

Enzima conversora de angiotensina I (ECA) N-domínio 90-kDa: possível marcador para hipertensão em modelo de transplante renal

90-kDa N-domain angiotensin I-converting enzyme (ACE): possible marker for hypertension in a renal transplant model

Autores

Cleber A Leite¹
 Nádia SC Bertonecello¹
 Ingrid KM Watanabe¹
 Fernanda B Fernandes¹
 Maria Claudina C Andrade¹
 Fernanda A Ronchi¹
 Danielle Y Arita¹
 Fernanda K Marcondes²
 Tatiana S Cunha¹
 Dulce E Casarini¹

¹ Universidade Federal de São Paulo.

² Universidade Estadual de Campinas.

Data de submissão: 30/9/2016.
 Data de aprovação: 4/10/2016.

Correspondência para:

Dulce E Casarini.
 Divisão de Nefrologia,
 Departamento de Medicina.
 Rua Botucatu, nº 740, Vila
 Clementino, São Paulo, SP,
 Brasil.
 E-mail: casarini.elena@unifesp.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20170002

RESUMO

Introdução: A hipertensão é altamente prevalente pós-transplante renal e vários fatores estão associados incluindo o tratamento com imunossupressores e a predisposição genética. **Objetivo:** Os objetivos foram avaliar os efeitos do transplante do rim de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em ratos Wistar, e a possível transferência da ECA N-domínio de 80/90-kDa para os tecidos dos receptores. **Métodos:** Para isso, os dados dos animais Wistar receptores dos rins de SHR foram comparados aos dados dos Wistar submetidos ao tratamento com CsA e Wistar Sham. **Resultados e Discussão:** Apesar da pressão arterial permanecer inalterada nos estágios iniciais pós-transplante renal, a expressão da ECA de 80/90-kDa foi identificada na urina de ratos 7 e 15 dias após o transplante, e de forma mais intensa aos 30 dias após a cirurgia, quando os animais tornaram-se hipertensos. **Conclusão:** Nossos dados mostram que ECA N-domínio está associada ao desenvolvimento da hipertensão, e que este marcador pode ser identificado na urina pós-transplante renal antes mesmo de qualquer alteração da pressão arterial.

Palavras-chave: hipertensão; sistema renina-angiotensina; transplante de rim.

ABSTRACT

Introduction: Hypertension is nearly universal in kidney transplant and several factors are associated with post transplant hypertension, including immunosuppressive medications and genetic predisposition. **Objective:** The aims were to evaluate the effects of spontaneously hypertensive rats (SHR) kidney transplantation in Wistar rats and the possible transference of 80/90-kDa N-domain ACE. **Methods:** To do so, the data from Wistar recipients of kidney from SHR were compared to data from transplanted Wistar submitted to CsA treatment and, to Wistar Sham. **Results and Discussion:** Despite the unaltered blood pressure observed at early stages, 80/90-kDa ACE was found expressed in the urine of rats 7 and 15 days after transplantation, which was intense when rats became hypertensive 30 days post-surgery. **Conclusion:** Our data show that this enzyme is associated with the development of hypertension, and this marker appears in the urine before any substantial blood pressure alteration.

Keywords: hypertension; kidney transplantation; renin-angiotensin system.

INTRODUÇÃO

A hipertensão é um achado quase universal em receptores de transplante renal resultante da interação de vários fatores, incluindo medicamentos imunossupressores, disfunção do enxerto, bem como predisposição genética.¹

Embora tenha sido demonstrado que o aumento da pressão arterial pós-transplante ocorre em 90% dos casos secundariamente a terapia com imunossupressores como a ciclosporina (CsA),² essa classe de fármacos continua a desempenhar um papel fundamental na prevenção da rejeição do

aloenxerto renal. O exato mecanismo da hipertensão induzida por CsA permanece obscuro, mas várias linhas de evidência sugerem o envolvimento do sistema renina-angiotensina (SRA).³

A caracterização da enzima conversora da angiotensina (ECA) N-domínio 80/90-kDa como possível marcador biológico de hipertensão nos levou a supor que tal proteína pudesse estar associada ao desenvolvimento de hipertensão em pacientes transplantados renais.⁴⁻⁶ Assim, o presente estudo prestou-se a investigar: 1) os efeitos do transplante

renal sobre ratos Wistar espontaneamente hipertensos (SHR) e a possível transferência da isoforma 80/90 kDa da ECA; e 2) se tal transferência pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão induzida por CsA.

MATERIAL E MÉTODOS

PROCEDIMENTOS GERAIS

Ratos Wistar machos espontaneamente hipertensos (SHR) de quatro meses de idade foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos (n = 6/grupo): 1) grupo de controle-placebo: ratos Wistar que tiveram seus rins removidos e retransplantados no mesmo compartimento, sacrificados após sete, quinze ou trinta dias (C-7, C-15 e C-30); 2) grupo transplante: ratos Wistar que receberam rim de um SHR, sacrificados sete, quinze ou trinta dias após o transplante (T-7, T-15 e T-30); 3) grupo transplante tratado com CsA: ratos Wistar que receberam rim de um SHR tratados com dose intraperitoneal diária de CsA (2mg/Kg/dia) por sete, quinze ou trinta dias após a cirurgia (TCsA-7, TCsA-15 e TCsA-30). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (número 04348/02).

TRANSPLANTE RENAL

Os rins esquerdos de SHR foram ortotopicamente transplantados nos ratos Wistar receptores após nefrectomia ipsilateral sob anestesia. Por um breve período, o rim esquerdo foi removido e mantido em soro fisiológico frio. Após o clampeamento dos vasos renais, o rim esquerdo nativo do receptor foi removido e substituído pelo rim do doador; anastomoses término-terminais foram realizadas nos vasos renais e ureter.⁷

ANÁLISE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida nos ratos conscientes, por meio de um sistema manguito de cauda computadorizado (BP-2000, Blood Pressure Analysis System™, Visitech System)⁸ sete, quinze e trinta dias após a manipulação cirúrgica ou transplante renal.

COLETA DE URINA E TECIDOS

Sete, quinze e trinta dias após a manipulação cirúrgica ou transplante renal, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina. Ao final do protocolo, os ratos foram sacrificados por decapitação e o sangue do tronco e os órgãos foram colhidos. Rins e pulmões foram homogeneizados⁹ e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.¹⁰

DETECÇÃO DE ECA POR WESTERN BLOT

A eletroforese foi realizada de acordo com o método de Laemmli.¹¹ As bandas foram reveladas por meio dos substratos tetrazólio nitroazul (NBT)/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (NBT/BCIP).

SEQUÊNCIA NH₂-TERMINAL DA ISOFORMA 80/90 KDA DA ECA PURIFICADA

A sequência NH₂-terminal das ECAs foi deduzida a partir do sequenciamento dos aminoácidos utilizando um sequenciador de proteínas (modelo PPSQ-23, Shimadzu).¹²

ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade catalítica da ECA foi determinada de acordo com o método descrito por Friedland e Silverstein,¹³ utilizando o substrato Z-Phe-His-Leu.¹²

ANÁLISE ESTATÍSTICA

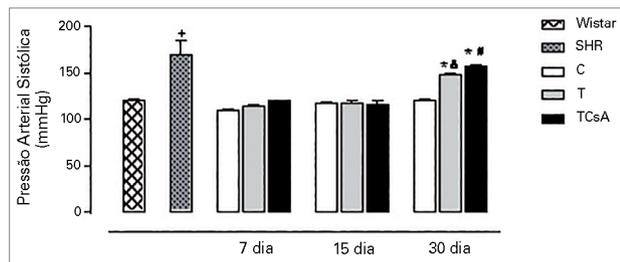
Os resultados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por ANOVA de fator único com o teste de diferença significativa de Fisher. Valores de *p* < 0.05 foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

São várias as causas que podem contribuir para a hipertensão pós-transplante. Os fatores relacionados aos doadores não se resumem apenas a hipertensão pré-existente e baixa qualidade do enxerto, mas incluem também fatores genéticos. Em tal contexto, descrevemos a presença da isoforma 80/90 kDa da ECA na urina e nos rins de indivíduos com predisposição a hipertensão, pacientes e animais hipertensos.⁴⁻⁶ Assim, pretendemos avaliar se a transferência de isoformas da ECA ocorre quando um enxerto renal de um SHR é transplantado para um rato normotenso, como o SRA é afetado, e a correlação entre PAS e presença de isoforma 80/90-kDa da ECA na urina.

Os ratos espontaneamente hipertensos apresentaram PAS significativamente mais elevada do que os ratos Wistar (171 ± 8 x 120 ± 2 mmHg, *p* < 0,05, Figura 1). Sete e quinze dias após o transplante, a PAS dos receptores de rins de SHR estava semelhante à dos animais nos grupos C e Wistar, e significativamente mais baixa do que a PAS do grupo SHR (Figura 1). Por outro lado, 30 dias após o transplante renal de SHR, o grupo T apresentou PAS significativamente mais elevada (em comparação aos grupos C e Wistar), como

Figura 1. PAS basal de SHR ou ratos Wistar transplantados após sete, quinze ou trinta dias de manipulação cirúrgica ou transplante renal, tratados ou não com ciclosporina (CsA, 2mg/Kg/dia; n = 6/ grupo). Valores representados como média \pm EPM. SHR: ratos espontaneamente hipertensos (SHR); C: controle placebo Wistar; T: ratos Wistar receptores de transplante renal de SHR; TCsA: ratos Wistar receptores de transplante renal de SHR tratados com CsA. + vs. Todos os grupos experimentais; * vs. C-30; & vs. T-7 e T-15; # vs. TCsA-7 e TCsA-15; $p < 0,05$.



visto nos SHR (Figura 1). Além disso, os resultados mostram que o tratamento com CsA não influenciou a PAS sete, quinze ou trinta dias após o transplante renal. Corroborando nossos achados, Kawabe *et al.*¹⁴ e Rettig *et al.*¹⁵ mostraram que a PAS em ratos submetidos a transplante renal é fortemente determinada pelo perfil genético do rim transplantado.

Segundo a Figura 2, a urina dos ratos Wistar que receberam rins de SHR apresentou três isoformas da ECA: a isoforma somática com 190-kDa, a isoforma N-domínio com 65-kDa e a isoforma 80/90-kDa da ECA. Esta última foi detectada na urina dos SHR e dos indivíduos do grupo T sete dias após o transplante (T-7), com expressão aumentada trinta dias após o procedimento (T-30; Figura 2).

É importante destacar que os ratos Wistar normalmente não expressam essa isoforma, como descrito por Ronchi *et al.*⁴ Considerando-se que a detecção da isoforma 80/90-kDa da ECA na urina dos grupos T-7 e T-15 ocorreu apesar da ausência de alterações na PAS, os resultados demonstram que a mensagem da proteína é transferida, predispondo esses animais ao desenvolvimento de hipertensão.

O transplante parece afetar a expressão da isoforma 80/90-kDa em rins transplantados, que mostrou-se mais elevada no grupo não tratado com CsA em relação ao tratado (Figura 3, Faixa 1 x Faixa 6), indicando que essa isoforma pode ser intensamente afetada pela resposta imunológica ao transplante.

Além das células imunológicas transferidas com o enxerto renal, macrófagos nativos e outras células imunológicas que portam a mensagem genética da isoforma 80/90-kDa da ECA transferidas com o enxerto renal, podem migrar para o órgão transplantado, elevando localmente a expressão da

Figura 2. Análise da expressão de isoformas da ECA na urina de SHR e ratos Wistar transplantados após sete, quinze ou trinta dias (anticorpo anti-ECA - 9B9). Faixa 1: padrão de peso molecular, Faixa 2: C-30, Faixa 3: SHR; Faixa 4: T-7, Faixa 5: T-15, Faixa 6: T-21, Faixa 7: T-30.

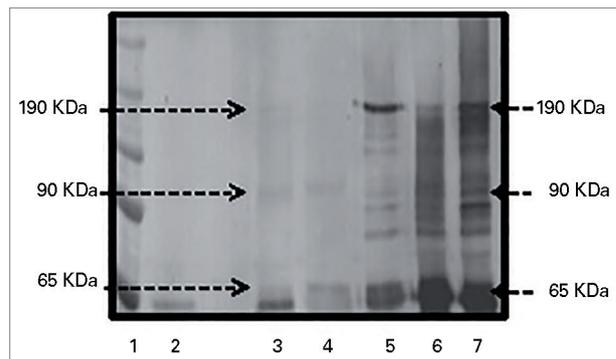


Figura 3. Análise da expressão da isoforma de ECA no tecido renal nos grupos SHR, placebo Wistar C e T-30 (anticorpo anti-ECA 9B9). Faixa 1: rim nativo de T-30; Faixa 2: SHR; Faixa 3: Wistar; Faixa 4: rim nativo de C-30; Faixa 5: aloenxerto renal de T-30; Faixa 6: rim nativo de TCsA-30.

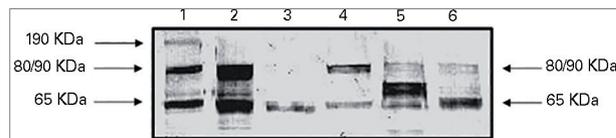


TABELA 1 SEQUÊNCIAS NH₂-TERMINAL DA ISOFORMA 80/90-KDA E ALINHAMENTO COM SEQUÊNCIAS NH₂-TERMINAL DA ECA DE BOVINOS, CAMUNDONGOS, RATOS E HUMANOS

Grupos	Sequência
ECA rins nativos T-30	DPGXQPGNXS
ECA rins nativos TCsA-30	- PGXQPGNFS
ECA bovina	DPALQPGNF -
ECA camundongos	DPGTQPSNF -
ECA ratos	DPGLQPGNFS
ECA humanos	DPGLQPGNFS

isoforma. Tal hipótese é corroborada pela observação da redução da expressão da isoforma 80/90-kDa da ECA durante tratamento com CsA.

A sequência NH₂-terminal da isoforma da ECA purificada com 80/90-kDa de rins transplantados é descrita na Tabela 1. O sequenciamento mostrou que a isoforma 80/90-kDa da ECA de rins nativos dos grupos T-30 e TCsA-30 era semelhante à das ECAs de ratos somáticos, camundongos e humanos (~80% homologia), comprovando que as enzimas detectadas contêm a porção NH₂-terminal da molécula (Tabela 1).

A atividade da ECA nos rins nativos dos ratos transplantados foi semelhante entre os grupos. Além disso, a atividade renal da ECA dos rins nativos dos

TABELA 2 ATIVIDADE DA ECA NOS PULMÕES, RINS NATIVOS E RINS TRANSPLANTADOS DE INDIVÍDUOS SHR E WISTAR TRANSPLANTADOS APÓS SETE, QUINZE E 30 DIAS DA MANIPULAÇÃO CIRÚRGICA OU TRANSPLANTE RENAL, TRATADOS OU NÃO COM CICLOSPORINA (CsA, 2MG/KG/DIA; N = 6/GRUPO).

Grupos	Pulmões (nmol/mL/min)	Rins nativos (nmol/mL/min)	Rins transplantados (nmol/mL/min)
Wistar	260 ± 19	24 ± 5	–
SHR	478 ± 29 ⁺	21 ± 1	–
C	290 ± 14	27 ± 4	–
T-15	404 ± 26 [#]	35 ± 5	10 ± 1
TCsA-15	257 ± 20 ^{&}	31 ± 5	8 ± 1
T-30	296 ± 10 ^{&}	31 ± 4	16 ± 1 ^{&}
TCsA-30	232 ± 15 [*]	32 ± 2	21 ± 3 [*]

Valores apresentados como média ± EPM (n = 6/grupo). ⁺ vs. Todos os grupos experimentais, [#] vs. Wistar e C, [&] vs. T-15; ^{*} vs. T-30; *p* < 0,05.

grupos T-15, TCsA-15, T-30 e TCsA-30 foi mais elevada do que no grupo SHR. É também importante citar que atividade mais baixa da ECA foi observada em rins transplantados no décimo-quinto dia (T-15, TCsA-15) em comparação aos indivíduos Wistar, C e SHR, sem qualquer efeito da CsA. Curiosamente, trinta dias após o transplante a atividade da ECA dos rins transplantados (T-30, TCsA-30) não foi significativamente diferente dos SHR (Tabela 2).

A atividade pulmonar da ECA estava elevada em T-15 em comparação ao grupo Wistar, sugerindo que o transplante renal tenha induzido tal alteração, ainda que a mesma não tenha sido suficiente para elevar a PAS dos receptores. O tratamento com CsA reduziu significativamente a atividade pulmonar da ECA quinze e trinta dias após o transplante (T-15 x TCsA-15 e T-30 x TcsA-30; Tabela 2). Nossos resultados sugerem que o transplante de rins de SHR para ratos Wistar também faz surtir um efeito de curto prazo sobre a atividade da ECA na fonte primária de produção de ECA (pulmões), que pode ser evitada com terapia imunossupressora.

A detecção precoce da isoforma 80/90-kDa na urina de ratos transplantados indica que este marcador biológico da hipertensão aparece antes de qualquer elevação substancial da PA. Nossos dados contribuem para destacar a relação entre SRA tecidual e disfunção do enxerto.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP pelo apoio financeiro [processos 04/10063-0 e 02/13290-2].

REFERÊNCIAS

- Mange KC, Feldman HI, Joffe MM, Fa K, Bloom RD. Blood pressure and the survival of renal allografts from living donors. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:187-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000104574.04006.08>
- Clyburn EB, DiPette DJ. Hypertension induced by drugs and other substances. *Semin Nephrol* 1995;15:72-86.
- Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987;32:19-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1987.166>
- Ronchi FA, Andrade MC, Carmona AK, Krieger JE, Casarini DE. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23:1869-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.hjh.0000183523.66123.95>
- Maluf LCV, A.D., Mill JG, Sesso R, Casarini DE. Populational study to determine the prevalence of the N-domain form of angiotensin converting enzyme with 90kDa described as a genetic marker of hypertension. *J Hypertens* 2006;24.
- Marques GD, Quinto BM, Plavinik FL, Krieger JE, Marson O, Casarini DE. N-domain angiotensin I-converting enzyme with 80 kDa as a possible genetic marker of hypertension. *Hypertension* 2003;42:693-701. PMID: 12900433 DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.HYP.0000085784.18572.CB>
- Fischer B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965;58:909-14.
- das Neves VJ, Tanno AP, Cunha TS, Fernandes T, Guzzoni V, da Silva CA, et al. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β -adrenergic receptors. *Life Sci* 2013;92:1029-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.04.002>
- Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:755-64. PMID: 10881050 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2000000700005>
- 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. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5. PMID: 5432063 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>
- Aragão DS, de Andrade MC, Ebihara F, Watanabe IK, Magalhães DC, Juliano MA, et al. Serine proteases as candidates for proteolytic processing of angiotensin-I converting enzyme. *Int J Biol Macromol* 2015;72:673-9. PMID: 25263467 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.017>
- Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976;66:416-24. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/66.2.416>
- Kawabe K, Watanabe TX, Shiono K, Sokabe H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Jpn Heart J* 1978;19:886-94. PMID: 374777 DOI: <http://dx.doi.org/10.1536/ihj.19.886>
- Rettig R, Bandelow N, Patschan O, Kuttler B, Frey B, Uber A. The importance of the kidney in primary hypertension: insights from cross-transplantation. *J Hum Hypertens* 1996;10:641-4.