

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FUNCIONAL E MOLECULAR DA ELASTASE-2
FORMADORA DE ANGIOTENSINA II DO LEITO ARTERIAL MESENTÉRICO DE
RATO

CARLOS FERREIRA DOS SANTOS

RIBEIRÃO PRETO – 2002

Carlos Ferreira dos Santos

Caracterização bioquímica, funcional e molecular da elastase-2 formadora de angiotensina II do leito arterial mesentérico de rato

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Cristina de Oliveira Salgado

Ribeirão Preto/SP

2002

Parte deste trabalho foi realizada no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, e no Department of Physiology do Medical College of Wisconsin, sob orientação do Prof. Dr. Andrew Seth Greene (com bolsa doutorado-sanduíche concedida pelo CNPQq)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao *Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira*, exemplo de verdadeiro mestre e cientista que se destaca no meio universitário por sua constante preocupação na formação de seus alunos. Agradeço pelo seu precioso tempo dedicado à minha formação durante o período em que estive em seu laboratório. Ser orientado pelo Prof. Eduardo é um privilégio de poucos e sinto-me profundamente honrado e feliz pelas oportunidades de aprendizado e constantes discussões científicas por ele a mim proporcionadas, apesar dos vários “cortes no pescoço” e “estraladas na parede”. Prof. Eduardo, as palavras para expressar minha gratidão seriam muitas, porém deixo aqui registrado, do fundo do meu coração, apenas o meu singelo e sincero **MUITO OBRIGADO!**

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Maria Cristina de Oliveira Salgado, pela orientação sólida e objetiva e por todas as oportunidades a mim dadas durante o longo período em que estive em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Maria Cristina de Oliveira Salgado, Fernando Aguiar Morgan Correa, Benedito Honório Machado, José Eduardo Krieger e Andrew Seth Greene pela disponibilidade em fazer parte da comissão julgadora desse trabalho de tese.

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

Aos Professores Doutores Antônio Gabriel Atta e Roberto Loureiro Maringoni, da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pelas primeiras lições de Farmacologia e Fisiologia e pelo incentivo ao meu ingresso na carreira científico-acadêmica.

A todos os professores do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, especialmente aos Professores Doutores Alceu Sérgio Trindade Júnior, Inge Elly Kiemle Trindade e Flávio Augusto Cardoso de Faria, por terem assumido a responsabilidade de minhas atividades profissionais durante todo o período do doutorado.

Ao Prof. Dr. Eduardo Batista Franco, tutor do Programa Especial de Treinamento (PET) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo exemplo de verdadeiro mestre e pelo rigor na orientação científica nos três anos em que fui bolsista do programa durante o curso de graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Prof^ª Dr^ª Carmem Aparecida de Paula, da Universidade Federal de Ouro Preto, pelos ensinamentos iniciais sobre o método de purificação da elastase-2 caracterizada nesse trabalho de tese.

Ao Marcos Caprio, aluno de graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e bolsista da Prof^ª Dr^ª Maria Cristina de Oliveira Salgado, pela realização dos experimentos funcionais com o leito arterial mesentérico isolado de rato.

Aos meus colegas de laboratório Leonilda, Sérgio, Kênia, Herbert e Cristina pelo companheirismo e discussões científicas constantes durante todo o período de pós-graduação.

Aos pós-graduandos Rodrigo Stábeli e Livia Magalhães, alunos do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, pelos ensinamentos, paciência e convivência diária.

Aos técnicos de laboratório José Seminate Filho e Osmar Vettore pela paciência e disponibilidade para me ensinar técnicas indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos senhores José Waldik Ramon, Sônia Andrade e Fátima Petean, secretários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à profissão.

Às funcionárias Eliana e Maria Inês, responsáveis pelo biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo cuidado com os animais utilizados nesse trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe, Lenira Simplício Ferreira, pelo incentivo e apoio incondicionais em todas as fases desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 141371/1998-6) e no Medical College of Wisconsin (bolsa doutorado sanduíche, processo nº 200588/00-1)

I have to thank

Dr. Andrew Seth Greene for his encouragement and respect to all of my opinions during the period I spent in his laboratory, and for allowing me to perform more experiments than we originally proposed in my project. Dr. Greene is a very open mind scientist and an excellent teacher, whose lessons I will keep in my memory forever.

Dr. Sandra Lia do Amaral for all of her help and support during my stay in the United States of America. Her friendship was one of the best surprises of this period.

Elisabeth Rute, Michael Aebly, Michelle Muller, Daniela Schippers, Lisa Henderson, Luanne Kelly, Camille, Robert Klum, Glenn Slocum and Carol for their excellent technical assistance during my stay in the Department of Physiology at the Medical College of Wisconsin.

Dr. Diane Munzenmaier for all of her critical opinions and for the help and tips to develop the technique for the culture of mesenteric endothelial cells.

Melissa Morse for sharing experiences as a graduate student and for teaching me some techniques.

Cathy and John Cummings for the patience, support and friendship during my stay in the United States of America. It was a pleasure to live with an American family and to learn so much about the American culture.

Dan Brozoski for his friendship and patience to solve all of my doubts about the English language.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	xiii
1 – Introdução	1
2 – Objetivos	8
3 – Materiais	10
4 – Métodos	18
5 – Resultados	45
6 – Discussão	79
7 – Conclusões	100
8 – Resumo	103
9 - Abstract	107
10 – Referências bibliográficas	111
11 – Trabalhos aceitos para publicação	128

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABC	Complexo avidina/peroxidase-biotinilada
Ac-AAPL-CK	Acetil-Ala-Ala-Pro-Leu-clorometilcetona
Ang	Angiotensina
CH 5450	Z-Ile-Glu-Pro-Phe-CO ₂ Me
DEPC	Dietil pirocarbonato
DPBS	Solução salina de Dulbecco tamponada em fosfato
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
E-2LAMR	Elastase-2 do perfusato do LAM isolado de rato
EPM	Erro padrão da média
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HRP	Peroxidase de horse raddish
LAM	Leito arterial mesentérico
MOPS	Ácido 4-morfolinepropanesulfônico
N-suc-AAPF-pNA	N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida
N-suc-AAPL-pNA	N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu- <i>p</i> -nitroanilida
pb	Pares de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PDA	[Pro ¹¹ -D-Ala ¹²]-Ang I
RT	Transcrição reversa

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBE	EDTA tamponado em Tris
TBS	Solução salina tamponada em Tris (Tris-HCl 30 mM/NaCl 0,15 M, pH 8,1)
TDP	Substrato tetradecapeptídeo da renina
TEMED	N, N, N', N' - tetrametiletilenediamina
TFA	Ácido trifluoroacético
U	Unidade

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante é um sistema endócrino que promove a liberação de angiotensina (Ang) II, a qual exerce seus efeitos pela interação com receptores específicos (Peach, 1977). A Ang II é gerada pela ação da renina (EC 3.4.23.15) sobre o angiotensinogênio plasmático formando o decapeptídeo Ang I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰), que é clivado na ligação Phe⁸-His⁹ pela enzima conversora de Ang I (ECA; EC 3.4.15.1) liberando o octapeptídeo ativo Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸). Além do seu efeito vasoconstritor e estimulatório sobre a secreção de aldosterona, a Ang II tem uma ação inotrópica e cronotrópica positiva sobre o coração (Peach, 1977). Esse conceito clássico do SRA circulante está sendo modificado em função de evidências experimentais que mostram a participação de diferentes tecidos na formação de Ang II. Um número crescente de estudos mostra a existência de sistemas locais capazes de gerar angiotensinas de forma independente do SRA circulante (Campbell, 1987).

Vários estudos têm mostrado a participação de outras enzimas, além da ECA, na geração de Ang II. As primeiras descrições de uma via alternativa de formação da Ang II foram relatadas por Boucher *et al.* (1974) nas glândulas submandibulares de rato, por Cornish *et al.* (1979) na bochecha de hamster e por Trachte e Lefér (1979) no músculo papilar cardíaco de gato. Cornish *et al.* (1979) também observaram a formação de Ang II de forma independente da ECA na artéria coronária de hamster. Okunishi *et al.* (1984)

identificaram uma enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina na artéria mesentérica de cão, a qual também é insensível a inibidores da ECA. Urata *et al.* (1990a) demonstraram *in vitro* um duplo caminho para a formação de Ang II em homogenatos de coração humano. Esses autores observaram que aproximadamente 80% da formação total de Ang II associava-se à presença de uma serino-protease até então desconhecida, enquanto a atividade formadora de Ang II dependente da ação da ECA era responsável somente por aproximadamente 11% da formação total de Ang II. Esta serino-protease cardíaca foi posteriormente purificada e identificada como um novo membro da família quimase e, desde então, denominada de quimase do coração humano (Urata *et al.*, 1990b).

Embora várias enzimas, incluindo a tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), tonina, catepsina G (EC 3.4.21.20), calicreína (3.4.21.34) e quimase I de rato (EC 3.4.21.39), possam produzir Ang II *in vitro* por meio da clivagem da ligação Phe⁸-His⁹ da Ang I (Urata *et al.*, 1995; Hollenberg *et al.*, 1998), a atividade fisiológica das mesmas no sistema cardiovascular *in vivo* não está esclarecida. Além disso, algumas destas enzimas, como por exemplo tripsina e quimotripsina, também degradam a Ang II (Le Trong *et al.*, 1987), deixando em dúvida a função destas enzimas na formação deste hormônio. Interessante notar que, enquanto as quimases humana e de hamster clivam eficientemente Ang I, formando Ang II (Takai *et al.*, 1996; Urata *et al.*, 1990b), a quimase I de rato apresenta principalmente atividade de

degração da Ang II (Le Trong *et al.*, 1987). Dados gerados a partir da suscetibilidade dessas diferentes enzimas a inibidores de proteases permitiram a classificação das enzimas formadoras de Ang II em três categorias (Arakawa, 1996). A primeira categoria corresponde à metalodipeptidil carboxipeptidase conhecida como ECA. A segunda categoria inclui um grupo de serino-proteases sensíveis à quimostatina, tais como a enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina da artéria mesentérica de cão (Okunishi *et al.*, 1987), quimase (Urata *et al.*, 1990b; Takai *et al.*, 1996) e catepsina G (Tonnesen *et al.*, 1982). A terceira categoria agrupa as serino-proteases sensíveis à aprotinina, destacando-se a calicreína (Maruta e Arakawa, 1983), tripsina (Arakawa, 1996) e tonina (Boucher *et al.*, 1974).

A despeito das diferenças de características entre as quimases de diferentes espécies, essas enzimas têm sido implicadas em vias funcionalmente relevantes de formação de Ang II independentes da ECA (Okunishi *et al.*, 1987; Urata *et al.*, 1996; Waldeck *et al.*, 1997). A determinação de atividades funcionais distintas para ECA e quimases tem sido possível, em alguns casos, pela utilização de inibidores (Bastos *et al.*, 1995; Cushman *et al.*, 1977) e substratos (Hoit *et al.*, 1995) seletivos. O desenvolvimento do composto Z-Ile-Glu-Pro-Phe-CO₂Me (CH 5450), um inibidor peptídico da quimase do coração humano (Bastos *et al.*, 1995), forneceu uma ferramenta farmacológica importante para a investigação das enzimas responsáveis pela formação tecidual de Ang II (Waldeck *et al.*, 1997), principalmente por ser um inibidor seletivo de

quimases em concentrações nanomolares. Evidências de que vias enzimáticas independentes da ECA sejam funcionais na conversão de precursores circulantes de Ang II foram fornecidas por experimentos *in vivo* (Garrison *et al.*, 1997; Hoit *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1999; Mangiapane *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1998) utilizando o peptídeo sintético [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I, um precursor biologicamente inativo que seletivamente libera Ang II após incubação com quimases, mas não com ECA ou carboxipeptidases (Hoit *et al.*, 1995). Esse substrato tem sido utilizado como ferramenta para demonstrar a participação de quimases na formação de Ang II em preparações derivadas de tecidos de humanos (Waldeck *et al.*, 1997; Wolny *et al.*, 1997), primatas (Hoit *et al.*, 1995; Mangiapane *et al.*, 1994), hamsters (Nishimura *et al.*, 1998), cães (Murakami *et al.*, 1997), gatos (Garrison *et al.*, 1997) e ratos (Inoue *et al.*, 1999).

Nosso grupo (Oliveira *et al.*, 1991) demonstrou a existência de algumas peptidases no perfusato do leito arterial mesentérico (LAM) isolado de rato, preparado para perfusão conforme descrição de McGregor (1965). Observou-se que a solução de perfusão recirculante acumulava endo e exopeptidases solúveis, entre as quais foi identificada uma serino-protease insensível ao captopril capaz de formar Ang II tanto a partir de Ang I quanto do substrato tetradecapeptídeo da renina (TDP). Posteriormente, nosso grupo isolou e purificou essa serino-protease formadora de Ang II do perfusato do LAM isolado de rato, a qual foi obtida numa forma altamente purificada por uma combinação de cromatografias de filtração e afinidade (Paula *et al.*, 1998). A

enzima mostrou-se sensível à quimostatina e foi identificada como uma glicoproteína de massa molecular igual a 28,5 kDa. A seqüência amino-terminal dos dez primeiros resíduos desta enzima mostrou-se idêntica à da elastase-2 pancreática de rato (EC 3.4.21.71), sendo a enzima denominada elastase-2 formadora de Ang II do perfusato do LAM isolado de rato (E-2LAMR). As propriedades enzimológicas desta elastase-2 claramente indicam diferenças entre esta peptidase e a ECA em vários aspectos, porém mostra similaridades com a enzima sensível à quimostatina da artéria renal isolada do cão (Okamura *et al.*, 1990) e quimase do coração humano (Arakawa, 1996). Uma atividade funcional para essa elastase-2 tem sido sugerida em estudos realizados por nosso grupo no LAM isolado de rato, os quais indicam a possível participação da E-2LAMR numa via independente da ECA responsável pelos efeitos farmacológicos de Ang I e TDP nessa preparação (Faria e Salgado, 1992; Leite e Salgado, 1992; Leite *et al.*, 1997). Dados do nosso laboratório também sugerem que essa via independente da ECA para geração de Ang II no LAM isolado de rato tem sua atividade aumentada no modelo de hipertensão um-rim, um clip (Leite e Salgado, 1992).

Como mencionado anteriormente, com base na afinidade a substratos e sensibilidade a inibidores, a E-2LAMR mostra similaridades com outras enzimas formadoras de Ang II. Dessa maneira, para a compreensão da base estrutural da ação enzimológica da E-2LAMR e para uma clara distinção entre esta e outras serino-proteases, são necessários estudos mais aprofundados

envolvendo, por exemplo, a clonagem e o seqüenciamento do cDNA que codifica a toda a molécula da enzima.

2 - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

Com base no exposto, este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

2.1 - Investigar a interação da E-2LAMR com substratos e inibidores de quimases formadoras de Ang II e de elastases-2 pancreáticas;

2.2 - Investigar a importância funcional da E-2LAMR na geração de Ang II no LAM isolado de rato;

2.3 – Clonar e seqüenciar o cDNA da E-2LAMR e

2.4 - Investigar a localização da E-2LAMR.

3 – MATERIAIS

3.1 – Animais: Ratos machos Wistar ou Sprague Dawley com peso entre 180 e 250 g foram fornecidos, respectivamente, pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e Harlan Sprague-Dawley Inc (Indianapolis, IN, Estados Unidos). Coelhos machos adultos jovens foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais tiveram livre acesso à ração e água.

3.2 – Experimentos envolvendo ensaios enzimáticos e purificação da E-2LAMR: Ang I e Ang II humanas foram obtidas da Peninsula (Belmont, CA, Estados Unidos). Ang I humana (utilizada no Medical College of Wisconsin), TDP, N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (N-suc-AAPF-pNA), N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilida (N-suc-AAPL-pNA), quimostatina, captopril, *o*-ftaldialdeído, *p*-nitroanilina, periodato de sódio, propilene-glicol, cloreto de manganês e ovo-inibidor da clara de ovo de galinha foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos). Resina Sephacryl S-300 Alta Resolução foi obtida da Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, Estados Unidos). Agarose-hidrazida (CarboLink™ Coupling Gel) foi obtida da Pierce (Rockford, IL, Estados Unidos). [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e Acetil-Ala-Ala-Pro-Leu-clorometilcetona (Ac-AAPL-CK) foram sintetizados por encomenda na Anaspec Inc (San Jose, CA, Estados Unidos). Z-Ile-Glu-Pro-Phe-CO₂Me (CH 5450) foi generosamente cedido por Dr. Graeme Sample (Ferring Research Ltd, Southampton, Reino Unido). A solução estoque de Ac-

AAPL-CK (5 mM) foi preparada em HCl 1,0 mM e as de CH 5450 (10 mM), N-suc-AAPF-pNA (20 mM) e N-suc-AAPL-pNA (20 mM) foram preparadas em dimetilsulfóxido.

3.3 – Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE): SDS foi obtido da Sigma. Corante para detecção de proteínas em gel de poliacrilamida (Coomassie® G250), solução de acrilamida/bisacrilamida 30%, persulfato de amônio, N, N, N', N' - tetrametiletilenediamina (TEMED), β -mercaptoetanol, sistema de eletroforese (Mini-Protean II cell system), gerador de corrente elétrica (PowerPac 300) e marcador de peso molecular de proteínas (Kaleidoscope) foram obtidos de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos. As soluções estoques foram as seguintes: tampão para gel de separação (concentrado 4X: Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4%), tampão para gel de concentração (concentrado 4X: Tris-HCl 0,5 M, SDS 0,4%), persulfato de amônio 10%, tampão para eletroforese (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3), tampão das amostras de proteína (concentrado 5X: Tris-HCl 60 mM, glicerol 25%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 14,4 mM e azul de bromofenol 0,1%), água bi-distilada e água saturada em butanol (1:1).

3.4 – Experimentos de imunológica: Membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia), IgG de carneiro biotinizada anti IgG de coelho, avidina, peroxidase (horseradish peroxidase tipo IV, Sigma) biotinizada, soroalbumina bovina (Sigma), 4-cloro-naftol (Sigma), leite Molico, solução salina tamponada em Tris (TBS; Tris-HCl 30 mM/NaCl 0,15 M, pH 8,1). Com exceção dos fabricantes indicados, os reagentes foram preparados no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, conforme descrito por Paula (1998).

3.5 – Experimentos com LAM isolado de rato: Polígrafo (Hewlett Packard 7754B System), transdutor de pressão (Hewlett Packard 1280C), bomba peristáltica (Multiperpex Pump 2115, LKB), fenilefrina (Sigma) e saralasin (Sar¹-Ile⁸-Ang II; Sigma). Outras substâncias utilizadas nesses experimentos já foram anteriormente catalogadas e serão devidamente mencionadas no capítulo Métodos.

3.6 – Experimentos de biologia molecular:

3.6.1 - Extração de RNA total: TRIzol (Gibco BRL Life Technologies, Frederick, MD, Estados Unidos), RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, Estados Unidos), colunas QIAshredder para homogeneização de amostras (Qiagen Inc),

homogenizador de tecidos (PowerGen 700, Fisher, Pittsburg, PA, Estados Unidos) e água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC; Sigma) (0,1% volume/volume).

3.6.2 – Eliminação de possível DNA genômico contaminante no RNA total: DNase (Amersham Pharmacia).

3.6.3 – Verificação da qualidade do RNA total: agarose livre de DNase e RNase (Sigma), tampão MOPS (concentrado 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M e EDTA 0,01 M), tampão das amostras de RNA (concentrado 10X: glicerol 50%, EDTA 1 mM e azul de bromofenol 0,4%), brometo de etídio (10 mg/mL; Sigma), formaldeído 37% (Sigma), formamida (Sigma), sistema de eletroforese horizontal (Horizon 11-14, Gibco BRL Life Technologies) e gerador de corrente elétrica (PowerPac 300).

3.6.4 - Transcrição reversa (RT): Kit para síntese de cDNA (First-strand cDNA synthesis kit; Amersham Pharmacia), ciclador térmico (DNA Thermal Cycler 480, Pelkin Elmer, Estados Unidos).

3.6.5 – Reação da polimerase em cadeia (PCR): Tampão para PCR (concentrado 10X; Gibco BRL Life Technologies), dNTPs (10 mM; Gibco BRL Life Technologies), primers sense e anti-sense (20 μ M; Research Genetics, Huntsville, AL, Estados Unidos – Tabela 1), Platinum Taq DNA polimerase (5,0 U/ μ L; Gibco BRL Life Technologies), tubos Hot Start 50 para PCR (Fisher) e ciclador térmico.

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação.

Alvo	Tamanho Antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
β -actina	351 pb	aaccgcgagaagatgaccagatcatgttt	agcagccgtggccatctcttgctcgaagtc
Elastase-2	875 pb	acagacatccacggacacac	gtgcgttccaagggtgac
Elastase-2	177 pb	ggctgcaactacccccgtaag	oligo d(T) ₁₈
Fator de von Willebrand	587 pb	ccctgcctcatcaatgagtgtgt	ggctcctcacatgtgtcacagca

3.6.6 – Visualização de produtos amplificados na PCR: Agarose livre de DNase e RNase, brometo de etídio, marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Amersham Pharmacia), EDTA tamponado em Tris (TBE, concentrado 10X: Trizma base 0,9 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 0,5 M), tampão das amostras de DNA (concentrado 6X: azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%), sistema de eletroforese (Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad), gerador de corrente elétrica (PowerPac 300) e aparelho detector de luz ultra-violeta (Eagle Eye® II Still Video System, Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos).

3.6.7 – Clonagem: Kit Topo TA Cloning® Version K2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), ágar bacteriológico (Bacto-Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI), caldo Luria-bertani (LB Broth Base, Life Technologies, Paisley, Scotland), ampicilina (50 mg/mL; Sigma) e glicerol (Sigma).

3.6.8 – Purificação de DNA de plasmídios de clones positivos: QIAprep Miniprep (Qiagen).

3.6.9 – Ponteiras e tubos de microcentrifuga: Todos os procedimentos de pipetagem foram realizados com ponteiras providas de filtros e livres de DNase e RNase (Fisher). Todos os tubos de microcentrifuga (0,5 ou 1,5 mL) eram livres de DNase e RNase (Fisher).

3.7 – Experimentos envolvendo cultura de células

3.7.1 – Colagenase tipo I (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, Estados Unidos).

3.7.2 – Meio de cultura RPMI 1640 com e sem vermelho fenol (Cellgro, Herndon, VA, Estados Unidos).

3.7.3 - Soro bovino fetal (Sigma).

3.7.4 – Solução de antibiótico/antimicótico concentrada 100X (Sigma).

3.7.5 – Gentamicina (50 mg/mL; Gibco BRL Life Technologies).

- 3.7.6 – Lâminas para cultura de células com câmaras individuais (Fisher).
- 3.7.7 – Solução não enzimática para dissociação de células (Concentrada 1X; Sigma).
- 3.7.8 – Placas para cultura de células (de 6 poços e de 100 mm x 20 mm; Corning®, Acton, MA, Estados Unidos).
- 3.7.9 – Solução salina de Dulbecco tamponada em fosfato (DPBS; Cellgro).
- 3.7.10 – Soro de carneiro (Bio-Rad).
- 3.7.11 – IgG de camundongo anti-CD31 de rato (BD Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos).
- 3.7.12 – IgG de carneiro anti-IgG de camundongo (Alexa™ 488, Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos).
- 3.7.13 – Soroalbumina bovina (Sigma).
- 3.7.14 – Anti-Fade (Oncor, Gaithersburg, MD, Estados Unidos).
- 3.7.15 – Azul Trypan (Gibco BRL Life Technologies).
- 3.7.16 – Colunas Centriplus YM-10 para concentração de amostras por ultrafiltração (Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos).
- 3.7.17 – Ponteiras estéreis de 1, 10 e 20 mL (Fisher).
- 3.7.18 – Capela com fluxo laminar.
- 3.7.19 – Outras substâncias utilizadas nesses experimentos já foram anteriormente catalogadas e serão devidamente mencionadas no capítulo Métodos.

4 – MÉTODOS

Como este trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Medical College of Wisconsin, sempre que necessário serão salientadas as diferenças existentes entre experimentos similares realizados em ambas as instituições.

4.1 – Remoção, perfusão do LAM isolado de rato e coleta de perfusato

As preparações de leito mesentérico foram isoladas dos animais conforme descrição de McGregor (1965). Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal, com tionembutal (40 mg/kg, em salina) e, em seguida à laparotomia, o leito era estendido e tinha os ramos pancreático-duodenal, ileo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior ligados e seccionados. O intestino era ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior era isolada na sua origem e à altura da aorta abdominal canulada com uma cânula de polietileno (PE-50; Clay Adams, Parsipanny, NJ, Estados Unidos) de aproximadamente 4 cm de comprimento. Aproximadamente 1 mL de solução de Krebs (NaCl 120 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂.2H₂O 3 mM; MgCl₂.6H₂O 1,43 mM; NaHCO₃ 25 mM; KH₂PO₄ 1,17 mM; glicose 11 mM; EDTA 0,03 mM; pH 7,4) heparinizada era injetado no leito mesentérico. O animal era sacrificado por rompimento do diafragma e em seguida o intestino delgado era separado cortando-se rente à borda intestinal, sendo a preparação lavada com 10 mL de solução de Krebs. Após este

procedimento o leito mesentérico era conectado a um sistema de perfusão mantido a 37°C. A perfusão foi realizada com solução de Krebs num fluxo constante de 1 mL/min, por meio de uma bomba peristáltica, conectada à cânula. Após perfusão aberta durante 30 min para garantir a total remoção de substâncias sanguíneas, as conexões do sistema de perfusão eram modificadas para manter 10 mL de solução de Krebs recirculando através da preparação isolada. A cada período de 60 min os 10 mL da solução de perfusão eram coletados e trocados pelo mesmo volume de uma solução nova de Krebs. O anestésico utilizado no Medical College of Wisconsin foi o pentobarbital sódico (50 mg/kg).

4.2 - Concentração do perfusato do LAM isolado de rato

O perfusato de 12 leitões mesentéricos (aproximadamente 700 mL) foi centrifugado (6.000 g x 10 min) a 4°C para a remoção de precipitado. A solução sobrenadante foi filtrada em membrana Millipore HA (0,45 µm) e o filtrado concentrado por ultrafiltração em membrana Amicon YM-10, sob pressão de 20 psi, para um volume final de 5 mL. Em seguida esta amostra obtida foi colocada num tubo de diálise e concentrada para 1 mL com polietilenoglicol-20.000. Para os experimentos realizados no Medical College of Wisconsin foram perfundidos 8 leitões mesentéricos.

4.3 – Medida da atividade enzimática

4.3.1 – Para purificação da E-2LAMR utilizada nos experimentos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

A conversão enzimática de Ang I em Ang II foi medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu (Yang e Neff, 1972). É importante salientar que o perfusato do LAM isolado de rato não contém dipeptidases que degradam His-Leu (Oliveira *et al.*, 1991). O procedimento a seguir foi aplicado para amostras do perfusato do LAM concentrado e para amostras obtidas durante as etapas de purificação da E-2LAMR. O volume de 10 µL de preparações da enzima devidamente diluídas foi incubado a 37°C com 100 µL de solução de Ang I (25 nmol) em TBS. Após 10 min foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5 M para interromper a ação enzimática. O dipeptídeo His-Leu foi detectado pela adição de 0,1 mL de *o*-ftaldialdeído 1% (massa/volume, em metanol), seguido da adição de 0,2 mL de HCl 6 M após 4 min. A fluorescência foi medida num espectrofluorímetro com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. Foi realizada uma curva padrão do dipeptídeo His-Leu (0,2-10 nmol) para quantificar a Ang II formada na reação de conversão de Ang I. Para todos os resultados apresentados nesse trabalho, uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de His-Leu por min, nas condições descritas.

4.3.2 – Para os outros ensaios enzimáticos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com a E-2LAMR purificada de acordo com a descrição no item 4.3.1

Todos os ensaios com a E-2LAMR foram realizados a 37°C, incubando-se o devido substrato com a enzima em tampão TBS. Sempre que necessário, as reações foram paralisadas pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) para cada mL de mistura de reação. A clivagem de Ang I ou de outros substratos foi avaliada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de fase reversa num equipamento Shimadzu SCL-6B acoplado a uma coluna Shim-pak ODS (4 x 250 mm). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de acetonitrila (12-42%, 30 min) em TFA 0,1%, num fluxo de 1,0 mL/min e monitorados pela absorvância no comprimento de onda de 214 nm. As concentrações molares de Ang II ou outros produtos formados foram calculadas com base numa curva padrão realizada em HPLC do peptídeo sintético cognato. As hidrólises dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA foram acompanhadas fotometricamente pelo registro do aumento da absorvância na mistura de reação (comprimento de onda de 410 nm) resultante da liberação de *p*-nitroanilina (Del Mar *et al.*, 1980). Os efeitos inibitórios de diferentes substâncias sobre a atividade da E-2LAMR foram determinados pela incubação da enzima com diferentes concentrações do inibidor por 10-15 min a 37°C antes da medida da atividade residual sobre o devido substrato. A IC₅₀, a concentração total do inibidor na qual a reação

enzimática corresponde a 50% da reação na ausência de inibidor, foi determinada para o inibidor CH 5450 em duas reações catalisadas pela E-2LAMR. Para o inibidor Ac-AAPL-CK foi determinada a IC_{50} de uma reação catalisada pela enzima.

4.3.3 – Para purificação da E-2LAMR utilizada nos experimentos realizados no Medical College of Wisconsin

A medida da atividade enzimática nas frações cromatográficas das diferentes etapas do processo de purificação da E-2LAMR utilizada nos experimentos realizados no Medical College of Wisconsin foi realizada usando-se os substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA (0,73 mM) e N-suc-AAPL-pNA (0,56 mM). Para tanto, 20 μ L de cada amostra foram individualmente incubados em TBS com cada um dos substratos cromogênicos numa placa transparente de 96 poços, num volume final de 100 μ L. A absorbância de cada mistura de reação resultante da liberação de *p*-nitroanilina foi lida em espectrofotômetro (ELX 800, Bio-Tek® Instruments Inc, Winoosli, VT, Estados Unidos) em comprimento de onda de 405 nm e a quantidade de produto formado foi determinada pela comparação com uma curva padrão de *p*-nitroanilina (1-64 nmol).

4.3.4 – Para os outros ensaios enzimáticos realizados no Medical College of Wisconsin com a E-2LAMR purificada de acordo com a descrição no item 4.3.3

No Medical College of Wisconsin a conversão enzimática de Ang I para Ang II também foi medida pelo ensaio fluorimétrico para detecção do dipeptídeo His-Leu, com algumas adaptações ao que foi descrito no item 4.3.1 de Métodos. Este ensaio foi realizado em placa opaca de 96 poços e os volumes dos reagentes foram os seguintes: 30 μL de solução de Ang I, 250 μL de NaOH 0,6 M, 25 μL de *o*-ftaldialdeído e 50 μL de HCl 6,0 M. As medidas foram feitas em fluorímetro (FL 600 Bio-Tek® Instruments Inc, Winoosli, VT, Estados Unidos) com comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. O efeito de inibidores foi determinado seguindo-se a mesma descrição do item 4.3.2 de Métodos.

4.4 – Síntese da resina de afinidade para purificação da E-2LAMR

Para os experimentos realizados na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foi utilizada a coluna de afinidade (Shepharose-ovoinibidor) sintetizada por Paula *et al.* (1998). No Medical College of Wisconsin foi sintetizada uma nova coluna (Agarose-ovoinibidor) pelo acoplamento de ovoinibidor de clara de ovo de galinha à agarose-hidrazida de acordo com os procedimentos recomendados por O'Shannessy e Wilchek (1990). Resumidamente, a 1 mL de solução de ovoinibidor (5 mg/mL) em tampão fostato

de sódio 0,1 M, pH 6,0 foi adicionado periodato de sódio para uma concentração final de 50 mM, submetendo-se a mistura à agitação lenta durante 30 min ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se glicina para uma concentração final de 0,2 M e imediatamente 30 µL de propileneglicol. A mistura foi deixada sob agitação lenta durante 1 h ao abrigo da luz. A seguir a mistura foi filtrada numa coluna de Sephadex G-25 (25 x 0,8 cm) equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0 e incubada com a agarose-hidrazida (3 mL) na presença de cloreto de manganês 1 mM durante 72 h a 4°C. Em seguida, a resina foi lavada com 20 mL de cada uma das seguintes soluções: NaCl 0,5 M, NaCl 0,25 M e NaCl 0,15 M. A resina agarose-ovoinidor foi armazenada em NaCl 0,15 M a 4°C até o momento do uso.

4.5 - Purificação da E-2LAMR

4.5.1 - Cromatografia do perfusato concentrado do LAM isolado de rato em coluna de Sephacryl S-300

O perfusato concentrado foi clarificado por centrifugação e filtrado numa coluna de Sephadex G-25 (5 x 1 cm) equilibrada em TBS para remover os componentes de baixa massa molecular. A fração rica em proteínas eluída da Sephadex G-25 (1,5 mL) foi aplicada numa coluna (90 x 1 cm) de Sephacryl S-300 previamente equilibrada com TBS. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura ambiente com um fluxo de 3,8 mL/h, coletando-se frações de 1 mL. Em cada fração a concentração de proteína foi estimada pela leitura da

absorbância em 280 nm e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.3 de Métodos. Para os experimentos realizados no Medical College of Wisconsin foi construída uma coluna (92 x 1 cm) de Sephacryl S-300 Alta Resolução, sendo a cromatografia desenvolvida num fluxo de 6,0 mL/h.

4.5.2 – Cromatografia de afinidade nas colunas Sepharose-ovoinibidor ou Agarose-ovoinibidor

As frações ativas da etapa de purificação em coluna Sephacryl S-300 foram reunidas e aplicadas às colunas de afinidade equilibradas em TBS. As colunas de afinidade foram operadas em temperatura ambiente num fluxo de aproximadamente 10 mL/h. As proteínas não retidas foram lavadas pela passagem de 20 mL de TBS. A E-2LAMR foi eluída das resinas de afinidade com HCl 20 mM, atentando-se para a neutralização do excesso de ácido nas frações logo após a coleta com tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,1. Estimou-se a concentração de proteína pela absorbância em 280 nm e avaliou-se a atividade enzimática em todas as frações de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.1 e 4.3.3 de Métodos. As frações ativas foram reunidas e denominadas E-2LAMR.

4.6 – Hidrólise enzimática de peptídeos e análise química dos produtos

Após a incubação de Ang I e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I com a E-2LAMR, as misturas de reações foram individualmente submetidas à HPLC de fase reversa, como descrito anteriormente no item 4.3.2 de Métodos e os materiais correspondentes a cada pico de absorção em 214 nm foram coletados, secos sob vácuo e submetidos à análise de amino ácidos após hidrólise ácida de acordo com o procedimento descrito por Liu e Boykins (1989). A determinação dos sítios de clivagem foi conseguida pelo pareamento da composição de amino ácidos para cada fragmento isolado com a composição da estrutura primária do substrato intacto (Ang I e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I).

4.7 – Determinação de constantes cinéticas

Para a determinação de parâmetros cinéticos das reações de hidrólise de precursores de Ang II (Ang I, [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e TDP) e de substratos cromogênicos (N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA) pela E-2LAMR, as velocidades iniciais foram determinadas, em duplicatas, em condições que limitaram o consumo do substrato a menos de 10% da concentração inicial.

4.7.1 – Determinação de constantes cinéticas para a hidrólise de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I pela E-2LAMR

Amostras de E-2LAMR (0,41 mU) foram incubadas por 60 min a 37°C com oito diferentes concentrações de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I na faixa de 2 a 160 µM, num volume final de 1,0 mL de TBS. Após a paralisação das reações com a adição de 10 µL de TFA 5%, cada solução obtida foi aplicada individualmente em coluna de Sep-pak C18 (Millipore, Bedford, MD, Estados Unidos) que foi então lavada com 5 mL de acetonitrila 5% em TFA 0,1%, seguidos de 3 mL de acetonitrila 60% em TFA 0,1% para a eluição dos peptídeos ligados à resina. As soluções obtidas foram secas sob vácuo e analisadas por HPLC de fase reversa conforme descrito no item 4.3.2 de Métodos.

4.7.2 – Determinação de constantes cinéticas para a hidrólise de TDP pela E-2LAMR

Amostras de E-2LAMR (0.01 fmol) foram incubadas por 30 min a 37°C com dez diferentes concentrações de TDP na faixa de 2,5 a 1280 µM, num volume final de 100 µL de TBS. As reações foram paralisadas pelo aquecimento a 100°C durante 3 min. Diluições apropriadas das misturas de reação foram analisadas para a detecção de Ang II por radioimunoensaio, conforme descrição de Rieder *et al.* (1997). Foi realizada uma curva padrão em radioimunoensaio para Ang II na faixa de 0,32 a 82,56 fmol, a qual possibilitou a quantificação da

reação de conversão de TDP para Ang II. Estes experimentos foram realizados no Medical College of Wisconsin.

4.7.3 – Determinação de constantes cinéticas para a hidrólise dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-Pna pela E-2LAMR

Amostras de E-2LAMR (20 mU) foram incubadas a 37°C com dez diferentes concentrações de N-suc-AAPF-pNA ou N-suc-AAPL-pNA na faixa de 40 a 1600 μM , num volume final de 500 μL de TBS. A formação do produto *p*-nitroanilina foi calculada pela medida do aumento na absorbância em 410 nm tomada em intervalos de 15 s durante 3 min.

4.7.4 – Cálculo de parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos K_m , K_{cat} e eficiência catalítica (K_m/K_{cat}) foram derivados dos dados de velocidades iniciais usando-se o programa de computador Grafit versão 3.0 (Leatherbarrow, 1992), o qual realizou análise de regressão não linear dos dados de acordo com a equação de Michaelis-Menten.

4.8 – Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi estimada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se como padrão uma solução de soroalbumina bovina.

4.9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Amostras da E-2LAMR nos vários estágios de purificação foram analisadas por SDS-PAGE. O gel de separação foi preparado com uma espessura de 0,75 mm numa concentração final de 12% de poliacrilamida misturando-se os seguintes volumes das soluções estoques descritas no item 3.3 de Materiais: 4 mL da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, 2,5 mL do tampão para gel de separação, 3,5 mL de água bi-destilada, 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. Essa mistura foi aplicada entre duas placas de vidro montadas de acordo com as instruções do fabricante do sistema de eletroforese, coberta com água saturada em butanol e deixada em repouso para polimerizar por 1 h. Em seguida, foi retirada a água saturada em butanol pela lavagem com água bi-destilada, secando-se o gel polimerizado com papel de filtro. O gel de concentração foi preparado misturando-se os seguintes volumes das soluções estoques descritas no item 3.3 de Materiais: 0,67 mL da da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, 1,0 mL do tampão para gel de concentração, 2,3 mL de água bi-destilada, 30 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. Essa mistura foi aplicada sobre o gel de separação e em seguida foi aplicado um pente com 10 dentes, o qual permitiu a formação de cavidades para a aplicação de amostras distintas. Após a polimerização do gel de concentração (aproximadamente 1 h), o pente foi retirado e o gel foi transferido para uma cuba com tampão para eletroforese. O gel foi então carregado com o padrão de

peso molecular de proteínas e com as amostras da E-2LAMR nos vários estágios de purificação, utilizando-se aproximadamente a mesma quantidade de mU enzimáticas. Para serem aplicadas ao gel, as amostras foram misturadas a 1/5 do volume final com o tampão das amostras de proteína e aquecidas a 100°C durante 5 min para desnaturação das amostras. A eletroforese foi realizada com a aplicação de corrente de 200 V durante 45 min. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água bi-destilada, sob agitação lenta, por 5 períodos de 30 min; em seguida, foi corado por imersão em 100 mL de Coomassie® G250 durante 1 h, sob agitação lenta. O gel foi descorado por 5 lavagens sucessivas de 30 min com água bi-destilada, sob agitação lenta.

4.10 - Imunização de coelhos para obtenção de anticorpos anti-E-2LAMR

Dois coelhos machos adultos jovens foram imunizados com a E-2LAMR utilizando-se adjuvante de Freund, como descrito por Herbert (1978). Cada animal recebeu uma quantidade total de antígeno de 122 mU de atividade enzimática. Os anticorpos anti-E-2LAMR foram preparados a partir dos soros imunes conforme descrição de Fahey e Terry (1978) e estocados em glicerol 30% numa temperatura de -20°C.

4.11 - Imunodot com a utilização de anticorpos de coelho anti-E-2LAMR

Diferentes quantidades da E-2LAMR (1 mU, 0,5 mU e 0,25 mU) foram aplicadas em duplicata sobre uma membrana de nitrocelulose, permitindo-se que a fixação ocorresse em câmara úmida a 4°C durante 15 h. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite Molico 4% em TBS durante 40 min. A membrana foi cortada em duas metades iguais, sendo cada uma delas incubada com o anticorpo primário anti-E-2LAMR diluído 80X em leite Molico 4% em TBS durante 15 h a 4°C (vale ressaltar que numa das metades, o anticorpo primário foi pré-incubado com 15 mU de E-2LAMR durante 15 min a 37°C). Posteriormente, ambas as metades da membrana original foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG de carneiro biotinilada anti IgG de coelho) numa diluição de 400X em leite Molico 4% em TBS durante 5 h a 4°C. Para a amplificação do sinal, as membranas foram incubadas numa mistura de avidina e TBS (diluição de 2.500X) durante 40 min a 4°C e em seguida numa mistura de HRP biotinilada e tampão (diluição de 2.500X) durante 80 min a 4°C. Posteriormente, as duas metades da membrana foram incubadas com o complexo ABC (1 mL de soroalbumina bovina, 20 µL de horse raddish peroxidase e 25 µL de avidina) durante 1 h, procedendo-se a revelação com a adição do substrato para a peroxidase biotinilada (4-cloro-naftol 0,1 mg/mL em trietanolamina/NaCl 0,15 M, pH 7,5). A reação foi paralisada com a lavagem das membranas em água destilada.

4.12 – Experimentos funcionais realizados com o LAM isolado de rato

4.12.1 - Pressão de perfusão basal

O LAM foi isolado conforme a descrição feita no item 4.1 de Métodos, realizando-se perfusão aberta durante todo o experimento. A solução de Krebs, mantida a 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), foi infundida num fluxo constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em polígrafo por meio de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão. Os experimentos foram precedidos por um período de 30 min de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal era observada. Em seguida foi adicionada fenilefrina (0,6 - 2,4 µg/mL) à solução de perfusão até que a pressão de perfusão se mantivesse em torno de 100 mmHg, evitando-se assim o fenômeno da taquifilaxia à Ang II (Juul *et al.*, 1987). A solução contendo fenilefrina foi mantida até o final do experimento.

4.12.2 - Administração de drogas

Para obtenção das curvas dose-resposta à Ang II e seus precursores (Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I) no LAM isolado, os referidos peptídeos foram aplicados por meio de injeção única (*in bolus*) no sistema de perfusão, na porção anterior à bomba peristáltica. O intervalo entre as injeções foi de no mínimo 5 min após o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores. Os peptídeos injetados foram diluídos em solução de Krebs

e o volume de injeção não foi superior a 40 μ L. As soluções contendo os peptídeos foram preparadas diariamente e mantidas em gelo durante todo o experimento. Os inibidores utilizados foram diluídos na solução de perfusão. As concentrações dos peptídeos foram confirmadas previamente por análise de amino ácidos.

4.13 – Extração de RNA total

Abaixo são descritos os dois métodos utilizados para a extração de RNA total utilizados nesse trabalho.

4.13.1 – Extração de RNA para os diferentes tecidos (pâncreas, LAM, pulmão, coração, rim, fígado e baço) e aorta

Para os tecidos e aorta utilizou-se extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. Logo após a remoção dos animais, os tecidos e aorta foram imediatamente homogenizados em tubos de centrífuga de 50 mL contendo TRIzol (0,1 g de tecido/1,0 mL de TRIzol), utilizando-se um homogenizador de tecidos. Os tubos foram incubados por 5 min a 4°C e então foi adicionado um volume de 20% de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso a 4°C por 5 min, sendo em seguida centrifugados a 7.500 g por 25 min. A camada superior (fase aquosa) foi recuperada em alíquotas de 650 μ L que foram colocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 650 μ L de isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso a 4°C por 15 min. Após

centrifugação a 14.000 rpm por 20 min a 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% (em água tratada com DEPC), agitando-se vigorosamente. Realizou-se centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4°C, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se outra centrifugação com 1 mL de etanol 70% a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 min para permitir a secagem das amostras. Para redissolver o RNA total, os tubos de microcentrífuga receberam um volume de 50 µL de água tratada com DEPC e foram incubados a 65°C por 15 a 30 min até a dissolução dos precipitados. Reuniu-se em um único tubo de microcentrífuga de 1,5 mL as amostras provenientes do mesmo tecido ou aorta. As amostras de RNA total foram mantidas a –80°C até o momento do uso.

4.13.2 – Extração de RNA total de células

RNA total de células foi extraído de acordo com as orientações do fabricante do RNeasy mini kit, utilizando as colunas QIAshredder para homogeneização das amostras. Todo o processo detalhado pode ser encontrado no endereço: http://www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/rnamini/1016272HBRNY_Iso_a_nim_cell.pdf. As amostras de RNA total foram mantidas a –80°C até o momento do uso.

4.14 – Tratamento do RNA total com DNase

Para que fosse evitada a possibilidade de contaminação do RNA total extraído de diferentes tecidos e células por DNA genômico, procedeu-se o tratamento de todas as amostras com DNase durante 15 min em temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado seguindo-se as orientações do fabricante RNeasy mini kit. Todo o processo detalhado pode ser encontrado no endereço: http://www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/rnamini/1016272HB_RNY_cleanup.pdf.

4.15 – Quantificação do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (1:110 em água destilada) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: $[RNA] = A_{260} \times 40 \times 110$ (fator de diluição), sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

4.16 – Avaliação da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada de duas formas. A primeira constou de diluição do RNA (1:110 em Tris-HCl 10 mM, pH 7,8) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Observou-se a relação A_{260}/A_{280} , a qual foi considerada

aceitável se estivesse entre 1,9 e 2,1, pois valores nesse intervalo indicam ausência de DNA na amostra. A segunda forma de avaliação da qualidade do RNA total foi a verificação de possível degradação em gel de agarose 1% (os reagentes utilizados nesse procedimento estão descritos no item 3.6.3 de Materiais). Inicialmente adicionou-se 1 g de agarose a 85 mL de água tratada com DEPC, aquecendo-se em forno de microondas até completa dissolução. Aguardou-se até que a mistura atingisse aproximadamente 60°C e adicionou-se 10 mL de MOPS concentrado 10X, 5,5 mL de formaldeído 37% e 6,4 µL da solução de brometo de etídio 10 mg/mL. Preparou-se um gel de 0,65 cm de espessura no sistema de eletroforese horizontal, aguardando-se a polimerização por 1,5 h. Às amostras de RNA (3 µg) foram adicionados 3,3 µL de formaldeído 37%, 10 µL de formamida e 1 µL de MOPS concentrado 10X, completando-se para um volume final de 18 µL com água tratada com DEPC; essa mistura foi realizada em tubos de microcentrifuga de 0,5 mL. Os tubos foram incubados a 55°C por 15 min e em seguida adicionou-se 2 µL do tampão das amostras de RNA, procedendo-se o carregamento do gel com todas as amostras. A eletroforese foi realizada com tampão MOPS concentrado 1X com aplicação de corrente de 70 V por 3,5 h. O gel foi lavado por 2 períodos sucessivos de 30 min com água tratada com DEPC sob agitação lenta e a seguir o gel foi fotografado em aparelho detector de luz ultra-violeta para visualização das unidades 28S e 18S.

4.17 – RT

O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada num volume de reação de 33 μL utilizando-se 10 μg de RNA total, 0,2 μg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH8,3; KCl 68 mM e MgCl_2 9 mM), soroalbumina bovina 0,08 mg/mL, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 U de transcriptase reversa. Todos os reagentes citados faziam parte do “First-strand cDNA synthesis kit” obtido da Amersham Pharmacia. cDNA foi sintetizado durante um período de 60 min de incubação a 37°C e a reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min.

4.18 - PCR e detecção de produtos amplificados em gel de agarose

Os produtos da RT (3 μL) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume de 50 μL em tubos Hot start com os seguintes reagentes: 20 pmol (0,4 μM) de cada primer (sense e anti-sense para cada alvo), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM e MgCl_2 1,0 mM), dNTPs 0,2 mM e 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase. O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 2 min a 94°C seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 45 s a 94°C, anelamento por 30 s a 58°C e extensão por 1 min 30 s a 72°C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo. Para cada par de primers realizou-se PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação

dos primers e para cada tecido alvo a PCR também foi realizada utilizando-se RNA como molde para avaliação de possível contaminação por DNA genômico. Uma alíquota de 9 μL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (0,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb.

4.19 – Clonagem

Produtos amplificados por RT-PCR a partir de RNA total de pâncreas e de LAM foram clonados de acordo com as instruções do fabricante do kit Topo TA Cloning® Version K2 (http://www.invitrogen.com/Content/Tech-Online/molecular_biology/manuals_pps/topota_man.pdf). Resumidamente, o produto fresco da PCR (4 μL) foi inicialmente ligado ao vetor TOPO® durante 30 min em temperatura ambiente. A seguir, 2 μL da mistura de reação foram adicionados a um tubo de *E. Coli* (One Shot® Chemically competent), o qual foi incubado por 30 min em gelo. A seguir foi realizado um choque térmico nas bactérias presentes no tubo pela incubação a 42°C durante 30 s. Imediatamente após, o tubo foi transferido para o gelo, adicionando-se 250 μL de meio de cultura SOC previamente equilibrado em temperatura ambiente. O tubo foi fechado e agitado horizontalmente (200 rpm) a 37°C durante 1 h. Os volumes de 10, 25 e 50 μL do tubo de reação foram espalhados sobre placas de ágar

bacteriológico 1,5% pré-aquecidas a 37°C contendo caldo Luria-bertani 2% e ampicilina 50 µg/mL. As placas de ágar foram incubadas a 37°C durante 15 h. Cinco colônias de coloração branca foram selecionadas para análise, incubando-se o material coletado de cada colônia a 37°C durante 15 h, em 5 mL de caldo Luria-bertani 2% contendo ampicilina 50 µg/mL, procedendo-se a análise dos clones positivos.

4.20 - Análise de clones positivos

A técnica de PCR foi utilizada para a análise de clones positivos. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as especificações descritas no item 4.18 de Métodos, utilizando-se 3 µL dos tubos contendo as bactérias em caldo Luria-Bertani 2%. Os primers utilizados foram M13 sense (5'-gtaaacgacggccag-3') ou M13 anti-sense (5'-caggaaacagctatgac-3'), ambos presentes no vetor, em combinação com um dos primers utilizados para a obtenção de produtos de amplificação da elastase-2 na PCR. O processo de ciclagem térmica consistiu de incubação inicial por 10 min a 94°C (para lise das células e inativação de nucleases) seguida de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 1 min a 94°C, anelamento por 1 min a 55°C e extensão por 1 min a 72°C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C (extensão final) após o término do último ciclo. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose, conforme descrição no item 4.18 de Métodos.

4.21 – Purificação do plasmídeo e seqüenciamento

A purificação do plasmídeo dos clones positivos foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit QIAprep Miniprep (http://www.qiagen.com/literature/handbooks/qp/1018936_QPHB_pro1.pdf).

Primeiramente, foi obtido um precipitado bacteriano por meio de centrifugação de 4 mL do caldo Luria-Bertani 2% (1 mL foi devidamente armazenado a -80°C adicionando-se glicerol estéril 30%). Após a purificação, 500 ng de DNA foram enviados para seqüenciamento na Protein/Nucleic Acid Facility do Medical College of Wisconsin (http://www.biochem.mcw.edu/protein_facility/index.html). O seqüenciamento foi realizado pela técnica de BigDye, utilizando os primers M13 sense e M13 anti-sense. As similaridades entre as seqüências da E-2LAMR e de outras proteínas conhecidas foram pesquisadas com o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), o qual explora todos os bancos de dados de seqüências disponíveis.

4.22 – Cultura de células endoteliais do LAM isolado de rato

O isolamento das células endoteliais do LAM foi realizado por meio de uma modificação do método descrito por Gomez-Sanchez *et al.* (1990). O LAM foi isolado de acordo com a descrição apresentada no item 4.1 de Métodos. Inicialmente, o LAM foi perfundido com solução de Krebs num fluxo de 1 mL/min por 15 min para assegurar a remoção de substâncias sanguíneas. Imediatamente

após, o LAM foi perfundido com solução de Krebs contendo colagenase tipo I 0,2% num fluxo de 2 mL/min por 90 min. O perfusato dos primeiros 30 min foi descartado e, a partir de então, o perfusato foi coletado a cada 10 min e centrifugado a 1.000 g por 10 min em temperatura ambiente. As células foram resuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contendo soro bovino fetal 20%, 1% de solução de antibiótico/antimicótico concentrada 100X e gentamicina (2 µg/mL). A partir desse momento passou-se a trabalhar em capela com fluxo laminar. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, as quais foram colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após atingirem confluência (5-7 dias), as células foram suspensas com auxílio da solução não enzimática para dissociação de células e sofreram passagem para placas de cultura de 100 mm de diâmetro (1,8 x 10⁶ células/placa).

4.23 – Imunocitoquímica para CD31 e RT-PCR para fator de von Willebrand

Foram realizadas imunocitoquímica para CD31 e RT-PCR para o fator de von Willebrand, ambos marcadores endoteliais, com o intuito de confirmar a identidade das células do LAM em cultura. Células confluentes do LAM foram suspensas conforme descrição feita no item 4.22 de Métodos, contadas num hemocitômetro e transferidas para lâminas com câmaras individuais (6 x 10⁴ células/câmara). Permitiu-se que as células crescessem durante 1-2 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até que atingissem

confluência. As lâminas foram então lavadas com DPBS e fixadas em metanol a -20°C por 5 min. As lâminas foram bloqueadas com soro de carneiro 3% por 1 h e incubadas em temperatura ambiente por 2 h com IgG de camundongo anti-CD31 de rato diluída em soro de carneiro 0,1% (1:100). As células foram lavadas com DPBS e incubadas por 1 h em IgG de carneiro anti-IgG de camundongo diluída em soroalbumina bovina 0,5% (1:100). As células foram lavadas com DPBS e montadas com anti-Fade. O anticorpo primário (IgG de camundongo anti-CD31 de rato) foi omitido nas lâminas para controle negativo. RT-PCR para o fator de von Willebrand foi realizada com primers específicos (Tabela 1), de acordo com a descrição dos itens 4.17 e 4.18 de Métodos.

4.24 – Experimentos bioquímicos com as células endoteliais do LAM em cultura

4.24.1 - Ensaios enzimáticos e inibição

Todos os ensaios foram realizados a 37°C pela incubação do devido substrato com as amostras em TBS. Para se medir a atividade enzimática das amostras sobre o substrato cromogênico N-suc-AAPL-pNA (0,56 mM), 100 μL de cada amostra foram incubados com o substrato por 20 h numa placa transparente de 96 poços num volume final de 300 μL . Os detalhes sobre a curva padrão e leitura dos resultados podem ser encontrados no item 4.3.3 de Métodos. O efeito inibitório de diferentes substâncias foi determinado conforme a descrição apresentada no item 4.3.2 de Métodos.

4.24.2 - Coleta de meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura

Após 1 h (n=4) e 48 h (n=4) de exposição ao meio RPMI 1640 (sem vermelho fenol), as amostras do meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura foram coletadas (3 mL/placa). A viabilidade celular foi avaliada pela exclusão por azul trypan. O meio condicionado após 48 h de exposição às células (n=12) foi utilizado para a purificação da E-2LAMR.

4.24.3 – Purificação da elastase-2 formadora de Ang II a partir do meio condicionado por células endoteliais do LAM

Amostras de meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura foram reunidas e concentradas 24X por ultrafiltração. A E-2LAMR foi purificada de acordo com a metodologia apresentada nos itens 4.5.1 e 4.5.2 de Métodos. A atividade enzimática durante as etapas de purificação foi monitorada pela formação de Ang II após incubação de 10 µL de cada fração cromatográfica por 30 min com Ang I (36 µM). As reações foram paralisados por aquecimento a 100°C por 3 min e a concentração de Ang II foi determinada por radioimunoensaio conforme descrição apresentada no item 4.7.2 de Métodos.

5 – RESULTADOS

5.1 - Experimentos envolvendo ensaios enzimáticos com a E-2LAMR purificada a partir de perfusato concentrado de LAM isolado de rato

5.1.1 – Purificação da E-2LAMR e hidrólises de Ang I e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I pela E-2LAMR e determinação de parâmetros cinéticos para as hidrólises de diferentes substratos pela E-2LAMR

A E-2LAMR foi purificada de acordo com o método descrito por Paula *et al.* (1998), sendo obtida numa forma altamente purificada; a atividade enzimática foi monitorada durante as etapas de purificação pelo ensaio fluorimétrico para o dipeptídeo His-Leu liberado durante a reação de conversão de Ang I em Ang II (dados não mostrados). Tanto Ang I quanto [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I foram convertidos em Ang II pela E-2LAMR. Como mostrado na Figura 1, a única ligação peptídica de Ang I e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I hidrolisada pela enzima foi a ligação Phe⁸-His⁹, mesmo após longos períodos de incubação, os quais levaram à completa conversão dos precursores de Ang II (2-6 h, dados não mostrados). Nas condições muito próximas da saturação descritas na Figura 1, a enzima formou Ang II a partir de Ang I numa velocidade aproximadamente três vezes mais rápida do que aquela alcançada com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I como substrato. Essa observação é consistente com os valores de K_{cat} de 496 min⁻¹ e 1530 min⁻¹ para as hidrólises de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (Tabela 2) e Ang I (Paula *et al.*, 1998), respectivamente, pela E-2LAMR. A mesma observação é válida para

o substrato TDP, que apresentou um valor de K_{cat} de 629 min^{-1} , confirmando os achados com a E-2LAMR parcialmente purificada, que também formou Ang II a partir de Ang I numa velocidade três vezes mais rápida do que a observada para TDP (Oliveira *et al.*, 1991). A Tabela 2 ainda mostra que a E-2LAMR hidrolisou o substrato cromogênico N-suc-AAPL-pNA com uma eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) ligeiramente maior do que aquela observada com o substrato N-suc-AAPF-pNA, uma preferência também observada para a elastase-2 pancreática humana (Del Mar *et al.*, 1980).

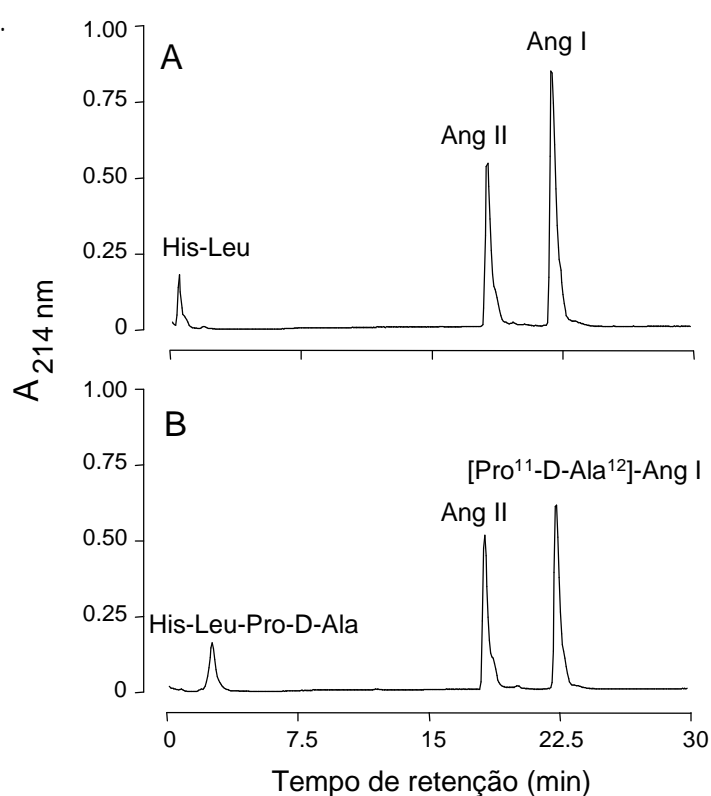


Figura 1 – Hidrólises de Ang I e $[\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12}]\text{-Ang I}$ pela E-2LAMR. Amostras da enzima (0,41 mU) foram incubadas separadamente com Ang I (25 nmol, 20 min) e $[\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12}]\text{-Ang I}$ (25 nmol, 60 min) num volume final de 0,1 mL, sob as condições descritas no texto. Os painéis A e B mostram os produtos de digestão de Ang I e $[\text{Pro}^{11}\text{-D-Ala}^{12}]\text{-Ang I}$, respectivamente, cujos cromatogramas foram gerados em HPLC de fase reversa numa coluna C-18 (0,4 x 25 cm) desenvolvida num fluxo constante de 1,0 mL/min com um gradiente linear de acetonitrila (12-42%) em TFA 0,1%. Os peptídeos foram detectados por absorvância em 214 nm e caracterizados por análise de amino ácidos realizada após hidrólise ácida.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para as hidrólises dos substratos [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I, TDP, N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA pela E-2LAMR

Substrato	K_m (μM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
[Pro ¹¹ -D-Ala ¹²]-Ang I	57±12	496±44	8,6
TDP	124±21	629±50	5,1
N-suc-AAPF-pNA	729±84	5587±280	7,6
N-suc-AAPL -pNA	556±73	5904±307	10,6

Ver Métodos para condições experimentais.

5.1.2 - Efeito de Ang I sobre as hidrólises dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA pela E-2LAMR

Ang I inibiu as hidrólises dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA, como mostrado na Figura 2, de maneira concentração-dependente e consistente com o fato de que a Ang I, um substrato alternativo para a enzima, agiu como um inibidor competitivo (Segel, 1993). Deve-se salientar, entretanto, que os efeitos inibitórios da Ang I sobre essas reações foram ligeiramente maiores do que aqueles previstos quando considerados os valores de K_m , indicados na Tabela 2 para cada substrato cromogênico, e aquele de 36 μM para Ang I (Paula *et al.*, 1998). É importante salientar que Ang II não afetou as hidrólises de ambos os substratos cromogênicos (dados não

mostrados), confirmando os achados de Paula *et al.* (1998), que mostraram que Ang II não é substrato para a E-2LAMR.

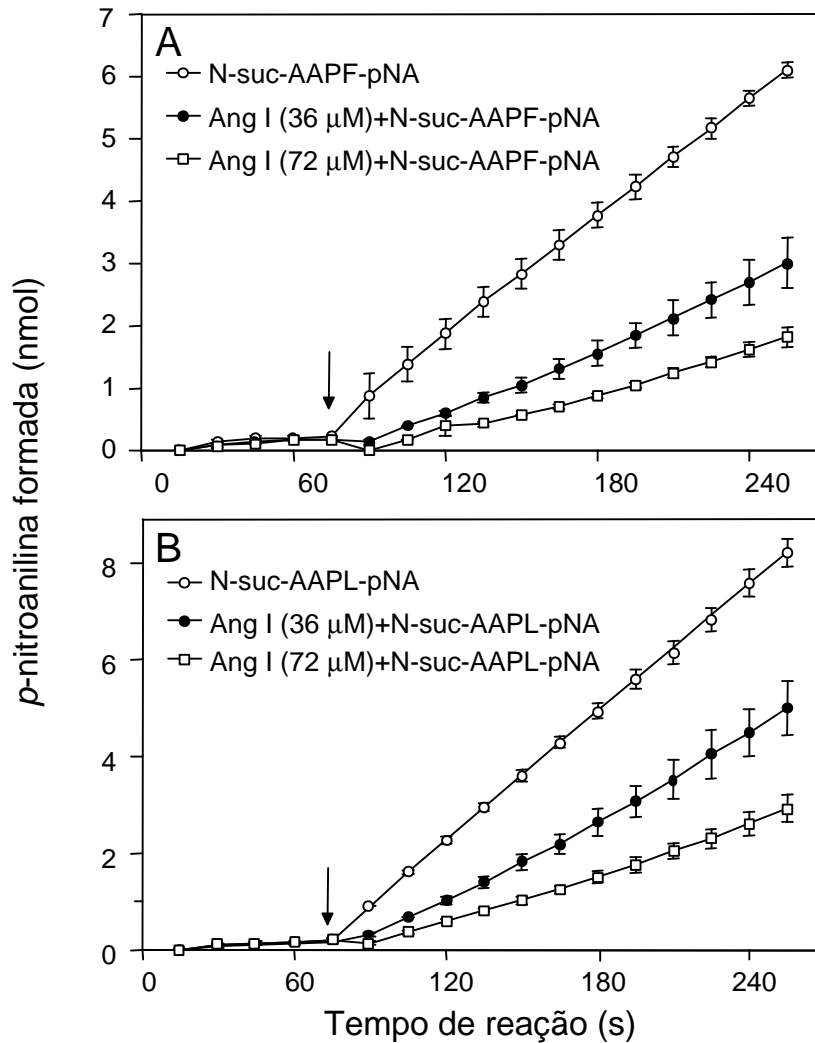


Figura 2 – Hidrólise de substratos cromogênicos sintéticos pela E-2LAMR e inibição por Ang I. As velocidades de formação de *p*-nitroanilina a partir dos substratos N-suc-AAPF-pNA (730 μM , painel A) e N-suc-AAPL-pNA (560 μM , painel B) foram determinadas, em duplicatas, pela medida do aumento da absorbância em 410 nm em intervalos de 15 s. As setas indicam a adição de 20 mU da enzima a cada mistura de reação contendo as concentrações indicadas do substrato e do inibidor. As reações foram realizadas a 37°C em cubetas de espectrofotômetro de 1,0 mL. Os dados foram plotados como média \pm EPM.

5.1.3 – Efeito de CH 5450 e Ac-AAPL-CK sobre a atividade da E-2LAMR

Os peptídeos CH 5450, desenvolvido para a quimase do coração humano (Bastos *et al.*, 1995), e Ac-AAPL-CK, um inibidor da elastase-2 pancreática humana (Largman *et al.*, 1980), inibiram a atividade da E-2LAMR. Como mostrado na Figura 3, CH 5450 inibiu a atividade enzimática sobre os substratos Ang I ($IC_{50} = 49 \mu M$) e N-suc-AAPF-pNA ($IC_{50} = 4,8 \mu M$). A diferença observada entre os valores indicados de IC_{50} provavelmente reflete a firmeza da ligação entre a enzima e cada substrato, como sugerido pelos correspondentes valores de K_m (Tabela 2 e Paula *et al.*, 1998). A Figura 3 também mostra que Ac-AAPL-CK, um eficiente inibidor da elastase-2 pancreática humana com $K_i = 2,1 \mu M$ (Largman *et al.*, 1980), inibiu completamente a atividade conversora de Ang I da E-2LAMR ($IC_{50} = 4,5 \mu M$), um resultado que corrobora todas as similaridades enzimológicas previamente relatadas entre elastases-2 pancreáticas (Largman *et al.*, 1980; Del Mar *et al.*, 1980; Szilagyi *et al.*, 1995) e a E-2LAMR (Paula *et al.*, 1998).

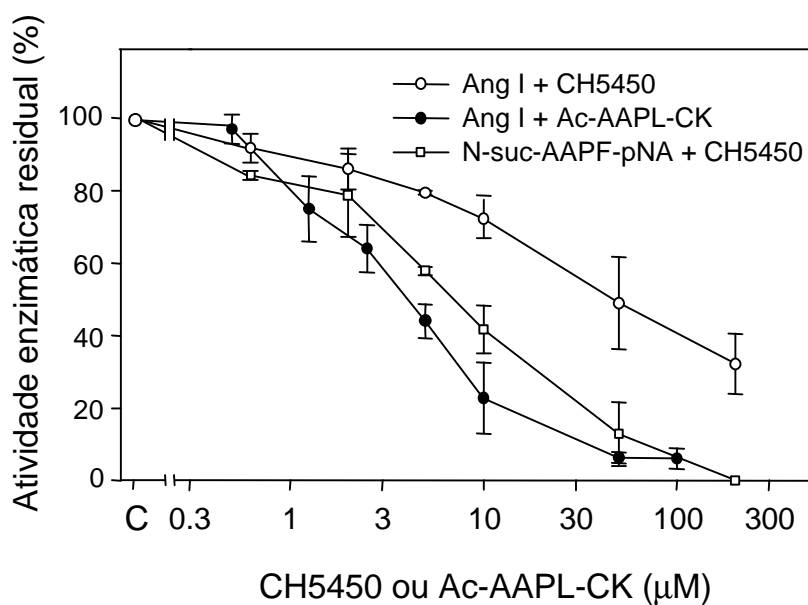


Figura 3 – Efeitos inibitórios de CH 5450 e Ac-AAPL-CK sobre a atividade da E-2LAMR. Amostras da enzima foram pré-incubadas por 10 min a 37°C, em duplicatas, com o inibidor nas concentrações indicadas e as atividades residuais correspondentes foram determinadas, sob as condições descritas no texto, tanto com Ang I (250 μM) quanto N-suc-AAPF-pNA (730 μM) como substrato. C significa a reação na ausência de inibidores (100% de atividade residual). Os dados foram plotados como média±EPM.

5.1.4 – Imunodot com a utilização de anticorpos de coelho anti-E-2LAMR

Os resultados do imunodot apresentados na Figura 4 mostram que os anticorpos anti-E-2LAMR foram capazes de detectar pequenas quantidades de E-2LAMR (1 mU, 0,5 mU e 0,25 mU, que correspondem a 20 ng, 10 ng e 5 ng, respectivamente). Quando os anticorpos foram pré-incubados com 15 mU de E-2LAMR, o sinal no imunodot foi apagado, o que sugere a ocupação de todos os sítios dos anticorpos pela E-2LAMR durante o período de pré-incubação.

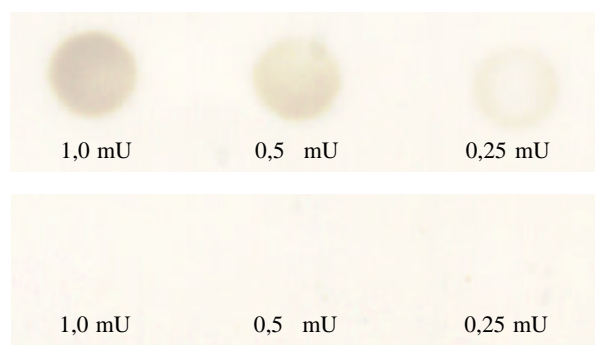


Figura 4 – Imunodot para E-2LAMR utilizando anticorpos de coelho contra a enzima. Quantidades conhecidas da E-2LAMR foram blotadas sobre uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi cortada em duas metades iguais, sendo cada uma delas incubada com o anticorpo primário diluído 80X (numa das metades - painel inferior - o anticorpo primário foi pré-incubado com 15 mU de E-2LAMR durante 15 min a 37°C). As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG de carneiro biotinilada anti IgG de coelho, diluição de 400X). Para a amplificação do sinal, as membranas foram incubadas com avidina (diluição de 2.500X) e em seguida com HRP biotinilada (diluição de 2.500X). As membranas foram incubadas com o complexo ABC, procedendo-se a revelação com a adição do substrato para a peroxidase (4-cloronaftol). A reação foi paralisada com a lavagem das membranas em água destilada.

5.1.5 – Efeito anti-catalítico de anticorpos de coelho anti-E-2LAMR

O efeito anti-catalítico de anticorpos de coelho anti-E-2LAMR pode ser observado na Figura 5. O padrão de inativação da enzima variou dependendo do substrato utilizado para o monitoramento do efeito anti-catalítico de quantidades crescentes de anticorpo. Uma mU de E-2LAMR perdeu praticamente toda sua atividade sobre os substratos cromogênicos com incubação com quantidades de anticorpo tão baixas quanto 0,02 μ L. Em compensação, a despeito da queda na atividade residual conversora de Ang I causada pelo aumento da relação anticorpo/enzima até 0,5 μ L/mU na mistura de incubação, aumentos adicionais não foram efetivos em bloquear completamente a atividade da enzima sobre a Ang I.

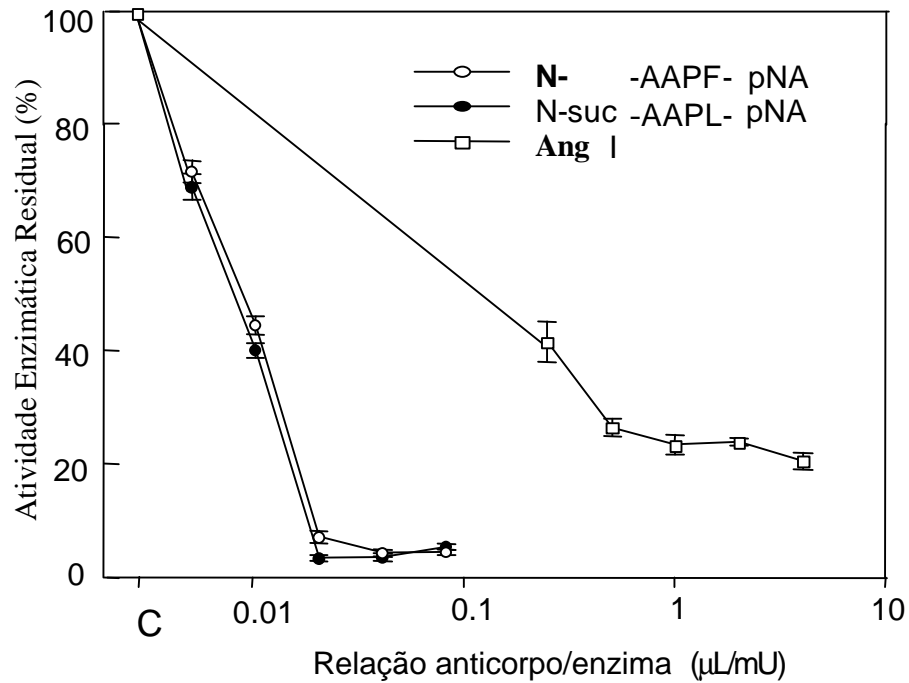


Figura 5 – Efeito anti-catalítico de anticorpos de coelho contra a E-2LAMR. As atividades residuais da E-2LAMR, após a incubação de amostras da enzima com as quantidades indicadas de anticorpo, foram determinadas separadamente com três substratos: Ang I (250 µM), N-suc-AAPF-pNA (730 µM) e N-suc-AAPL-pNA (560 µM). Os ensaios para medida de conversão de Ang I em Ang II foram realizados com 0,41 mU enzimáticas, ao passo que as hidrólises dos substratos cromogênicos foram realizadas com 20 mU enzimáticas. Os anticorpos de coelho não apresentaram atividade enzimática (dados não mostrados). As relações anticorpo/enzima são expressas como os volumes equivalentes de soro imune por mU de atividade enzimática. C significa a reação na ausência de anticorpo (100% de atividade residual). Os dados foram plotados como média±EPM.

5.1.6 - Purificação da E-2LAMR a partir do perfusato do LAM utilizando os substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA para monitoramento da atividade enzimática

A purificação da E-2LAMR foi alcançada pela mesma combinação de cromatografias de filtração e de afinidade descrita por Paula *et al.* (1998), em que a atividade enzimática foi acompanhada pela reação de conversão de Ang I em Ang II. A modificação apresentada na Figura 6 diz respeito à utilização dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA, para os quais foram determinados os parâmetros de hidrólise pela E-2LAMR (Tabela 2), para o monitoramento da atividade enzimática durante as etapas do processo de purificação. O perfusato concentrado do LAM de rato mostrou um pico principal de atividade sobre ambos os substratos cromogênicos nas frações eluídas da coluna Sephacryl S-300 (Figura 6A; 47% de recuperação, fator de purificação de 5,7X). As frações ativas desse pico foram reunidas e utilizadas para subsequente purificação na coluna de afinidade agarose-ovoinibidor (Figura 6B). A E-2LAMR (Figura 7, coluna 3) foi purificada com uma recuperação de 44% e atividade específica de 53 U/mg, correspondendo a um fator de purificação de 150X em comparação ao perfusato do LAM. A reprodutibilidade da purificação da E-2LAMR com os substratos cromogênicos foi confirmada em cinco experimentos independentes. Saliente-se que a percentagem de recuperação e o fator de purificação da E-2LAMR obtidos com essa nova abordagem (utilização dos substratos cromogênicos) comparam-se àqueles obtidos por Paula *et al.* (1998),

quando a atividade enzimática da E-2LAMR foi monitorada em todas as etapas de purificação pela liberação do dipeptídeo His-Leu durante a conversão de Ang I em Ang II.

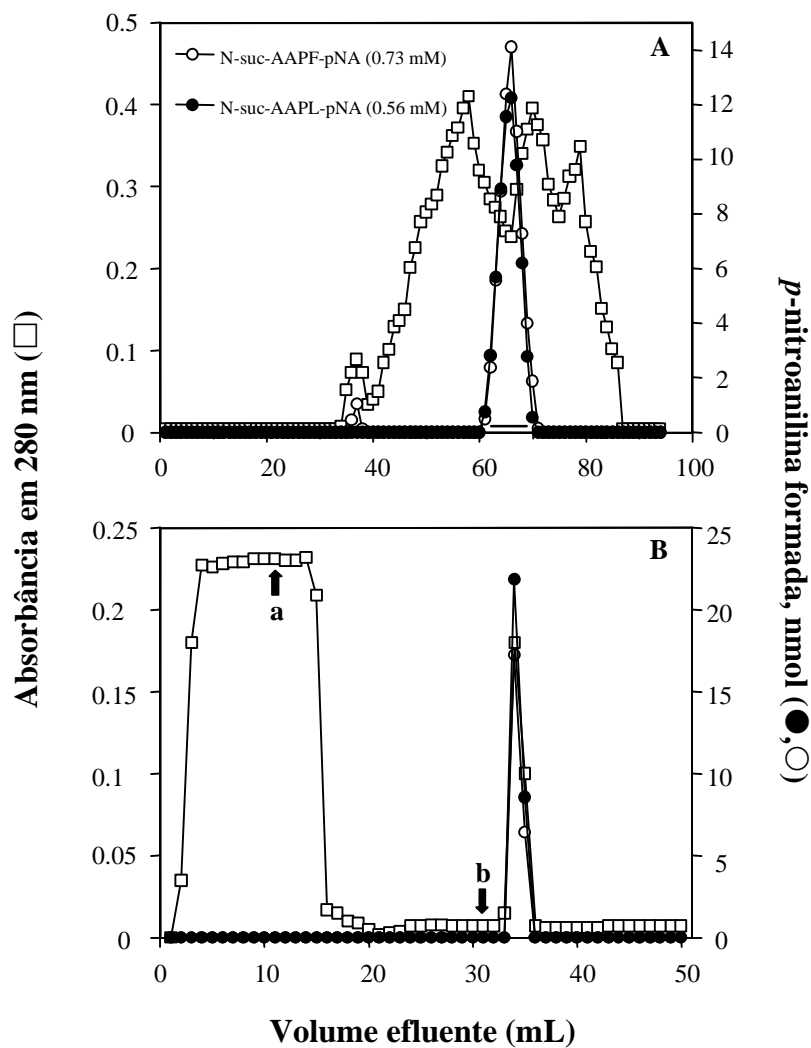


Figura 6 – Purificação da E-2LAMR por cromatografias de filtração em gel e de afinidade. A atividade enzimática foi acompanhada pelo ensaio colorimétrico para a *p*-nitroanilina formada durante a incubação tanto com N-suc-AAPF-pNA ou N-suc-AAPL-pNA. (A) Um mL de perfusato do

LAM concentrado 200X (8,5 mg de proteína; 3,04 U) foi aplicado a uma coluna Sephacryl S-300 (1,0 x 92 cm) pré-equilibrada com TBS, sendo a cromatografia desenvolvida em temperatura ambiente num fluxo de 6,0 mL/h. As frações ativas (barra horizontal; 47% de recuperação com atividade específica de 2,02 U/mg) foram reunidas para posterior purificação. (B) As frações ativas descritas acima foram aplicadas a uma coluna de agarose-ovoinibidor (1,0 x 2,0 cm). Após lavagem da coluna com 20 mL de TBS (seta a), a enzima foi eluída com 20 mL de HCl 0,02 M (seta b). Após neutralização do pH com Tris base 1,0 M, as frações ativas foram reunidas e estocadas a 4°C (44% de recuperação com atividade específica de 53 U/mg).

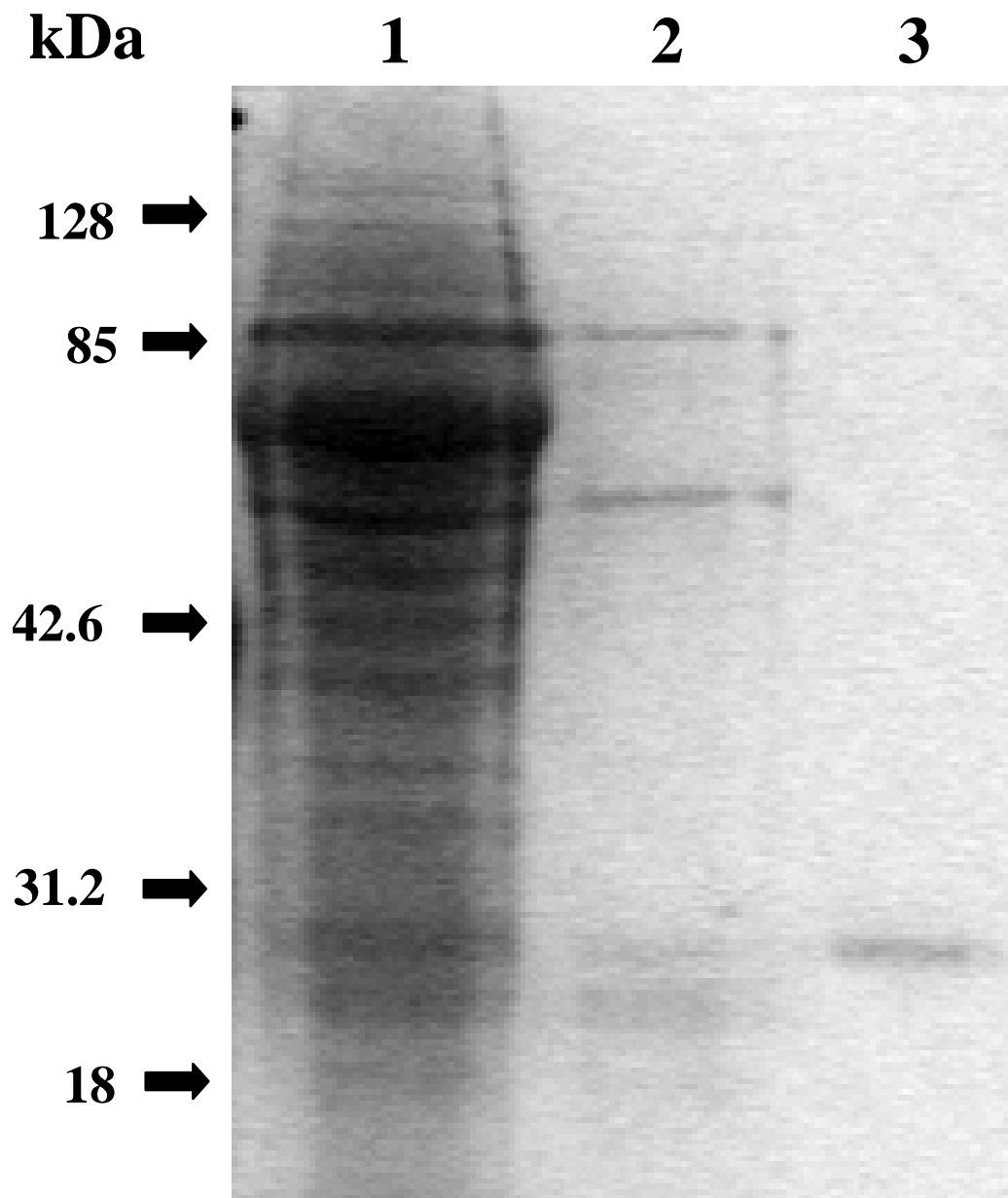


Figura 7 – Análise em SDS-PAGE do perfusato do LAM isolado de rato, das frações ativas eluídas da coluna de filtração em gel e da E-2LAMR purificada na coluna de afinidade. As amostras foram analisadas sob condições redutoras num gel de poliacrilamida 12%. As proteínas foram coradas com Coomassie® G250. As setas à esquerda indicam a massa molecular das proteínas padrão. As colunas 1 (perfusato do LAM concentrado), 2 (frações ativas eluídas da coluna de filtração em gel) e 3 (E-2LAMR purificada em coluna de afinidade) foram carregadas com aproximadamente a mesma quantidade de atividade enzimática (2,43 mU, 2,58 mU e 2,66 mU, respectivamente).

5.1.7 – Efeito inibitório de diferentes substâncias sobre a atividade conversora de Ang I da E-2LAMR purificada com os substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA

O efeito inibitório de captopril, quimostatina e Ac-AAPL-CK sobre a atividade formadora de Ang II da E-2LAMR purificada com os substratos cromogênicos foi determinado com o intuito de confirmar a identidade da enzima (Figura 8). O inibidor Ac-AAPL-CK (100 μ M) aboliu a atividade enzimática, corroborando os achados apresentados na Figura 3 e confirmando que a enzima purificada é uma elastase-2. Quimostatina também mostrou um notável efeito inibitório sobre a atividade da enzima, o que também está de acordo com os dados publicados por Paula *et al.* (1998). Por outro lado, captopril não afetou a atividade formadora de Ang II dessa enzima, confirmando que a E-2LAMR representa uma via alternativa à ECA para a geração de Ang II.

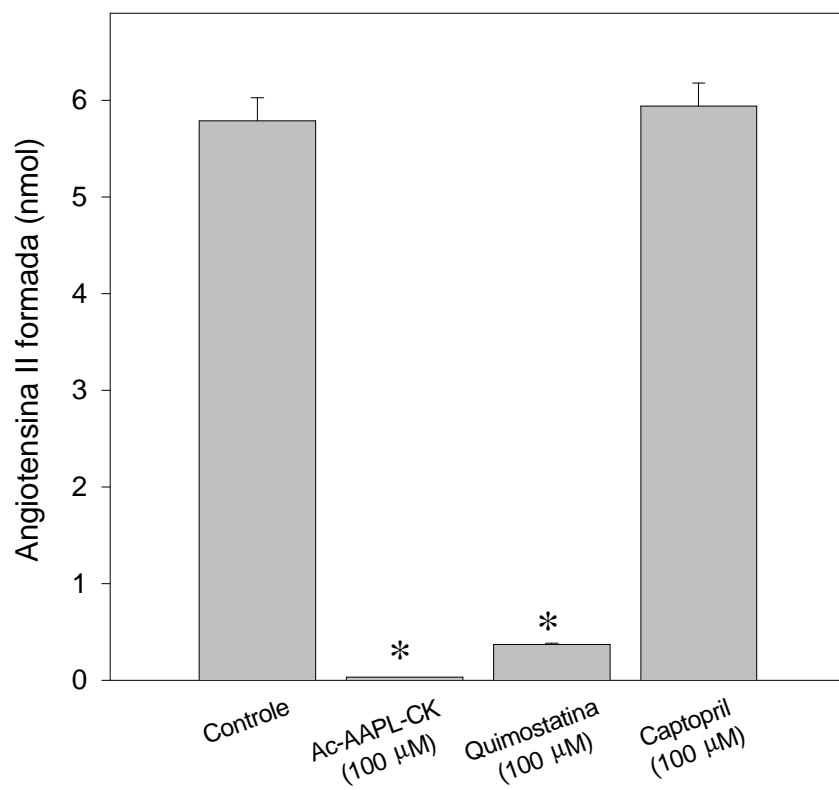


Figura 8 – Efeitos inibitórios de Ac-AAPL-CK, quimostatina e captopril sobre a atividade formadora de Ang II da E-2LAMR purificada com a utilização dos substratos cromogênicos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA. Amostras da enzima (0,6 mU) foram pré-incubadas com os inibidores nas concentrações indicadas e as atividades residuais correspondentes foram determinadas com Ang I (0,25 mM) como substrato (n=4). Os dados foram plotados como média±EPM; *p<0,01 comparado ao controle.

5.2 - Experimentos funcionais realizados com o LAM isolado de rato

5.2.1 - Determinação das curvas dose-resposta à Ang II, Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I sobre a pressão de perfusão do LAM isolado de rato

Ang II, Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I produziram aumento dose-dependente na pressão de perfusão do LAM isolado de rato. Apesar de todos os peptídeos terem apresentado resposta pressora máxima similar, eles mostraram potências diferentes, sendo a potência de Ang II > Ang I > TDP ≈ [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (Figura 9). Vale a pena ressaltar que os dados obtidos para

Ang II, Ang I e TDP concordam com aqueles mostrados por nosso grupo (Leite *et al.*, 1997). Os dados obtidos com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I são inéditos.

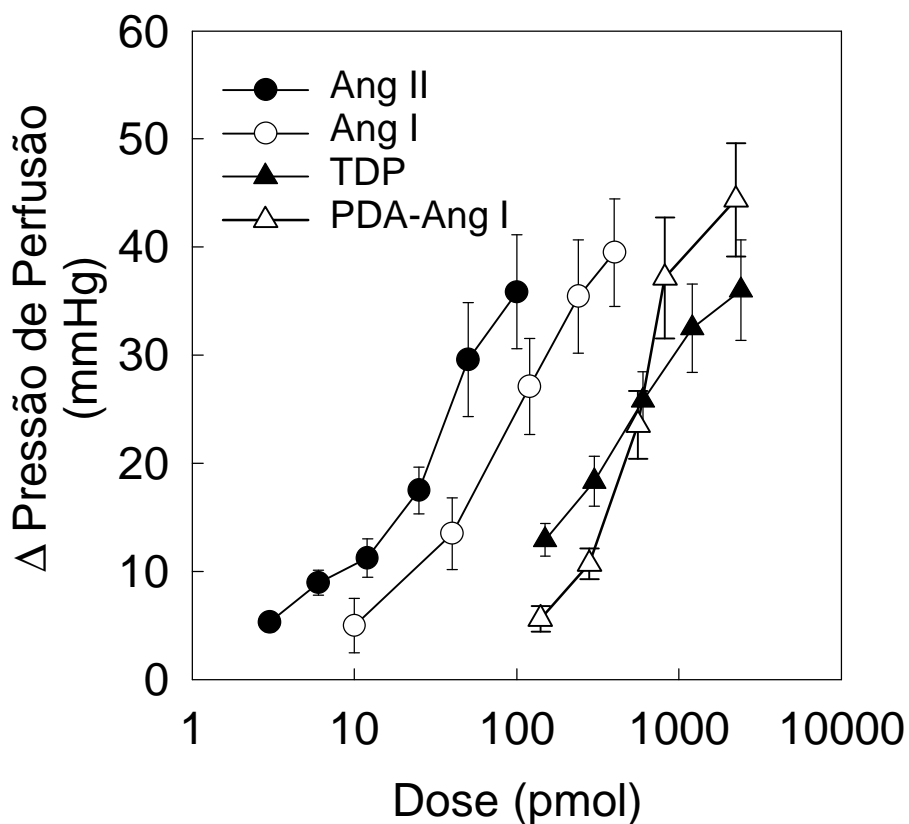


Figura 9 – Variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por injeções *in bolus* de Ang II (2-100 pmol), Ang I (20-400 pmol), TDP (150-2.400 pmol) e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (140-2.400 pmol). Os resultados foram plotados como média±EPM, n=8.

Dados do laboratório demonstraram que as respostas vasoconstritoras produzidas por Ang II, Ang I e TDP foram completamente bloqueadas por saralasin, um antagonista de receptores de Ang II (Leite *et al.*, 1997). Esses resultados sugerem que Ang I e TDP são convertidos em Ang II, a qual é a responsável pela resposta vasoconstritora observada no LAM isolado de rato. Nesse trabalho, realizamos experimentos para verificar o efeito da saralasin sobre as respostas vasoconstritoras produzidas por [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I. Como pode ser visto na Figura 10, as respostas vasoconstritoras induzidas por [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I foram praticamente abolidas pela saralasin, comprovando que o peptídeo [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I precisa ser convertido em Ang II para produzir as respostas vasoconstritoras no LAM isolado de rato.

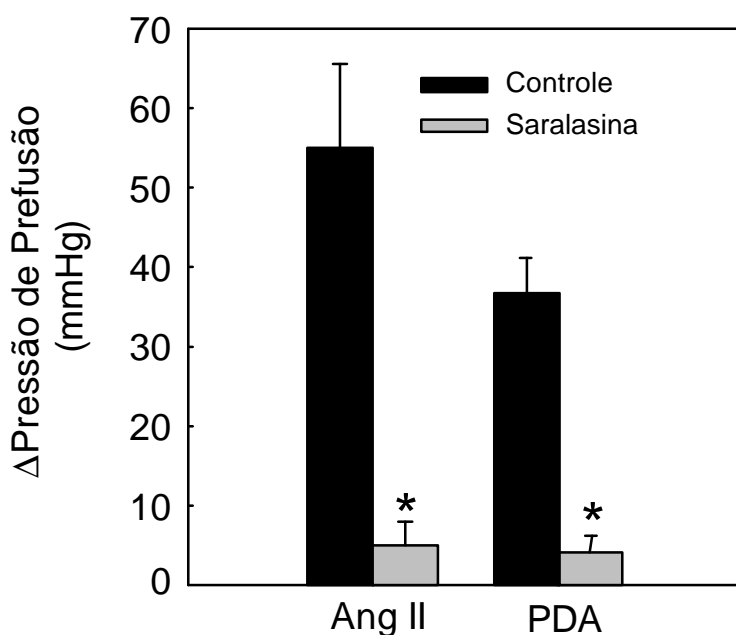


Figura 10 – Variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por injeções *in bolus* de Ang II (10 pmol) e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (1.000 pmol) durante um período controle e na presença de saralasin (50 nM) na solução de perfusão. Os resultados foram plotados como média±EPM, n=3. *p<0,05 em relação ao controle.

5.2.2 - Efeito da inibição de proteases sobre a variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por Ang II, Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I

5.2.2.1 – Captopril

As respostas vasoconstritoras produzidas por Ang I e TDP foram significativamente reduzidas na presença de captopril, enquanto as respostas de Ang II e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I não foram afetadas (Figura 11). Os dados obtidos com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I na presença de captopril confirmam dados da literatura de que este peptídeo não é substrato para a ECA. Além disso, este peptídeo apresenta efeitos vasoconstritores semelhantes ao TDP na preparação de LAM. ECA participa, ao menos parcialmente, da conversão de Ang I e de TDP em Ang II, já que seus efeitos foram parcialmente inibidos na presença de captopril.

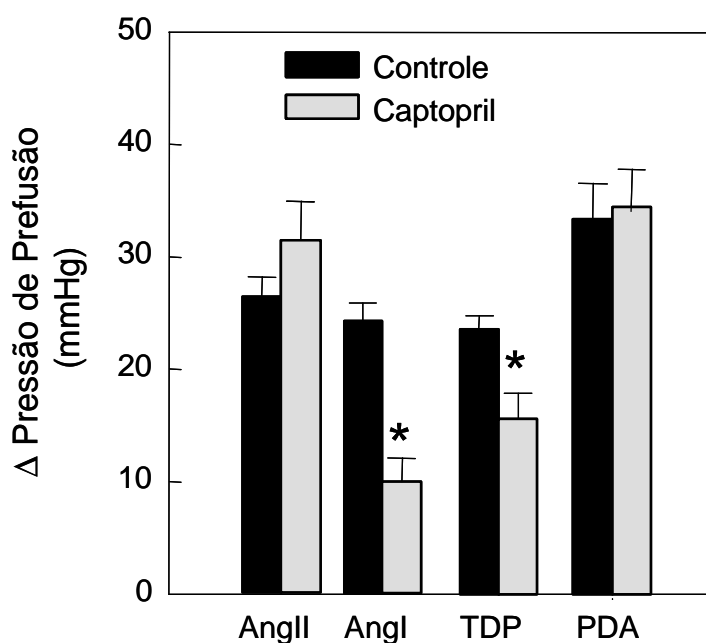


Figura 11 – Variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por injeções *in bolus* de Ang II (10 pmol), Ang I (100 pmol), TDP (1.000 pmol) e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (1.000 pmol) durante um período controle e na presença de captopril (36 μM) na solução de perfusão. Os resultados foram plotados como média±EPM, n=8. *p<0,05 em relação ao controle.

5.2.2.2 – Captopril em combinação com quimostatina

As respostas vasoconstritoras produzidas por Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I foram significativamente reduzidas na presença da combinação de captopril e quimostatina, enquanto as respostas de Ang II não foram afetadas pela combinação desses inibidores (Figura 12).

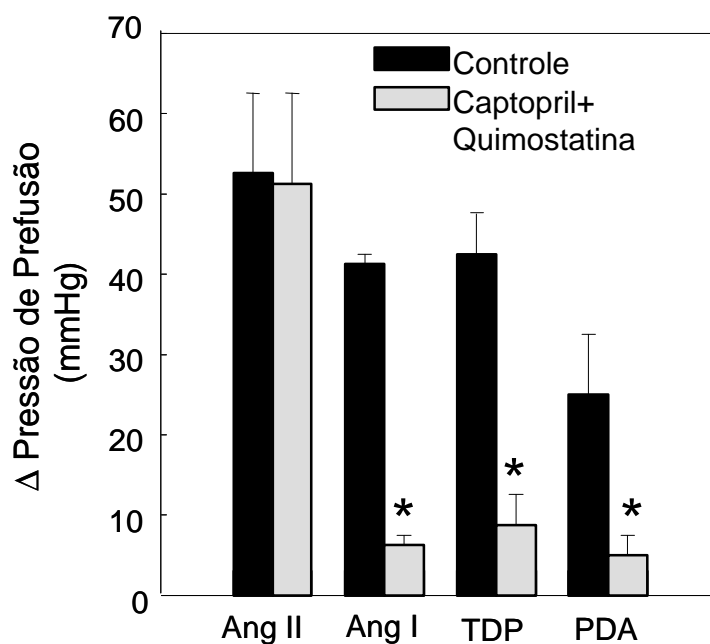


Figura 12 – Variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por injeções *in bolus* de Ang II (10 pmol), Ang I (100 pmol), TDP (1.000 pmol) e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (1.000 pmol) durante um período controle e na presença de captopril (36 μ M) em combinação com quimostatina (100 μ M) na solução de perfusão. Os resultados foram plotados como média \pm EPM, n=3. *p<0,05 em relação ao controle.

5.2.2.3 – Ac-AAPL-CK

Quando adicionado à solução de perfusão, o inibidor de elastases–2 Ac-AAPL-CK (50 μ M) promoveu diminuição significativa das respostas vasoconstritoras produzidas por TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I, enquanto as respostas produzidas por Ang I e Ang II não foram significativamente afetadas (Figura 13). Esses dados sugerem fortemente que uma elastase-2 tem uma

participação importante nos efeitos produzidos por TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I. Como sabemos que a E-2LAMR está presente no LAM isolado de rato, acreditamos ser esta uma forte evidência de um papel funcional para essa enzima nessa preparação.

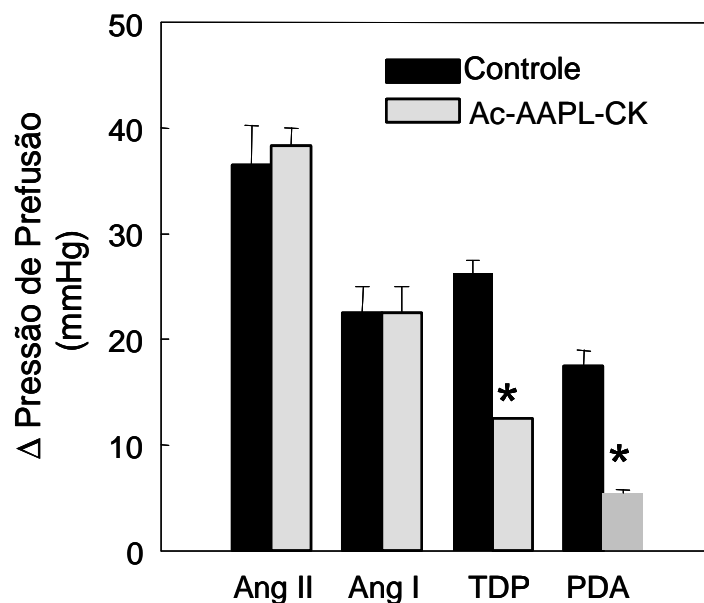


Figura 13 – Variação na pressão de perfusão do LAM isolado de rato induzida por injeções *in bolus* de Ang II (10 pmol), Ang I (100 pmol), TDP (1.000 pmol) e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (1.000 pmol) durante um período controle e na presença de Ac-AAPL-CK (50 μM) na solução de perfusão. Os resultados foram plotados como média±EPM, n=3. *p<0,05 em relação ao controle.

5.3 - Experimentos de biologia molecular

5.3.1 – Avaliação da qualidade do RNA total das amostras utilizadas nesse trabalho

A Figura 14 mostra um gel de agarose corado com brometo de etídio no qual podem ser visualizadas as unidades 28S e 18S do RNA total extraído de todas as amostras utilizadas nesse trabalho. Fica claro que não houve degradação do RNA total nas amostras, pois todas elas mostram as duas bandas citadas. Outro parâmetro utilizado para a avaliação da qualidade das amostras de RNA total foi a relação A_{260}/A_{280} , a qual apresentou valores entre 2,0 e 2,1 para todas as amostras. Vale lembrar que valores entre 1,9 e 2,1 significam ausência de contaminação por DNA.

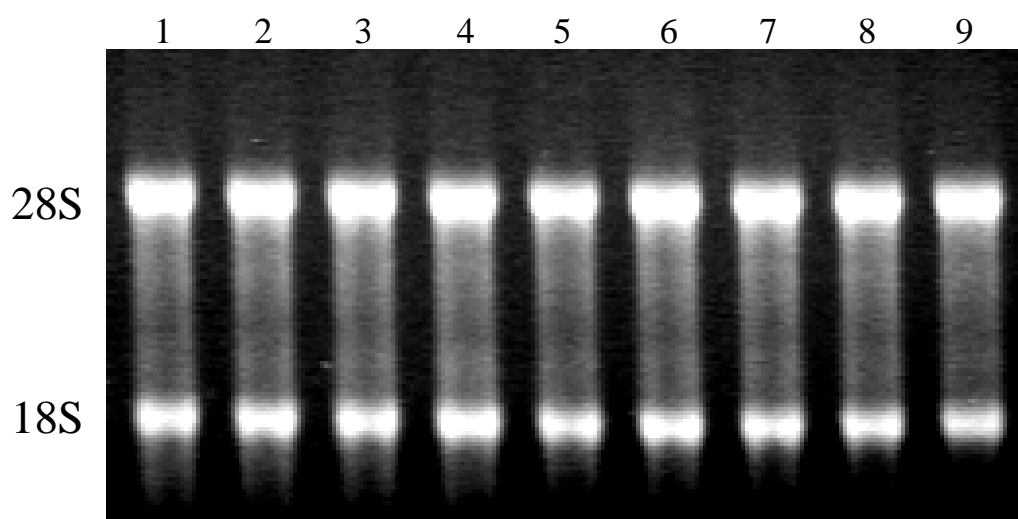


Figura 14 – Gel de agarose corado com brometo de etídio para avaliação da qualidade do RNA total de todas as amostras utilizadas. A figura mostra a presença das unidades 28S e 18S, o que confirma que o RNA extraído das amostras não estava degradado. 1=pâncreas; 2=LAM; 3=pulmão; 4=coração; 5=rim; 6=fígado; 7=baço; 8=aorta e 9=células endoteliais do LAM em cultura.

5.3.2 – Estratégia para clonagem do cDNA para a E-2LAMR e obtenção de produtos por RT-PCR

A estratégia escolhida para a clonagem e seqüenciamento do cDNA para a E-2LAMR (Figura 15) foi baseada no fato de que a região amino terminal dessa enzima é idêntica à da elastase-2 do pâncreas de rato (Paula *et al.*, 1998; MacDonald *et al.*, 1982). Portanto, com base na seqüência publicada para a enzima do pâncreas de rato (MacDonald *et al.*, 1982), foram desenhados dois pares de primers que forneceriam produtos na PCR com uma sobreposição de 125 pb (Figura 15). Para o primeiro par de primers, sense e anti-sense foram análogo e complemento, respectivamente, às seqüências 1-20 e 858-875 pb, fornecendo um produto na PCR de 875 pb a partir de RNA total de LAM e pâncreas (Figura 16). Para o segundo par de primers, sense foi análogo à seqüência 751-771 pb e o anti-sense foi um oligo d(T)18, o qual seria complementar à cauda poli (A) do RNA_m; esse par de primers forneceu um produto de PCR de 177 pb tanto a partir de RNA total de LAM como de pâncreas (Figura 16). As duas bandas de tamanho antecipado (875 e 177 pb) tanto do LAM quanto do pâncreas foram clonadas em *E.coli*. A Figura 17 mostra um exemplar de placa de ágar contendo possíveis clones.

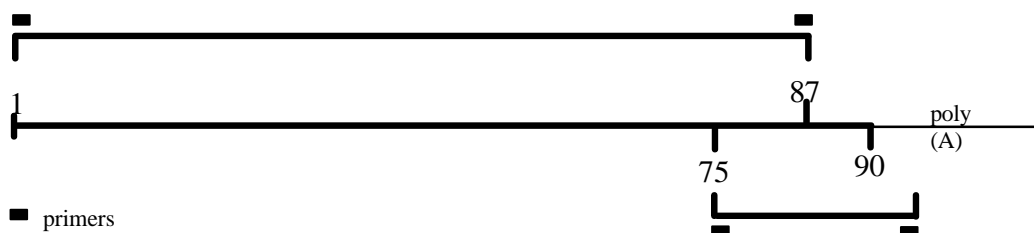


Figura 15 – Estratégia para seqüenciamento do cDNA das preproelastases-2 do LAM e pâncreas de rato, com a demonstração da sobreposição dos produtos amplificados por PCR (751-875 pb).

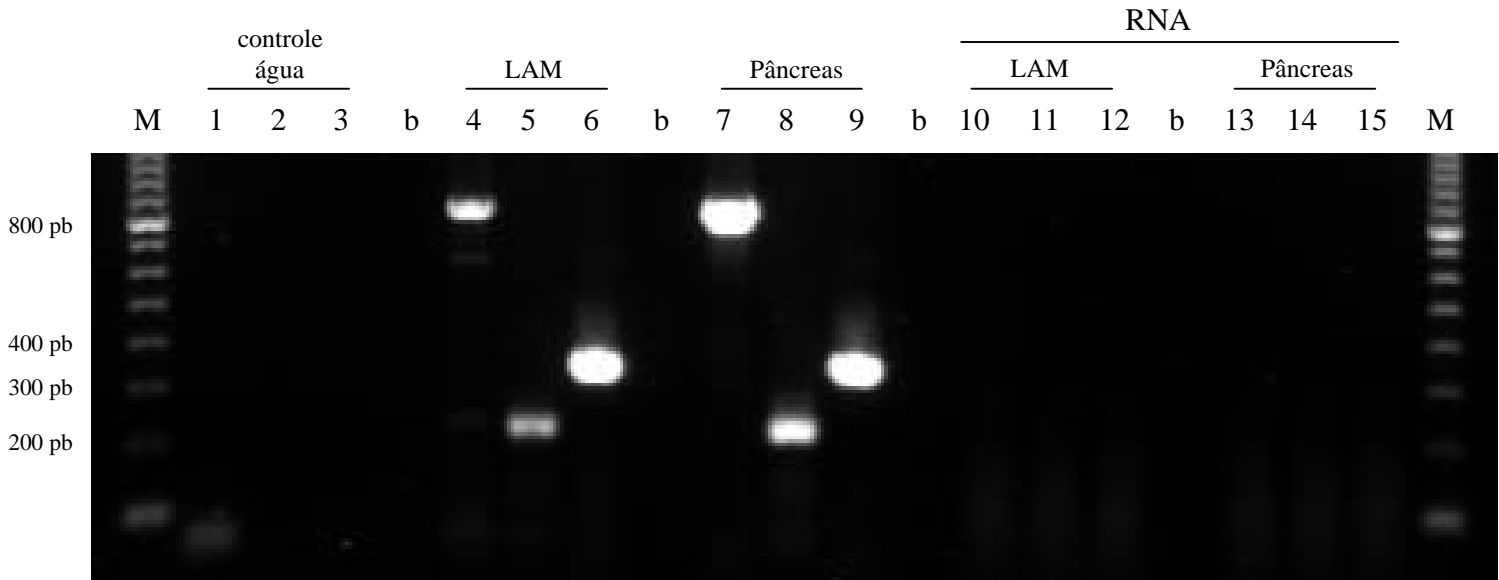


Figura 16 – Gel de agarose corado com brometo de etídio para observação dos produtos amplificados por RT-PCR a partir de RNA total de LAM e pâncreas de rato. Os cDNAs foram amplificados por PCR com primers específicos para elastase-2 e β -actina. Colunas 1, 2 e 3 = controle água de primers para elastase-2 (875 pb e 177 pb) e β -actina (351 pb), respectivamente; coluna 4, mRNA para elastase-2 detectado no LAM (875 pb); coluna 5, mRNA para elastase-2 detectado no LAM (177 pb); coluna 6, mRNA para β -actina detectado no LAM; coluna 7, mRNA para elastase-2 detectado no pâncreas (875 pb); coluna 8, mRNA para elastase-2 detectado no pâncreas (177 pb); coluna 9, mRNA para β -actina detectado no pâncreas; coluna 10, PCR de RNA total do LAM utilizando primers para elastase-2 (875 pb); coluna 11, PCR de RNA total do LAM utilizando primers para elastase-2 (177 pb); coluna 12, PCR de RNA total do LAM utilizando primers para β -actina; coluna 13, PCR de RNA total do pâncreas utilizando primers para elastase-2 (875 pb); coluna 14, PCR de RNA total do pâncreas utilizando primers para elastase-2 (177 pb); coluna 15, PCR de RNA total do pâncreas utilizando primers para β -actina; M, marcadores de peso molecular de 100 pb; b, vazio.

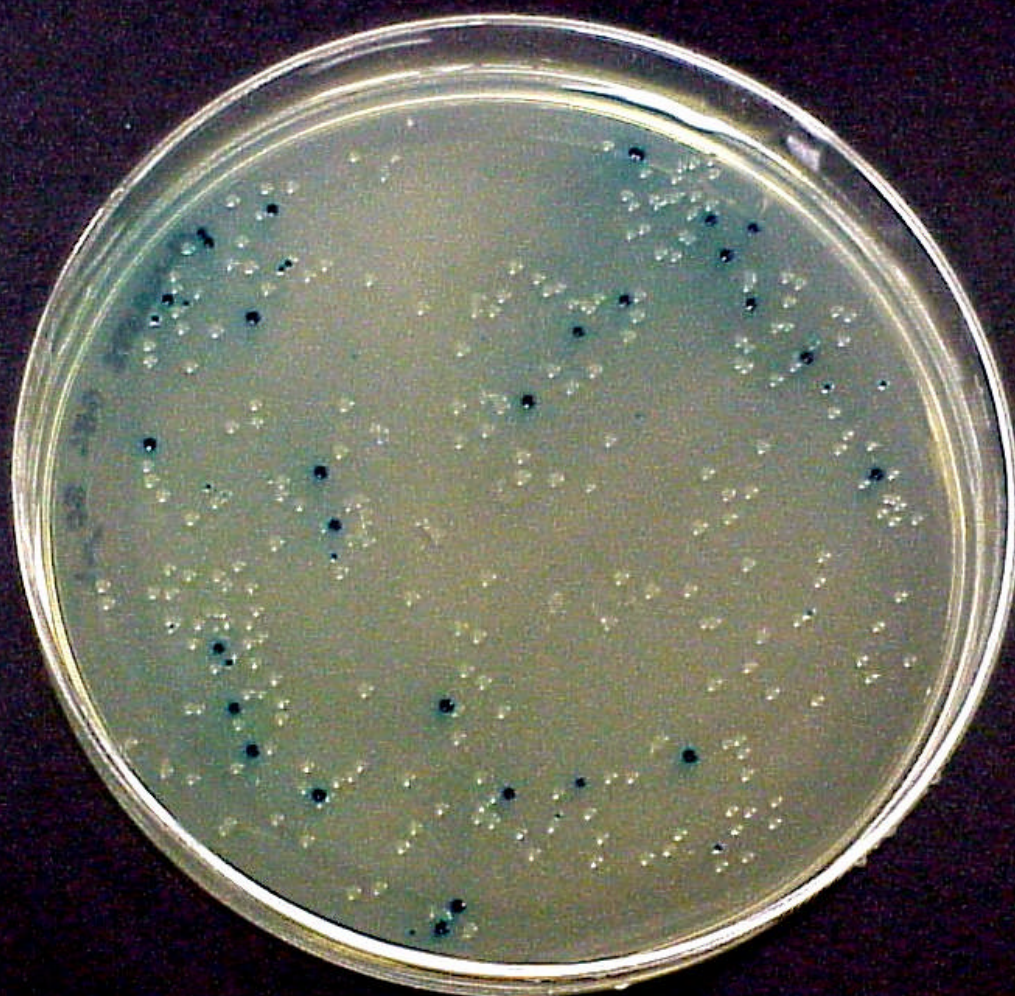


Figura 17 – Placa de ágar contendo possíveis clones para elastase-2. As colônias bacterianas selecionadas foram aquelas com coloração branca. A análise dos clones positivos foi realizada por PCR (Figuras 20 e 21).

5.3.3 – Confirmação de clones positivos

A confirmação de clones positivos foi realizada por PCR. As Figuras 18 e 19 mostram, respectivamente, os clones positivos para os produtos de 875 pb e 177 pb obtidos a partir de RNA total de LAM e pâncreas (Figura 16). Vale a pena salientar que o tamanho dos produtos de PCR presentes nas Figuras 18 e 19 está de acordo com o que havia sido antecipado. Os clones positivos para o produto de 875 pb foram confirmados com o primer M13 sense, presente no vetor, e com o primer anti-sense usado na obtenção do produto de 875 pb (Tabela 1). Como a distância de M13 sense até o produto de PCR ligado ao vetor é de aproximadamente 100 pb, o tamanho antecipado do produto seria por volta de 975 pb, exatamente o que pode ser observado na Figura 18. Os clones positivos para o produto de 177 pb foram confirmados com o primer M13 anti-sense, presente no vetor, e com o primer sense usado na obtenção do produto de 177 pb (Tabela 1). Como a distância de M13 anti-sense até o produto de PCR ligado ao vetor é de aproximadamente 100 pb, o tamanho antecipado do produto seria por volta de 277 pb, o que pode ser observado na Figura 19. Ainda com relação aos resultados das Figuras 18 e 19, de todos os clones testados, apenas dois (duas primeiras colunas da Figura 18, painel inferior) não tiveram o produto de PCR clonado nas bactérias.

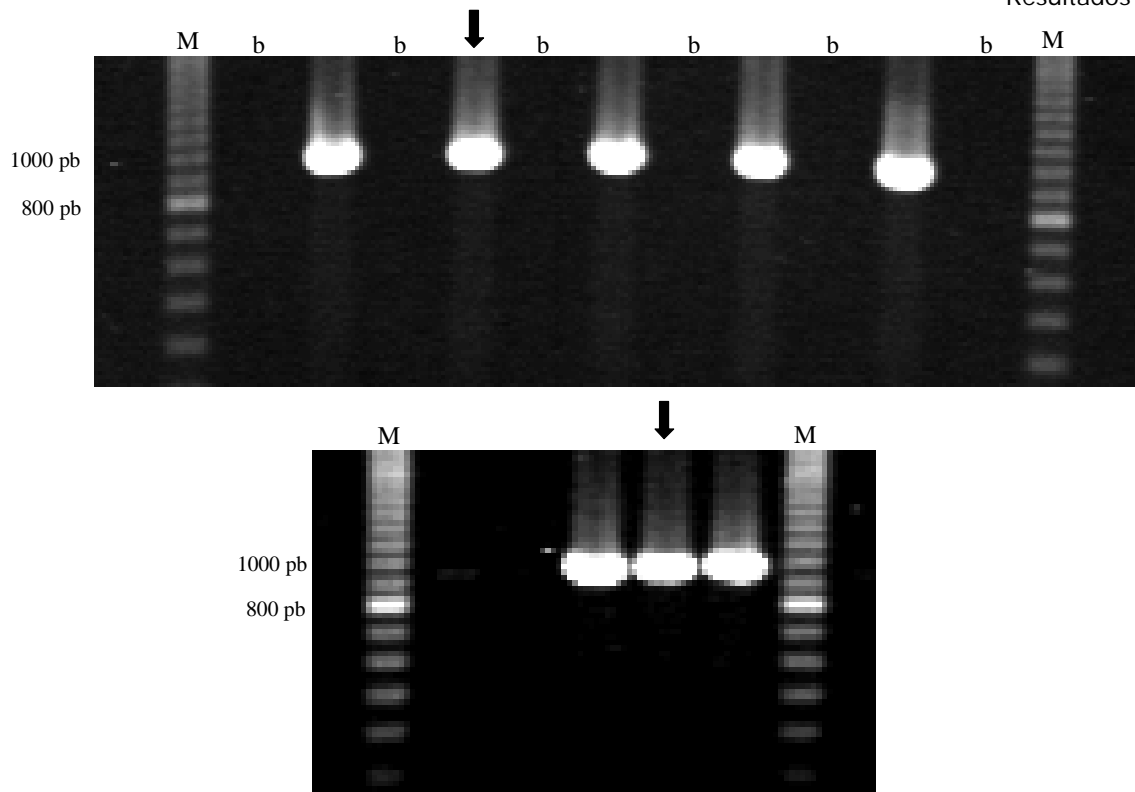


Figura 18 – Géis de agarose corados com brometo de etídio para confirmação de clones positivos para elastase-2 (produto de 875 pb) do LAM (painel superior) e pâncreas (painel inferior). Os produtos foram amplificados por PCR com o primer específico para M13 sense (presente no vetor) e primer anti-sense para elastase-2 (Tabela 1). As setas indicam os clones positivos escolhidos para a purificação do plasmídeo usado no seqüenciamento de cDNA para elastase-2. M, marcadores de peso molecular de 100 pb; b, vazio.

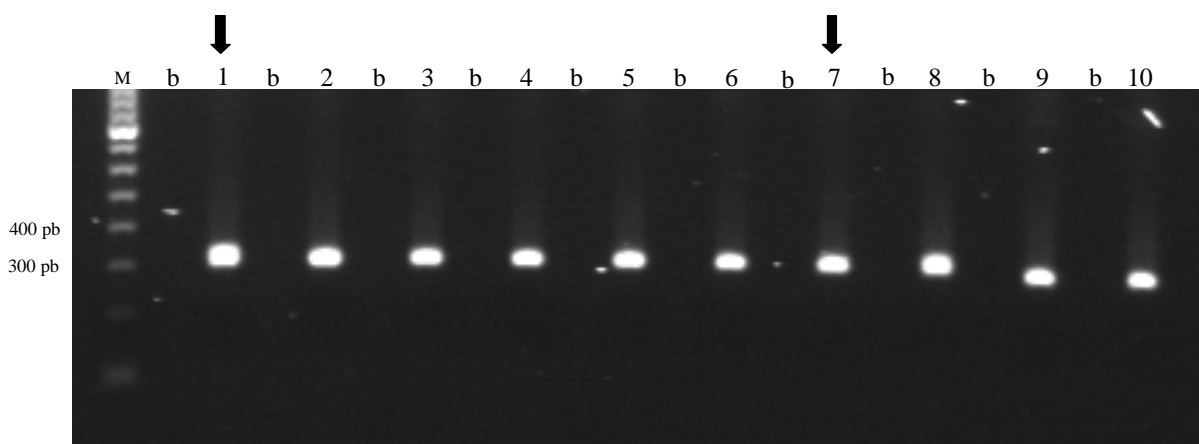


Figura 19 – Gel de agarose corado com brometo de etídio para confirmação de clones positivos para elastase-2 (produto de 177 pb) do LAM (colunas 1 a 5) e pâncreas (colunas 6 a 10). Os produtos foram amplificados por PCR com o primer específico para M13 anti-sense (presente no vetor) e primer sense para elastase-2 (Tabela 1). As setas indicam os clones positivos escolhidos para a purificação do plasmídeo usado no seqüenciamento de cDNA para elastase-2. M, marcador de peso molecular de 100 pb; b, vazio.

5.3.4 – Seqüenciamento do cDNA para as elastases-2 do LAM e pâncreas

A elastase-2 do pâncreas de rato foi utilizada como controle de qualidade para o seqüenciamento e comparada àquela previamente publicada (MacDonald *et al.*, 1982). Adicionalmente, com o intuito de avaliar a precisão dos resultados de seqüenciamento, o cDNA de todos os plasmídios foi seqüenciado quatro vezes em ambas as direções. A sobreposição de 125 pb também foi utilizada como um controle para o seqüenciamento. Como mostrado na Figura 20, a seqüência do cDNA e a seqüência deduzida de amino ácidos de ambas as enzimas são idênticas (909 nucleotídeos mais uma cauda poli (A), e uma preproenzima de 271 amino ácidos).

1		acagacatcccagcacacacc	atg	atc	agg	aca	ctg	ctg	cta	tct	gcc	ttg	gtg	gct	gga	gct	ctc	agc	tcg	ggg	tac	ccc	act	tat	gag	90
			M	I	R	T	L	L	S	A	A	L	V	A	G	A	L	S	C	G	Y	P	T	Y	E	
91	gfc	cag	cat	gat	gfc	agc	agg	gta	ggt	ggg	gga	gag	gca	gag	gca	gag	gca	gag	gca	gag	tac	ctt	tcc	tct	180	
	V	Q	H	D	V	S	R	V	G	G	V	Q	E	A	S	P	A	S	S	L	Q	Y	L	S	S	
181	gga	aag	gac	acc	tcg	gga	gac	gga	ggc	tcc	gga	gag	gca	gag	gca	gag	gca	gag	gca	gag	tct	agg	acc	tac	270	
	G	K	W	H	T	C	G	G	G	S	G	V	A	N	W	T	A	H	C	S	N	S	R	T	Y	
271	cgc	gfc	ctg	gga	cac	agc	gca	gca	gca	ctc	agc	tcg	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	gaa	360	
	R	V	L	L	G	R	H	S	S	L	S	S	E	S	G	S	L	A	A	L	V	V	V	V	W	
361	aac	gct	caa	aag	ctc	tcc	aac	ggg	aat	gac	att	gcc	ctg	gct	cca	gfc	gcc	ctg	acc	agc	aag	atc	gct	gct	450	
	N	A	Q	K	L	S	N	G	D	I	I	A	L	A	S	P	V	A	T	S	K	I	A	C		
451	ctc	cca	ccc	gct	ggc	att	ctg	ctg	cca	aac	aac	tac	ccc	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	540	
	L	P	P	A	G	T	I	L	P	N	N	Y	P	C	T	V	G	L	Q	T	N	G	T	D		
541	gfc	ctg	cag	cag	ggc	ggt	ctg	ctg	ggt	gfc	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	gca	630	
	V	L	Q	Q	G	R	L	L	V	V	D	Y	A	T	C	S	S	A	S	S	V	G	S	V		
631	tcg	gct	ggt	ggc	gac	ggt	gfc	gfc	gac	tcc	ggc	gga	cca	ctg	aat	tcg	cag	gca	tct	aat	ggc	cag	tcg	gfc	720	
	C	A	G	G	D	G	V	T	S	S	C	N	P	L	N	C	Q	A	S	S	N	Q	W	V		
721	cac	ggt	att	gfc	agg	tcc	ggc	tcc	act	ctg	ggc	cca	cca	ctt	gfc	ttc	acc	agg	gfc	tcc	aac	tac	gac	tcg	810	
	H	G	I	V	S	F	G	S	T	L	G	P	P	S	V	F	T	R	R	V	S	N	I	W		
811	atc	aac	tcg	gfc	att	gca	aag	aac	taa	gca	agg	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	
	I	N	S	V	I	A	K	N	stop	gca	agg	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	ctc	

Figura 20- Sequência completa do cDNA e sequência deduzida de amino ácidos das preproelastases-2 do LAM e pâncreas de rato.

5.3.5 – Localização do RNA_m para E-2LAMR em diferentes tecidos

O RNA_m para a E-2LAMR também foi encontrado em outros tecidos além de pâncreas e LAM (pulmão, coração, rim, fígado e baço), porém não sendo detectado em aorta (Figura 21). O RNA_m para o controle positivo β -actina foi encontrado em todas as amostras.

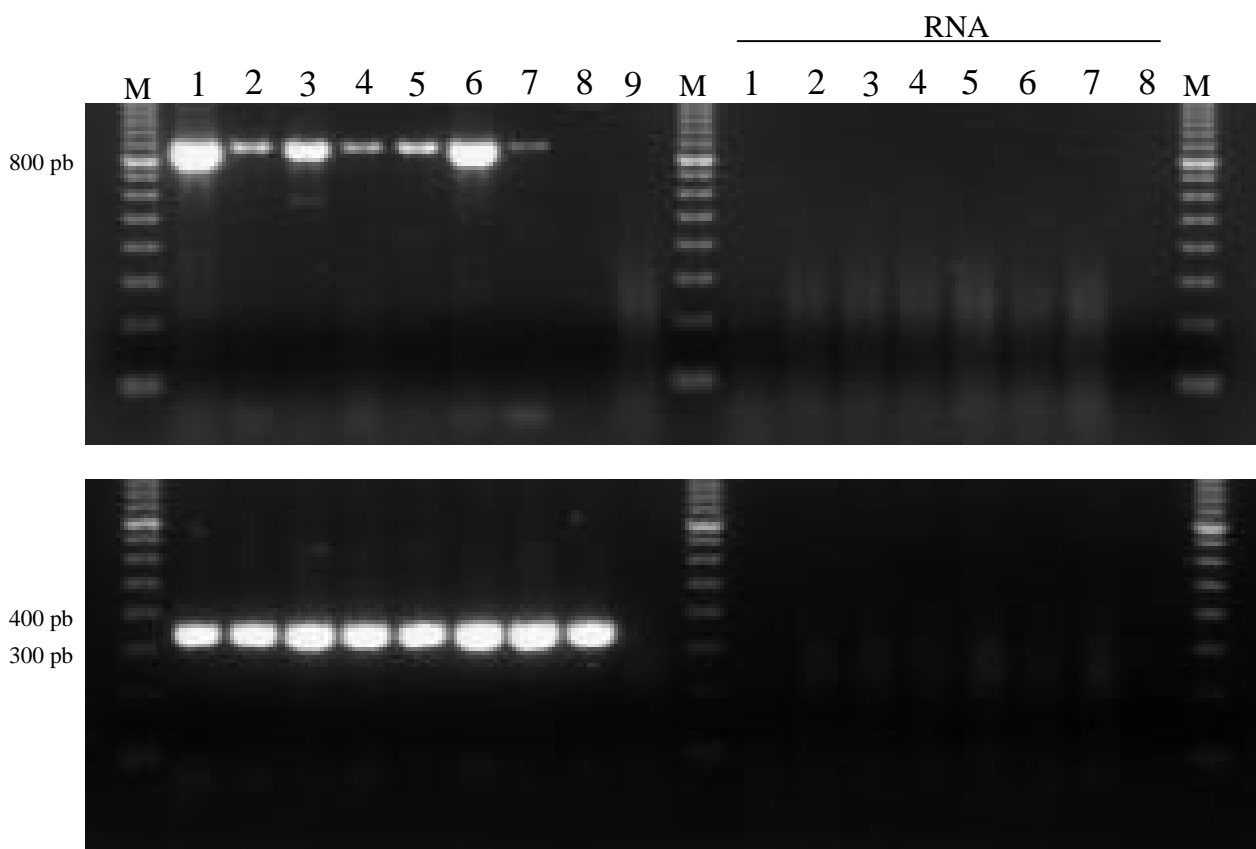


Figura 21 – Géis de agarose corados com brometo de etídio para detecção, por RT-PCR, da expressão do RNA_m para E-2LAMR e β -actina em diferentes tecidos. Os cDNAs foram amplificados por PCR com primers específicos para elastase-2 (875 pb) e β -actina (351 pb). Painel superior: RNA_m para elastase-2 (esquerda) e PCR de RNA total com primers para elastase-2 (direita). Painel inferior: RNA_m para β -actina (esquerda) e PCR de RNA total com primers para β -actina (direita). M, marcadores de peso molecular de 100 pb; 1=pâncreas; 2=LAM; 3=pulmão; 4=coração; 5=rim; 6=fígado; 7=baço; 8=aorta; 9=controle água para os primers (elastase-2 no painel superior e β -actina no painel inferior).

5.4 - Experimentos com cultura de células endoteliais do LAM

5.4.1 – Caracterização e validação das células endoteliais do LAM em cultura

O método descrito nesse estudo mostrou-se uma eficiente técnica para a cultura de células endoteliais do LAM de rato. As células endoteliais foram validadas e caracterizadas pela típica aparência de calçamento de pedras arredondadas (Figura 22A), quando em confluência, e pela presença dos marcadores endoteliais CD31 (Figura 22D) e fator de von Willebrand (Figura 23).

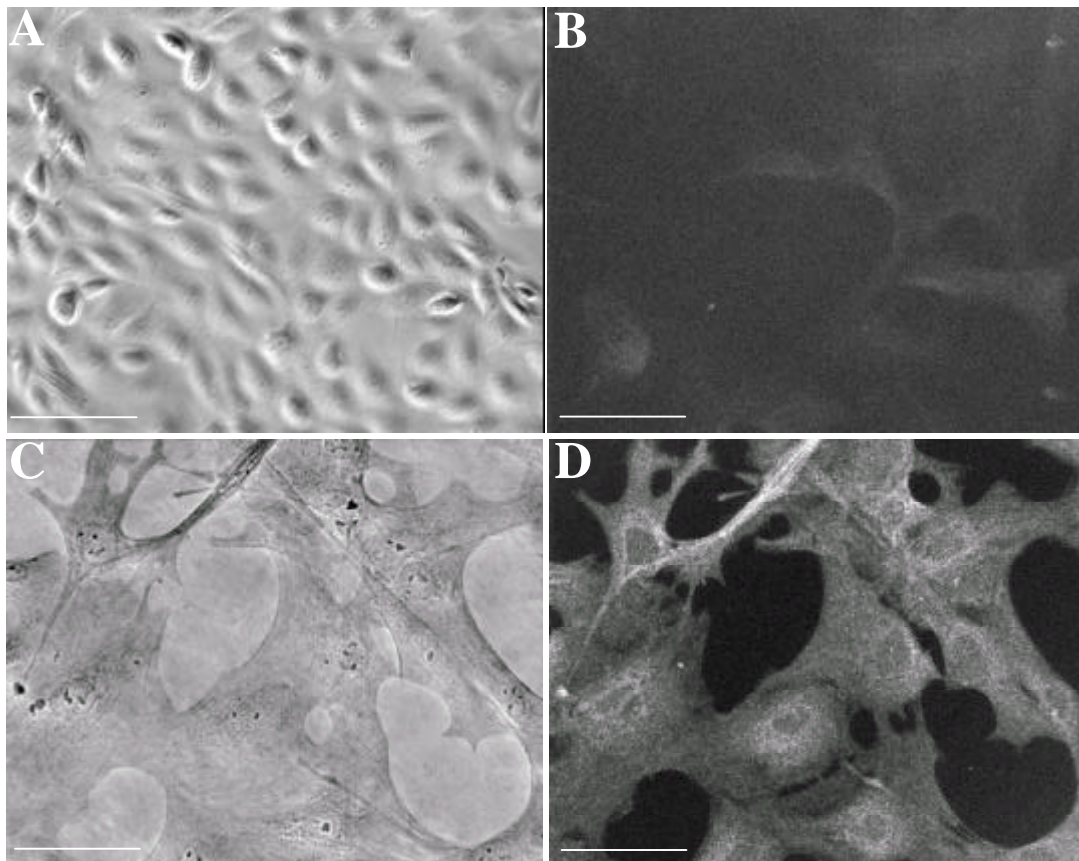


Figura 22 – Caracterização e validação das células endoteliais do LAM de rato em cultura. A, aparência de calçamento de pedras arredondadas; B, C e D: imunocitoquímica para o marcador endotelial CD31. B, controle negativo (sem anticorpo primário); C, fase de campo claro e D, fluorescência (todas as células mostram marcação para CD31). Barra = 50 μ m.

5.4.2 – Detecção de RNA_m para E-2LAMR em células endoteliais do LAM em cultura

RT-PCR, realizado em RNA total de células endoteliais do LAM isolado de rato, com primers específicos para a E-2LAMR resultou numa única banda com o tamanho antecipado de 875 pb (Figura 23). Esse resultado motivou a investigação da presença da enzima nas células endoteliais em cultura.

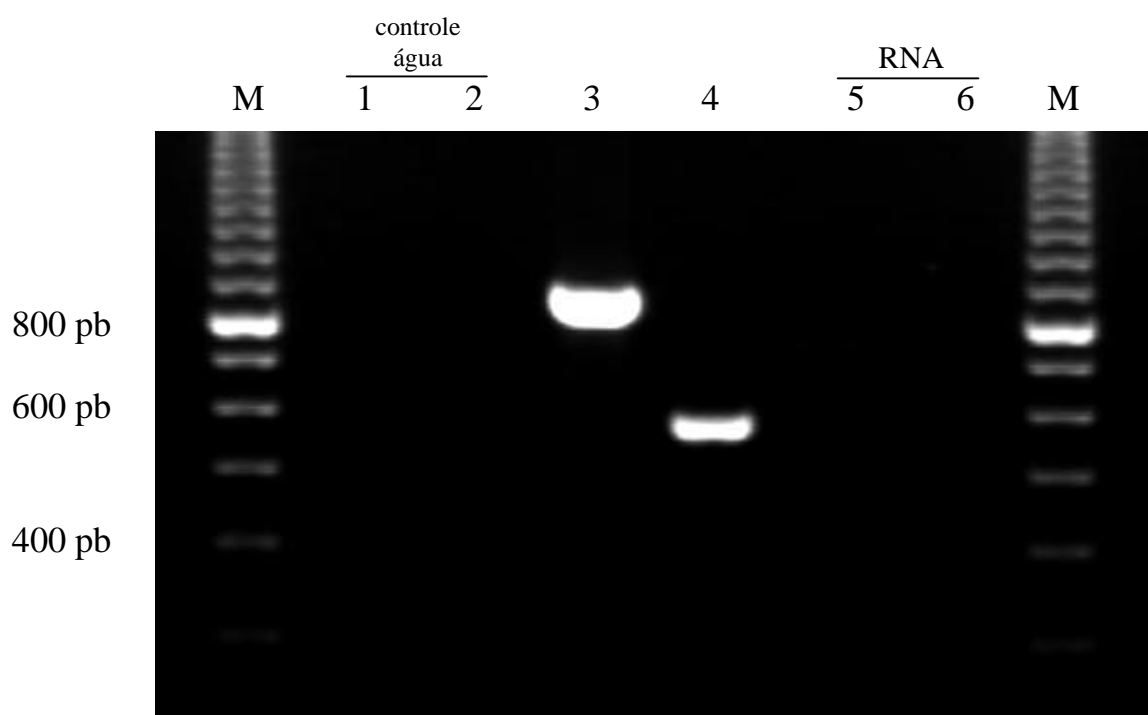


Figura 23 – Gel de agarose corado com brometo de etídio para detecção, por RT-PCR, da expressão do RNA_m para E-2LAMR e β -actina em células endoteliais do LAM de rato em cultura. Os cDNAs foram amplificados por PCR com primers específicos para elastase-2 (875 pb) e fator de von Willebrand (587 pb). Colunas 1 e 2, controle água de primers para elastase-2 e fator de von Willebrand, respectivamente; coluna 3, mRNA para elastase-2 detectado nas células; coluna 4, RNA_m para fator de von Willebrand detectado nas células; coluna 5, PCR de RNA total das células utilizando primers para elastase-2; coluna 6, PCR de RNA total das células utilizando primers para fator de von Willebrand; M, marcadores de peso molecular de 100 pb.

5.4.3 – Detecção de atividade da E-2LAMR no meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura

O meio condicionado pelas células endoteliais em cultura mostrou atividade sobre o substrato cromogênico N-suc-AAPL-pNA (Figura 24), um substrato específico para elastases-2 (Largman *et al.*, 1980) e para o qual determinamos os parâmetros cinéticos de hidrólise pela E-2LAMR (Tabela 2). Essa atividade foi abolida pelo inibidor Ac-AAPL-CK, descrito para a elastase-2 pancreática humana (Del Mar *et al.*, 1980) e para o qual também determinamos os parâmetros inibitórios para a E-2LAMR (Figuras 3 e 8), fornecendo evidência funcional de que a enzima clivando o substrato cromogênico é realmente uma elastase-2.

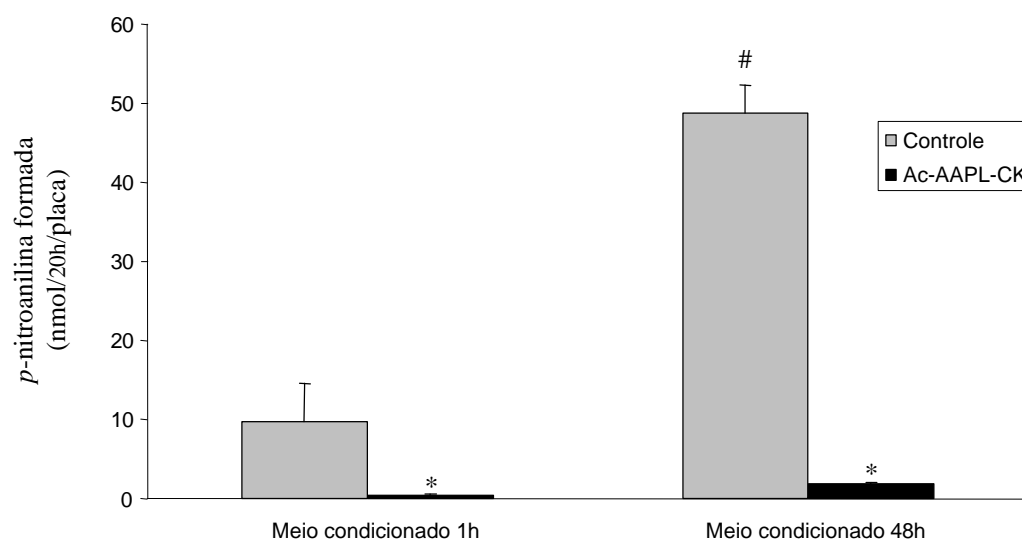


Figura 24 – Formação de *p*-nitroanilina a partir do substrato N-suc-AAPL-pNA pelo meio de cultura condicionado por células endoteliais do LAM de rato em cultura. Amostras do meio de cultura (n=4) foram pré-incubadas por 15 min a 37°C com o inibidor Ac-AAPL-CK (100 μM) e as atividades residuais correspondentes foram determinadas com N-suc-AAPL-pNA (0,56 mM) como substrato. Os dados foram plotados como média±EPM; *p<0,01 comparado ao controle; # p<0,01 comparado ao meio condicionado 1 h.

5.4.4 – Purificação da E-2LAMR a partir do meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura

A E-2LAMR foi purificada a partir do meio de cultura condicionado pelas células endoteliais de acordo com o método descrito por Paula *et al.* (1998), usando uma combinação de cromatografias de filtração e de afinidade (nesse trabalho a descrição do método pode ser encontrada no item 4.5 de Métodos). A Tabela 3 mostra que a reação de conversão de Ang I em Ang II pela enzima purificada do meio condicionado pelas células endoteliais não foi afetada por captopril (1 mM), porém foi inibida de maneira concentração-dependente por quimostatina e Ac-AAPL-CK (1-100 μ M), corroborando os achados de Paula *et al.* (1998) e aqueles apresentados nesse trabalho (Figuras 3 e 8).

Tabela 3 - Perfil inibitório da E-2LAMR purificada a partir do meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura

Inibidores	Atividade Residual (% do controle)
Controle	100
Captopril (1 mM)	100,57 ± 0,73
Ac-AAPL-CK (100 µM)	1,88 ± 0,22
10 µM	28,27 ± 0,79
1 µM	79,78 ± 1,48
Quimostatina (100 µM)	1,53 ± 0,51
10 µM	50,08 ± 4,47
1 µM	85,90 ± 1,76

Os inibidores foram pré-incubados nas concentrações indicadas com E-2LAMR purificada a partir de meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura, por 15 min, a 37°C. O substrato Ang I (36 µM) foi então adicionado à mistura enzima-inibidor. A Ang II formada nas reações foi determinada por radioimunoensaio. Os valores apresentados representam a média±EPM de quatro ensaios independentes.

6 – DISCUSSÃO

6.1 - Experimentos envolvendo ensaios enzimáticos com a E-2LAMR purificada a partir de perfusato concentrado de LAM isolado de rato

Os resultados desse trabalho confirmaram e ampliaram nossa identificação prévia de uma enzima formadora de Ang II no perfusato do LAM isolado de rato como uma elastase-2 (Paula *et al.*, 1998). De fato, os parâmetros cinéticos para as hidrólises dos substratos cromogênicos N-suc-AAPL-pNA e N-suc-AAPF-pNA (Tabela 2) mostraram uma discreta preferência da enzima pelo primeiro substrato, assemelhando-se à especificidade da elastase-2 pancreática humana (Del Mar *et al.*, 1980). A demonstração de que a Ang I inibe essas reações, provavelmente por agir como um substrato alternativo (Figura 2), indica que tanto a Ang I como os substratos cromogênicos são hidrolisados pela mesma enzima. Tirando proveito dessa observação, pudemos mostrar que a purificação da elastase-2 presente no perfusato do LAM e em suas frações cromatográficas pode ser fidedigna e convenientemente purificada pela medida da hidrólise dos substratos N-suc-AAPF-pNA e N-suc-AAPL-pNA (Figuras 6, 7 e 8). Para tal propósito, o substrato N-suc-AAPL-pNA é particularmente adequado porque é refratário à ação de proteases do tipo quimases, tais como aquelas presentes em homogenatos de mastócitos peritoneais de rato (dados não mostrados).

O inibidor Ac-AAPL-CK, descrito para a elastase-2 pancreática humana (Largman *et al.*, 1980), também inibiu a E-2LAMR (Figura 3). O uso

terapêutico de inibidores clorometilcetona derivados da seqüência peptídica Ala-Ala-Pro-Leu já tem sido considerado em estados em que elastases-2 possam causar lesão tecidual (Largman *et al.*, 1980); similarmente, nossos resultados mostrados na Figura 3 indicam que também se poderia tirar vantagem desses inibidores na investigação farmacológica da participação da E-2LAMR no controle local do tônus vascular ou em outros estados patofisiológicos atribuídos a vias alternativas para a formação de Ang II (Arakawa e Urata, 2000). Nesse trabalho, utilizamos o inibidor Ac-AAPL-CK para investigar a participação da E-2LAMR nos efeitos contráteis determinados por precursores de Ang II no LAM isolado de rato. Esses resultados serão discutidos adiante no item 6.2 da Discussão.

Uma característica notável da E-2LAMR como uma enzima conversora de Ang I é que ela não destrói o produto Ang II, a despeito de sua ampla especificidade proteolítica sobre a somastostatina, melitina e cadeia B oxidada da insulina (Paula *et al.*, 1998). Essa característica é compartilhada com algumas quimases, tais como humana, de babuíno e de cão, mas não com a maioria das quimases de roedores. No entanto, uma quimase de rato que forma e não cliva Ang II foi recentemente descrita em células do músculo liso vascular (Guo *et al.*, 2001). Uma característica que diferencia esta última da E-2LAMR é que ela não é secretada, enquanto a E-2LAMR é liberada para o perfusato do LAM (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998).

Uma importante contribuição do presente trabalho para melhor caracterizar a E-2LAMR foi a demonstração de que o substrato [Pro¹¹-D-Ala¹²]-

Ang I foi prontamente convertido em Ang II pela enzima (Figura 1). Essa reação ocorreu numa velocidade comparável àquela da enzima com TDP como substrato (Paula *et al.*, 1998; Tabela 2). O peptídeo [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I, um análogo à Ang I biologicamente inativo, foi desenvolvido para suprir a necessidade de um substrato capaz de discriminar entre as ações de quimases e ECA, *in vivo* e *in vitro*, como enzimas formadoras de Ang II (Hoit *et al.*, 1995). Esse substrato tem sido considerado tanto específico como seletivo para quimases, de forma que resultados de vários protocolos experimentais demonstrando efeitos hemodinâmicos pela administração de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I têm sido interpretados como evidência da participação de quimases em algumas vias independentes da ECA para a geração de Ang II *in vivo* ou *in vitro* em leitos vasculares isolados (Waldeck *et al.*, 1997; Hoit *et al.*, 1995; Wolny *et al.*, 1997; Nishimura *et al.*, 1998; Mangiapane *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1997; Garrison *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1999). A clara demonstração de que a E-2LAMR também forma Ang II a partir desse precursor indica, entretanto, que se deve ter cautela quando da interpretação de dados bioquímicos a respeito da produção de Ang II ao se assumir que a conversão de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I é um evento dependente da quimase. A quimase do ventrículo esquerdo cardíaco de sagüi e a E-2LAMR ligam-se ao peptídeo [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I com afinidades similares, o que pode ser evidenciado pelos valores de K_m de 41 μM (Mangiapane *et al.*, 1994) e 57 μM (Tabela 2), respectivamente, uma observação que sugere cuidado adicional com o uso de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I como uma ferramenta para

a identificação da enzima responsável pela via de geração de Ang II alternativa à ECA.

A seleção do composto CH 5450 a partir de uma biblioteca de peptídeos como um inibidor altamente seletivo para a quimase humana foi realizada com base na capacidade de inibição da atividade enzimática sobre o substrato N-suc-AAPF-pNA, um típico substrato para quimases (Bastos *et al.*, 1995). Visto que a E-2LAMR também cliva o substrato N-suc-AAPF-pNA (Figura 2 e Tabela 2), ampliando a lista de características compartilhadas por esta enzima e a quimase humana, investigamos os efeitos inibitórios de CH 5450 sobre a hidrólise de N-suc-AAPF-pNA e a conversão de Ang I em Ang II pela E-2LAMR. Apesar dos valores de IC_{50} derivados dos dados apresentados na Figura 3 indicarem que o peptídeo CH 5450 pode ser considerado como um dos melhores inibidores da E-2LAMR, esse composto é 2-3 ordens de magnitude mais potente como um inibidor de enzimas do tipo quimotripsinas, com valores de K_i na baixa faixa nanomolar, quando estas são incubadas com N-suc-AAPF-pNA como substrato (Bastos *et al.*, 1995). O composto CH 5450 tem sido utilizado em estudos realizados com células e tecidos para avaliar a participação de quimases em vias de geração de Ang II independentes da ECA (Waldeck *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999). A inibição de maneira concentração-dependente por CH 5450 da contração desencadeada por Ang I em tiras de bexiga humana foi determinada na presença de enalapril e resultou num valor de IC_{50} de aproximadamente 100 nM (Waldeck *et al.*, 1997). Adicionalmente, CH 5450 inibiu as contrações da

preparação de bexiga humana induzidas por [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I. Levando-se em consideração a alta potência de CH 5450 para quimases (Bastos *et al.*, 1995) e assumindo a seletividade do substrato [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I para essa família de proteases (Hoit *et al.*, 1995), uma enzima do tipo quimase foi indicada como responsável pela produção de Ang II na bexiga humana (Waldeck *et al.*, 1997). Apesar de termos demonstrado que [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I é prontamente convertido em Ang II pela E-2LAMR ($K_{cat}/K_m = 8,6 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, Tabela 2), o valor de IC₅₀ de CH 5450 para essa enzima (Figura 3) é muito alto para se admitir a possibilidade de participação de uma elastase-2 na produção de Ang II na bexiga humana. Seguindo a mesma linha de raciocínio, a participação de outra enzima conversora de Ang I, catepsina G, pode ser sugerida na contração de tiras de bexiga humana, pois o valor de IC₅₀ de CH 5450 é de 920 nM para a enzima com N-suc-AAPF-pNA como substrato (He *et al.*, 1999). Apesar da escassez de dados descrevendo o uso de CH 5450, esse inibidor altamente específico (Bastos *et al.*, 1995) parece também ser seletivo para quimases se empregado em baixas concentrações, uma combinação de duas características desejáveis para um reagente que se pretende utilizar com o propósito de identificação inequívoca de uma determinada protease responsável por uma via independente da ECA para geração de Ang II. Dados da literatura demonstram que quimostatina, inibidor de tripsina da soja e outros inibidores de serino-proteases são pouco seletivos para esse propósito, visto que essas substâncias inibem, entre outras enzimas, a

quimase do coração humano (Urata *et al.*, 1990b) e a E-2LAMR (Paula *et al.*, 1998).

O uso de anticorpos de coelho anti-E2LAMR nos levou a alguns resultados inesperados com relação à sua atividade anti-catalítica. Enquanto o complexo enzima-anticorpo formado na presença de excesso de anticorpo apresentou nenhuma ou mínima atividade sobre os substratos cromogênicos, ainda reteve aproximadamente 20% de sua atividade original sobre a conversão de Ang I em Ang II (Figura 5). A demonstração de que a Ang I inibiu a atividade da enzima sobre os substratos cromogênicos, possivelmente agindo como um substrato alternativo (Figura 2), sugeriu a existência de um único sítio ativo na enzima. Apesar disso, a comparação das curvas de inibição mostradas na Figura 5 parece indicar que distintos conjuntos de epítopos estejam envolvidos na inativação da E-2LAMR sobre a Ang I pelos anticorpos anti-E-2LAMR. Apesar de não terem sido realizadas tentativas para melhor caracterizar os anticorpos anti-E-2LAMR, é possível que eles sejam importantes ferramentas para estudos funcionais da E-2LAMR. Esses estudos já estão programados, mas infelizmente ainda não temos dados para apresentar nesse trabalho de tese.

Em conclusão, os dados apresentados nesse trabalho confirmam e ampliam as similaridades enzimológicas entre elastases-2 pancreáticas e a E-2LAMR. Além disso, a interação até então desconhecida da E-2LAMR com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e CH 5450, ambos considerados como reagentes seletivos para quimases, sugere que as evidências para a formação de Ang II *in vivo* por

quimases podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre vias geradoras de Ang II.

6.2 - Experimentos funcionais realizados com o LAM isolado de rato

A demonstração de que o antagonista de receptores de Ang II (saralasin) bloqueou o efeito vasoconstritor de Ang II e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (Figura 10) sugere fortemente que as ações de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I são precedidas pela sua conversão em Ang II no LAM isolado de rato. Isso já havia sido demonstrado para Ang I e TDP na mesma preparação isolada (Leite *et al.*, 1997). Os resultados obtidos com a adição de captopril à solução de perfusão (Figura 11) confirmaram dados da literatura de que o peptídeo [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I não é substrato para a ECA (Hoit *et al.*, 1995). Como mostramos que a E-2LAMR é capaz de formar Ang II a partir de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (Figura 1; Tabela 2) e por sabermos que essa enzima está presente na preparação de LAM isolado de rato (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998), a E-2LAMR aparece como um possível candidato para a conversão de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I em Ang II nessa preparação. Interessante observar que as respostas vasoconstritoras produzidas tanto por Ang I quanto por TDP foram significativamente reduzidas por captopril (Figura 11). O fato dessa inibição não ter sido total confirma a existência de via(s) alternativa(s) à ECA para a geração de Ang II no LAM isolado de rato (Faria e Salgado, 1992; Leite e Salgado, 1992; Leite *et al.*, 1997).

A adição da combinação de captopril e quimostatina à solução de perfusão (Figura 12) causou redução significativa nas respostas contráteis produzidas por Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I no LAM isolado de rato. É importante salientar que as respostas produzidas por Ang I e TDP foram praticamente abolidas, sugerindo que é necessária a inibição de ambas as vias, a sensível ao captopril e a sensível à quimostatina, para que ocorra um bloqueio mais efetivo das respostas induzidas por esses peptídeos; quando adicionado isoladamente à solução de perfusão, captopril produziu inibições menos pronunciadas (Figura 11) do que aquelas observadas com a combinação de ambos os inibidores (Figura 12). Vale a pena destacar que captopril adicionado à solução de perfusão não alterou a resposta contrátil ao peptídeo [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I (Figura 11), porém a combinação de captopril e quimostatina foi capaz de inibir significativamente a resposta contrátil induzida pelo mesmo peptídeo (Figura 12). Em conjunto, esses dados confirmam que [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I não é substrato para a ECA e sugerem que uma via sensível à quimostatina seria a responsável pela conversão de [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I em Ang II. Um candidato em potencial para fazer parte dessa via é a E-2LAMR, pois ela é uma enzima sensível à quimostatina (Paula *et al.*, 1998; Figura 8; Tabela 3) e está presente na preparação de LAM isolado de rato (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998).

Os experimentos realizados com a adição do inibidor Ac-AAPL-CK à solução de perfusão mostraram redução significativa da resposta vasoconstritora produzida por TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I no LAM isolado de rato (Figura 13).

Devido à seletividade desse inibidor para elastases-2 (Largman *et al.*, 1980), esses resultados sugerem fortemente que a E-2LAMR contribui para a geração de Ang II no LAM isolado de rato. O fato do inibidor Ac-AAPL-CK não ter alterado a resposta vasoconstritora à Ang I reforça a idéia de que a ECA é a principal enzima conversora de Ang I em Ang II no LAM isolado de rato, porém não invalida a existência de uma via alternativa à ECA sensível ao inibidor Ac-AAPL-CK no LAM. Acreditamos que quando Ang I é ofertada como substrato, a importância funcional de uma via alternativa para a geração de Ang II só pode ser estudada quando ambas as vias, ECA e alternativa, forem inibidas. Acreditamos que num caso de inibição apenas da via alternativa (Figura 13), a geração de Ang II fica predominantemente dependente da ECA, que por apresentar alta eficiência catalítica para a reação de conversão de Ang I em Ang II acaba por compensar a inibição da via alternativa. Vale a pena lembrar que as respostas contráteis à Ang I tiveram redução mais significativa quando captopril e quimostatina foram adicionados em combinação à solução de perfusão (Figura 12) do que quando apenas captopril foi adicionado à solução de perfusão (Figura 11). Acreditamos que para comprovar essa nossa hipótese é mandatória a realização de experimentos que combinem captopril e Ac-AAPL-CK na solução de perfusão do LAM isolado de rato. Esclarecemos que esses experimentos já estão programados e podemos antecipar que esperaríamos resultados semelhantes aos da Figura 12, já que a E-2LAMR é igualmente sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK (Figura 8; Tabela 3). Por outro lado, quando são utilizados outros precursores

de Ang II que não são substratos para a ECA, tais como TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I, ficam mais evidentes a existência e a importância funcional da via alternativa para a geração de Ang II no LAM isolado de rato. Portanto, parece claro que o estudo das vias geradoras de Ang II no LAM somente pode ser compreendido de uma forma mais adequada quando são utilizadas combinações apropriadas de diferentes precursores de Ang II e de inibidores de proteases formadoras de Ang II.

Em conclusão, fazendo uma interpretação conjunta dos resultados apresentados nas Figuras 9 a 13, podemos dizer que no LAM há fortes evidências da existência de uma via sensível à quimostatina e de uma via sensível ao inibidor Ac-AAPL-CK responsáveis pela geração de Ang II independentemente da ECA. Dentre os possíveis candidatos que podem fazer parte dessa(s) via(s) aparece a E-2LAMR, uma enzima presente na preparação (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998), insensível ao captopril, sensível à quimostatina (Paula *et al.*, 1998; Figura 8; Tabela 3) e sensível ao inibidor Ac-AAPL-CK (Figura 3; Figura 8; Tabela 3). Pode-se argumentar que quimases, também sensíveis à quimostatina, seriam outros possíveis candidatos a fazer parte da(s) via(s) alternativa(s) para a geração de Ang II no LAM isolado de rato. Porém, pelo fato da quimase I de rato apresentar atividade predominante de degradação da Ang II (Le Trong *et al.*, 1987) e de não existirem dados na literatura de que quimases sejam sensíveis ao inibidor Ac-AAPL-CK, todos esses dados, em conjunto, sugerem uma possível função para a E-2LAMR, e não

quimases, como uma via alternativa à ECA para a geração vascular de Ang II no rato.

6.3 - Experimentos de biologia molecular envolvendo clonagem, seqüenciamento e localização do RNA_m para E-2LAMR em diferentes tecidos

O seqüenciamento dos cDNAs para as elastases-2 do pâncreas e do LAM forneceu seqüências idênticas, como mostra a Figura 20. As seqüências também foram idênticas àquela previamente publicada por MacDonald *et al.* (1982) para a elastase-2 do pâncreas de rato. Ao que sabemos, a E-2LAMR é o único representante dessa família de proteases secretada fora do trato digestivo e implicada na geração de Ang II; além disso, a clonagem e o seqüenciamento do RNA_m extraído de leito mesentérico de rato indicou que a enzima ativa isolada do perfusato do LAM é provavelmente produzida localmente. A perfeita homologia entre as seqüências nucleotídicas das elastases-2 do pâncreas e do LAM (Figura 20) era previsível, visto que apenas um conjunto de seqüências de íntrons/éxons foi encontrado em fragmentos de DNA genômico de rato que possuem o gene da elastase-2 (Swift *et al.*, 1984). A E-2LAMR compartilha propriedades estruturais e enzimológicas com a elastase-2 do pâncreas de rato, exceto a presença de carboidratos nas suas estruturas. Enquanto a elastase-2 pancreática não possui carboidratos (Szilagyi *et al.*, 1995), a E-2LAMR foi

identificada como uma glicoproteína (Paula *et al.*, 1998). Dessa forma, diferenças enzimológicas entre elastases-2 de rato, se existentes, somente podem ser atribuídas a modificações pós-translacionais, tais como a glicosilação da enzima do LAM. É interessante e oportuno salientar que apesar de a seqüência da elastase-2 do pâncreas de rato e a estrutura do gene correspondente serem conhecidas desde os anos 80 (MacDonald *et al.*, 1982; Swift *et al.*, 1984), a enzima propriamente dita foi primeiramente isolada e caracterizada apenas uma década após como uma enzima degradadora de somatostatina (Szilagyi *et al.*, 1995). Mais recentemente, nosso grupo mostrou que a principal enzima geradora de Ang II no perfusato do LAM isolado de rato também era uma elastase-2, cujas propriedades enzimológicas até então descritas mostraram-se idênticas àquelas da enzima do pâncreas (Paula *et al.*, 1998). A identidade da seqüência de amino ácidos das elastases-2 pancreática e do LAM isolado de rato (Figura 20) forneceu uma base estrutural para as similaridades previamente observadas entre as elastases-2 isoladas a partir dessas duas fontes. Saliente-se ainda que a elastase-2 do pâncreas de rato foi considerada uma elastase-2 com base na homologia de sua seqüência (MacDonald *et al.*, 1982), mas ela não foi isolada a partir de extratos de tecidos pancreáticos durante uma triagem para atividade elastolítica (Largman, 1983). Quando a enzima foi isolada e purificada por Szilagyi *et al.*, (1995) a partir do suco pancreático de rato, demonstrou-se que ela não apresentava atividade elastolítica, apresentando, porém, uma função até então desconhecida de degradação da somatostatina. De maneira interessante,

nosso grupo purificou a elastase-2 do LAM isolado de rato também a partir de uma função desconhecida para uma elastase-2, ou seja, atividade formadora de Ang II. Como os resultados de clonagem e seqüenciamento do cDNA apresentados nesse trabalho mostraram que as seqüências das elastases-2 de pâncreas e do LAM são idênticas (Figura 20) e com base em todas as similaridades enzimológicas já demonstradas para ambas as enzimas (Szilagyi *et al.*, 1995 ; Paula *et al.*, 1998), podemos concluir, por analogia, que a E-2LAMR não apresenta atividade elastolítica. Acreditamos que isso pode gerar um pouco de confusão no que diz respeito ao nome que foi dado à enzima na década de 80 apenas com base na homologia de sua seqüência e não com a função que ela realmente desempenha. Num julgamento rigoroso, a enzima não poderia ser considerada uma elastase, já que, por definição, uma elastase seria uma enzima capaz de degradar o substrato elastina.

A análise da seqüência nucleotídica mostrou que a E-2LAMR tem 909 pb mais uma cauda poli (A). Quando comparada à seqüência nucleotídica de outras espécies, a seqüência nucleotídica da E-2LAMR mostra homologia de 79%, 80%, 83% e 88% com as elastases-2 do pâncreas humano (Fletcher *et al.*, 1987), bovino (Gestin *et al.*, 1997), porcino (Kawashima *et al.*, 1987) e murino (Stevenson *et al.*, 1986), respectivamente. A seqüência de amino ácidos, deduzida a partir da seqüência nucleotídica do cDNA e contendo 271 resíduos (Figura 20), estabelece claramente que a proteína contém a seqüência N-terminal Val-Val-Gly-Gly-Gln-Glu-Ala-Xxx-Pro-Asn determinada por

microseqüenciamento da enzima ativa (Paula *et al.*, 1998). A estrutura do pré-peptídeo, que compreende os resíduos Met¹ a Ser¹⁶, e o peptídeo de ativação, que se estende de Cys¹⁷ a Arg³⁰ (Figura 20), também foram identificados por MacDonald *et al.* (1982) para a elastase-2 do pâncreas de rato. Adicionalmente, a característica tríade catalítica de serino-proteases composta por His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵ (numeração do quimotripsinogênio) foi encontrada na seqüência da E-2LAMR. A similaridade da seqüência de amino ácidos da preproenzima com aquelas de elastases-2 do pâncreas humano, bovino, porcino e murino é de 77%, 79%, 80% e 84%, respectivamente.

A determinação da estrutura primária da E-2LAMR nos motivou a compará-la com a seqüência de outra serino-protease formadora de Ang II, a quimase humana (Urata *et al.*, 1991), numa tentativa de identificar amino ácidos que poderiam determinar a especificidade dessa elastase-2 com relação à conversão de Ang I. Relatos anteriores e dados apresentados neste trabalho indicam que a E-2LAMR e a quimase humana possuem propriedades enzimológicas semelhantes como proteases conversoras de Ang I (Urata *et al.*, 1990b; Paula *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 1991; Sanker *et al.*, 1997). A comparação dos supostos amino ácidos no sítio de ligação da Ang I dessas enzimas (Tabela 4) indica que elas compartilham algumas características estruturais que podem ser importantes na determinação de suas eficiências como enzimas conversoras de Ang I e não destruidoras de Ang II. Tem-se dado ênfase ao potencial eletrostático fortemente positivo no subsítio S₂' , que

favoreceria a correta colocação do grupo carboxilato do carboxi-terminal da Ang I, o que é necessário para a clivagem da ligação Phe⁸-His⁹. Apesar de alguns resíduos positivos que contribuem para a criação de um subsítio S₂' da quimase humana poderem desempenhar uma função não essencial na determinação da especificidade da enzima (Caughey *et al.*, 2000), a participação da Arg¹⁴³ na formação do subsítio S₂' tem sido constantemente proposta por diferentes autores (Tabela 4). Assumindo-se que a E-2LAMR apresenta a estrutura tridimensional altamente conservada comum às serino-proteases (Stroud *et al.*, 1971), como aquela observada por modelamento molecular para a elastase-2 do pâncreas de rato (Carlson *et al.*, 1986), é provável que o subsítio S₂' criado por His⁴⁰, Arg¹⁴³ e Asn¹⁹² (Tabela 4), cujas cadeias laterais apresentariam potencial para estabilizar a interação da enzima com o grupo carboxilato do carboxi-terminal da Ang I, contribuiria para a atividade geradora de Ang II da E-2LAMR. Exceto pela composição do subsítio S₂' e algumas mudanças conservativas nas posições 171, 215 e 218, a estrutura da E-2LAMR é distinta daquela da quimase humana no que diz respeito àquelas posições descritas como determinantes para a especificidade da enzima (Tabela 4). Como um todo, as diferenças na estrutura dos subsítios de ligação da quimase humana e da E-2LAMR, com uma predominância de cadeias menores e neutras na primeira enzima, podem contribuir para a mais ampla especificidade da E-2LAMR por substratos (MacDonald *et al.*, 1982; Carlson *et al.*, 1986).

Tabela 4 – Supostos amino ácidos no sítio ativo de ligação da Ang I da quimase humana determinados por modelamento da Ang I posicionada para hidrólise na ligação Phe⁸-His⁹. Comparação com resíduos de posições homólogas na seqüência da E-2LAMR. ^{a)}

Enzimas	Sítio de ligação do substrato ^{b)}											
	S ₄	S ₄	S ₄	S ₃	S ₃	S ₂	S ₁	S ₁	S ₁ '	S ₂ '	S ₂ '	S ₂ '
Quimase humana^{c)}	171	215	217	192	218	99	190	191	40	40	143	192
McGrath <i>et al.</i> , 1997	Phe	Tyr	Arg	Lys	Ser		Ala	Phe	Lys		Arg	
Pereira <i>et al.</i> , 1999	Phe	Tyr			Ser	Leu	Ala	Phe		Lys	Arg	Lys
Yamamoto <i>et al.</i> , 1998											Arg	Lys
Caughey <i>et al.</i> , 2000											Arg	
E-2LAMR	Trp	Phe	Ser	Asn	Thr	Asn	Ser	Cys	His	His	Arg	Asn

^{a)} A numeração é baseada na seqüência do quimotripsinogênio descrita por Hartley, 1964; ^{b)} Os subsítios são identificados de acordo com a nomenclatura proposta por Schechter e Berger, 1967; ^{c)} De acordo com os autores indicados.

O RNA_m para a E-2LAMR também foi encontrado em outros tecidos além de pâncreas e LAM. A expressão foi encontrada em pulmão, coração, rim, fígado e baço, porém não em aorta (Figura 21). Esses resultados são muito promissores e sugerem que E-2LAMR possa ter uma participação funcional na geração local de Ang II em vários órgãos importantes no sistema cardiovascular. O fato de termos encontrado o RNA_m para a E-2LAMR no coração também tem respaldo de achados do nosso laboratório, os quais demonstraram que a enzima foi purificada a partir do perfusato da preparação de Langendorff (Stuckert-Seixas, 2001). Em outro trabalho, nosso grupo relatou que em anéis de aorta a Ang I é convertida em Ang II essencialmente pela ação da ECA; chegou-se a essa conclusão pela observação de que o captopril aboliu a contração à Ang I nessas

preparações, mas não em artérias mesentéricas (Leite *et al.*, 1997). Portanto, a ausência do RNA_m para a E-2LAMR na aorta (Figura 21) tem respaldo desses achados em experimentos funcionais. Esses resultados podem também indicar que a E-2LAMR é expressa em vasos de resistência, tais como vasos do LAM, mas não em vasos de condutância, tais como aorta.

Apesar da ECA ser a enzima formadora de Ang II que predomina no pulmão do rato, uma atividade sensível à quimostatina foi relatada nesse órgão (Akasu *et al.*, 1998). Visto que a E-2LAMR é inibida pela quimostatina (Paula *et al.*, 1998; Figura 8 e Tabela 3) e é expressa no pulmão do rato (Figura 21), esses dados sugerem que essa enzima pode ser uma das enzimas que contribuem para a formação de Ang II nesse órgão. O uso de inibidores de elastase com biodisponibilidade por via oral foi recentemente documentado num modelo de hipertensão pulmonar em ratos, resultando na reversão da patologia (Cowan *et al.*, 2000a). Visto que a E-2LAMR é uma eficiente enzima formadora de Ang II e que seu RNA_m também foi encontrado no pulmão de rato (Figura 21), seria interessante investigar os efeitos inibitórios dessas substâncias sobre a E-2LAMR numa tentativa de explicar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos observados na terapia com esses inibidores com biodisponibilidade por via oral. Entre esses inibidores, o composto ZD0892, o qual é ativo contra a elastase de neutrófilo humano (Edwards *et al.*, 1997) bem como outras elastases (Cowan *et al.*, 2000b), parece ser um provável inibidor da E-2LAMR. Adicionalmente, visto que o pulmão é altamente vascularizado e possui uma superfície endotelial muito

extensa, é possível que o endotélio seja uma fonte potencial da E-2LAMR. O fato da E-2LAMR ser liberada para o perfusato do LAM (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998) também sugere que o endotélio poderia ser uma fonte potencial dessa enzima. Essa questão foi investigada e os resultados serão discutidos adiante no item 6.4 da Discussão.

Em conclusão, nesse trabalho clonamos e seqüenciamos o cDNA que codifica toda a molécula da E-2LAMR, a qual exibe 100% de homologia com a elastase-2 do pâncreas de rato e alta homologia com as elastases-2 pancreáticas humana, bovina, porcina e murina quando se comparam tanto as seqüências de cDNA quanto as seqüências de amino ácidos. A análise dos supostos amino ácidos no sítio ativo da E-2LAMR revela características estruturais que podem garantir eficiente conversão de Ang I em Ang II e ausência de atividade degradadora de Ang II pela enzima. O RNA_m para E-2LAMR foi expresso em LAM, pâncreas, pulmão, coração, rim, fígado e baço, porém não em aorta. Esses resultados também podem indicar que a E-2LAMR é expressa em vasos de resistência, mas não em vasos de condutância.

6.4 - Experimentos com cultura de células endoteliais do LAM

O endotélio vascular participa ativamente no controle do tônus vascular por meio da síntese e metabolismo de várias substâncias vasoativas (Alexander e Dzau, 2000). Em particular, o endotélio vascular tem sido mostrado como sendo o principal sítio de conversão de Ang I circulante em Ang II pela

ação da ECA localizada sobre sua superfície luminal (Caldwell *et al.*, 1976). Além disso, tem-se mostrado que células endoteliais em cultura contêm renina e angiotensinogênio e são capazes de sintetizar e secretar angiotensinas (Lilly *et al.*, 1985; Kifor e Dzau, 1987; Dzau, 1989; Tang *et al.*, 1990; Ideishi *et al.*, 1993; Xiao *et al.*, 2000). Dessa forma, células endoteliais têm o potencial para desempenhar uma participação importante na geração vascular de Ang II.

O achado de que o captopril não bloqueia completamente a síntese de Ang II em células endoteliais (Tang *et al.*, 1990; Ideishi *et al.*, 1993) sugere a existência de vias independentes da ECA para a geração de Ang II e deixa dúvidas sobre o fato da ECA ser a única enzima responsável pela geração de Ang II em células endoteliais. De fato, tem sido relatada a existência de vias alternativas à ECA para a formação de Ang II na parede vascular (Ideishi *et al.*, 1993; Okunishi *et al.*, 1987; Ziogas e Story, 1987; Leite e Salgado, 1992; Faria e Salgado, 1992; Leite *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1999; Urata *et al.*, 1993; Voors *et al.*, 1998; Nishimoto *et al.*, 2001; Miyazaki e Takai, 2001).

O fato de que a E-2LAMR é liberada para o perfusato do LAM (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998) sugeriu-nos que as células endoteliais do LAM poderiam ser uma fonte potencial para essa enzima. Portanto, realizamos alguns experimentos para investigar se células endoteliais do mesentério expressam a E-2LAMR.

Inicialmente, preocupamo-nos em padronizar um método para a cultura de células endoteliais do LAM, caracterizando e validando as células em

cultura como células endoteliais por meio da presença de marcadores endoteliais (CD31 e fator de von Willebrand; Figuras 22 e 23, respectivamente). RT-PCR realizado com RNA total de células endoteliais do LAM em cultura resultou numa única banda de tamanho antecipado (875 pb; Figura 23). A atividade enzimática sobre o substrato N-suc-AAPL-pNA e a abolição dessa atividade por Ac-AAPL-CK, um inibidor descrito para a elastase-2 pancreática humana (Largman *et al.*, 1980), forneceram evidências para a presença da E-2LAMR no meio condicionado pelas células em cultura (Figura 24). Adicionalmente, os resultados apresentados nesse trabalho (Figura 24) sugerem neo-síntese da E-2LAMR, pois a atividade enzimática liberada para o meio condicionado pelas células aumentou com o tempo. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados para o perfusato do LAM isolado de rato, em que a atividade formadora de Ang II liberada para o perfusato também aumentou com o tempo de perfusão (Oliveira *et al.*, 1991). De fato, a liberação da E-2LAMR para o perfusato do LAM (Oliveira *et al.*, 1991; Paula *et al.*, 1998) e para o meio condicionado por células endoteliais do LAM em cultura é respaldada pelos dados derivados da clonagem molecular e do seqüenciamento da enzima, os quais revelaram que o RNA_m codifica uma serino-protease com um peptídeo secretório líder (Figura 20).

Em conclusão, nesse estudo nós mostramos que células endoteliais do LAM em cultura sintetizam a E-2LAMR. A localização intravascular dessa enzima e sua habilidade em formar Ang II e não destruir esse peptídeo sugerem

que a E-2LAMR pode desempenhar uma participação importante no sistema cardiovascular do rato como um agente formador de Ang II.

7 – Conclusões

7.1 – Os dados apresentados nesse trabalho confirmam e ampliam as similaridades enzimológicas entre elastases-2 pancreáticas e a E-2LAMR. Além disso, a interação até então desconhecida da E-2LAMR com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e CH 5450, ambos considerados como reagentes seletivos para quimases, sugere que as evidências para a formação de Ang II *in vivo* por quimases podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre vias geradoras de Ang II.

7.2 – Experimentos realizados no LAM isolado de rato avaliando o efeito vasoconstritor de Ang II, Ang I, TDP, and [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I mostraram a existência de uma via geradora de Ang II independente da ECA, a qual é sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK. Dentre os possíveis candidatos que podem fazer parte dessa(s) via(s) aparece a E-2LAMR, uma enzima presente na preparação, insensível ao captopril, sensível à quimostatina e sensível ao inibidor Ac-AAPL-CK. Quimases, enzimas também sensíveis à quimostatina, seriam outros possíveis candidatos a fazer parte da(s) via(s) alternativa(s) para a geração de Ang II no LAM isolado de rato. Porém, pelo fato da quimase I de rato apresentar atividade predominante de degradação da Ang II e de não existirem dados na literatura de que quimases sejam sensíveis ao inibidor Ac-AAPL-CK, todos esses dados, em conjunto, sugerem uma possível função para a E-2LAMR, e não quimases, como uma via alternativa à ECA para a geração vascular de Ang II no LAM de rato.

7.3 – O cDNA que codifica toda a molécula da E-2LAMR exibe 100% de homologia com a elastase-2 do pâncreas de rato e alta homologia com as elastases-2 pancreáticas humana, bovina, porcina e murina quando se comparam tanto as seqüências de cDNA quanto as seqüências de amino ácidos. A análise dos supostos amino ácidos no sítio ativo da E-2LAMR revela características estruturais que podem garantir eficiente conversão de Ang I em Ang II e ausência de atividade degradadora de Ang II pela enzima.

7.4 – O RNA_m para E-2LAMR foi expresso em LAM, pâncreas, pulmão, coração, rim, fígado e baço, porém não em aorta. Células endoteliais do LAM em cultura expressaram o RNA_m para a E-2LAMR e sintetizaram a enzima. A localização intravascular dessa enzima e sua habilidade em formar Ang II e não destruir esse peptídeo sugerem que a E-2LAMR pode desempenhar um papel importante no sistema cardiovascular do rato como um agente formador de Ang II. Esses resultados também podem indicar que a E-2LAMR é expressa em vasos de resistência, mas não em vasos de condutância.

8 – Resumo

Uma elastase-2 foi recentemente descrita como a principal enzima formadora de angiotensina (Ang) II no perfusato do leito arterial mesentérico (LAM) isolado de rato. Investigamos a interação dessa elastase-2 do perfusato do LAM isolado de rato (E-2LAMR) com alguns substratos e inibidores de elastases-2 e de quimases formadoras de Ang II. Os precursores de Ang II, [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e substrato tetradecapeptídeo de renina (TDP), foram convertidos em Ang II pela E-2LAMR com eficiências catalíticas de 8,6 min⁻¹μM⁻¹ e 5,1 min⁻¹μM⁻¹, respectivamente, enquanto os substratos cromogênicos N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilida e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida foram hidrolisados pela enzima com eficiências catalíticas de 10,6 min⁻¹μM⁻¹ e 7,6 min⁻¹μM⁻¹, respectivamente. O inibidor peptídico CH 5450 inibiu as atividades da E-2LAMR sobre os substratos Ang I (IC₅₀=49 μM) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (IC₅₀=4,8 μM), enquanto Acetil-Ala-Ala-Pro-Leu-clorometilcetona (Ac-AAPL-CK), um efetivo inibidor de elastases-2 pancreáticas, bloqueou eficientemente a atividade formadora de Ang II da E-2LAMR (IC₅₀=4,5 μM). Em conjunto, esses dados confirmaram e estenderam as similaridades enzimológicas entre elastases-2 pancreáticas e a E-2LAMR. Além disso, a interação até então desconhecida da E-2LAMR com [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I e CH 5450, ambos considerados como reagentes seletivos para quimases, sugere que as evidências para a formação de Ang II *in*

vivo por quimases podem ter sido superestimadas em investigações prévias sobre vias geradoras de Ang II.

Experimentos realizados com o LAM isolado de rato analisando o efeito vasoconstritor de Ang II, Ang I, TDP e [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I mostraram a existência de uma via geradora de Ang II independente da ECA, a qual é sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK. Entre os possíveis candidatos para essa via alternativa à ECA aparece a E-2LAMR, uma enzima que não é inibida por captopril e que é sensível à quimostatina e Ac-AAPL-CK. Embora quimases, que também são sensíveis à quimostatina, também possam ser candidatos a essa via independente da ECA, com base nos fatos de que a quimase I de rato tem uma atividade predominante de degradação da Ang II e que não existem relatos na literatura de que quimases sejam sensíveis ao inibidor Ac-AAPL-CK, esses dados em conjunto sugerem um possível papel para a E-2LAMR, mas não quimases, como uma via alternativa à ECA para a geração de Ang II no LAM isolado de rato.

A clonagem e o seqüenciamento do cDNA para a E-2LAMR foram alcançados pela combinação de transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia. A seqüência do cDNA mostrou-se idêntica à do cDNA para a elastase-2 pancreática de rato; o cDNA tem 909 nucleotídeos mais uma cauda poli (A) e codifica uma preproenzima de 271 amino ácidos. A análise dos supostos amino ácidos no sítio de ligação da Ang I revelou características que poderiam explicar a atividade do tipo carboxidipeptidase necessária para a eficiente conversão de Ang I

em Ang II. Adicionalmente, a seqüência revela características estruturais que poderiam contribuir para a ausência de atividade dessa enzima sobre a Ang II.

O RNA_m para a E-2LAMR foi expresso em LAM, pâncreas, pulmão, coração, rim, fígado e baço, mas não em aorta de rato. Células endoteliais do LAM em cultura expressaram o RNA_m para a E-2LAMR e sintetizaram a enzima. A localização intravascular dessa enzima e sua habilidade em formar Ang II e não clivar esse peptídeo indicam que ela poderia ter uma participação significativa como um agente formador de Ang II no sistema cardiovascular. Esses resultados também podem indicar que a E-2LAMR é expressa em vasos de resistência, mas não em vasos de condutância.

Abstract108

9 – Abstract

An elastase-2 has been recently described as the major angiotensin (Ang) II-forming enzyme of the rat mesenteric arterial bed (MAB) perfusate. Here, we have investigated the interaction of affinity-purified rat MAB elastase-2 with some substrates and inhibitors of both pancreatic elastases-2 and Ang II-forming chymases. The Ang II precursors [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I and renin substrate tetradecapeptide (TDP) were converted into Ang II by the rat MAB elastase-2 with catalytic efficiencies of 8.6 min⁻¹μM⁻¹ and 5.1 min⁻¹μM⁻¹, respectively, and the chromogenic substrates N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-*p*-nitroanilide and N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide were hydrolyzed by the enzyme with catalytic efficiencies of 10.6 min⁻¹μM⁻¹ and 7.6 min⁻¹μM⁻¹, respectively. The noncleavable peptide inhibitor CH 5450 inhibited the rat MAB elastase-2 activities toward the substrates Ang I (IC₅₀=49 μM) and N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (IC₅₀=4.8 μM), whereas N-acetyl-Ala-Ala-Pro-Leu-chloromethylketone (Ac-AAPL-CK), an effective active site-directed inhibitor of pancreatic elastases-2, efficiently blocked the Ang II-generating activity of the rat MAB enzyme (IC₅₀=4.5 μM). Altogether, these data confirm and extend the enzymological similarities between pancreatic elastases-2 and their rat MAB counterpart. Moreover, the thus far unrealized interaction of rat MAB elastase-2 with [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I and CH 5450, both regarded as selective for chymases, suggests that evidence for the *in*

in vivo formation of Ang II by chymases may have been overestimated in previous investigations of Ang II-forming pathways.

Experiments carried out in the isolated rat MAB analyzing the vasoconstrictor effect of Ang II, Ang I, TDP, and [Pro¹¹-D-Ala¹²]-Ang I showed the existence of an ACE-independent pathway for Ang II generation, which is sensitive to chymostatin and Ac-AAPL-CK. Among the possible candidates for this ACE-independent pathway is rat MAB elastase-2, an enzyme that is not inhibited by captopril, and that is sensitive to chymostatin and Ac-AAPL-CK. Although chymases, which are also chymostatin-sensitive enzymes, might also be other possible candidates for this ACE-independent pathway, based on the fact that rat chymase I has a predominant Ang II-degrading activity, and because there are no reports in the literature that chymases are sensitive to Ac-AAPL-CK, altogether these data suggest a possible role for rat MAB elastase-2, but not chymases, as an alternative pathway to ACE for Ang II generation in the isolated rat MAB.

The cloning and sequencing of the cDNA for the rat MAB elastase-2 was accomplished by reverse transcription-polymerase chain reaction. The sequence of this cDNA was found identical to the sequence of the rat pancreatic elastase-2; the cDNA is 909 nucleotides in length plus a poly (A) tail and encodes a preproenzyme of 271 amino acids. Analysis of the putative amino acids in the extended Ang I binding site of the rat MAB elastase-2 reveals features that could explain the dipeptidyl carboxypeptidase-like activity required for efficient Ang I to

Ang II conversion. Additionally, the sequence reveals structural features that could contribute to the lack of activity of this enzyme toward Ang II.

Rat MAB elastase-2 mRNA was expressed in rat mesenteric arteries, pancreas, lung, heart, kidney, liver, and spleen but not in aorta. Cultured mesenteric endothelial cells expressed the mRNA for rat MAB elastase-2 and synthesized the enzyme itself. The intravascular localization of this enzyme and its ability to generate Ang II and not destroy this peptide indicate that it might play a role in the rat cardiovascular system as an Ang II-forming agent. These results may also indicate that rat MAB elastase-2 is expressed in resistance vessels but not in conduit vessels.

10 – Referências Bibliográficas

Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K. Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension* 1998;32(3):514-20.

Alexander RW, Dzau VJ. Vascular biology: the past 50 years. *Circulation* 2000;102(20 Suppl 4):IV112-6.

Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension* 2000;36(4):638-41.

Arakawa K. Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens Suppl* 1996;14(5):S3-7.

Bastos M, Maeji NJ, Abeles RH. Inhibitors of human heart chymase based on a peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(15):6738-42.

Boucher R, Asselin J, Genest J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 1974;34-35(Suppl 1):203-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Caldwell PR, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976;191(4231):1050-1.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;79(1):1-6.

Carlson GM, MacDonald RJ, Meyer EF Jr. Computer aided prediction and evaluation of the tertiary structure for rat elastase II. *J Theor Biol* 1986;119(1):107-24.

Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1480(1-2):245-57.

Cornish KG, Joyner WL, Gilmore JP. Evidence for the conversion of angiotensin I to angiotensin II by the coronary microcirculation. *Blood Vessels* 1979;16(5):241-6.

Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nature Med* 2000a;6(6):698-702.

Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest* 2000b;105(1):21-34.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 1977;16(25):5484-91.

Del Mar EG, Largman C, Brodrick JW, Fassett M, Geokas MC. Substrate specificity of human pancreatic elastase 2. *Biochemistry* 1980;19(3):468-72.

Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens* 1989;7(12):933-6.

Edwards PD, Andisik DW, Bryant CA, Ewing B, Gomes B, Lewis JJ, Rakiewicz D, Steelman G, Strimpler A, Trainor DA, Tuthill PA, Mauger RC, Veale CA, Wildonger RA, Williams JC, Wolanin DJ, Zottola M. Discovery and biological activity of orally active peptidyl trifluoromethyl ketone inhibitors of human neutrophil elastase. *J Med Chem* 1997;40(12):1876-85.

Fahey JL, Terry E. Ion exchange chromatography and gel filtration. *In: Handbook of Experimental Immunology*. 3rd ed. (part 1): 8.1-8.16, 1978.

Faria FA, Salgado MCO. Facilitation of noradrenergic transmission by angiotensin in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19(2 Suppl):II30-5.

Fletcher TS, Shen WF, Largman C. Primary structure of human pancreatic elastase 2 determined by sequence analysis of the cloned mRNA. *Biochemistry* 1987;26(23):7256-61.

Garrison EA, Champion HC, Kadowitz PJ. [Pro¹¹,D-Ala¹²]angiotensin I has rapid onset vasoconstrictor activity in the cat. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):E1059-64.

Gestin M, Le Huerou-Luron I, Wicker-Planquart C, Le Drean G, Chaix JC, Puigserver A, Guilloteau P. Bovine pancreatic preproelastases I and II: comparison of nucleotide and amino acid sequences and tissue specific expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;118(1):181-7.

Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Ferris MW, Hieda HS, Gomez-Sanchez EP. Rat mesenteric artery endothelial cells in culture secrete ET-1. *Life Sci* 1990;46(12):881-4.

Guo C, Ju H, Leung D, Massaelli H, Shi M, Rabinovitch M. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest* 2001;107(6):703-15.

Hartley BS. Amino acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature* 1964;201:1284-7.

He S, Gaca MD, McEuen AR, Walls AF. Inhibitors of chymase as mast cell-stabilizing agents: contribution of chymase in the activation of human mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(2):517-23.

Herbert JW. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals (appendix 3). *In: Handbook of Experimental Immunology*. 3rd ed. (part 3): 3.1-3.15, 1978.

Hoit BD, Shao Y, Kinoshita A, Gabel M, Husain A, Walsh RA. Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J Clin Invest* 1995;95(4):1519-27.

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 1998;32(3):387-92.

Ideishi M, Noda K, Sasaguri M, Ikeda M, Arakawa K. Angiotensin II forming activity of vascular endothelial and smooth muscle cells. *Artery* 1993;20(2):95-102.

Inoue K, Nishimura H, Kubota J, Kawamura K. Alternative angiotensin II formation in rat arteries occurs only at very high concentrations of angiotensin I. *Hypertension* 1999;34(3):525-30.

Juul B, Aalkjaer C, Mulvany MJ. Contractile effects of tetradecapeptide renin substrate on rat femoral resistance vessels. *J Hypertens Suppl* 1987;5(2):S7-10.

Kawashima I, Tani T, Shimoda K, Takiguchi Y. Characterization of pancreatic elastase II cDNAs: two elastase II mRNAs are expressed in human pancreas. *DNA* 1987;6(2):163-72.

Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 1987;60(3):422-8.

Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A. Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem* 1991;266(29):19192-7.

Largman C, DelMar EG, Brodrick JW, Fassett M, Geokas MC. Inhibition of human pancreatic elastase 2 by peptide chloromethyl ketones. *Biochim Biophys Acta* 1980;614(1):113-20.

Largman C. Isolation and characterization of rat pancreatic elastase. *Biochemistry* 1983;22(16):3763-70.

Le Trong H, Neurath H, Woodbury RG. Substrate specificity of the chymotrypsin-like protease in secretory granules isolated from rat mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(2):364-7.

Leatherbarrow RJ. *Grafit version 3.0*. Erithacus Software Ltd., Staines, U.K. 1992.

Leite R, Salgado MCO. Increased vascular formation of angiotensin II in one-kidney, one clip hypertension. *Hypertension* 1992;19(6 Pt 1):575-81.

Leite R, Estevao R, Resende AC, Salgado MCO. Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. *Braz J Med Biol Res* 1997;30(5):649-56.

Lilly LS, Pratt RE, Alexander RW, Larson DM, Ellison KE, Gimbrone MA Jr, Dzau VJ. Renin expression by vascular endothelial cells in culture. *Circ Res* 1985;57(2):312-8.

Liu TY, Boykins RA. Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube: high recovery of labile amino acids. *Anal Biochem* 1989;182(2):383-7.

MacDonald RJ, Swift GH, Quinto C, Swain W, Pictet RL, Nikovits W, Rutter WJ. Primary structure of two distinct rat pancreatic preproelastases determined by sequence analysis of the complete cloned messenger ribonucleic acid sequences. *Biochemistry* 1982;21(6):1453-63.

Mangiapane ML, Rauch AL, MacAndrew JT, Ellery SS, Hoover KW, Knight DR, Johnson HA, Magee WP, Cushing DJ, Buchholz RA. Vasoconstrictor action of angiotensin I-convertase and the synthetic substrate (Pro¹¹,D-Ala¹²)-angiotensin I. *Hypertension* 1994;23(6 Pt 2):857-60.

Maruta H, Arakawa K. Confirmation of direct angiotensin formation by kallikrein. *Biochem J* 1983;213:193-200.

McGrath ME, Mirzadegan T, Schmidt BF. Crystal structure of phenylmethanesulfonyl fluoride-treated human chymase at 1.9 Å. *Biochemistry* 1997;36(47):14318-24.

McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels in rat. *J Physiol (London)* 1965;177:21-30.

Miyazaki M, Takai S. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res* 2001;24(3):189-93.

Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T. Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl* 1997;63:S132-5.

Nishimoto M, Takai S, Sawada Y, Yuda A, Kondo K, Yamada M, Jin D, Sakaguchi M, Asada K, Sasaki S, Miyazaki M. Chymase-dependent angiotensin II formation in the saphenous vein versus the internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(4):729-34.

Nishimura H, Buikema H, Baltatu O, Ganten D, Urata H. Functional evidence for alternative ANG II-forming pathways in hamster cardiovascular system. *Am J Physiol* 1998;275(4 Pt 2):H1307-12.

O'Shannessy DJ, Wilchek M. Immobilization of glycoconjugates by their oligosaccharides: use of hydrazido-derivatized matrices. *Anal Biochem* 1990;191(1):1-8.

Okamura T, Okunishi H, Ayajiki K, Toda N. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery: role of two different angiotensin II-generating enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15(3):353-9.

Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 1984;2(3):277-84.

Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149(3):1186-92.

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

Paula CA. Purificação e caracterização de uma serina-protease formadora de AngII do perfusato do leito arterial mesentérico isolado de rato. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1998;117p.

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

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977;57:313-70.

Pereira PJ, Wang ZM, Rubin H, Huber R, Bode W, Schechter NM, Strobl S. The 2.2 Å crystal structure of human chymase in complex with succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-chloromethylketone: structural explanation for its dipeptidyl carboxypeptidase specificity. *J Mol Biol* 1999;286(1):163-73.

Rieder MJ, Roman RJ, Greene AS. Reversal of microvascular rarefaction and reduced renal mass hypertension. *Hypertension* 1997;30(1 Pt 1):120-7.

Sanker S, Chandrasekharan UM, Wilk D, Glynias MJ, Karnik SS, Husain A. Distinct multisite synergistic interactions determine substrate specificities of human chymase and rat chymase-1 for angiotensin II formation and degradation. *J Biol Chem* 1997;272(5):2963-8.

Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;27(2):157-62.

Segel IH. Rapid equilibrium bireactant and terreactant systems. *In* Enzyme kinetics. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1993;273-345.

Stevenson BJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK. Sequence organisation and transcriptional regulation of the mouse elastase II and trypsin genes. *Nucleic Acids Res* 1986;14(21):8307-30.

Stuckert-Seixas SR. Identificação e purificação de uma enzima formadora de angiotensina II no perfusato cardíaco de ratos normotensos e hipertensos. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2001;72p.

Stroud RM, Kay LM, Dickerson RE. The crystal and molecular structure of DIP-inhibited bovine trypsin at 2.7 Å resolution. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1971;36:125-40.

Swift GH, Craik CS, Stary SJ, Quinto C, Lahaie RG, Rutter WJ, MacDonald RJ. Structure of the two related elastase genes expressed in the rat pancreas. *J Biol Chem* 1984;259(22):14271-8.

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

Takai S, Shiota N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci* 1996;58(7):591-7.

Tang SS, Stevenson L, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway. Adrenergic regulation of angiotensin secretion. *Circ Res* 1990;66(1):103-8.

Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest* 1982;69:25-30.

Trachte GJ, Lefer AM. Inotropic and vasoactive effects of the naturally occurring angiotensins in isolated cat cardiac muscle and coronary arteries. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;25(3):419-27.

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

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990b;265(36):22348-57.

Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, Graham RM, Husain A. Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem* 1991;266(26):17173-9.

Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 1993;91(4):1269-81.

Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J* 1995;16 Suppl N:79-85.

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

Voors AA, Pinto YM, Buikema H, Urata H, Oosterga M, Rooks G, Grandjean JG, Ganten D, van Gilst WH. Dual pathway for angiotensin II formation in human internal mammary arteries. *Br J Pharmacol* 1998;125(5):1028-32.

Waldeck K, Lindberg BF, Persson K, Andersson KE. Characterization of angiotensin II formation in human isolated bladder by selective inhibitors of ACE and human chymase: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol* 1997;121(6):1081-6.

Wolny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, Fischli W. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res* 1997 Feb;80(2):219-27.

Xiao F, Puddefoot JR, Vinson GP. The expression of renin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells. *J Endocrinol* 2000;164(2):207-14.

Yamamoto D, Shiota N, Takai S, Ishida T, Okunishi H, Miyazaki M. Three-dimensional molecular modeling explains why catalytic function for angiotensin-I is different between human and rat chymases. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242(1):158-63.

Yang HYT, Neff NH. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J Neurochem* 1972;19:2443-50.

Ziogas J, Story DF. Effect of locally generated angiotensin II on noradrenergic neuroeffector function in the rat isolated caudal artery. *J Hypertens Suppl* 1987;5(2):47-52.