VE (Figura 19B). Estes resultados mostraram uma correlação positiva entre o grau de hipertrofia e a atividade da ECA no VE após o tratamento com isoproterenol ($r=0,78$, $p<0,0001$), sugerindo uma proporcionalidade entre a indução do sistema renina angiotensina cardíaco e a hipertrofia (Figura 19C).

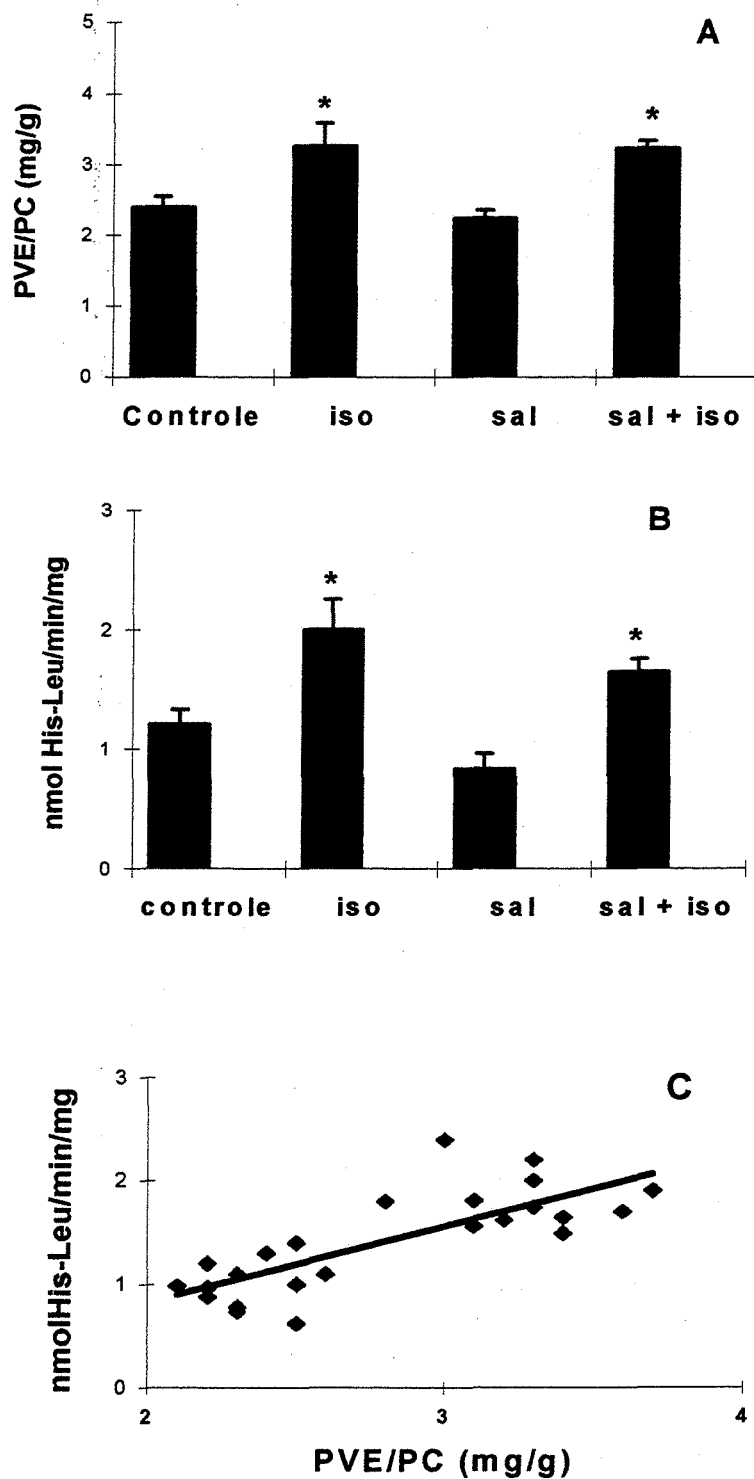


Figura 19. Relação entre a hipertrofia e a atividade da ECA no VE. Hipertrofia observada no VE (A). Atividade da ECA no VE (B). Correlação positiva entre o peso do VE e a atividade da ECA no VE (C). ($r=0,78$; $p<0,0001$). * $p<0,05$.

O tratamento com isoproterenol, além de aumentar a atividade da ECA no VE e o peso do VE, também aumentou em 28% o diâmetro dos miócitos cardíacos (Figura 20).

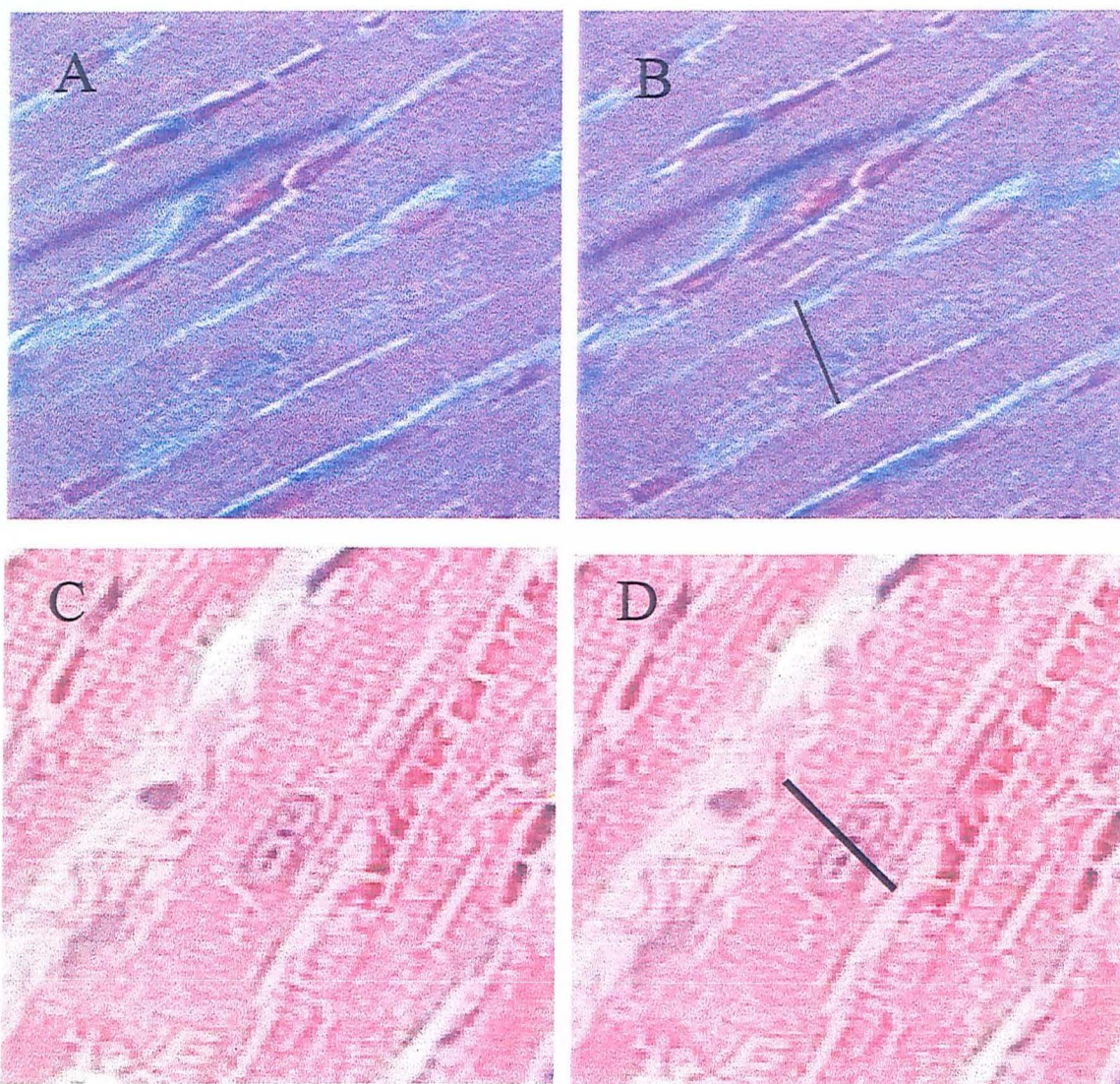


Figura 20. Fotografia de uma região do VE de rato mostrando o diâmetro de miócitos isolados. As fotos mostram o diâmetro dos miócitos corados com hematoxilina e eosina. Fotos A e B, grupo controle. Fotos C e D, grupo tratado com isoproterenol. O diâmetro dos miócitos foi analisado com aumento de 400X em 20 campos visuais para cada corte. Houve um aumento de 28% no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. $p < 0,05$.

Também foi observado um aumento de 58 % na expressão do gene da ECA no VE (Figura 21) através da análise de northern blot. Estes resultados são consistentes com a idéia de que a resposta de hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com isoproterenol se acompanha de aumento no diâmetro dos miócitos e ativação do sistema renina angiotensina local através do aumento da expressão e da atividade da ECA cardíaca e ocorre mesmo na ausência da ativação do sistema renina angiotensina sistêmico.

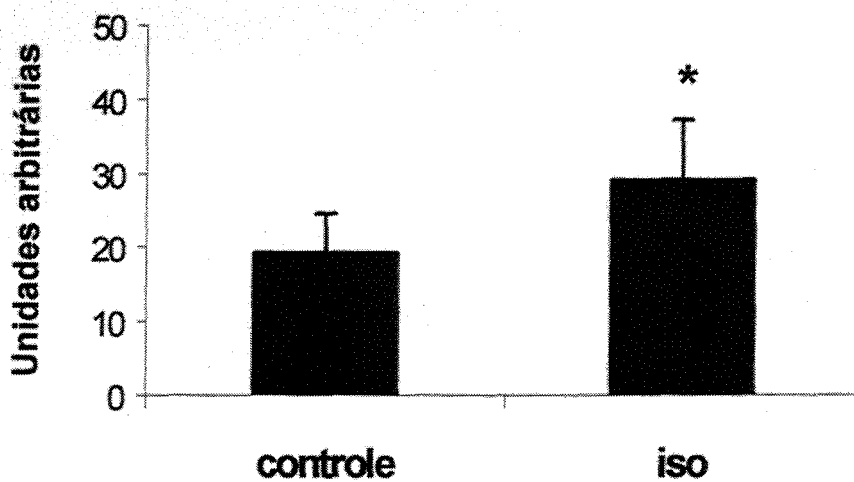
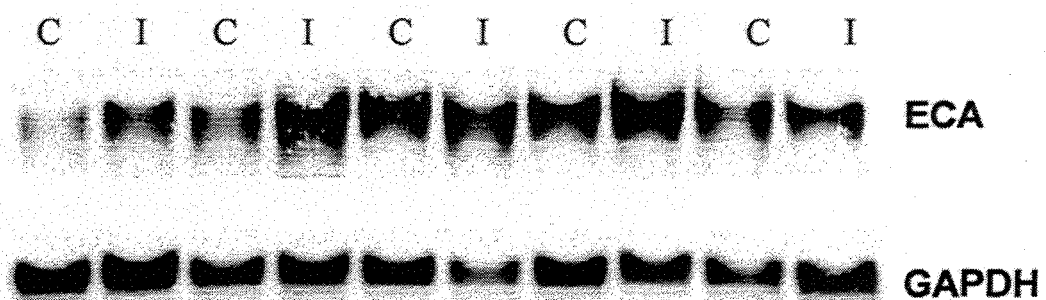


Figura 21. Expressão e quantificação do RNAm do gene da ECA no VE de ratos. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=5$ em cada grupo. * $p<0,05$. (C, controle; I, isoproterenol).

A reprogramação fetal de determinados genes como o do fator natriurético atrial é demonstrada em ventrículo adulto em resposta a sobrecarga de volume ou pressão. Neste modelo de hipertrofia observamos um aumento de 4,7X na expressão do ANF (Figura 22). Dados da literatura indicam que o ANF pode participar da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia, embora o significado fisiológico deste aumento de expressão do ANF no ventrículo ainda permaneça desconhecido (Izumo et al., 1988; Krieger, 1994).

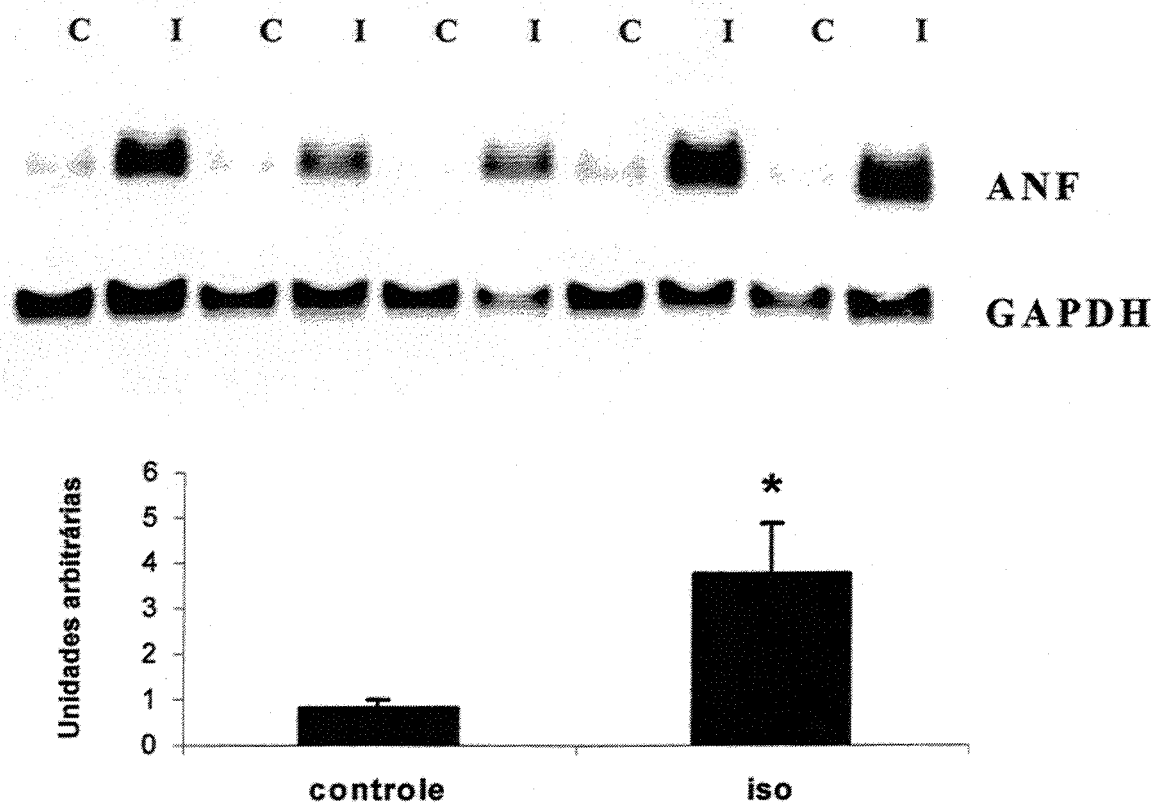


Figura 22: Expressão e quantificação do RNAm do gene do ANF (Fator Natriurético Atrial) no VE de ratos. Cada valor representa a média \pm desvio padrão para $n=5$ em cada grupo. * $p<0,001$. (C, controle; I, isoproterenol)

4.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA no VE de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

Na Figura 23 está representada a seqüência de nucleotídeos da região promotora (região 5') do gene da ECA do rato WKY ((Koike et al., 1994). Os números negativos representam as seqüências a montante do sítio de início de transcrição. Este clone contém 1273 pares de bases da região promotora do gene da ECA. Os nucleotídeos grifados representam as seqüências que estão ajuzante do sítio de início de transcrição. Eles incluem seqüências não traduzidas, e as traduzidas a partir do ATG (início da transcrição), que estão em negrito. As seqüências que possuem homologia para seqüências regulatórias conhecidas, as quais já foram descritas para outros genes, estão marcadas na figura em negrito e incluem a seqüência rica em timina-adenina (TA), localizada entre as bases -77 a -81 e que corresponde ao consenso da "TATA box". Existem 4 seqüências consensuais para Sp1. Uma seqüência TGGTCT que é capaz de ligar o receptor de glicocorticóide. Duas seqüências consensuais para "H1-Box" (TGTGTTT), que são importantes para a expressão dos genes da família das histonas. Três seqüências consensuais do tipo AP2 que conferem responsividade a ácido retinóico, à via do AMPc e a proteína quinase C. Uma seqüência homóloga ao elemento de resposta ao "shear stress" e duas seqüências responsiva a AMPc (TGAGGTGA) e (TAACCTCA).

4.3.1 - Localização da célula que incorpora o “naked de DNA”

Antes de começarmos a estudar a regulação do promotor da ECA no VE de ratos com hipertrofia induzida por isoproterenol nos certificamos de que nosso sistema de expressão estava funcionando corretamente (Figura 24). Para tanto injetamos na parede do VE um plasmídeo que confere resposta positiva (CRETK-LUC) à via de estimulação pelo AMPc e tratamos os animais com isoproterenol (n=6). O segundo controle, um plasmídeo que confere resposta positiva a glicocorticóides (MMTV-LUC) foi injetado diretamente na parede do VE e os animais foram tratados dexametasona (n=6). Os resultados apresentados na Figura 24A mostram que houve uma indução de 5X na expressão da luciferase quando os animais injetados com CRETK-LUC foram tratados com isoproterenol em relação ao grupo controle (veículo). Os resultados apresentados na Figura 24B mostram que houve um aumento de 12X na expressão da luciferase quando os animais injetados com MMTV-LUC foram tratados com dexametasona em relação ao grupo controle. Estes resultados indicam que este sistema responde, especificamente, a um estímulo (aumento de AMPc intracelular ou ação de glicocorticóides), desta forma demonstramos que o sistema estava funcionando de forma confiável.

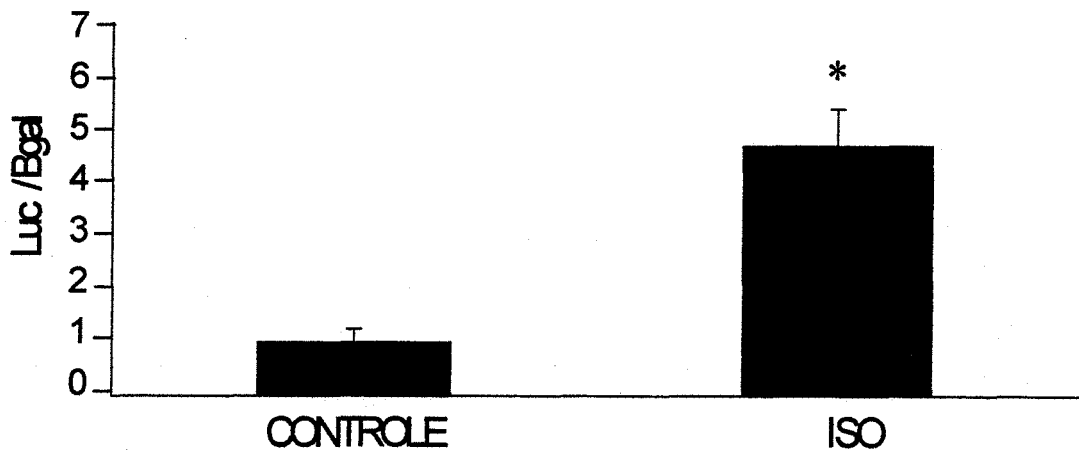


Figura 24A. Injeção do CRETK-LUC. Expressão da luciferase em amostras de VE injetados com um plasmídeo que confere resposta positiva a via de estimulação pelo AMPc. $p^* < 0,05$.

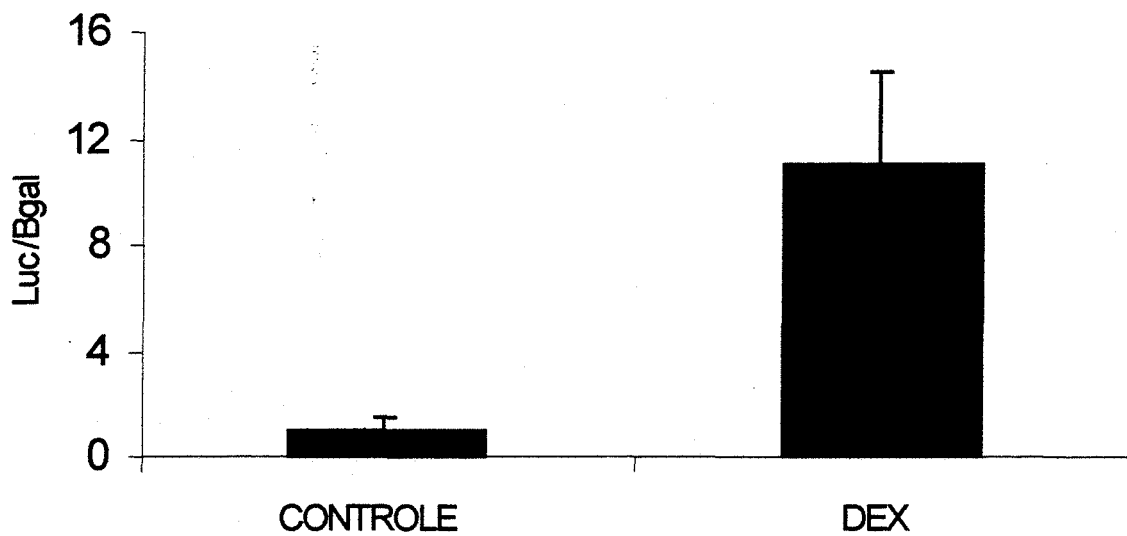


Figura 24B. Injeção do MMTV-LUC. Expressão da luciferase em amostras de VE injetados com um plasmídeo que confere resposta positiva a glicocorticóides. * $p < 0,05$. DEX - Dexametasona

Com o objetivo de identificarmos qual o tipo celular que estava sendo responsável por captar o DNA injetado foi realizado um ensaio colorimétrico para β -galactosidase em cortes histológicos de tecido cardíaco transfectados com o vetor pSV- β -gal. Os resultados apresentados na Figura 25 mostram que as células que estão captando o DNA injetado são os miócitos e esses miócitos que foram transfectados e expressam a β -galactosidase apresentam uma coloração em azul. A Figura 25A mostra os resultados de um animal controle (aumento de 100X) e B mostra uma célula que expressa β -galactosidase com um aumento de 400X. A Figura 25C e D mostram cortes histológicos seqüenciais onde as células que foram transfectadas estão coradas de azul. Estes cortes foram fotografados com um aumento de 100X. A observação desta coloração azul em cortes seqüências demonstra que essa coloração não é um artefato de técnica. Também pode ser observado nestes cortes o tecido de reparo no local onde passou a agulha de injeção durante a transfecção do plasmídeo.

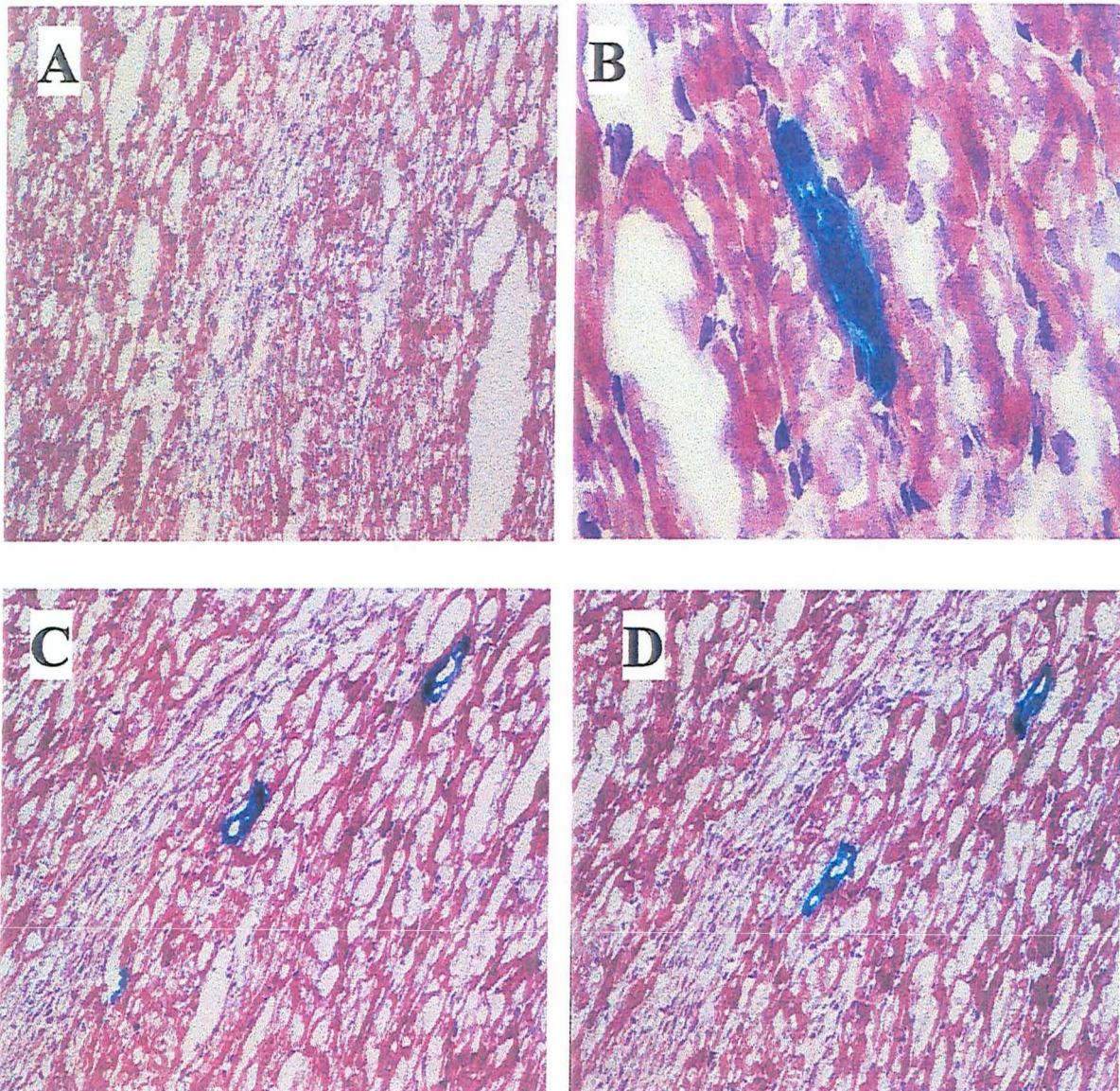


Figura 25. Ensaio para β -galactosidase. (A) corte controle (aumento de 100X); (B) mostra um miócito corado de azul pela reação da β -galactosidase (aumento de 400X), (C e D) mostra cortes seqüenciais do VE com a célula que capta o “naked DNA” corada de azul (aumento de 100X).

4.3.2 - Identificação das seqüências regulatórias do gene da ECA

Em um outro grupo de animais o vetor W/Luc foi injetado diretamente na parede do VE e os animais foram tratados por sete dias com veículo ou isoproterenol (Figura 26A). O tratamento com isoproterenol resultou em hipertrofia, conforme já foi demonstrado anteriormente, e um aumento da atividade da luciferase de 3,5 X quando comparado ao grupo controle (Figura 26B).

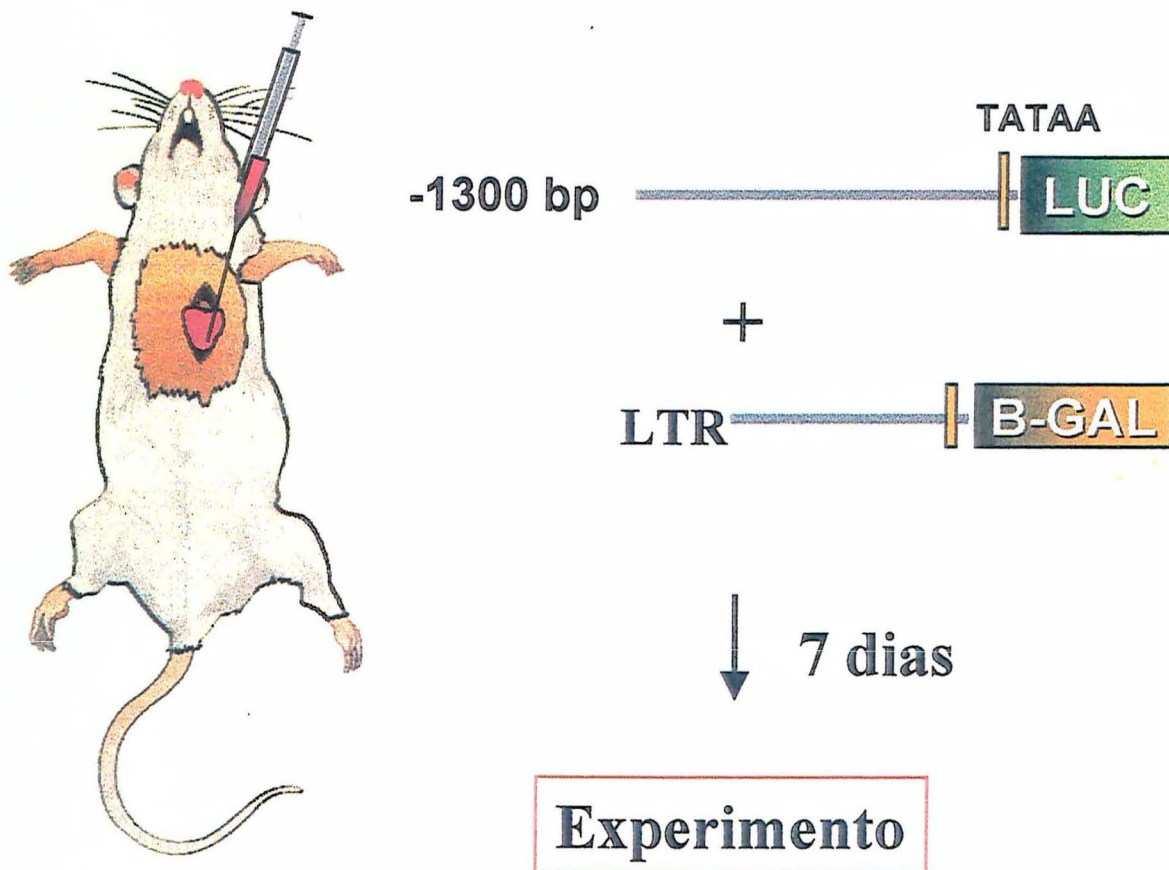


Figura 26A. Injeção do vetor W/Luc. Representação esquemática da injeção do promotor da ECA *in vivo* através da injeção direta de “naked DNA” na parede do VE.

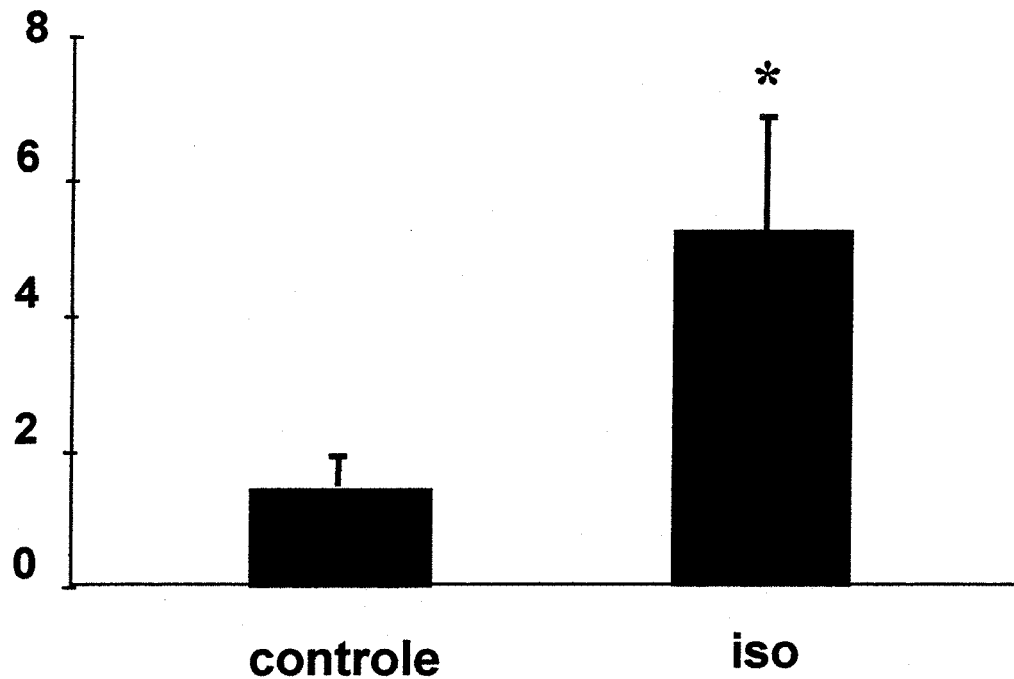


Figura 26B. Expressão do vetor W/Luc. Expressão da luciferase em amostras de VE injetadas com o promotor da ECA e tratadas com veículo ou isoproterenol por sete dias. * $p < 0,05$.

Para mapearmos as seqüências regulatórias localizadas no promotor da ECA que estavam sendo responsáveis pelo aumento da atividade da luciferase, injetamos os vetores com deleções progressivas da seqüência completa de 1.3 Kb do promotor. Foram injetados vetores contendo -1273, -1089, -477, -385, -252, -199 e -94 pb, localizados ajuzante do sítio de início da transcrição (Figura 27A). Um grupo de animais foi tratado com veículo e o outro com isoproterenol. O tratamento com isoproterenol produziu hipertrofia em todos os grupos estudados. Os resultados apresentados na Figura 27B mostram que o tratamento com isoproterenol aumentou significativamente a expressão da luciferase nos animais injetados com os fragmentos de -1273/Luc e -1089/Luc ($4,41 \pm 1,03$ e $2,6 \pm 0,4$ respectivamente, $p < 0,05$). Para os fragmentos de -477/Luc, -385/Luc, -252/Luc, -199/Luc, e -94/Luc as diferenças entre os grupos tratados com isoproterenol e o controle foram de $1,23 \pm 0,14$; $1,67 \pm 0,38$; $2,05 \pm 0,31$; $1,71 \pm 0,24$ e $1,24 \pm 0,23$, respectivamente. Estes resultados sugerem a existência de seqüências regulatórias importantes para a ativação do gene da ECA durante o desenvolvimento da hipertrofia induzida por isoproterenol no intervalo de -1089 a -477 pb no promotor do gene da ECA.

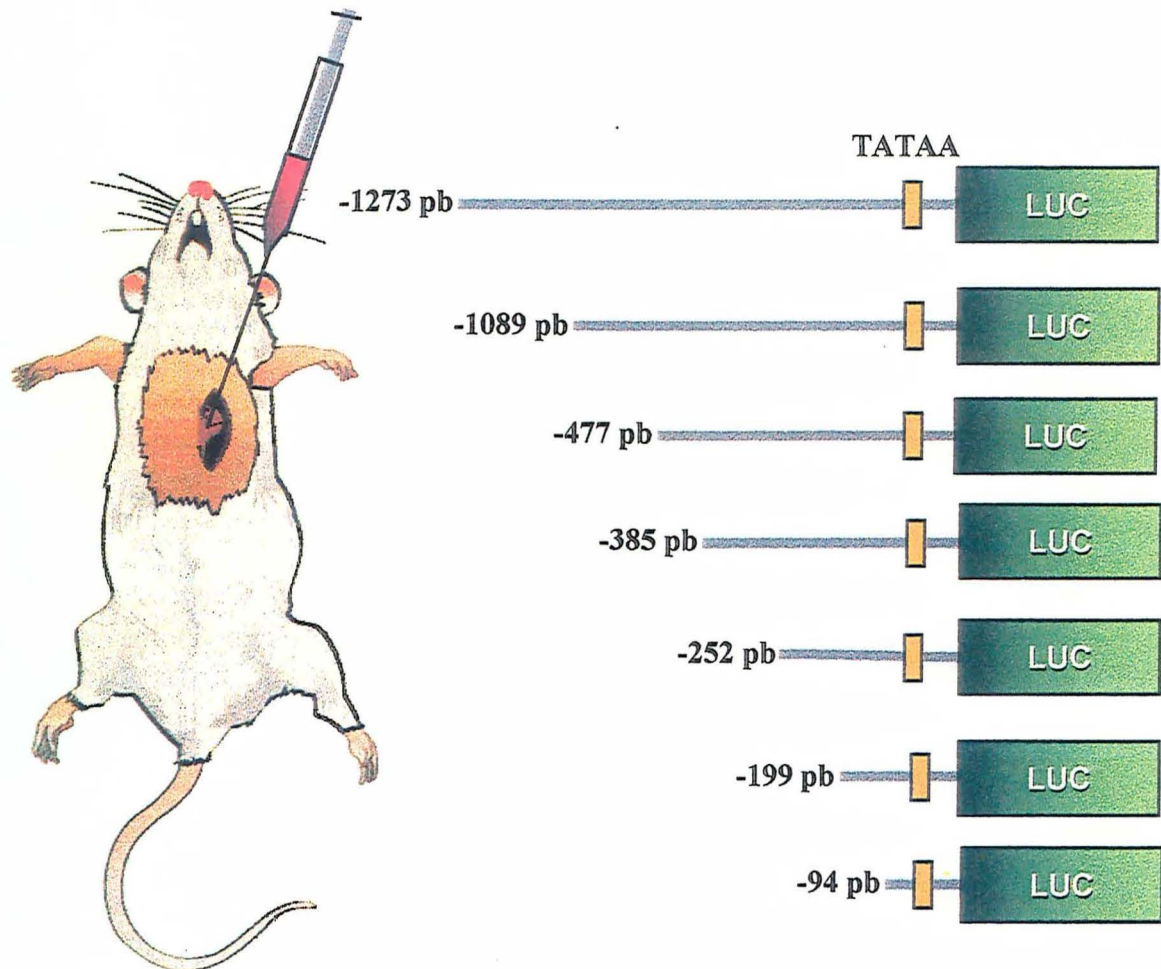


Figura 27A. Representação esquemática das deleções progressivas do vetor W/Luc. Sequências do promotor utilizadas no mapeamento das regiões regulatórias consideradas importante para a expressão do promotor da ECA durante a hipertrofia cardíaca.

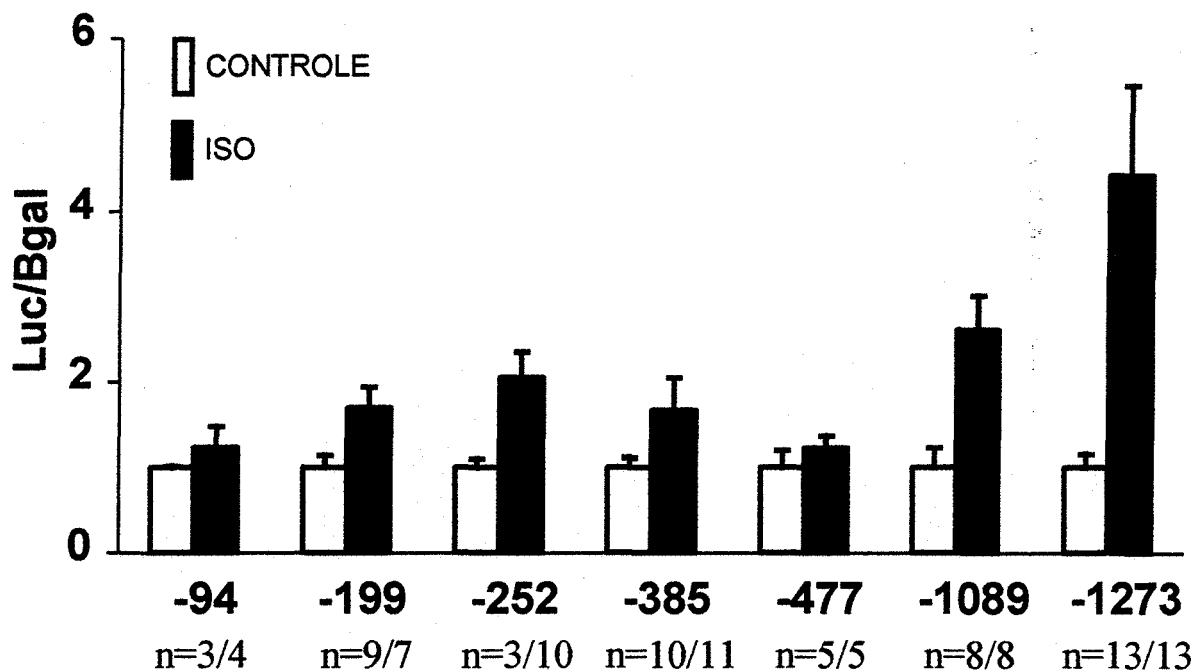


Figura 27B. Expressão dos fragmentos do vetor. Expressão da luciferase em amostras de VE de ratos injetados com os fragmento do vetor e tratos com veículo ou isoproterenol por 7 dias.

A seqüência regulatória que aumentou a expressão da luciferase durante o tratamento com isoproterenol contém 612 pb. Uma vez que a estimulação β -adrenérgica do isoproterenol aumenta os níveis de AMPc intracelular e essa região apresenta um elemento responsivo a AMPc (CRE), injetamos no VE um plasmídeo contendo mutação neste sítio (mutante distal - W5J), portanto deixando de responder ao AMPc, conforme pode ser observado na representação esquemática da Figura 28A.

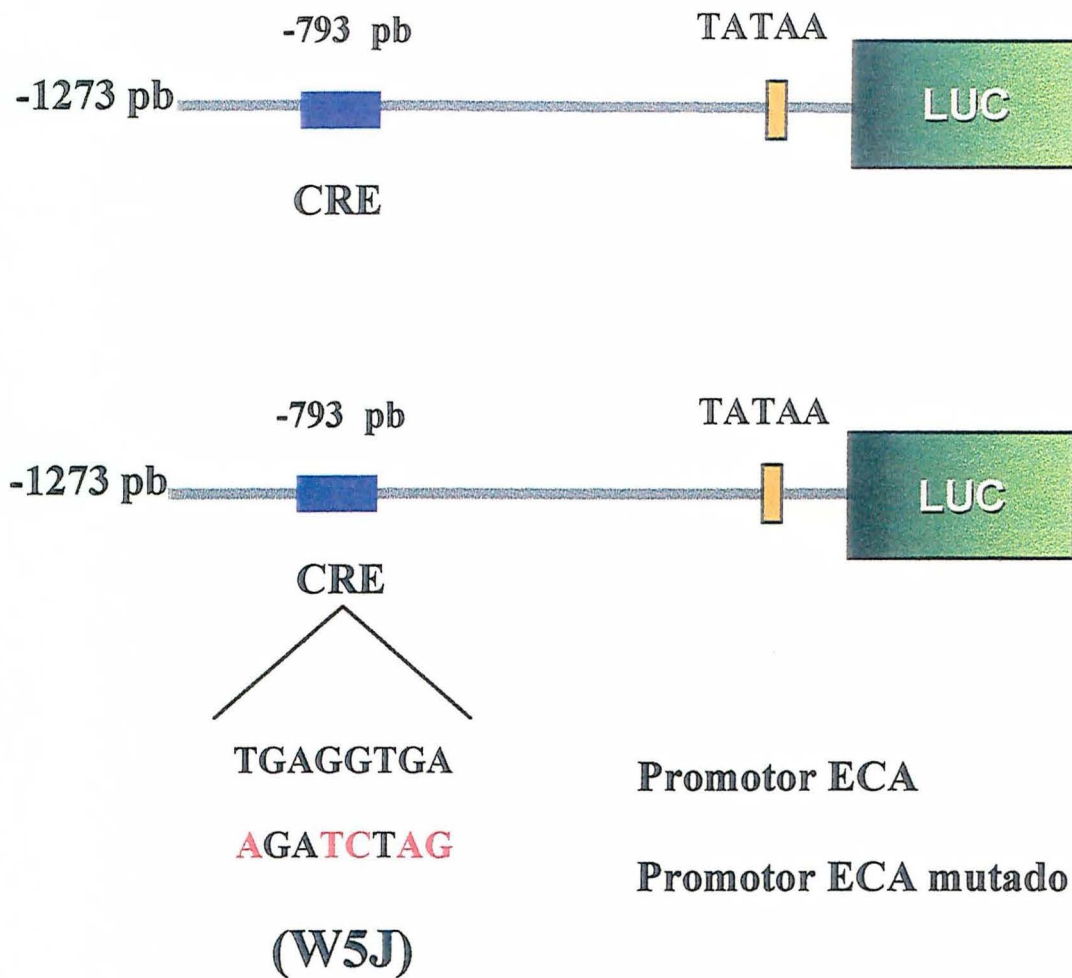


Figura 28A. Representação esquemática do promotor da ECA (W/Luc) contendo a mutação no CRE (W5J). Mutação localizada na região entre -1089 a -477pb.

Para cada mutante foi feito um grupo controle e outro tratado com isoproterenol. Os resultados apresentados na Figura 28B mostram que a expressão do promotor da ECA continua aumentando no grupo tratado com isoproterenol. Estes resultados indicam que a seqüência regulatória responsável pelo aumento na expressão da luciferase durante o tratamento com isoproterenol não é o elemento responsivo a AMPc (CRE).

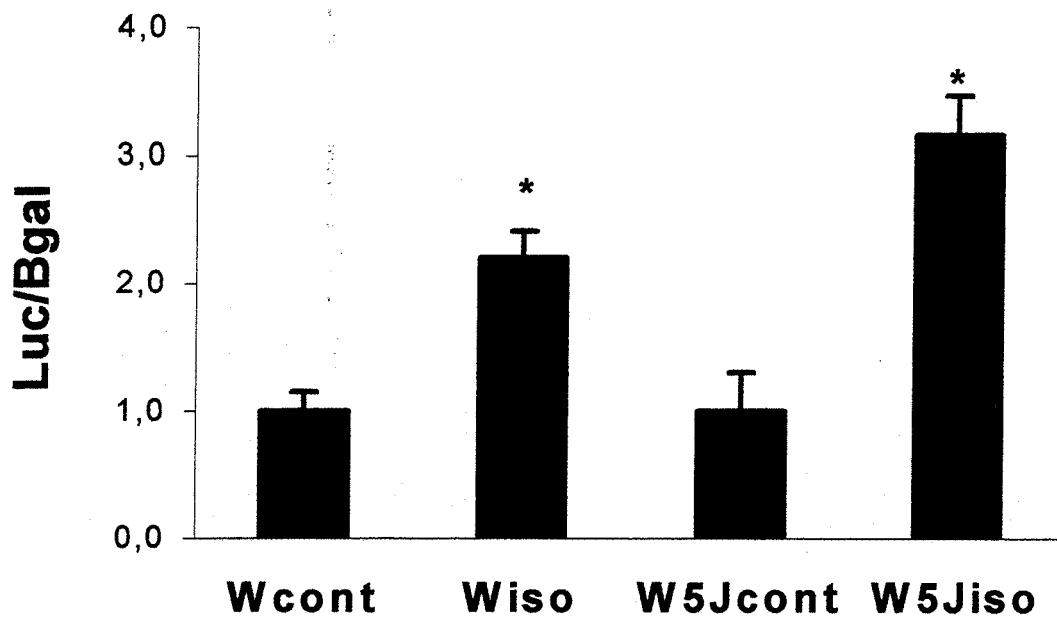


Figura 28B. Mutação no CRE (Elemento Responsivo a AMPc). W, promotor da ECA com -1273 pb (W/Luc). W5J, promotor da ECA com a mutação no CRE localizado na região entre -1089 a -477 pb (W5J/Luc). Os resultados representam a média \pm desvio padrão para n=6 em cada grupo. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Os principais achados no desenvolvimento desta tese indicam que seqüências regulatórias contidas no promotor da ECA (-1089 a -477pb) participam da ativação do gene durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no rato.

Para isto foi necessário:

1. Padronizar um método de análise de atividade da ECA tecidual de ratos;
2. Caracterizar a ativação do SRA e em particular da atividade e expressão da ECA em um modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol e
3. Utilizar ensaios de função de promotor baseados na análise de gene *reporter* (luciferase) para reproduzir a atividade do gene endógeno no fragmento utilizado e finalmente utilizar deleções progressivas do promotor para identificar as regiões regulatórias envolvidas através de técnica de injeção do “naked DNA” diretamente na parede do ventrículo cardíaco dos animais.

5.1 - Determinação fluorimétrica da atividade da enzima conversora de angiotensina I em tecidos de ratos.

A padronização de uma metodologia para determinação da atividade da ECA em diferentes tecidos de ratos foi essencial, pois serviu para caracterização das mudanças da atividade da ECA em vários tecidos importantes para a homeostasia cardiovascular durante o desenvolvimento de um quadro patológico caracterizado por hipertrofia cardíaca. Além disso, é importante salientar que a utilização desta metodologia vem sendo empregada em vários outros projetos no laboratório e em outros locais que procuram avaliar a regulação do SRA em situações fisiológicas e patológicas.

A atividade da ECA tem sido determinada por diferentes métodos (Bakhle, 1974; Soffer, 1976; Ondetti e Cushman, 1982). Os métodos mais empregados para determinar a atividade da enzima no soro, plasma ou extratos teciduais são os que utilizam substratos sintéticos, normalmente tripeptídicos com o grupo amino terminal bloqueado tais como o Z-phe-His-Leu, Hip-Gly-Gly e Hip-His-Leu, que são mais resistente à hidrólise por outras peptidases (Bakhle, 1974; Soffer, 1976; Ondetti e Cushman, 1982; Santos et al., 1985; Welsch et al., 1989; Busatto et al., 1999). A utilização de substratos naturais como angiotensina I e a bradicinina foi praticamente abandonado porque esses substratos são mais sensíveis à hidrólise por outras peptidases e são hidrolisados cerca de 20 vezes mais

lentamente pela ECA do que substratos sintéticos como Hip-His-Leu (Bakhle, 1974; Cheung e Cushman, 1973). A determinação fluorimétrica da atividade da ECA com substratos sintéticos, inicialmente descrita por Piquilloud et al. (1970), apresenta uma série de vantagens que torna esse tipo de ensaio bastante útil para a determinação da atividade da enzima em estudos experimentais, principalmente a sua simplicidade, reprodutibilidade e sua alta sensibilidade. Além disso a utilização de substratos sintéticos é economicamente mais viável.

Neste trabalho utilizamos como substrato o tripeptídeo Benzoil-Gly-His-Leu (Hip-His-Leu), que é um dos substratos mais usados experimentalmente para determinação da atividade da ECA (Cushman e Cheung, 1971a, 1971b; Lieberman, 1975; Friedland e Silvertein, 1976; Weaver et al., 1981; Mendelsohn et al., 1982; Ondetti e Cushman, 1982; Santos et al., 1985; Welsch et al., 1989; Grima et al., 1990; Busatto et al., 1999).

Para padronizarmos a atividade da enzima em diferentes tecidos de ratos utilizamos o método descrito anteriormente por Santos et al., (1985) para soro e plasma de ratos. Para isso utilizamos as mesmas concentrações de tampão borato, NaCl e pH que haviam sido sugeridas como condições ideais para a atividade da ECA. Nesse trabalho os autores mostraram que a atividade da enzima é maior na presença de tampão borato quando comparado ao tampão fosfato. Foi ainda determinado que o V_{max} e o K_m para a ECA e atividades dipeptidásicas na presença dos dois tampões em soro de ratos. Esses resultados mostraram que na presença de tampão borato aumenta o V_{max} e diminui o K_m para a ECA. Melhora, então, a atividade e aumenta a afinidade da enzima pelo substrato. Além disso os autores observaram uma menor atividade dipeptidásica quando o His-Leu foi utilizado como substrato na presença de tampão borato. Para essa enzima o V_{max} é maior e o K_m menor na presença do tampão fosfato quando comparado ao tampão borato. Esses resultados indicam que há uma proteção do dipeptídeo His-Leu que é formado, como produto da reação, durante a medida da atividade da ECA com tampão borato. A hidrólise do His-Leu poderia determinar uma subestimação da atividade da ECA porque, nas condições utilizadas para detecção do dipeptídeo His-Leu por fluorimetria, a leucina não apresenta fluorescência, enquanto que a intensidade de fluorescência produzida pela histidina é cerca de 8% da observada com o dipeptídeo His-Leu (Friedland e Silvestein, 1976; Mendelsohn et al., 1982; Santos et al., 1985). Baseados nestes resultados, que haviam sido demonstrados anteriormente (Santos et al., 1985), padronizamos uma metodologia para determinação da atividade da ECA em diferentes tecidos de rato.

Considerando que os tecidos de rato apresentam composições bioquímicas diferentes, investigamos inicialmente as interferências dos homogeneizados de tecidos com a

determinação do produto His-Leu. Na presença dos homogeneizados de pulmão, córtex e medula renal houve aumento na intensidade de fluorescência do produto modificando a inclinação da curva padrão. Esse aumento foi corrigido diluindo a amostra dez vezes em tampão borato com sacarose antes de ser incubada para medida da atividade da ECA (Figura 3). Para os demais tecidos não houve alterações na intensidade de fluorescência do produto.

Verificamos também que as amostras são estáveis nas condições do ensaio e não produzem produtos fluorescentes, pelo menos por 1 hora a 37 °C. A fluorescência medida no tempo zero e após a incubação foi somente a fluorescência intrínseca do tecido (Tabela 1). Como, nenhuma das amostras de tecido seriam incubadas por um tempo superior a esse, durante a medida da atividade da ECA, asseguramos a estabilidade da amostra nas condições do ensaio e a não formação de produtos capazes de reagir com o-ftaldialdeído, produzindo fluorescência. Resultados semelhantes foram obtidos para soro e aorta utilizando as mesma condições de ensaio para determinação fluorimétrica da atividade da ECA (Santos, 1983; Campagnole-Santos, 1986).

Uma das maiores críticas aos ensaios fluorimétricos que se baseiam na determinação de dipeptídeos, especialmente o His-Leu, é a possibilidade de sua hidrólise por dipeptidases do soro, plasma ou homogeneizados de tecidos (Bakhle, 1974; Friedland e Silverstein, 1976; Santos et al., 1985). Conforme comentado anteriormente essa hidrólise subestima a atividade da ECA. Neste trabalho investigamos, numa primeira etapa, a presença de dipeptidases nos tecidos de ratos Wistar (Figura 4A) e SHR (Figura 4B) incubados com tampão borato. As atividades dipeptidásicas foram encontradas somente para homogeneizados de fígado e foram parcialmente bloqueadas quando incubamos a amostra com 100 µM de PCMB, um inibidor de dipeptidases. Posteriormente, comparamos essas atividades na presença dos tampões borato e fosfato, uma vez que o fosfato (tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,3M, pH 8,0) é um dos tampões mais utilizados na literatura para medida da atividade da ECA (Cushman e Cheung, 1971a; Unger et al, 1982; Welsch et al., 1989; Grima et al., 1990). Os resultados apresentados na Figura 6A mostraram a presença de atividades que hidrolisam o dipeptídeo His-Leu, somente para o fígado, quando incubado com tampão borato. Essa hidrólise foi parcialmente bloqueada pela presença de PCMB. Na presença de tampão fosfato (Figura 6B) a hidrólise do dipeptídeo foi de 50% no rim, 8% no ventrículo, 65% no fígado e 5% no soro. Essa hidrólise, porém foi totalmente bloqueada na presença de PCMB. Estes resultados indicam que a atividade da ECA poderia estar sendo subestimada no fígado quando a amostra fosse incubada tanto em tampão fosfato quanto borato sem o uso de PCMB. A

atividade seria de 100% somente se incubássemos a amostra em tampão fosfato com PCMB. Ainda, para tecidos como rim, ventrículo e soro a atividade da ECA também seria subestimada se as amostras fossem incubadas em tampão fosfato sem PCMB. Unger et al. (1982) refere-se à impossibilidade de determinar a atividade da ECA em homogeneizado de fígado de ratos, porém os autores determinaram a atividade da enzima na presença de tampão fosfato sem PCMB. Apesar da atividade da ECA ser baixa no fígado, é mensurável se utilizarmos como meio de incubação tampão fosfato com PCMB. Sem haver, portanto, sem haver perda da atividade enzimática pela ação de dipeptidases. Santos et al. (1985), utilizando as mesmas condições experimentais (tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,3M pH 8,0), encontraram uma subestimação nos valores de atividade da ECA de 3,3% para soro humano e 23,2% para soro de ratos. A diferença de erro encontrada por esses autores se deve ao fato de terem sido avaliados, simultaneamente, as quantidades de produto (fluorimetria) e de histidina livre (análise de aminoácidos) ao final do período de incubação do substrato Hip-His-Leu com "pools" de soro humano e de ratos. Esse erro diminuiu para 1,6% e 6,3%, respectivamente, quando as concentrações de tampão fosfato foram aumentadas para 0,2M e NaCl para 0,9M e mantido o mesmo pH do meio de incubação. O aumento da concentração de fosfato e NaCl reduziu o erro produzido pelas dipeptidases, principalmente no soro de rato e aumentou a atividade da ECA.

Nossos resultados mostram que a presença de PCMB no meio de incubação é extremamente importante para reduzir as atividades dipeptidásicas. Além disso o tampão borato funciona como um protetor da hidrólise do His-Leu. A redução da atividade dipeptidásica em tampão borato está relacionada tanto com um aumento do K_m , como diminuição da V_{max} das dipeptidases (Santos et al., 1985).

É importante ressaltar que embora o alto nível de atividade dipeptidásica no soro e tecidos de rato seja um fator prejudicial para o ensaio fluorimétrico da ECA "in vitro", a capacidade do soro e tecidos hidrolisarem o dipeptídeo His-Leu e também outros dipeptídeos pode resultar em importantes implicações fisiológicas tanto no metabolismo proteico em geral como na própria modulação da atividade da ECA sistêmica e local, uma vez que o dipeptídeo His-Leu é um inibidor da atividade da ECA.

Para validação do ensaio enzimático foram realizados experimentos onde verificamos existir linearidade entre o tempo de incubação e a liberação do produto (Figura 7) e entre quantidades crescentes de amostra e a velocidade da reação enzimática (Figura 8) para ratos Wistar e SHR. A velocidade da reação foi linear em relação ao tempo de incubação para

todos os tecidos pelo menos por 30 minutos. Adotamos incubar todas as amostra de tecidos por 30 minutos, exceto pulmão e aorta, que foram incubados por 15 minutos, porque a velocidade de liberação do produto é muito alta, desta forma não havendo necessidade de diluirmos o produto final da reação para fazer a determinação fluorimétrica. É importante observar que para o fígado foi necessário a utilização de PCMB para obtermos uma linearidade na velocidade de liberação do produto em relação ao tempo de incubação. Com 20 μ l do homogeneizado a velocidade da reação foi linear para todas as amostras de tecidos. O fato de obtermos uma velocidade de reação constante, pelo menos por 30 minutos, indica que não ocorre a ação de dipeptidases nem inativação da enzima nas condições do ensaio. Poderia haver uma inativação significativa da enzima, nesse período de tempo, em decorrência da alta força iônica do meio de incubação (Santos, 1983).

A especificidade do ensaio enzimático para ECA foi demonstrada pela inibição de 98% da atividade da enzima na presença de um inibidor clássico da ECA, o enalaprilato, também denominado de MK-422 ou MK-diácido (é a forma ativa do MK-421, o enalapril; depende das atividades hidrolases do plasma e tecidos para converter o éster MK-421 no diácido mais ativo MK-diácido, sua forma de-esterificada) (Unger et al., 1982), indicando que a atividade enzimática determinada nesse ensaio se deve a enzima conversora. Outros inibidores como enalapril e captopril também podem ser utilizados para experimentos *in vitro* (Unger et al., 1982). Esses autores, porém mostraram que MK-422, *in vitro* apresenta uma potência de inibição maior que o captopril e o enalapril em diferentes tecidos. O MK-422 mostrou uma inibição de 15, 10, 8, 7 e 5 vezes maior para homogeneizados de rim, plasma, adrenal, cérebro e pulmão, respectivamente, quando comparado ao captopril. Além disso, o percentual de inibição com MK-422 foi diferente para cada tecido, sendo 3 vezes maior para o rim quando comparado ao pulmão. Tais diferenças de inibição provavelmente se devem ao enalaprilato apresentar um IC_{50} , para a ECA "in vitro", de 10, 5, 15 e 8 vezes menor para plasma, pulmão, rim e adrenal, respectivamente, quando comparado ao captopril. Com relação ao enalapril, a inibição da atividade da ECA foi observada com uma concentração de 4 μ M para o plasma e pulmão, 40 μ M para o cérebro e rim e para a adrenal a inibição máxima foi de 98%, com uma concentração também de 40 μ M do inibidor. Enquanto o MK-422 produziu uma inibição quase completa da enzima com uma concentração de 0,4 μ M para o plasma e todos os tecidos testados (Unger et al., 1982). Esses resultados também indicam que o cérebro, rim e adrenal podem apresentar uma menor atividade hidrolásica mostrando

uma menor capacidade de transformar o enalapril em enalaprilato, forma ativa do inibidor.

Ao utilizarmos esses inibidores *in vitro* é extremamente importante observar além da capacidade de inibição, a sua estabilidade nas condições do ensaio. O inibidor pode ser utilizado também para determinar o *background* da amostra, ou seja, o branco da amostra. A presença do MK-422 (3 μM) no meio de incubação, durante 60 minutos, inibiu 98% da atividade enzimática para todos os tecidos testados. Nossos resultados foram muito semelhantes aos encontrados por Unger et al., 1982; em plasma de rato, o MK-422 (4 μM) mostrou uma inibição da atividade enzimática de 100% e foi estável por 120 minutos. Porém, esses resultados foram diferentes para extrato de pulmão onde o MK-422 foi estável por apenas 24 minutos. A inibição com enalapril aumentou com o tempo, atingindo o máximo de 93 % entre 60 e 75 minutos e aumentando levemente a atividade da enzima com 120 minutos de incubação. O captopril causou uma inibição de 97%, porém foi estável por somente 24 minutos de incubação e sua potência de inibição caiu rapidamente para 40% permanecendo até 120 minutos de incubação (Unger et al., 1982).

A especificidade do ensaio para ECA pode ser demonstrada pelo uso de outros inibidores da ECA como por exemplo o pentapeptídeo, L-piroglutamil-L-lisyl-L-triptofil-L-alanil-L-prolina (SQ 20475). Esse peptídeo foi isolado do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*) e inicialmente mostrado como um fator potenciador da bradicinina (Ferreira, 1965) e mais tarde observou-se que era um potente inibidor da enzima conversora (Ferreira et al., 1970). A atividade da ECA pode ser inibida também pelo uso de EDTA no meio de incubação. A completa inibição da atividade da enzima em extrato de pulmão de coelho foi demonstrada com 0,1mM de EDTA (Cushman e Cheung, 1971a). A atividade da enzima foi restaurada em 100% com o uso de 200 μM de ZnCl_2 , mostrando que a ECA é uma metaloproteína (Cushman e Cheung, 1971a). Uma outra forma de demonstrar a especificidade do ensaio para a ECA é retirar o NaCl do meio de incubação, porque a enzima apresenta uma dependência funcional de íons cloro. Os trabalhos originais sobre o estudo da ECA (Skeggs et al., 1954;1956) sugerem a dependência de íons cloro para atividade da enzima. O mecanismo de ativação da ECA pelos íons cloro ainda é pouco conhecido, mas provavelmente depende da interação do íon com um resíduo de lisina próximo ao sítio ativo da enzima (Weare, 1982), causando uma mudança conformacional na estrutura da enzima e facilitando sua interação com o substrato (Oshima et al., 1974).

Nossos resultados mostraram que a atividade da ECA foi maior quando a enzima era

incubada na presença de tampão borato, quando comparados em presença do tampão fosfato (Figura 10). Resultados semelhantes foram observados para soro de rato e humano (Santos et al., 1985). Estes autores também mostraram que aumentando as concentrações de tampão fosfato de 0,1M para 0,3 e 0,4M a atividade da ECA diminui 52 e 63 %, respectivamente. Por outro lado, aumentando as concentrações de tampão borato de 0,1M para 0,3 e 0,4M a atividade da ECA aumenta 11 e 17%, respectivamente. Esse experimento foi realizado com soro de ratos, mantendo as concentrações de NaCl 0,9M e pH 8,3, próximas às concentrações ótimas para a enzima. A inibição da atividade da ECA na presença de tampão fosfato já havia sido relatado anteriormente (Dorer et al., 1976; Oshima e Nagasawa, 1977; Cushman e Ondetti, 1980) e, possivelmente, se deve às propriedades quelantes de orto e polifosfatos. Os fosfatos podem inibir a atividade da ECA por interagirem com o zinco. Santos et al (1985), sugerem que a inibição observada em tampão fosfato esteja relacionada com alterações da reação “hidrolítica” (redução da V_{max} , ou mais propriamente da relação V_{max}/K_m) e não decorrente de alteração da afinidade da enzima pelo substrato. Assim, com a substituição de tampão fosfato 0,1M por igual concentração de tampão borato, observaram que o K_m não se alterava significativamente enquanto que a V_{max} aumentou aproximadamente 70%. O aumento da atividade da ECA se deve a uma possível ativação aniônica da enzima pelo íons borato ou ainda pode estar relacionada com alterações conformacionais da enzima, decorrentes da interação do borato (na forma ácida) com carboidratos constituintes da molécula da ECA (Santos, 1983).

Também investigamos a possibilidade de um aumento da atividade da ECA pelo uso de detergente (Figura 10). Nesse experimento a atividade da ECA foi medida em tampão borato com tecidos homogeneizados com 0,1 % de Triton X-100. Os resultados mostraram um aumento de 20% na atividade da enzima somente no homogeneizado de pulmão. Uma vez que o detergente remove a enzima da membrana da célula é possível que esse resultado esteja relacionado com o fato do pulmão ser o maior sítio de síntese da ECA. Welsch et al. (1989), mostraram que na ausência de triton a atividade da ECA representa somente 15-30% da atividade obtida na presença do detergente para medula, córtex, túbulo e glomérulo renal de coelho. A diferença destes resultados quando comparados aos nossos podem estar relacionados a concentração de triton utilizada que foi 3 vezes maior que as usadas em nossos experimentos, além disso esses resultados foram encontrados em rim de coelhos e não de ratos.

Nossos resultados mostraram que as amostras podem ser estocadas a -20°C e -80°C

pelo menos por 30 dias (Tabela 2), sem alterar a atividade da enzima. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura. Resultados semelhantes foram mostrados para soro, quando dosados no dia da coleta e 30 dias após (Santos et al., 1985). Cushman e Cheung, 1971, mostram que a atividade da ECA foi estável em extrato de pulmão de coelho por 6 meses quando estocados a 5 °C.

A atividade da ECA foi comparada entre os diferentes tecidos de ratos Wistar e SHR, embora esse não fosse o objetivo do trabalho (Figura 11). Os resultados mostraram que atividade da ECA foi menor no córtex renal, ventrículo, átrio e soro, maior no pulmão e aorta e não apresentaram diferenças na medula renal, adrenal e fígado, quando amostras de tecidos de SHR foram comparados com ratos Wistar. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados para plasma e coração de ratos com 11 semanas de idade (Grima et al., 1990). Rosenthal et al., (1987) mostrou que a atividade da ECA no ventrículo estava reduzida em SHR adultos e essa diferença manteve-se na hipertrofia cardíaca. Nossos resultados mostraram um aumento na atividade da aorta e outros autores também encontraram resultados semelhantes (Matsushima et al., 1988 e Okunishi et al., 1991), assim como para o plasma (Okunishi et al., 1991). Outros autores mostraram que não há diferenças na atividade da enzima para a aorta (Grima et al., 1990). A atividade da ECA vascular aumentada em ratos espontaneamente hipertensos pode ser um fator importante no desenvolvimento e manutenção da sua hipertensão. Nossos resultados para o pulmão foram diferentes dos encontrados por Grima et al., 1990, esses autores mostraram que não há diferenças e uma diminuição na atividade da enzima para ratos com 8 e 11 semanas de idade, respectivamente. Para o rim nossos resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura (Grima et al., 1990 e Okunishi et al., 1991) e diferente dos resultados encontrados para ratos com 20 semanas de idade, onde a atividade da enzima foi menor para SHR (Okunishi et al., 1991). As diferenças encontradas entre nossos resultados e os dados da literatura podem estar relacionados com diferenças metodológicas devido ao uso de diferentes substratos (Hip-His-Leu e Cbz-Phe-His-Leu), aos métodos de ensaio (fluorimétrico e cromatografia líquida de alta performance-HPLC) utilizados no desenho experimental e, finalmente, ao fato de existirem diferenças genéticas entre os diferentes animais investigados.

As variações na atividade da ECA, não somente entre os tecidos mas também entre SHR e Wistar, podem ser devido as mudanças nas concentrações da enzima ou nas características bioquímicas dos tecidos. Essas diferenças, ainda, podem estar relacionadas com as variabilidades biológicas e genéticas das duas linhagens de animais estudados. Nossos

dados indicam que os mecanismos regulatórios atuam de forma diferente e sugerem que o sistema renina angiotensina desempenha diferentes funções em cada tecido.

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que o uso do tampão borato para detecção fluorimétrica do dipeptídeo His-Leu é altamente sensível, rápido, simples e seguro para a determinação da atividade da ECA no soro ou homogeneizado de tecidos de ratos. Embora não tenham sido investigados, nossos resultados sugerem que essa metodologia pode ser utilizada para determinação da atividade da ECA em frações subcelulares, devido à sua alta sensibilidade.

5.2 - Caracterização do Sistema Renina Angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

Os resultados apresentados neste trabalho mostram evidências de que a hipertrofia cardíaca induzida pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos, através do tratamento com isoproterenol, podem modular a atividade da ECA em diferentes tecidos e aumentar a expressão da enzima e do promotor da ECA no coração.

O Sistema Renina Angiotensina é reconhecido como um importante regulador hormonal da homeostase cardiovascular (Dzau, 1987; Dzau e Re, 1994). O controle do SRA circulante está bem estabelecido na literatura. Sabe-se que a secreção de renina pelas células justa-glomerulares das arteríolas aferentes dos glomérulos renais é regulada por estimulação simpática, fluxo sanguíneo renal e pela mácula densa. Estes três fatores regulam a secreção de renina da seguinte forma: 1) Um aumento na atividade das fibras nervosas simpáticas que inervam as arteríolas aferentes e eferentes estimula a liberação de renina. 2) A arteríola aferente comporta-se como um barorreceptor. Quando a pressão de perfusão renal diminui, a secreção de renina é estimulada. Por outro lado, o aumento da pressão de perfusão inibe a liberação de renina. 3) A mácula densa também regula a secreção de renina. Por exemplo, se a carga de NaCl ao nível da mácula densa estiver diminuída, a secreção de renina irá aumentar. Por outro lado a carga aumentada de NaCl na mácula densa inibe a liberação de renina (Berne e Levy, 1990). A renina uma vez liberada dispara uma cascata de reações, conforme descrito na introdução, aumentando a concentração plasmática de Ang II, que é produzida principalmente na circulação pulmonar onde a ECA encontra-se em alta concentração nas células endoteliais. A Ang II, produto final da cascata bioquímica, atuando sobre receptores específicos localizados na membrana plasmática de diferentes órgãos alvo pode mediar várias funções importantes. Porém, mesmo bloqueando este mecanismo

sistêmico, vários efeitos da A II ainda se encontram presentes em alguns tecidos. Essa visão clássica do SRA como um sistema endócrino, nos últimos 15 anos, está se modificando com a demonstração de SRA locais em vários tecidos. No tecido cardíaco já foi demonstrada a presença dos componentes do SRA, tais como angiotensinogênio, renina, ECA e receptores para a Ang II (Dzau, 1988b; Lindpaintner e Ganten, 1991), os quais sugerem evidências para uma ação parácrina e autócrina da Ang II. Pouco se sabe, entretanto, sobre os mecanismos de controle destes SRA locais. Para entendermos estes sistemas locais temos que saber como são regulados os genes que compõem o SRA em cada tecido em diferentes condições fisiológicas ou patológicas. Neste trabalho estudamos localmente a atividade, a expressão e a regulação do promotor de um dos componentes do SRA, a enzima conversora de Ang I, em um processo patológico como a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

O tratamento com isoproterenol, uma catecolamina sintética, por 7 dias (0,3 mg/Kg/d, sc) resultou em uma hipertrofia de 36% no VE e um aumento na atividade da ECA local de 67%. Resultados semelhantes quanto à hipertrofia são descritos na literatura (Taylor e Tang, 1983, Tang e Taylor, 1996; Busatto et al., 1999), mesmo quando a droga utilizada é hidrossolúvel e necessita mais de uma dose diária (Trindade et al., 1992). Taylor e Tang, 1983, demonstraram que o peso ventricular aumentou significativamente a partir do segundo dia de tratamento com isoproterenol e atingiu o nível máximo de 44% de hipertrofia com 8 dias e manteve-se em *steady-state* até os 12 dias de tratamento. Mostraram, ainda, que 50% do crescimento máximo do miocárdio foi atingido com 3,6 dias, nesta condição de tratamento. Esse rápido aumento do peso do VE não se deve a edema, uma vez que o percentual de água foi estável até os 12 dias de tratamento. A administração de uma dose menor de isoproterenol (0,02 mg/Kg/d) por 13 ou 31 dias mostrou um aumento do peso seco do ventrículo de 14% e 26%, respectivamente (Alderman e Harrison, 1971), portanto estes dados confirmam que a hipertrofia induzida por isoproterenol não se deve a edema cardíaco.

O isoproterenol, mesmo em pequenas doses, produz algumas alterações no miocárdio como necrose dos miócitos, que é seguida de um aumento na população de células fibroblásticas e fibrose da matriz extracelular na região subendocárdica (Benjamin et al., 1989; Pick et al., 1989). Porém baixas doses quando infundidas por um tempo mais prolongado (bomba osmótica) podem produzir fibrose miocárdica sem gerar necrose significativa nos miócitos, isto porque o tratamento com injeção subcutânea (em bolus) resulta em um aumento agudo nos níveis plasmáticos de isoproterenol (Benjamin et al., 1989). Para obtermos resultados semelhantes injetamos a droga diluída em óleo, resultando

em absorção mais lenta. No miocárdio de ratos 85% do colágeno encontrado é do tipo I e 11% do tipo III e são produzidos por fibroblastos sendo que os miócitos não participam deste processo (Eghbali et al., 1988). Os mecanismos reponsáveis pelo aumento na produção de colágeno em resposta ao tratamento com isoproterenol não estão bem esclarecidos, mas com certeza não são simplesmente o resultado da necrose dos miócitos. A hipertrofia se deve mais a um aumento da carga cardíaca ou a uma resposta reativa a estimulação β -adrenérgica do que uma compensação pela perda de miócitos (Benjamin et al., 1989).

É importante salientar que o tratamento com pequenas doses de isoproterenol não produziram alterações na pressão arterial média (Figura 12). Isto está de acordo com a idéia de que este modelo não é dependente de sobrecarga hemodinâmica. Entretanto, dados recentes de nosso laboratório mostram que nas primeiras 8 hs após a injeção de Iso ocorre um aumento significativo do débito cardíaco às custas de um aumento da frequência cardíaca. Desta forma, a idéia de que este modelo de hipertrofia é hemodinamicamente independente deve ser examinado com maior cuidado.

Com relação a atividade da ECA, uma publicação recente utilizando a mesma dose e tempo de tratamento com isoproterenol, mostrou resultados diferentes (Busatto et al., 1999). Para um grau de hipertrofia de 38%, bastante semelhante aos nossos resultados, os autores encontraram um aumento na atividade da ECA de 39%, utilizando a mesma técnica para dosagem da enzima. Esta diferença discrepante pode ser devido a concentração de proteína utilizada na dosagem da enzima, possivelmente fora da linearidade da reação. Foram incubados 100 μ l de homogeneizado de VE, diluído cinco vezes. Nossos resultados apresentados na Figura 8 (Curva de Proteína) mostram que a reação foi linear até 200 μ g (50 μ l) de proteína de uma amostra que foi diluída 10 vezes. A disparidade observada pode ser devido a determinação da atividade da ECA fora da linearidade da reação.

É de fundamental importância ressaltarmos os dados observados na Figura 19 C, que mostram uma correlação positiva entre o grau de hipertrofia cardíaca e a atividade ECA no VE, sugerindo uma indução proporcional do SRA intracardíaco. Um grau de correlação semelhantes foi descritos por Grimm et al., 1998, porém estes autores utilizaram uma dose maior (150 mg/Kg/d) e um tempo mais prolongado (2 semanas) de tratamento com de isoproterenol. Com doses maiores da droga podem ocorrer regiões com micro infartos no sub-endocárdio e no endocárdio. Os resultados da caracterização histomorfológica dos corações tratados com isoproterenol demonstraram uma extensiva quantidade de cardiomiócitos com

necrose e fibrose reparativa, semelhante a que ocorre após infarto do miocárdio experimental, verificada principalmente no VE (Grimm et al., 1998). No tecido cicatricial fibrótico, da zona de infarto, a atividade e a expressão da ECA é muito elevada (Falkenhahn et al., 1995; Passier et al., 1995; Busatto et al., 1997). Com essa dose de isoproterenol a correlação entre a atividade da ECA e a hipertrofia pode ser devido a regiões com micro infartos. Uma correlação positiva entre a hipertrofia cardíaca e a expressão da ECA foi demonstrada para um modelo de hipertrofia induzido por “aortocaval shunt” ou “shunt” arterio-venoso (anastomose aortocaval) (Iwai et al., 1995). Também foi demonstrado um aumento de Ang II local na hipertrofia induzida por isoproterenol (Nagano et al., 1992; Nagano e Ogihara, 1994). Essa modulação da ECA durante a hipertrofia cardíaca pode influenciar na formação de Ang II local contribuindo para a manutenção da hipertrofia cardíaca.

O tratamento com isoproterenol também aumentou a atividade da ECA no pulmão e no rim, mas manteve-se inalterada no plasma, enquanto a atividade da renina plasmática aumentou 130%. Vários autores demonstraram aumento na atividade da renina plasmática pelo tratamento com isoproterenol (Nagano et al., 1992; Nagano e Ogihara, 1994; Golomb et al., 1994; Boluyt et al., 1995; Holmer et al., 1997; Grimm et al., 1999), e também *in vitro*, em fatias de rim de rato o isoproterenol aumenta a liberação de renina (Capponi et al., 1977). Ainda foram observados aumentos no RNAm de renina renal (Holmer et al., 1997) e cardíaca (Iwai et al., 1996) pelo tratamento com isoproterenol.

Com o intuito de separar a ativação do SRA circulante do local, utilizamos de forma interessante uma sobrecarga salina (iniciada 7 dias antes da injeção com isoproterenol). O tratamento com uma dieta rica em sal inibiu o SRA circulante e previniu o seu aumento pelo tratamento concomitante com isoproterenol, conforme pode ser observado na Figura 14. A atividade da renina plasmática foi quase totalmente bloqueada pela dieta hiperbólica e o tratamento com isoproterenol não induziu aumento na atividade da enzima. Resultados semelhantes foram obtidos por Holmer et al., 1997, com infusão de isoproterenol (40 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{h}$) durante 40 horas. Porém, quando os animais foram submetidos a dieta rica em sal e tratados com isoproterenol, a atividade da renina plasmática continuou aumentada, mas numa magnitude muito menor que o grupo controle (salina). É possível que este resultado tenha sido diferente porque a dose de isoproterenol utilizada foi maior do que em nossos experimentos. Mesmo com o SRA inibido o tratamento com isoproterenol resultou em hipertrofia do VE e aumento da atividade da ECA no coração e no pulmão. Allard et al., 1990, também demonstraram que o tratamento com isoproterenol induz hipertrofia tanto com

dieta pobre como rica em sal. Estes resultados sugerem que a ativação do SRA local desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção da hipertrofia cardíaca e possivelmente é regulado independente do SRA sistêmico.

Outras evidências de que o SRA local é regulado independente do SRA sistêmico foram mostradas utilizando o mesmo modelo de hipertrofia cardíaca (Nagano et al., 1992; Nagano e Ogihara, 1994). O tratamento com isoproterenol (4,2 mg/Kg/d) induziu hipertrofia do VE, aumento na atividade da renina plasmática e nas concentrações de Ang II vascular e cardíaca. Para testar a possibilidade de que a Ang II fosse proveniente do plasma ou do tecido cardíaco os animais foram submetidos a nefrectomia bilateral (inibindo o SRA circulante) e tratados com isoproterenol. Os resultados mostraram que a atividade da renina plasmática e da Ang II circulante foram significativamente diminuídas pela nefrectomia, mas as concentrações de Ang II cardíaca não sofreram alterações. Nos animais nefrectomizados, o tratamento com isoproterenol induziu hipertrofia do VE e aumento na Ang II cardíaca, similar ao grupo com cirurgia fictícia e não aumentou a Ang II plasmática e vascular. A Ang II cardíaca parece estar mais relacionada com a hipertrofia do VE do que a Ang II plasmática. Estes resultados estão de acordo com os nossos dados. Mesmo inibindo o SRA circulante o tratamento com isoproterenol induz hipertrofia, possivelmente devido ao aumento na atividade e expressão da ECA aumentando os níveis de Ang II local, portanto ativando o SRA intracardíaco. Ainda, os resultados apresentados por Nagano e Ogihara, 1994, mostraram que o tratamento com isoproterenol resulta em hipertrofia do VD e átrios, a qual não está relacionada com a elevação nos níveis de Ang II tecidual. A função da Ang II no VD e átrios pode ser diferente do VE, demonstrando um papel patofisiológico alternativo para o SRA cardíaco.

Utilizando um modelo de hipertrofia por sobrecarga de volume (anastomose aortocaval), onde o SRA circulante não está ativado, os autores estudaram o SRA cardíaco (Iwai et al., 1995). Nos animais com hipertrofia a atividade da ECA e da renina plasmática foram semelhantes ao grupo controle com 7 e 40 dias após a cirurgia. Uma correlação significativa foi observada, porém, entre os níveis de expressão da ECA no coração e a hipertrofia do VE (PVE/PC). A expressão da ECA aumentada no ventrículo com hipertrofia pode permitir um aumento na formação de Ang II ou degradação da bradicinina e contribuir para a manutenção deste tipo de hipertrofia. Foi demonstrado que a bradicinina reduz a síntese de colágeno e aumenta a atividade da colagenase em fibroblastos cardíacos adulto

(Zhou et al., 1993). Por outro lado, a Ang II não é somente um peptídeo vasoativo mas também um fator de crescimento e foi demonstrado promover a proliferação de fibroblastos (hiperplasia) e regular o crescimento de miócitos cardíacos (hipertrofia) (Sadoshima e Izumo, 1993).

O tratamento com isoproterenol aumentou a atividade (36%) e a expressão da ECA (58%) no tecido cardíaco (Figura 21) podendo resultar em elevação nas concentrações de Ang II local, conforme demonstrado também por Nagano e Ogihara, 1994. Um aumento no RNAm e na atividade da ECA de ratos com diferente modelos de indução de hipertrofia cardíaca sugerem que a resposta hipertrofica está diretamente associada com a enzima conversora de angiotensina I. Estes dados corroboram a correlação que existe entre o grau de hipertrofia cardíaca e a atividade da ECA, demonstrados anteriormente.

A hipertrofia do VE induzida por isoproterenol pode estar relacionada com a elevação nas concentrações de Ang II no tecido cardíaco, resultante do aumento na atividade e expressão da ECA. A Ang II produzida intracelularmente pode ser exportada e exercer uma ação parácrina ou permanecer dentro da célula e realizar um efeito autócrino (Robertson e Khairallah, 1971; Dostal et al., 1994). A Ang II exerce um efeito proliferativo sobre os miócitos cardíacos podendo ser um dos fatores que regulam o crescimento dos cardiomiócitos. É possível, ainda, que a Ang II se ligue a sítios de ligação para Ang II na membrana nuclear dos miócitos cardíacos através de um mecanismo autócrino estimulando a transcrição e a síntese proteica (Robertson e Khairallah, 1971). Um SRA cardíaco autócrino foi postulado baseado na possibilidade de que essa interação nuclear poderia permitir a Ang II ser sintetizada e ativada na mesma célula (Lindpaintner e Ganten, 1991). Portanto, mecanismos parácrino e autócrino podem ser os responsáveis pelo início da resposta hipertrofica induzida por isoproterenol.

A Ang II apresenta um efeito trófico sobre os miócitos (aumentando a síntese de proteínas sem aumentar a síntese de DNA) e mitogênico sobre não miócitos, o qual foi determinado pelo aumento na incorporação de fenilalanina e na captação de timidina pelos fibroblastos e confirmado pelo aumento no número de células (Sadoshima e Izumo, 1993) o que pode estar relacionado com um aumento de 28% no diâmetro dos miócitos (Figura 20) nos animais que foram tratados com isoproterenol. Este aumento no diâmetro dos miócitos pode em parte estar relacionado com a síntese de proteínas sarcoméricas, aumentando o número de sarcômeros em paralelo e levando a uma hipertrofia do tipo concêntrica (Anversa et al., 1986). Conforme demonstrado por Chien et al., 1991, um aumento no RNAm da α -

miosina de cadeia leve e da α -actina cardíaca, proteínas contráteis que são expressas constitutivamente no miocárdio, pode levar a um acúmulo quantitativo destas proteínas no miócito durante a hipertrofia

No processo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca são observadas modificações de proteínas que participam de diversas funções no miocárdio como contração, relaxamento, remodelagem e endócrinas. Algumas destas alterações são muito semelhantes às etapas características da fase de desenvolvimento do órgão durante o período fetal e perinatal, sendo pois estas respostas chamadas de “reprogramação fetal”. Um dos principais marcadores de fenótipo fetal em miócitos cardíacos é o fator natriurético atrial (ANF). No coração adulto normal a expressão do gene que codifica o ANF está restrita ao átrio, enquanto que em corações de pacientes com insuficiência cardíaca (Feldman et al., 1991) ou animais de experimentação submetidos a sobrecarga de volume ou pressão no ventrículo (Chien et al., 1991). Também pela infusão de Ang II (Sadoshima e Izumo, 1993; Kim et al., 1995) e isoproterenol (Boluyt et al., 1995) existe indução da expressão do gene do ANF no ventrículo. Nossos resultados mostraram um aumento de 4,7X na expressão do ANF (Figura 22), que foram semelhantes aos demonstrados na literatura neste mesmo modelo de hipertrofia (Boluyt et al., 1995). É importante ressaltarmos que a expressão deste fenótipo fetal não se deve a geração de novos miócitos, porque não ocorre replicação do DNA em miócitos cardíacos adultos, mesmo durante a hipertrofia. A reprogramação fetal não está obrigatoriamente relacionado com o rápido aumento na massa miocárdica porque o hipertireoidismo causa graus comparáveis de hipertrofia sem induzir fenótipo fetal (Izumo et al., 1988; Kim et al., 1995). Especula-se que o ANF pode participar da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia, embora o significado fisiológico deste aumento de expressão do ANF no ventrículo ainda permaneça desconhecido. Talvez uma forma de utilizar este dado tenha sido a descrita no infarto do miocárdio experimental onde ocorre aumento de ANF no plasma e foi demonstrada uma correlação positiva entre o tamanho do infarto e a pressão diastólica final no VE, enfatizando o valor deste parâmetro como um índice seguro de prejuízo hemodinâmico na insuficiência cardíaca experimental (Riegger et al., 1987).

Os resultados apresentados por Boluyt et al., 1995, mostram que o tratamento com isoproterenol (2,4 mg/Kg/d) induziu a alterações na expressão de outros genes de programa fetal. Foi observado um aumento na expressão de duas isoformas de proteínas contráteis de fenótipo fetal, α -actina esquelética e β -miosina de cadeia pesada. Redução na expressão da

Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumento na expressão da fibronectina, uma proteína da matriz extracelular e aumento na expressão do TGF-β1, um fator de crescimento multifuncional que regula o crescimento celular, induz a proliferação de fibroblastos, aumenta a produção de componentes da matrix extracelular e estimula sua incorporação na matrix, o que pode ser um importante componente da resposta fibrótica observada na hipertrofia induzida por isoproterenol, possivelmente contribuindo para o crescimento de miócitos e a remodelagem do miocárdio. O tratamento com propranolol resultou em diminuição na expressão da fibronectina, inibiu totalmente a resposta do TGF-β1 e da SERCA, mas não foi observado nenhum efeito sobre a α-actina esquelética. Estes resultados, portanto, sugerem que a estimulação dos receptores β-adrenérgicos com isoproterenol não foi completamente bloqueada por propranolol ou pode resultar em liberação de substâncias autócrinas, parácrinas e endócrinas que podem levar a essa resposta, como a Ang II.

Estes resultados de caracterização do SRA são consistentes com a idéia de que a resposta de hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com isoproterenol, se acompanha do aumento no diâmetro dos miócitos e ativação do SRA local através do aumento da expressão e da atividade da ECA cardíaca e ocorre mesmo na ausência da ativação do SRA sistêmico.

5.3 - Mapeamento das seqüências regulatórias do gene da ECA no VE de ratos com hipertrofia cardíaca induzida por Isoproterenol

Nossos resultados mostram uma clara associação entre a ativação do SRA local, mais especificamente da ECA, e o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. Estes dados associados a inúmeras evidências clínicas e experimentais que mostram que os inibidores da ECA reduzem a hipertrofia cardíaca sugerem fortemente a participação do SRA local na gênese da hipertrofia. Isto nos motivou a caracterizar melhor o mecanismo molecular pelo qual o gene da ECA é ativado nestas circunstâncias. Para fazermos esse estudo, uma molécula de DNA recombinante contendo a região promotora do gene da ECA (contém as seqüências regulatórias ou o painel de interruptores que ligam e desligam o gene) ligado a luciferase (gene *repórter*) foi injetada diretamente na parede do VE de ratos.

Para avaliarmos o sucesso da transfecção e localizarmos qual o tipo celular que estava captando o DNA foi transfectado o vetor pSVβ-gal diretamente na parede do VE de ratos.

Após 7 dias os animais foram sacrificados e coração removido para serem feitos os cortes histológicos. O ensaio colorimétrico para β -galactosidase demonstrou que as células que estão captando o DNA são os miócitos, conforme pode ser observado na Figura 25. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada na literatura (Nabel et al., 1989; Wolff et al., 1990; von Harsdorf et al., 1993; Aoki et al., 1997)

Os resultados do sequenciamento das 1273 bases do promotor do gene da ECA mostrou que existem várias seqüências com potencial de participar do processo de controle da expressão do gene da ECA frente a diferentes estímulos fisiológicos ou patológicos.

Com o objetivo de identificarmos se elementos regulatórios que participam desta resposta estão presentes no fragmento de 1273 pb estudados, o vetor W/Luc foi injetado na parede do VE e os animais foram tratados com isoproterenol ou veículo. Os resultados apresentados na Figura 26B mostram um aumento de 3,5X na atividade da luciferase. Estes resultados indicam que na região promotora do gene da ECA investigado, existe uma ou mais seqüências regulatórias importantes que estão sendo responsáveis pelo aumento na expressão do gene da enzima durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Resultados recentes de nosso laboratório mostraram um aumento na expressão do promotor da ECA por estimulação β -adrenérgica, através do tratamento com isoproterenol e IBMX (isobutil metilxantina) e também com AMPc em células endoteliais de aorta de coelho (REC) (Xavier-Neto et al., 1999). Estes resultados estão em concordância com estudos que demonstram que diante de processos proliferativos no coração e vasos (Krieger et al., 1994; Morishita, et al., 1994) há aumento da ECA local. Além disso a transfecção de um vetor de expressão com cDNA da ECA humana em artéria carótida de ratos, através do método de lipossomos, resultou em aumento na atividade da ECA vascular que levou a uma elevação na síntese de DNA vascular, conteúdo de proteína e hipertrofia da camada média do vaso, através da produção autócrina/parácrina da Ang II. A transfecção local do vetor da ECA no vaso não resultou em efeitos sistêmicos tais como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e atividade da ECA no soro. Os autores postularam que o aumento na expressão da ECA vascular induziu a hipertrofia vascular pelo aumento na síntese local de Ang II na parede do vaso, independente de fatores sistêmicos e efeitos hemodinâmicos (Morishita et al., 1994; Dzau, 1994). Os mesmos autores demonstraram que a transfecção do vetor da ECA "in vitro", em células musculares lisa, modula o crescimento vascular também pela ação autócrina/parácrina da Ang II (Morishita et al., 1993).

Para mapearmos as seqüências regulatórias localizadas no promotor da ECA que estavam sendo responsáveis pelo aumento da atividade da luciferase, injetamos os vetores com deleções progressivas da seqüência completa de 1,3 Kb do promotor, conforme esquema ilustrado na Figura 27A. O mapeamento das seqüências regulatórias é feito comparando-se a expressão dos diversos fragmentos. Desta forma se a retirada de uma região resultar em aumento da expressão, isto se deve à remoção de uma região contendo uma ou mais seqüências regulatórias negativas. Ao contrário, se a retirada de uma região estiver associada a diminuição da expressão, isto sugere que uma ou mais seqüências regulatórias positivas estão contidas na região retirada. Os resultados mostraram que o tratamento com isoproterenol aumentou significativamente a expressão da luciferase nos animais injetados com os fragmentos de -1273/Luc e -1089/Luc pb. Estes resultados indicam que as seqüências regulatórias importantes para a ativação do gene da ECA durante o desenvolvimento da hipertrofia estão localizados entre o intervalo de -1089/Luc a -477/Luc pb no promotor do gene da ECA. Esta metodologia, tem sido bastante utilizada para estudos da regulação de diversos genes recebendo diferentes estímulos e podemos citar como exemplos o gene da renina (Tamura et al., 1994), Ca^{2+} -ATPase (Fisher et al., 1993), ANF (Cornelius et al., 1997) e do hormônio do crescimento (Petersenn et al., 1998).

A via de sinalização intracelular do agonista isoproterenol sobre o receptor β -adrenérgico aumenta os níveis de AMPc dentro da célula. Pelo menos duas categorias de seqüências responsivas ao AMPc são conhecidas, as do tipo CRE (cyclicAMP Responsive Element) e as do tipo AP2 (activating protein-2), portanto essas duas seqüências podem estar sendo responsáveis pela ativação do promotor da ECA. Através da análise na seqüência de nucleotídeos do promotor da ECA (1273 pb) foram identificadas pelo menos duas regiões contendo seqüências responsivas a estimulação por AMPc (-131 a -232 e a outra -510 a -809 pb) e três seqüências consensuais do tipo AP2. Na região do promotor que aumenta a expressão durante o desenvolvimento da hipertrofia (-1089/Luc a -477/Luc pb) encontra-se uma seqüência AP2 e um elemento responsivo a AMPc (CRE). Um recente trabalho de nosso laboratório mostra que o promotor da ECA de rato é regulado por estímulo β -adrenérgico e AMPc em cultura de células endoteliais de aorta de coelho (Xavier et al., 1999). Os resultados do gel shift (interação proteína-CRE do promotor) mostraram que proteínas nucleares da REC (célula endotelial de aorta de coelho) são capazes de se ligar a seqüências consenso para CRE, evidenciando uma via CRE ativa em REC.

Para verificarmos se *in vivo*, durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, a ativação do promotor da ECA também é regulada por essa mesma via de sinalização intracelular, injetamos na parede do VE um plasmídeo com mutação na seqüência CRE localizada na região que está sendo responsável pelo aumento na expressão do promotor (W5J). Os resultados da Figura 28B mostram que o tratamento com isoproterenol continua aumentando a expressão da luciferase nos animais que foram transfectados com o promotor mutado (W5J). Estes resultados, portanto, indicam que a seqüência regulatória que aumenta a expressão da luciferase durante o tratamento com isoproterenol parece não ser o elemento responsivo a AMPc. Outros experimentos estão sendo realizados com o objetivos de identificarmos qual a seqüência de nucleotídeos que está sendo responsável pela ativação do promotor da ECA durante a hipertrofia induzida por isoproterenol. O nosso trabalho está direcionado a tentar localizar e entender como funcionam os “interruptores” que ligam e desligam o gene da ECA na hipertrofia cardíaca. A continuidade deste trabalho poderá nos levar a importantes informações da regulação do SRA durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

Esta técnica de transfecção de genes na forma de “naked DNA” foi primeiramente utilizada para transferência de genes em músculo esquelético (Wolff et al., 1990), posteriormente sendo utilizada por vários laboratórios para transfecção em músculo cardíaco, mostrando que a capacidade de captar e expressar o “naked de DNA” introduzido por uma simples injeção não era restrito ao músculo esquelético (Lin et al., 1990; Acsadi et al., 1991; Kitsis et al., 1991; Buttrick et al., 1992; von Harsdorf et al., 1993; Li, et. al., 1997). Porém, por razões não muito claras este método funciona principalmente em músculo esquelético e cardíaco, não sendo muito eficiente para outros tecidos (Blau e Springer, 1995). Neste modelo de transfecção, a expressão do gene injetado parece estar localizada somente ao redor do local da injeção, com um pequeno número de células expressando o produto gênico (Lin et al., 1990; Buttrick et al., 1991; Acsadi et al., 1991). Análises de Southern blot do DNA obtido de músculo esquelético de camundongos injetados com “DNA plasmidial” mostraram a primeira evidência da localização episomal do gene transfectado (Wolff et al., 1990). Isto sugere que DNA transfectado permanece na forma circular e extracromossomal, localizado no citoplasma da célula, conforme mostrado através de técnicas de histoquímica (Lin et al., 1990 ; Wolff et al., 1990; Buttrick et al., 1991), porém baixos níveis de integração no cromossoma não podem ser definitivamente excluídos (Wolff et al., 1990). Os mecanismos pelo quais o DNA é captado pelos miócitos necessitam ser melhor esclarecidos. Entretanto,

devem ser dependentes das propriedades estruturais e funcionais da célula. Possivelmente, dependem de fatores estruturais como o retículo sarcoplasmático e túbulos transversos, estes últimos contendo fluido extracelular e penetrando profundamente na célula muscular. Ainda é possível que o plasmídeo penetre na célula através de uma ruptura física da membrana celular durante a injeção do DNA recombinante (Lin, et al., 1990; Wolff et al., 1990). Essa última hipótese parece não ser provável. De acordo com os resultados mostrados por von Harsdorf et al., 1993, nos quais os níveis de expressão do gene repórter CAT-cloranfenicol aciltransferase (CAT) não se correlacionaram com a quantidade de injúria imposta sobre o tecido cardíaco. O coração foi submetido a três diferentes níveis de injúria. No primeiro grupo, 200 µl da solução de DNA recombinante foi transfectada através de uma única injeção. No segundo grupo, 50 µl da mesma concentração de DNA foi transfectada em quatro sítios diferentes de injeção. No terceiro grupo, 200 µl da solução de DNA recombinante contendo a mesma concentração dos dois anteriores foi transfectada com uma injeção e outras três transfecções foram feitas sem o DNA recombinante ao redor do primeiro sítio de injeção. Os resultados da atividade da CAT não mostraram diferença entre os três grupos.

Esta técnica apesar da baixa eficiência na transfecção apresenta várias vantagens quando comparada com outros métodos de terapia gênica. Primeiro não necessita de vetor viral para a transfecção, eliminando a possibilidade de uma infecção permanente na célula do hospedeiro. Segundo o DNA recombinante captado pela célula permanece na forma episomal e portanto não apresenta o mesmo potencial para mutagêneses da célula hospedeira como o vetor retroviral que se integra no cromossoma da célula. Finalmente este método não necessita de cultura da célula hospedeira *in vitro* para depois ser transfectada no hospedeiro, o que seria particularmente mais difícil para miócitos por serem células que não se dividem.

Embora a tecnologia de animais transgênicos também seja utilizada para o estudo da função de genes específicos, esta tecnologia apresenta várias desvantagens, tais como:

- a) o tempo e custo para gerar um animal transgênico é muito grande;
- b) os efeitos da super expressão do gene é exercida durante todo o desenvolvimento do animal;
- c) é impossível expressar o gene em um único local como por exemplo somente no VE ou em segmentos de um vaso;
- d) é difícil excluir a contribuição potencial dos efeitos sistêmicos da expressão do gene nos animais transgênicos.

A transfecção de genes localizados pode ser muito eficiente para o estudo da regulação de um determinado gene em diferentes situações fisiopatológicas.

Os resultados apresentados neste trabalho são consistentes com a idéia de SRA locais que podem ser regulados de maneira independente do SRA circulante e de alterações na pressão arterial. Nossos resultados ainda sugerem que o promotor do gene da enzima conversora de angiotensina I possui uma série de regiões que contém seqüências regulatórias que podem estar participando da expressão do gene em processos patológicos como a hipertrofia cardíaca.

Nossos dados indicam que a técnica de transfecção localizada de genes *in vivo* é uma ferramenta experimental útil para o estudo de fatores que podem influenciar na expressão de um gene durante um complexo estado patofisiológico *in vivo*, como na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acsadi, G.; Jiao, S.; Jani, A.; Duke, D.; Willaims, P.; Whong, W. e Wolff, J.A. Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. **New Biol** 3: 71-81, 1991.
- Allard, M.F.; De Venny, M.F.; Doss, L.K.; Grizzle, W.E. e Bishop, S.P. Alterations in dietary sodium affect isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiology** 22: 1135-1145, 1990.
- Alderman, E.L. e Harrison, D.C. Miocardial hypertrophy resulting from low dosage isoproterenol administration in rats. **Proc Soc Exp Biol Med** 136: 268-270, 1971.
- Anversa, P.; Ricci, R. e Olivetti, G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. **J Am Coll Cardiol** 7: 1140-1149, 1986.
- Aoki, M.; Morishita, R.; Muraishi, A.; Moriguchi, A.; Sugimoto, T.; Maeda, K.; Dzau, V.J.; Kaneda, Y.; Higaki, J. e Ogihara, T. Efficient *in vivo* gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ (hemagglutinating virus of Japan)-Liposome method. **J Mol Cell Cardiol** 29: 949-959, 1997.
- Baker, K.M. e Aceto, J.F. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. **Am. J. Physiol.** 259: H610-H618, 1990.
- Bakhle, Y.S. Converting enzyme: *in vitro* measurement and properties. In: **Angiotensin**. Edited by Page, I.H. e Bumpus, F.M. New York, Springer-Verlang, 1974.
- Barreto-Chaves, M. L.M.; Xavier-Neto, J. e Krieger, J.E. Dexametasona estimula a atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) em cultura primária de fibroblastos cardíaco de rato. **FESBE**. 1997.

- Beldent, V.; Michaud, A.; Bonnefoy, C.; Chauvet, M-T. e Corvol, P. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. **J Biochem Chem** 270: 28962-28969, 1995.
- Benjamin I.J.; Jalil, E.J.; Tan, L.B.; Cho, K.; Weber, K.T. e Clark, W.A. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. **Circulation Research** 65 (3): 657-670, 1989.
- Berne MR e Levy MN. **Princípios de Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS, p.394, 1991.
- Blau, H.M. e Springer, M.L. Gene therapy-a novel form of drug delivery. **New Engl J Med** 2: 1201-1207, 1995.
- Boluyt, M.O.; Long, X.; Eschenhagen, T.; Mende, U.; Schmitz, W.; Crow, M.T. e Lakatta, E.G. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. **Am J. Physiology** 269: H638-H647, 1995.
- Booz, G.W.; Dostal, D.E.; Singer, H.A. e Baker, K.M. Involvement of protein kinase C and Ca^{2+} in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. **Am. J. Physiol.** 267: C1308-C1318, 1994.
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analy. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- Brand, T.; Sharma, H.S. e Schaper, W. Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiology** 25: 1325-1337, 1993.
- Busatto, V.C.W.; Cicilini, M.A. e Mill, J.G. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. **Braz J Med Biol Res** 30: 679-687, 1997.

- Busatto, V.C.W.; Cunha, V.; Cicilini, M.A e Mill, J.G. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. **Braz J Med Biol Res** **32** (3): 355-360, 1999.
- Buttrick, P.M.; Kass, A.; Kitsis, R.N.; Kaplan, M.L. e Leinwand L.A. Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. **Circulation Research** **70**: 193-198,1992.
- Campagnole-Santos, M.J. Participação do sistema renina angiotensina na fase aguda da hipertensão neurogênica (central e periférica). Ribeirão Preto, 1986. 171p. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiologia)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Capponi, A.M.; Gourjon, M. e Vallotton, M.B. Effect of β -blocking agents and angiotensin II on isoproterenol-stimulated renin release from rat kidney slices. **Circ Research** **40**: I89-I93, 1977.
- Carmona, R.; Lizun, C.; Junqueira, M.L.; Xavier-Neto, J. e Krieger, J.M. Ang II mechanism to control ACE activity and promotor function in renal and endothelial cells. **Hypertension** **29(3)**:887, 1997.
- Chapman, D.; Weber, K.T. e Eghbali, M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. **Circ. Res.** **67**: 787-794, 1990.
- Cheung, H.S. e Cushman, D.W. Inhibition of homogeneous angiotensin converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochem Biophys Acta**; 451-463, 1973.
- Chien, K.R.; Knowlton, K.U.; Zhu, H. e Chien, S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. **FASEB J** **5**: 3037-3046, 1991.

- Chomczynski, P. e Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** **162**: 156-159, 1987.
- Chruscinski, A.J.; Rohrer, D.K.; Schauble, E.; Desai, K.H.; Bernstein, D. e Kobilka, B.K. Targeted disruption of the β 2 adrenergic receptor gene. **J Biol Chemistry** **274**: 16694-700, 1999.
- Cohen M.L. e Kurz, K.D. Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rats after treatment with captopril or MK421. **J Pharmacol Exp Ther** **220**: 63-69, 1982.
- Cornelius, T; Holmer, S; Müller, F.U.; Rigger, G.A.J. e Schunker, H. Regulation of the rat atrial natriuretic peptide gene after acute imposition of left ventricular pressure overload. **Hypertension** **30**: 1348-1355, 1997.
- Crabos, M.; Roth, M.; Hahn, AWA e Erne, P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. **J. Clin. Invest.** **93**: 2372-2378, 1994.
- Cushman, D.W. e Cheung, H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochem Pharmacology** **20**: 1637-1648, 1971a.
- Cushman, D.W. e Cheung, H.S. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. **Biochem Biophys Acta** **250**: 261-265, 1971b.
- Cushman, D.W. e Ondetti, M.A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **Prog Med Chem** **17**: 41-104, 1980.
- Danser, A.H.J. e Schalekamp, A.D.H. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? **Heart (Suppl. 3)** **76**: 28-32, 1996.

- Dorer, F.E.; Kahn, J.R.; Lentz, K.E., Levine, M. e Skeggs, L.T. Kinetic properties of pulmonary angiotensin-converting enzyme: hydrolysis of hippurylglycylglycine. **Biochem Biophys Acta** 429: 220-228, 1976.
- Dostal, D.E.; Rothblum, K.N.; Conrad, K.M.; Cooper, G.R.; Baker, K.M. Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. **Am. J. Physiol.** 263: C851-C863, 1992.
- Dostal, D. E.; Booz, G.W. e Baker, K.M. The cardiac renin-angiotensin system: An overview. In: **The cardiac renin-angiotensin system**. Edited by Lindpaintner, K. e Ganten, D. New York, Futura publishing Company, Inc. 1994.
- Dunmon, P.M.; Iwaki, K.; Henderson, S.A.; Sem, A. e Chien, K.R. Phorbol esters induce immediate-early gene and activate cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. **J Mol Cell Cardiol** 22: 901-910, 1990.
- Dzau, V.J.; Brody, T.; Ellison, K.E; Pratt, R.E. e Ingelfinger, J.R. Tissue-specific regulation of renin expression in the mouse. **Hypertension** 9: 36-41, 1987.
- Dzau, V.J. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. **Am J Cardiol** 59: 59A-65A, 1987.
- Dzau, V.J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation** 77 (Suppl. 19): 1-4, 1988a.
- Dzau, V.J. Cardiac renin-angiotensin system. **Am J Med** 84 (suppl 3A): 22-27, 1988b.
- Dzau, V.J. e Re, R.N. Evidence for the existence of renin in the heart. **Circulation**, 73: 134-136, 1987.
- Dzau, V.J. e Re, R.N. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift. **Circulation** 89: 493-498, 1994.

- Eghbali, M.; Czaja, M.J.; Zaydel, M.; Weiner, F.R.; Zern, M.A.; Seifter, S. e Blumenfeld, O.O. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **20**: 267-276, 1988.
- Eghbali, M.; Blumenfeld, O.O.; Seifter, S.; Buttick, P.M.; Leinwand, L.A.; Robinson, T.F. e Zern, M.A.; Giambone, M.A. Localization of type I, III, and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **21**: 102-113, 1989.
- Erdős, E.G. e Skidgel, R.A. The Angiotensin I - Converting Enzyme. **Lab. Invest.** **56**:345-348, 1987.
- Falkenhahn, M.; Fanke, F.; Bohle, R.M.; Zhu, Y-C.; Stauss, H.M.; Bachmann, S.; Danilov, S. e Unger, T. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. **Hypertension** **25**: 219-226, 1995.
- Feldman, A.M.; Ray, P.E.; Silan, C.M.; Mercer, J.A.; Minob, W. e Bristow, M.R. Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in endomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction. **Circulation** **83**: 1866-1872, 1991.
- Ferreira, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit J Pharmacology** **24**: 163-69, 1965.
- Ferreira, S.H.; Greene, L.J.; Alabaster, V.A.; Bakhie, Y.S. e Vane, J.R. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. **Nature** **225**: 379-380, 1970.
- Fisher, S.A.; Buttrick, P.M; Sukovich, D. e Periasamy, M. Characterization of promoter elements of the rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene required expression in cardiac muscle cells. **Circulation Research** **73**: 622-628, 1993.

- Friedland, J. e Silverstein, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **Am J Clin Pathol** 66: 416-420, 1976.
- Frohlich, E.D.; Apstein, C.; Chobanian, A.V.; Devereux, R.B.; Dustan, H.P.; Dzau, V.; Fauad-Tarazi, F; Horan, M.J.; Marcus, M.; Massie, B.; Pfeffer, M.A.; Re, R. N.; Roccella, E.J.; Savage, D. e Shub, C. The heart in hypertension. **The New England J of Medicine** 327: 998-1007, 1992.
- Geisterfer, A.A.T.; Peach, M.J. e Owens, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circ. Res.** 62: 749-756, 1988.
- Gibbons, G.H.; Pratt, R.E. e Dzau, V.J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.** 90: 456-461, 1992.
- Golomb, F.; Abassi, Z.A.; Cuda, G.; Stylianou, M.; Pachal, V.R.; Trachewsky, D. e Keiser, H. Angiotensin II maintains, but does not mediate, isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. **Am J Physiology** 267: H1496-H1506, 1994.
- Griendling, K.K.; Murphy, T.J. e Alexander, R.W. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. **Circulation** 87: 1816-1828, 1993.
- Grima M, Welsch C, Giesen-Crouse E-M, Coquard C, Barthelmebs M e Imbs J-L. Age-related variations in tissue angiotensin converting enzyme activities: comparison between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **J Hypertension** 8: 697-702, 1990.
- Grimm, D.; Elsner, D; Schunckert, H.; Pfeifer, M.; Griese, D.; Bruckschlegel, G.; Muders, F.; Riegger, G.A.J. e Kromer, E.P. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. **Cardiovascular Res** 37: 91-100, 1998.

- Grossman, W.; Jones, D. e McLaurin, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest** 56: 56-64, 1975.
- Holmer, S.R.; Kaissling, B.; Putnik, K.; Pfeifer, M.; Krämer, B.K.; Riegger, G.A.J. e Kurtz, A. Beta-adrenergic stimulation of renin expression *in vivo*. **J Hypertension** 15: 1471-1479, 1997.
- Hooper, N.M.; Keen, J.; Pappin, D.J.C. e Turner, A.J. Pig kidney angiotensin converting enzyme. **Biochem. J.** 247:85-93, 1987.
- Hubert, C.; Houot, A.M.; Corvol, P. e Soubrier, F. Structure of the Angiotensin I-converting Enzyme Gene. Two Alternate Promoters Correspond to Evolutionary Steps of a Duplicated Gene. **J. Biol. Chem.** 266:15377-15383, 1991.
- Huston, T.P.; Puffer, J.C.; Mac Millan Rodney, W.M. The athletic syndrome. **N. Engl. J. Med.** 313: 24-32, 1985.
- Ito, M.; Oliverio, M.I.; Mannon, P.J.; Best, C.F.; Maeda, N.; Smithies, O. e Coffman, T.M. Regulation of blood pressure by the type IA angiotensin II receptor gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 92: 3521-3525, 1995.
- Iwai, N.; Shimoike, H. e Kinoshita, M. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. **Circulation** 92: 2690-2696, 1995.
- Iwai, K.; Ashizawa, N.; Do, Y.S.; Graf, K. e Hsueh, W. Comparison of Ang II with other growth factors on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. **Am. J. Physiol.** 270: H2100-H2107, 1996.
- Izumo, S.; Nadal-Ginard, B. e Mahdavi, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 85: 339-343, 1988.

- Junqueira ML e Krieger JE. Evidence for regulatory regions in the promoter of the rat angiotensin converting enzyme (ECA) gene important for specific tissue expression. **Anais da SBBq**, 104, 1995.
- Kato K, Nakanishi M, Kaneda Y, Uchida T e Okada Y. Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. **J Biol. Chem.** 266: 3361-3364, 1991.
- Katona, P.G.; McLean, M.; Dighton, D.H. e Guz, A. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. **J. Appl. Physiol: Respiratory: Environment Exercise physiology**, 52: 1652-1657, 1982.
- Kim, H.S.; Kregge, J.H.; Kluckman, K.D.; Hagaman, J.R.; Hodgins, J.B.; Best, C.F.; Jennette, J.C.; Coffman, T.M.; Maeda, N. e Smithies, O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. **Proc Natl Acad Sci USA** 92: 2735-2739, 1995a.
- Kim, S.; Ohta, K.; Hamaguchi, A.; Yukimura, T.; Miura, K. e Iwao, H. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. **Hypertension** 25: 1252-1259, 1995.
- Kitsis, R.; Buttrick, P.; McNally, E.; Kaplan M. e Leinwand, L. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 4138-4124, 1991.
- Koike, G.; Krieger, J.E.; Jacob, H.J.; Mukoyama, M.; Pratt, R.E. e Dzau, V.J. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNA and characterization of the enzyme. **Biochem Biophys Res Commun** 198: 380-386, 1994.
- Kregge, J.H.; John, S.W.M.; Langenbach, L.L.; Hodgins, J.B.; Hagaman, J.R.; Bachman, E.S.; Jennette, J.C.; O'Brien, D.A. e Smithies, O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature** 375: 146-148, 1995.
- Krieger, J.E. e Dzau, V.J. Molecular biology of hypertension. **Hypertension** 18 (Suppl. 1): I3-I17, 1991.

Krieger, J.E. Bases moleculares da hipertrofia cardíaca. **J Bras Nefrol** 16: 198-202, 1994.

Krieger, J.E. Hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo** 3: 356-361, 1995.

Krulewicz, A.H.; Baur, W.E. e Fanburg, B.L. Hormonal influence on endothelial cell angiotensin-converting enzyme activity. **Am. J. Physiol.** 247: C163-C168, 1984.

Lattion, A.L.; Soubrier, F.; Allegrini, J.; Hubert, C.; Corvol, P. e Alhencgelas, F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. **FEBS Lett.** 252: 99-104, 1989.

Lieberman, J. Elevation of serum-angiotensin-converting enzyme level in sarcoidosis. **Am J. Med.** 59: 365-372, 1975.

Lindpaintner, K.; Wilhelm, M.; Jin, M.; Unger, T.; Lang, R.E. e Ganten, D. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **J. Hypertens. (Suppl. 2)** : S33-S38, 1987.

Lindpaintner, K. e Ganten, D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. **Circulation** 8: 905-921, 1991.

Lin, H.; Parmacek, M.S.; Morle, G.; Bolling, S. e Leiden, J.M. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. **Circulation** 82: 2217-2221, 1990.

Li, K.; Welikson, R.E.; Vikstrom, K.L. e Leinwand, L.A. Direct gene transfer into the mouse heart. **J Mol Cell Cardiol** 29: 1499-1504, 1997.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F. e Sambrook, J. Molecular cloning. **A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a edição, 1989.

- Matsubara, H.; Kanasaki, M.; Murasawa, S.; Tsukaguchi, Y.; Nio, Y.; Inada, M. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. **J. Clin. Invest.**, **93**: 1592-1601, 1994.
- Matsushima Y, Kawamura M, Akabane S, et al. Increases in renal angiotensina II content and tubular angiotensina II receptors in prehypertensive spontaneously hypertensive rat. **J Hypertension** **6**: 791-796, 1988.
- Menard, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin antagonists. **J. Hypert.** **11 (suppl. 3)**: S3-S11, 1993.
- Mendelsohn, F.A.O.; Lloyd, C.J.; Kachel, C.; Funder, J.W. Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. **J. Clin. Invest.** **70**: 684-692, 1982.
- Milano, C.A.; Dolber, P.C.; Rockman, H.A.; Bond, R.A.; Venable, M.E.; Allen, L.F. e Lefkowitz, R.J. Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induced cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci USA** **91**: 10109-10113, 1994a.
- Milano, C.A.; Allen, L.F.; Rockman, H.A.; Dolber, P.C.; McMinn, T.R.; Chien, K.R.; Johnson, T.D.; Bond, R.A. e Lefkowitz, R.J. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. **Science** **264**: 582-586, 1994b.
- Miyata, S. e Haneda, T. Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by type 1 angiotensin II receptor. **Am. J. Physiol.** **266**: H2443-51, 1994.
- Moolenaar, W.H. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. **Ann Rev Physiology** **48**: 363-376, 1987.

- Morgan, H.E.; Gordon, E.E.; Kira, Y.; Chua, B.H.L.; Russo, L.A.; Peterson, C.J.; McDermott, P.J. e Watson, P.A. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. **Ann Rev Physiology** 49:533-543, 1987.
- Morgan, H. e Baker K.M. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural and endocrine dependence. **Circulation** 83: 13-25, 1991.
- Morganroth, J.; Maron, B.J.; Henry, W.L.; Epstein, S.E. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. **Ann. Int. Med.** 82: 524-525, 1975.
- Morishita, R.; Gibbons, G.H.; Ellison, K.E.; Lee, W.; Zhang, L.; Yu H.; Kaneda, Y.; Ogihara, T. e Dzau, V.J. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. **J Clin Invest** 94: 978-984, 1994.
- Morishita, R.; Gibbons, G.H.; Kaneda, Y.; Ogihara, T.; Dzau, V.J. Novel in vivo gene transfer method for study of local modulators in vascular smooth muscle cells. **Hypertension** 21: 894-899, 1993.
- Nabel, E.G.; Plautz, G.; Boyce, F.M.; Stanley, J.C. e Nabel, G.J. Recombinant gene expression *in vivo* within endothelial cells of the arterial wall. **Science** 244:1342-1344, 1989.
- Nadal-Ginard, B. e Mahdavi, V. Molecular basis of cardiac performance: plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. **J Clin Invest** 84: 1693-700, 1989.
- Naftilan, A.J., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. Induction of platelet - derived growth factor A - chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.** 83:1419-1424, 1989.

- Nagano, M.; Higaki, J.; Nakamura, F.; Higashimori, K.; Nagano, N.; Mikami, H. e Ogihara, T. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. **Hypertension** 19: 708-712, 1992.
- Nagano, M. e Ogihara, T. Role of the cardiac renin-angiotensin system in left-ventricular hypertrophy. In: **The cardiac renin-angiotensin system**. Edited by Lindpaintner, K. e Ganten, D. New York, Futura publishing Company, Inc. 1994.
- Neyses, L. e Pelzer, T. The biological cascade leading to cardiac hypertrophy. **European Heart J** 16: 8-11, 1995.
- Okamura, T.; Miyazaki, M.; Inagami, T. e Toda, N. Vascular renin-angiotensin system in two kidney, one clip hypertensive rats. **Hypertension** 8: 560-565, 1986.
- Okunishi H, Kawamoto T, Kurobe Y, Oka K, Ishii K, Tanaka T e Miyazaki M . Pathogenetic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 18: 649-659, 1991.
- Oliveira, E.M.; Santos, RAS e Krieger, J.E. Standardization of the fluorimetric assay to determine tissue ACE activity in rats. **Brazilian J Med Biol Res**. Aceito para publicação, 1999.
- Oliveira, E. M.; Koike, M.K.; Junqueira, M.L.; Oliveira, V.L.L.; Pires, M.D.; Fortner, P.L.; Krieger, J.K. Isoproterenol Induced Hypertrophy Increases Left Ventricle Ace Activity and Promoter Expression in Vivo. **J of Hypertension** 14: (suppl 1) S211, 1996.
- Oliveira, E.M.; Carmona, R. e Krieger, J.E. Experimental hypertrophy in mice is influenced by ACE gene copy number. **Hypertension** 33: 202, 1999.
- Ondetti, M. A. e Cushman, D.W. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. **Ann. Rev. Biochem.** 51: 283-308, 1982.

- Opie, L.H. **The Heart**. Physiology, from cell to circulation. Philadelphia. Lippincott-Raven Publisher. 3 ed., 1998.
- Oshima G, Gecse A, Erdős EG. Angiotensin I converting enzyme of the kidney cortex.. **Bioch Biophysica Acta 350**: 26-37, 1974.
- Oshima, G. e Nagasawa, K. Some enzymatic properties of peptidyl dipeptidase hydrolase (Angiotensin I-converting enzyme). **J Biochem 81**: 57-63, 1977.
- Passier, R.C.J.J.; Smits, J.F.M.; Verluyten, M.J.A.; Studer, R.; Drexler, H. e Daemen, M.J.A.P. Activation of angiotensin-converting enzyme expression in infarct zone following myocardial infarction. **Am J Physiology 269**: H1268-H1276, 1995.
- Parker, T.G. e Schneider, M.D. Growth factors, protooncogenes, and plasticity of the cardiac genome. **Ann. Rev. Physiol 53**: 179-200, 1991.
- Paul, M.; Bachmann, J. e Ganten, D. The tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc Med. 2**: 94-99, 1992.
- Peach MJ. Renin-angiotensin systems: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol Rev 57**: 313-370, 1977.
- Pereira, F.E.L. Hipertrofia cardíaca: aspectos morfológicos e patológicos. In: **Contratilidade miocárdica**. Aspectos básicos e clínicos. Editado por Vassallo, D.V. e Lima, E.G. São Paulo. Fundo Editorial BYK, 1993.
- Petersenn, S.; Rasch, A.C.; Heyens, M. e Schulte, H.M. Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. **Molecular Endocrinology 12**: 233-247, 1998.
- Pick R, Jalil JE, Janicki JS e Weber KT. The fibrillar nature and structure of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in the rat. **Am J Pathol 134**: 365-371, 1989.

- Pinto, J.; Brunning, P. e Unger, Th. Autoradiographic localization and quantification of rat heart angiotensin converting enzyme. **Am. J. Hypertension** 4: 321-326, 1991.
- Piquilloud, Y.; Reinharz, A.; e Roth M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. **Biochem Biophys Acta** 206: 136-142, 1970.
- Rakugi, H; Duk-Kyung, K.; Krieger, J.E.; Wang, D.S.; Dzau, V.J. e Pratt, R.E. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury: possible role in restenosis. **J Clin Invest** 93: 339-346, 1994.
- Ramchandran , R.; Kasturi, S.; Douglas, J.G. e Sem, I. Metalloprotease-mediated cleavage secretion of pulmonary ACE by vascular endothelial and kidney epithelial cells. **Am J Physiol** 272: H744-H751, 1996
- Riegger, A.J.G.; Kromer, E.P.; Wild, S.; Hofbauer, H.; Klug, M.L. e Kochsiek, K. Atrial natriuretic factor in acute and chronic cardiac failure. **J Cardiovasc Pharm** 10: 161-165, 1987.
- Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P.; Soubrier, F. An insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J. Clin. Invest.** 86: 1343-1346, 1990.
- Robertson, A.L. e Khairallah, P.A. Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. **Science** 172: 1138-1139, 1971.
- Rockman, H.R.; Koch, W.J. e Lefkowitz, R.J. Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling. **Am J Physiology** 272: H1553-H1559, 1997.

ANEXOS

STANDARDIZATION OF A FLUORIMETRIC ASSAY FOR DETERMINATION OF TISSUE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME ACTIVITY IN RATS

E.M.Oliveira^{1,2}, R.A.S.Santos³ and J.E.Krieger¹

1. Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e Depto Clínica Médica/LIM 13, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-000, São Paulo, SP, Brasil

2. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil e Escola de Educação Física, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

3. Laboratório de Hipertensão, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

Acknowledgment: this research was supported by grants from FINEP(6693002300), FAPESP(9546686), CNPq (520696/95-6) and Fundação EJ Zerbini. E.M. Oliveira is the recipient of a CNPq doctoral fellowship (140621/93-8).

Correspondence should be addressed to Dr JE Krieger, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr Eneas C. Aguiar 44, São Paulo, SP, Brazil, CEP 05403-000. Telephone 011-3069-5069, Fax 011-3069-5022, and e-mail: KRIEGER@INCOR.USP.BR.

Running title: ACE activity in rat tissue samples.

Key words: - angiotensin-converting enzyme

- ACE activity

- fluorimetric assay

- rat tissues

ABSTRACT

The tripeptide Hip-His-Leu was used to standardize the fluorimetric method to assay tissue angiotensin converting enzyme (ACE) activity in rats. To evaluate whether the homogenate from different tissues interfered with the fluorimetric determination of the His-Leu product, the fluorescence of *o*-phthaldialdehyde-His-Leu adduct was compared in the presence and absence of the homogenate (25 μ l). The results showed that the homogenates from lung and renal medulla and cortex alter significantly the intensity of the fluorescence while the homogenate from the other tissues studied do not. To overcome this problem, the homogenate from those tissues were diluted 10X, with the assay buffer. The specificity of the assay was demonstrated by inhibition of ACE activity using the compound enalaprilat (MK-422, 3 μ M). There is a linear relationship between product formation and incubation time for up to 90 min with homogenates of renal cortex and medulla and liver, for up to 60 min with ventricles and adrenal and for up to 30 min with aorta, lung and atrium homogenates. In addition, there is a linear relationship between product formation and the amount of protein in the homogenates within the following range: lung, 30-600 μ g; renal cortex and medulla, 40-400 μ g; atrium and ventricles, 20-200 μ g; adrenal, 20-100 μ g; aorta, 5-100 μ g; and liver, 5-25 μ g. In the different homogenates no peptidase activity against the His-Leu product (31 nMoles), assayed in BB (borate buffer), was detected, excepted in liver, which was inhibited by PCMB (0.1 mM *p*-chloromercuribenzoic

acid). The activity of ACE in BB was higher than in PB (phosphate buffer) due, at least in part, to a greater hydrolysis of the His-Leu product in PB. The ACE activity increased 20% in the lung when the BB plus triton was used. The enzyme activity was kept constant when the homogenates were stored at -20 °C or -70 °C for at least 30 days. These results indicate the condition whereby ACE activity can be easily and efficiently assayed in rat tissue samples homogenized in borate buffer using a fluorimetric method with Hip-His-Leu as a substrate.

INTRODUCTION

Angiotensin converting enzyme (ACE) is a dipeptidyl carboxypeptidase (EC 3.4.15.1) that inactivates the vasodepressor compound bradykinin and activates the potent vasoconstrictor and growth promoting substance Ang II by removal of the carboxy-terminal dipeptide of Angiotensin I (Ang I). The enzyme is found mainly in the lung (1) but also in the plasma and other tissues (2,3). In these locations, ACE can influence the production of Ang II and may have important physiological contribution in the maintenance of cardiovascular homeostasis (4). Thus, measurements of ACE activity in tissues combined with molecular biology approaches can provide important information regarding the role of ACE in physiological and pathophysiological mechanisms.

ACE activity has been determined by different methods (1,5-10). In general, measurements of ACE activity are based on the hydrolysis of synthetic tripeptides blocked at the amino terminal groups (6,7,10,11). Among the synthetic substrates, one of the most used has been Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu). This tripeptide displays the terminal sequence of Angiotensin I and its hydrolysis can be detected by the formation of hypuric acid (1) or by the formation of the dipeptide His-Leu (8,10). The fluorimetric detection of this dipeptide is a method of high sensitivity and is both a reproducible and simple assay to determine ACE activity.

In the present work ACE activity in different rat tissues was

determined using the fluorimetric assay described by Santos et al. (10) to analyze ACE activity in rat serum. Our results indicate that borate buffer performs better than phosphate buffer, which has been the most used buffer to determine ACE activity (1,12). Moreover, the hydrolysis of the His-Leu dipeptide was shown to be very high in tissues like liver thus, underestimating the measurements of ACE activity. The use of PCMB, a dipeptidase inhibitor, successfully ameliorates this problem.

Taken together, these findings extend the initial work of Santos et al. (10) to use this method to determine tissue ACE activity in rat samples.

METHODS

Rat tissues and serum samples

Male normotensive Wistar and SHR rats (200-250 g) were used and handled according to the guidelines of our Institution. ACE determination was performed in serum, lung, kidney (cortex and medulla), heart ventricle and atrium, adrenal, liver and aorta. The animals were decapitated, the blood was collected without anticoagulant, kept on ice, rapidly centrifuged (3.000 rpm X 10 min) and preserved at -20 °C or -70 °C. Tissue samples were quickly harvested, rinsed, blotted and homogenized in 0.4 M borate buffer pH 7.2, containing 0.34 M sucrose and 0.9M NaCl, and frozen at -20 °C or -70 °C (1g tissue : 10ml buffer) or 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2, containing 0.34M sucrose and 0.3M NaCl. Homogenates

were centrifuged (3.000 rpm X 10 min) and the supernatants frozen at -20 °C or -70 °C for fluorimetric assay of ACE activity.

Determination of ACE activity

ACE activity was determined in rat tissues by the method described by Santos et al. (10) for detection of ACE activity in plasma and serum. Briefly, serum (10 µl) and supernatants from homogenized tissues (20 µl) were incubated with 490 or 480 µl of assay buffer containing 5mM Hip-His-Leu in 0.4M sodium borate buffer with 0.9M NaCl, pH 8.3, sodium borate buffer with 0.1% Triton X-100 with 0.9M NaCl, pH 8.0 or 0.1M phosphate buffer with 0.3M NaCl, pH 8.0) for 15 or 30 min at 37°C. The reaction was halted by the addition of 1.2 ml of 0.34N NaOH. The product, His-Leu, was measured fluorimetrically at 365-nm excitation and 495-nm emission with a Fluoro-colorimeter (AMINCO) after the addition of 100 µl of *o*-phthaldialdehyde (20mg/ml) in methanol. This was followed 10 minutes later by the addition of 200 µl of 3N HCl and centrifugation in a clinical centrifuge at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature. To correct for the intrinsic fluorescence of the tissues and serum, blanks (To) were done by adding the samples after NaOH had been added to the reaction. All assays were performed in duplicate or triplicate. The samples were assayed within a 10 second interval.

Demonstration of the validity of the enzymatic assay

Standard curves of the His-Leu were obtained daily. There was a linear relationship between relative fluorescence and His-Leu concentration. The 10 μ l rat serum or 20 μ l tissue homogenates did not change the slope of the His-Leu standard curve, except for homogenates from lung, renal medulla and cortex. To overcome this problem, homogenates from those tissues were diluted ten fold with the assay buffer. When assays were carried out in phosphate buffer solution, His-Leu standards were prepared with the same buffer and performed in parallel.

Demonstration of the specificity of the enzymatic assay

The specificity of the assay was determined by the inhibition of ACE activity using the compound enalaprilat, (MK-422, 3 μ M).

Linearity of the assay with regard to time: a 20 μ l sample of homogenized tissue was incubated in the assay buffer for up to 120 minutes (kidney medulla and cortex), 90 minutes (liver), 60 minutes (ventricle and adrenal) and 30 minutes (aorta, lung and atrium). The assay was carried out as described above.

Linearity of the assay with regard to protein concentration: the samples of homogenized tissues were tested within the following range: 30-600 μ g for lung, 40-800 μ g for renal medulla and cortex, 20-200 μ g for ventricle, 20-400 for atrium, 20-200 μ g for adrenal, 5-100 μ g for aorta and 5-25 μ g for liver. The homogenates

were incubated in different times. The samples were incubated in assay buffer as described above.

Measurement of dipeptidase activity

To investigate the presence of dipeptidase activity in BB and PB we incubated 20 μ l of tissue samples with 31 nMoles His-Leu for 30 minutes. The relative fluorescence of the incubated product was compared with the value obtained at time zero (T_0). The reaction was stopped with NaOH before the samples were added. The assay was carried out as described above. In tissues where dipeptidase activity was detected, the samples were analyzed in the presence of the protease inhibitor PCMB 0,1 mM.

Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (13) using bovine serum albumin as a standard.

RESULTS

To evaluate whether homogenates from different tissues interfere with the detection of the His-Leu product, we compared the fluorimetric determination of the dipeptide in the presence and absence of homogenate (25 μ l). The results showed that homogenate from renal medulla and cortex and lung, significantly

altered the intensity of the fluorescence signal, while homogenate from other tissues did not. Diluting the homogenate from those tissues ten fold with the assay buffer eliminated this interference (Figure 1).

The specificity of the hydrolysis of Hip-His-Leu as a measure of ACE activity was demonstrated by greater than 98% inhibition of the enzymatic activity using the compound MK-422, 3 μM (results not shown).

Production of the dipeptide His-Leu as a function of the time of incubation is shown in the Figure 2. The linearity of the assay as a function of time was maintained for up to 90 min for renal medulla and cortex and liver; and up to 60 min for ventricle and adrenal; and up to 30 min for aorta, lung, and atrium. The linearity of the assay as a function of protein concentration (Figure 3), was maintained within the following range: lung, 30-600 μg ; renal medulla and cortex, 40-400 μg ; atrium and ventricle, 20-200 μg ; adrenal, 20-100 μg ; aorta, 5-100 μg ; and liver, 5-25 μg homogenates. Based on these results 20 μl of the lung and aorta homogenates were incubated for 15 minutes while the other tissues were incubated for 30 minutes to determine ACE activity. These results were obtained for both SHR and Wistar rats.

To analyze the possibility of unspecific fluorescence development under assay conditions, the relative fluorescence of the homogenate was evaluated under control conditions (T_0) and after 1 hour of incubation of tissue homogenate samples from Wistar and SHR rats. This period of time was chosen because it was the maximum used for incubation. No difference between the two

conditions were observed indicating that the stability of the homogenates is maintained under the assay conditions for up to 1 hour (results not shown).

To investigate whether dipeptidases in the homogenates can hydrolyze His-Leu, destroying the compound that gives the fluorescence to measure ACE activity, the homogenates were incubated for 30 min with the dipeptide His-Leu. In 0,4 M borate buffer dipeptidase activity was found only in the liver (Table I) and could be partially blocked by 100 μ M PCMB. This concentration of PCMB was chosen from a range tested (0-2 mM) which produced the highest inhibition of dipeptidase activity without affecting ACE activity. Dipeptidase activity observed in borate and phosphate buffer is shown in Table II. In the presence of the phosphate buffer (Table II), dipeptidase activity was detected in kidney (50%), ventricle (8%), serum (5%) and liver (65%). 100 μ M PCMB in the incubation medium abolished His-Leu hydrolysis in these tissues. In contrast, in borate buffer (Table II) the dipeptidase activity which was detected only in the liver (75% of His-Leu was hydrolyzed) could be partially (38%) blocked by PCMB. In addition to the difference in dipeptidase activity, it is interesting to note that ACE activity determined using borate buffer was consistently higher than the values obtained with phosphate buffer (Table III).

The effect of release of the enzyme from the membranes was tested using the detergent Triton X-100. ACE activity increased 20% in lung homogenates treated with 0.1% Triton X-100 ($p < 0.05$) while no differences were detected in the remaining tissues (results not shown).

The effect of different time periods and temperature of storage on ACE activity in tissue homogenates was tested (Table IV). To this end, the homogenates were stored at -20 °C or -70 °C for 7 and 30 days. The enzyme activity was kept constant when stored in both temperatures up to 30 days.

Finally, ACE activity was compared among the different tissues of the SHR and Wistar rats from our colony. ACE activity was lower in renal cortex, ventricle, atrium and serum, similar in renal medulla, adrenal and liver and higher in lung and aorta when Wistar and SHR samples were compared (Table V).

DISCUSSION

The study of the tissue ACE is a relevant issue since there are several lines of evidence indicating that it may be linked to the development of physiopathological conditions such as cardiac and vascular hypertrophy (14). However, the methods for determination of ACE activity usually show different activities depending on the buffer used.

The fluorimetric detection of the dipeptide His-Leu is one of the most sensitive non-isotopic procedures for measuring ACE activity using synthetic substrates such as Hip-His-Leu or the natural substrate, Angiotensin I. According to Santos et al. (10), the use of sodium borate buffer instead of

phosphate buffer increased the V_{max} and reduced the K_m of the enzyme measured in rat serum. As a consequence, better activity was obtained with higher affinity of the enzyme for the substrate. Santos et al. (10) also observed lower dipeptidase activity against the His-Leu substrate when borate buffer was used. The V_{max} of this enzyme was reduced and the K_m increased. These results indicated a protection of the His-Leu dipeptide used to measure ACE activity, reducing its hydrolysis by the dipeptidases. Hydrolysis of His-Leu could lead to underestimation of ACE activity due to the lower fluorescence of the aminoacids leucine and histidine alone (10). In the present study, we extended these results to optimize the conditions of the assay to determine ACE activity in several rat tissues.

Considering that the tissues display different biochemical composition it was necessary to investigate the interference of the different tissues homogenates with the detection of the His-Leu product. Our results indicated that interference was produced by lung and kidney medulla and cortex homogenates. This problem was successfully resolved by diluting the homogenate 10X with the assay buffer.

The specificity of the hydrolysis of Hip-His-Leu by the ACE activity was tested in the presence of the ACE inhibitor enalaprilat. This compound at a 3 μ M concentration essentially abolished ACE activity.

The linearity of the reaction was also evaluated considering the effects of time of incubation and protein concentration present in the

homogenate. The results showed that linearity could be obtained for all tissues using 20 μ l of the homogenate and a time of incubation of 30 min. Lung and aorta required incubation times of 15 min. This is in accordance to previous reports showing a high ACE activity in lung and aorta (15,16). Homogenate stability was maintained up to 1 hour in the assay conditions using the borate buffer.

Dipeptidase activity varied according to tissue homogenates and the buffer used. The results showed that the high dipetidase activity observed in the liver could be partially inhibited by the use of 100 μ M PCMB. Interestingly, in both SHR and WKY rats, dipeptidase activity measured with borate buffer was essentially absent in all tissue homogenates, except liver. Meanwhile, the phosphate buffer displayed dipeptidase activity in several other tissue homogenates. Similarly to what was observed for serum the use of borate buffer successfully minimizes the interference of dipeptidase activity with the assay from rat tissues (10). The mechanism of the inhibitory effect of high ionic strength (NaCl) combined with sodium borate buffer on the His-Leu dipeptidase activity remains to be elucidated.

The possibility of an enhancement of ACE activity produced by the detergent Triton X-100 was also investigated. It is thought that the detergent can increase activity by displacing the enzyme from the membranes (3). In our protocol only lung homogenate showed a significant increment of ACE activity indicating no need for such treatment before the assay. The effect of time and temperature storage were evaluated. Similar and reproducible results were

obtained for stocks of tissue homogenates maintained for different periods of time and at -20 °C or -70 °C.

Although the objective of this study was not to compare ACE activity among rat strains, we observed that ACE activity varied when different tissues were compared between SHR and Wistar rats from the colony maintained at our facility. These results are in general agreement with findings from other laboratories. However, discrepancies have been found (15), which may be explained, at least in part, by different assay conditions and genetic variability in strains of the animals studied.

In summary, the results presented here indicate that the use of borate buffer for the fluorimetric detection of the His-Leu dipeptide is simple, sensitive and reliable method for determination of ACE activity in rat tissue samples. Although the sensibility of this assay for determination of ACE activity in subcellular fractions was not investigated, the data obtained with the homogenates suggest that this method maybe applicable as well for subcellular fractions analysis. Precise ACE activity measurements combined with molecular biology approaches will allow a better understanding regulatory mechanisms involved in the control of circulating and tissue ACE activity. This is an important aspect to unravel how the renin angiotensin system is regulated under most different physiological and pathological condition.

REFERENCES

1. Cushman DW & Cheung HS (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648.
2. Yang HYT, Erdös EG & Levin Y (1972). Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 117: 291-300.
3. Welsch C, Grima M, Giesen EM, Helwing JJ, Barthelmebs M, Coquard C & Imbs JL (1989). Assay of tissue angiotensin converting enzyme. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 14 (suppl. 4): S26-S31.
4. Dzau VJ (1988). Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 (suppl I): I 4-I 13.
5. Piquilloud Y, Reinharz A & Roth M (1970). Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophysical Acta* 206: 136-142.
6. Bakhle YS (1974). Converting enzyme: in vitro measurement and properties. In: Page, IH and FM Bumpus (Editors), *Angiotensin*. Springer-Verlang, New York.
7. Soffer RL (1976). Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annual Review Biochemistry*, 45: 73-93.
8. Friedland J & Silverstein E (1976). A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *American Journal Clinical Pathology*, 66: 416-424.

9. Ondetti MA & Cushman DW (1982). Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review Biochemistry*, 51: 283-308.
10. Santos RAS, Krieger EM & Greene LJ (1985). Na improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*, 7: 244-252.
11. Soffer RL (1981). Angiotensin-converting enzyme. In: Soffer RL (Editor), *Biochemical regulation of blood pressure*. John Wiley & Sons. New York.
12. Unger T, Schull B, Rascher W, Lang RE & Ganten D(1982). Selective activation of the converting enzyme inhibitor MK 421 and comparison of its active diacid form with captopril in different tissues of the rat. *Biochemical Pharmacology*, 31 (19): 3063-3070.
13. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
14. Shunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsh AT, Apstein CS & Lorell BH (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *Journal Clinical Investigation*, 86: 1913-1920.
15. Grima M, Welsch C, Giesen-Crouse EM, Coquard C, Barthelmebs M & Imbs JL (1990). Age-related variations in tissue angiotensin converting enzyme activities: comparison between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Journal of Hypertension*, 8: 697-702.

16. Okunishi H, Kawamoto T, Kurobe Y, Oka Y, Ishii K, Tanaka T & Miyazaki M (1991). Pathogenic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 18: 649-659.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Influence of tissue homogenates on the fluorescence of the dipeptide His-Leu. The fluorescence of the dipeptide His-Leu was compared in presence and absence of the homogenate (25 μ l). Results are expressed as fluorescence/ nmol His-Leu. Data represent the mean of three experiments \pm SD for SHR (\square) and Wistar (\blacksquare) rats. * $p < 0.001$, significant differences.

Figure 2. Effect of incubation time on the formation of His-Leu product by different tissues homogenates. Detection of the His-Leu product formation as described in Materials and Methods. Data represent the mean of three experiments \pm SD. SHR (\blacksquare), Wistar (\blacklozenge) rats. In the liver homogenate the effect of PCMB (100 μ M) treatment was tested (\blacklozenge)

Figure 3. Effect of protein concentration in the assay medium on the formation of His-Leu product by different tissues homogenates. Detection of the His-Leu product formation as described in Materials and Methods. Data represent the mean of three experiments \pm SD. SHR (\blacksquare) and Wistar (\blacklozenge) rats.

Table I. Measurement of dipeptidase activity. The tissue homogenates of SHR and Wistar rats were incubated for 30 min with the 31 nMoles His-Leu. Data represent the relative fluorescence of the incubated product and the values obtained at time zero (Control). Data represent the mean of three experiments \pm SD. For the liver homogenate, the effect of 100 μ M PCMB on the dipeptidase activity is shown. * $p < 0.01$, significant differences.

Table II. Effect of borate and phosphate buffer on the dipeptidase activity of tissues homogenates of Wistar rats. The homogenates (20 μ l) and serum (10 μ l) were incubated for 30 min with 62 nMoles His-Leu in presence and absence of 100 μ M PCMB. Data represent the relative fluorescence of the incubated product and the values obtained at time zero (Control). Data represent the mean of three experiments \pm SD. * $p < 0.01$, significant differences.

Table III. Effect of borate and phosphate buffer on the ACE activity of Wistar rat samples. The enzyme activity was assayed as described in Materials and Methods. Results are expressed as nmol His-Leu/min/mg protein or nmol His-Leu/min/ml. Data represent the mean of three experiments \pm SD. * $p < 0.01$, significant differences.

Table IV. Stability of ACE activity in tissue homogenates stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 or 30 days. Analysis was performed in fresh and stored tissue homogenates. The enzyme activity was assayed as described in Materials and Methods. Results are expressed as nmol His-Leu/min/mg protein. Data represent the mean of three experiments \pm SD.

Table V. Determination of the ACE activity in several tissues of Wistar and SHR rats. The enzyme activity was assayed as described in Materials and Methods. Results are expressed as nmol His-Leu/min/mg protein or nmol His-Leu/min/ml. Data represent the mean of three experiments \pm SD. * $p < 0.05$, significant differences.

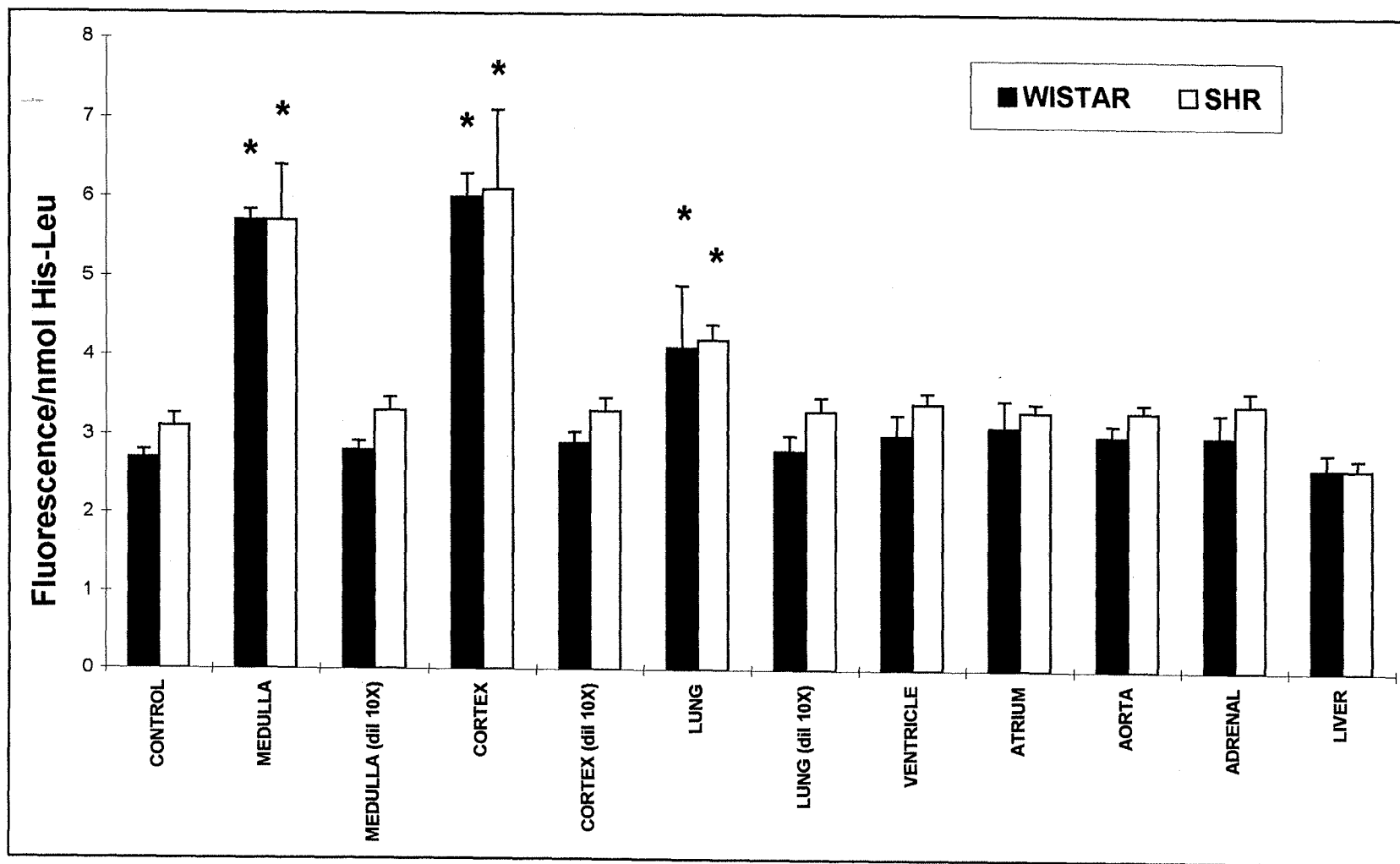


Figura 1

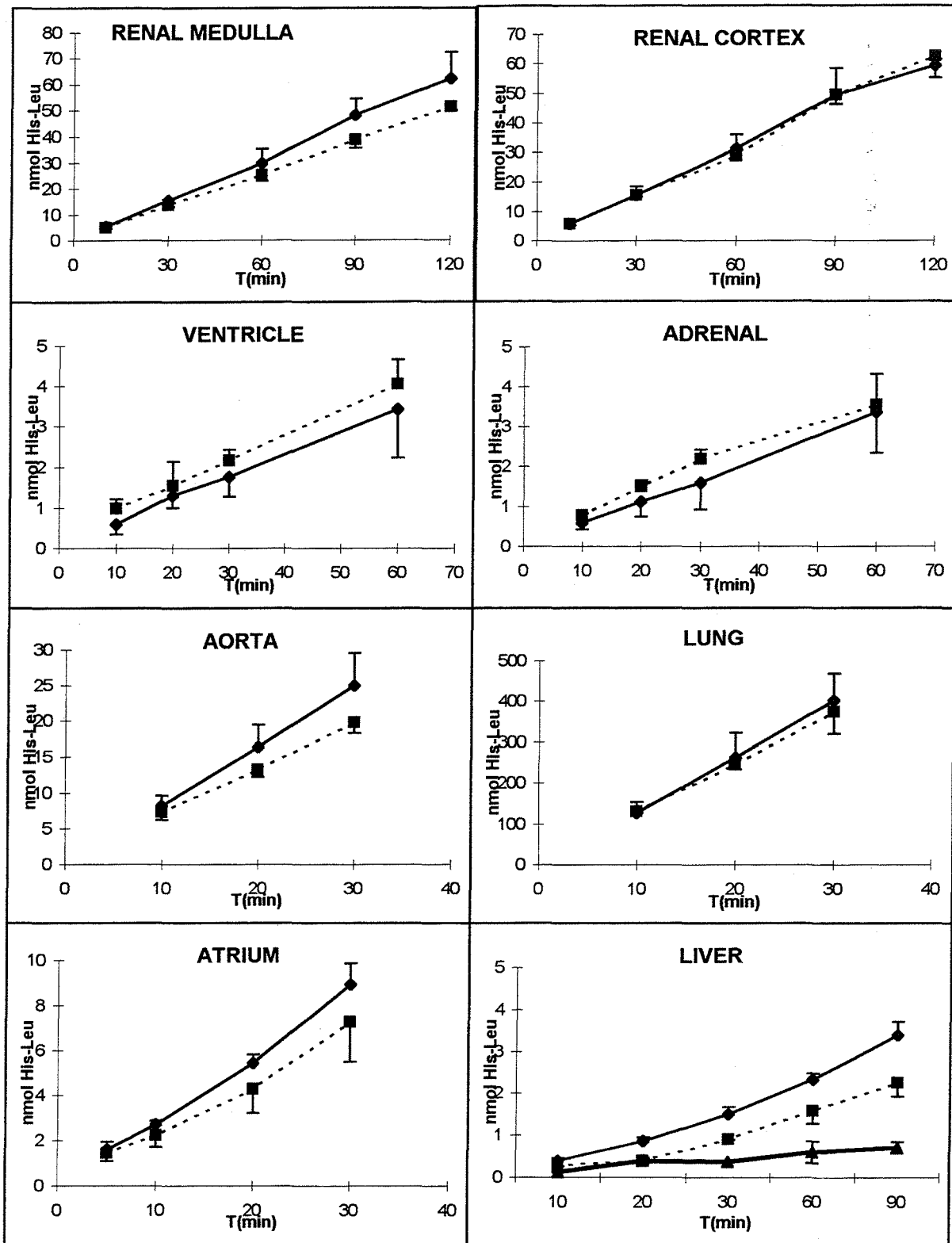


Figure 2

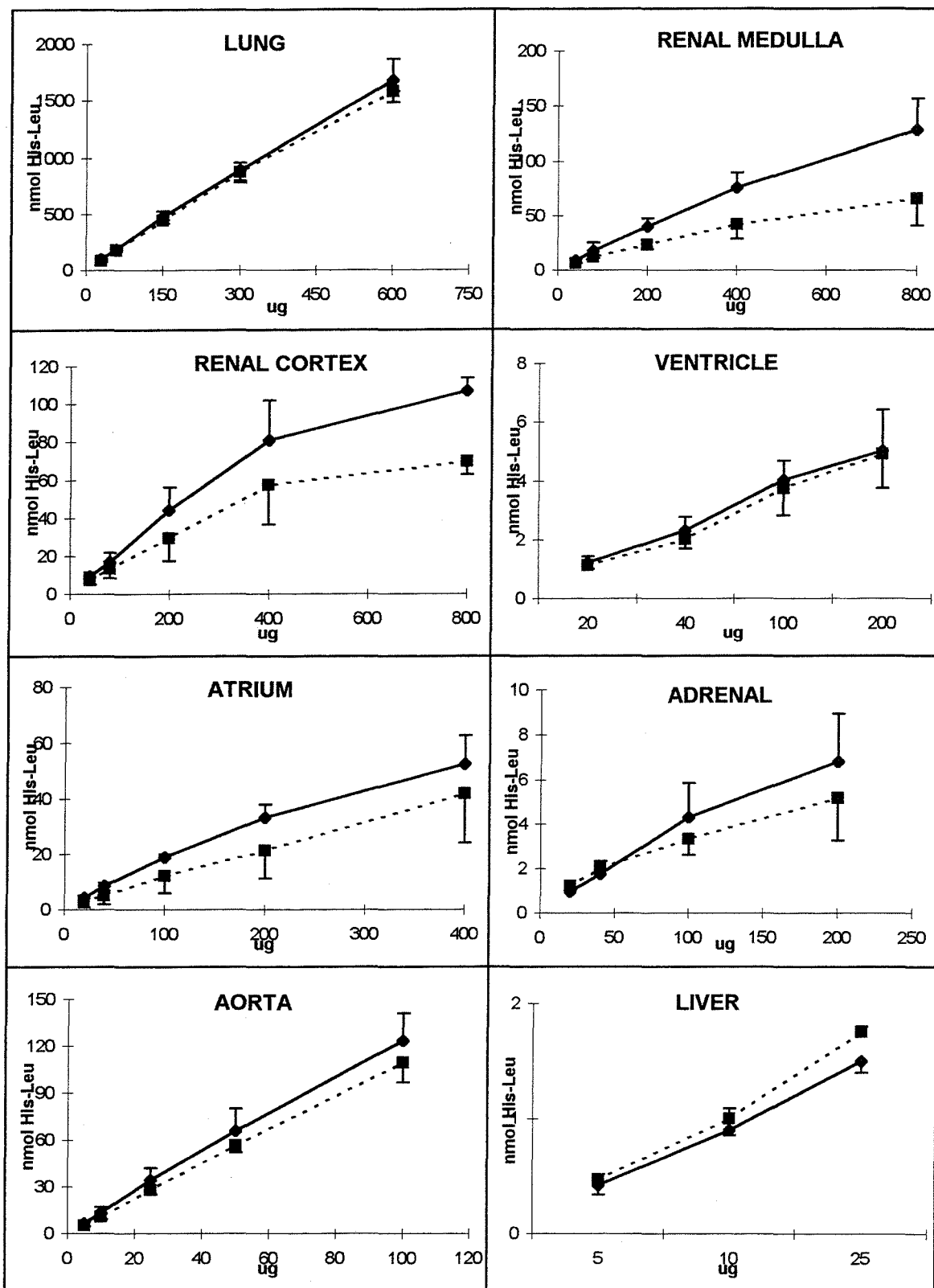


Figure 3

TISSUES	WISTAR		SHR	
	CONTROL	INCUBATED	CONTROL	INCUBATED
MEDULLA	5,7 ± 0,09	5,8 ± 0,04	5,7 ± 0,09	5,7 ± 0,06
CORTEX	5,8 ± 0,08	5,7 ± 0,14	5,7 ± 0,05	5,6 ± 0,10
LUNG	5,7 ± 0,01	5,8 ± 0,04	5,7 ± 0,07	5,8 ± 0,05
VENTRICLE	5,5 ± 0,05	5,3 ± 0,09	5,5 ± 0,07	5,2 ± 0,05
AORTA	5,7 ± 0,02	5,7 ± 0,02	5,9 ± 0,01	5,9 ± 0,02
ATRIUM	5,5 ± 0,05	5,3 ± 0,03	5,8 ± 0,05	5,6 ± 0,03
ADRENAL	5,5 ± 0,04	5,5 ± 0,03	5,7 ± 0,03	5,5 ± 0,09
LIVER (-)PCMB	5,8 ± 0,05	2,0 ± 0,09 *	5,8 ± 0,05	2,3 ± 0,03 *
LIVER (+)PCMB	5,8 ± 0,05	3,8 ± 0,12 *	5,8 ± 0,05	3,8 ± 0,12 *

Table I

TISSUES	BORATE BUFFER		PHOSPHATE BUFFER	
	CONTROL	INCUBATED	CONTROL	INCUBATED
LUNG (+) PCMB	14,9 ± 0,1	14,9 ± 0,06	14,6 ± 0,33	14,6 ± 0,30
LUNG (-) PCMB	15,0 ± 0,2	14,4 ± 0,86	14,7 ± 0,19	14,8 ± 0,57
SERUM (+) PCMB	11,8 ± 0,3	12,1 ± 0,09	12,7 ± 0,05	11,9 ± 0,09
SERUM (-) PCMB	13,6 ± 0,2	13,4 ± 0,25	13,3 ± 0,09	11,2 ± 0,27 *
KIDNEY (+) PCMB	14,7 ± 0,1	13,8 ± 0,10	14,7 ± 0,13	13,8 ± 0,24
KIDNEY (-) PCMB	14,7 ± 0,1	13,5 ± 0,21	14,7 ± 0,11	7,57 ± 0,41 *
VENTRICLE (+) PCMB	12,4 ± 0,2	12,4 ± 0,15	12,5 ± 0,05	12,3 ± 0,07
VENTRICLE (-) PCMB	12,9 ± 0,3	11,7 ± 0,47	12,7 ± 0,05	9,8 ± 0,18 *
LIVER (+) PCMB	12,2 ± 0,5	7,6 ± 0,62 *	12,5 ± 0,05	11,8 ± 0,02
LIVER (-) PCMB	13,8 ± 0,2	3,5 ± 0,20 *	14,2 ± 0,22	5,0 ± 0,34 *

Table II

TISSUES	BORATE BUFFER	PHOSPHATE BUFFER
LUNG	141,3 ± 4,8	28,6 ± 2,1 *
SERUM	131,0 ± 4	28,0 ± 2,3 *
KIDNEY	8,6 ± 1,7	1,2 ± 0,18 *
VENTRICLE	1,5 ± 0,12	0,16 ± 0,013 *
LIVER	0,15 ± 0,017	0,023 ± 0,0054 *

Table III

TISSUES	To	7 DAYS		30 DAYS	
		-20 °C	-80 °C	-20 °C	-80 °C
MEDULLA	8.6 ± 1.0	6.6 ± 1.1	7.0 ± 1.0	6.8 ± 0.3	6.1 ± 0.9
CORTEX	7.1 ± 0.3	7.0 ± 1.6	6.3 ± 1.0	6.4 ± 0.5	6.4 ± 0.8
LUNG	172.4 ± 6.1	186.7 ± 10.7	179.3 ± 22.9	170.3 ± 11.9	162.1 ± 8.3
VENTRICLE	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
AORTA	121.8 ± 5.5	115.0 ± 11.4	107.6 ± 7.8	110.5 ± 7.9	104.0 ± 4.8
ATRIUM	10.2 ± 1.6	10.7 ± 2.3	10.0 ± 1.4	10.9 ± 1.7	10.2 ± 1.6
ADRENAL	1.1 ± 0.1	2.0 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
LIVER	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0

Table IV

TISSUES	WISTAR	SHR
MEDULLA	8,5 ± 1,2	8,3 ± 0,4
CORTEX	7,1 ± 0,4	6,0 ± 0,4
LUNG	172,4 ± 7,5	228,9 ± 26,2
VENTRICLE	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,0
ATRIUM	10,2 ± 1,9	5,9 ± 0,9
AORTA	121,8 ± 6,7	136,8 ± 5,9
ADRENAL	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2
LIVER	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
SERUM	127,6 ± 1,5	92,9 ± 9,7

Table V