

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
MARIANA LIMA PRATA ROCHA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
ISOFORMA C-DOMÍNIO DE ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA DO FLUIDO ILEAL HUMANO

UBERABA  
2008

---

MARIANA LIMA PRATA ROCHA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
ISOFORMA C-DOMÍNIO DE ENZIMA CONVERSORA  
DE ANGIOTENSINA DO FLUIDO ILEAL HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Clínica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli Aparecida da Silva Gomes.

UBERABA  
2008

***Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)***  
***(Biblioteca da UFTM, Universidade Federal do Triângulo Mineiro,***  
***MG, Brasil)***

R672p Rocha, Marina Lima Prata, 1982-  
Purificação e caracterização de uma isoforma C-domínio de enzima  
conversora de angiotensina do fluido ileal humano/Mariana Lima Prata Rocha.  
-- 2008.  
78f. : tab; fig.; graf; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro,  
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Uberaba, 2008.  
Orientadora: Profa. Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes.

1. Angiotensina I. 2. Íleo 3. Bradicinina. I. Gomes, Roseli Aparecida da  
Silva. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 577.151.4

---

MARIANA LIMA PRATA ROCHA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ISOFORMA C-DOMÍNIO DE  
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DO FLUIDO ILEAL HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Clínica

Uberaba, 01 de Julho de 2008.

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Karaoglanovic Carmona

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli Aparecida da Silva Gomes

---

Prof. Dr. Eduardo Crema

Aos meus pais, e à minha irmã, pelo estímulo, carinho e compreensão.  
Aos meu Tio Dom Joviano, pelo grande incentivo e contribuição nos meus estudos.  
Ao meu namorado, Fernando, pela compreensão e paciência nos momentos de ausência.  
À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseli Ap. da Silva Gomes, pela confiança e incentivo neste trabalho.

---

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roseli Aparecida da Silva Gomes, pela grande oportunidade, pela confiança e pelos conhecimentos compartilhados durante a realização deste trabalho. Agradeço a oportunidade de ter realizado um trabalho sobre sua orientação.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e ao Departamento de Bioquímica e Biofísica pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – em particular ao Departamento de Biofísica pela doação dos substratos sintéticos.

Ao professor Eduardo Crema pela coleta do fluido ileal humano dos pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Ao professor Valdo, Departamento de Fisiologia, pela doação do captopril.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lívia das Graças Vieito Lombardi Teodoro, pelos conhecimentos compartilhados durante as atividades práticas.

À farmacêutica Ana Maria Pires, da Farmácia São Sebastião, em Uberaba, pela doação do lisinopril.

Ao meu amigo Francisco Colmanetti, pela amizade e companheirismo durante esses anos na realização da parte prática dessa dissertação.

Ao Marco Túlio Parolini e ao Geraldo Garcia Júnior, pelo companheirismo, confiança e pelos grandes ensinamentos dentro do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Ao professor Geraldo Londe que estava sempre a disposição durante esses anos, pela amizade e compreensão nos momentos mais difíceis de realização deste trabalho.

Aos meus pais, Dagoberto e Vera Lúcia, e à minha irmã, Juliana, que me acompanharam nessa trajetória.

Ao meu tio, Dom Joviano de Lima Júnior, que sempre me apoiou e me incentivou nos estudos. Obrigado por acreditar em mim.

Ao meu namorado, Fernando Cantarino Borges, que com os seus conhecimentos em Engenharia, me auxiliou na esquematização dos gráficos.

Aos meus amigos, professores e demais funcionários da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, nos quais encontrei compreensão, estímulo e cooperação.

*“O cientista não só tem que fazer  
ciência, mas também escrevê-la.”*

*(Day, 1990)*

### **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi desenvolvido com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).



## RESUMO

A enzima conversora de angiotensina I (ECA) - (EC.3.4.15.1) é uma metaloproteinase com dois domínios homólogos ativos amino e carbóxi-terminal. A enzima está envolvida na conversão de Angiotensina I em Angiotensina II e na inativação da bradicinina *in vivo*. Por isso é uma importante reguladora da pressão sanguínea e da homeostase eletrolítica e fluídica. A ECA se encontra em diversos tecidos e líquidos biológicos e pode atuar sobre substratos diferentes em cada local. *In vitro*, sabe-se que a ECA hidrolisa vários outros peptídeos, tais como substância P, N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), hormônio liberador do hormônio luteinizante (LH-RH) e neurotensina. Além disso, hidrolisa a colescistocinina-8 e análogos da gastrina. Existem duas formas de ECA, sendo uma de membrana e outra secretória. Entre as formas secretórias a ECA testicular apresenta apenas o C-domínio. O íleo é o local de síntese de hormônios gastrointestinais que afetam a motilidade do intestino delgado. Nele se encontra a neurotensina e a substância P que são hidrolisados *in vitro* pela ECA. De posse de substratos com supressão intramolecular de fluorescência que são hidrolisados por ambos os domínios catalíticos da enzima e que distinguem as atividades dos domínios C e N, e dos dados da literatura nos propusemos a caracterizar a(s) enzima(s) com atividade conversora de angiotensina no fluido ileal humano. Foram purificadas duas formas de ECA que apresentam atividade sobre os substratos: Hippuryl-His-Leu e Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, sendo que esta atividade enzimática foi inibida com captopril numa concentração final na cubeta de  $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ . A maior parte da atividade enzimática mostrou uma massa molecular aparente em torno de 108 kDa sendo predominantemente a atividade para N-domínio. Outra forma de massa molecular em torno de 55 kDa mostrou atividade principalmente para C-domínio. Essa fração de 55 kDa foi testada quanto à sua capacidade de hidrólise sobre a angiotensina I, a bradicinina, a neurotensina e a substância P. A hidrólise foi verificada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de octadecilsilano, dos produtos gerados após a incubação com a enzima purificada. Essa isoforma de 55 kDa apresentou pH ótimo para o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH em pH 7 e para o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH em torno do pH 6. O perfil de pH ótimo para o Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, é muito semelhante aos dados da literatura para outras formas de enzima conversora de angiotensina. Os parâmetros cinéticos determinados para o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH foi de  $K_m = 1,95 \mu\text{M}$ ;  $K_{cat} = 154,5 \text{ s}^{-1}$  e  $K_{cat}/K_m = 79,23 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e para o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH os valores foram de  $K_m = 3,64 \mu\text{M}$ ;  $K_{cat} = 854 \text{ s}^{-1}$  e  $K_{cat}/K_m = 234,61 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Uma isoforma N-domínio já foi descrita no fluido ileal humano, esse trabalho mostra que o fluido ileal contém uma isoforma com características C-domínio. O papel fisiológico da ECA no fluido ileal ainda não está esclarecido. Entretanto a presença simultânea de peptídeos tais como substância P, angiotensina II e neurotensina no intestino relacionados com a ação da enzima conversora sugere um papel fisiológico local para essa enzima. O isolamento e a caracterização de uma isoforma com atividade predominantemente de C-domínio no fluido ileal humano está sendo descrita pela primeira vez nesse trabalho.

Palavras-chave: Enzima Conversora de Angiotensina, ECA, Fluido Ileal Humano, Angiotensina I.

# *Listas*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz – Ácido *orto*-aminobenzóico

Ac-SDKP – Acetil-seril-aspartil-lisil-prolina

ACTH – Hormônio adenocorticotrófico

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Arg – R – Arginina

Asp – D – Ácido aspártico

Bk – Bradicinina

C-terminal – Carbóxi-terminal

°C – grau centígrado

Captopril – [(D-3-mercapto-2-methylpropanoyl)-L-Pro]

CCK – Colecistoquinina

CEP/UFTM – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm – centímetro

CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cobre

---

Cys – C – Cisteína

Da – Dalton

dL – decilitro

Dnp – 2,4-dinitrofenil

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECAsec – Enzima Conversora de Angiotensina secretória

ECAm – Enzima Conversora de Angiotensina de membrana

EDDnp – N-etilenodiamino-2,4-dinitrofenil

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

Enalapril – 1-\*(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl\*-L-alanyl\*-L-proline 1"-ethyl ester

FPLC – Cromatografia líquida de rápida execução

g – grama

Glu – E – Ácido glutâmico

Gly – G – Glicina

h – hora

HBO<sub>3</sub> – Ácido Bórico

HCl – Ácido Clorídrico

---

Hip – Hippuryl

His – Histidil

H<sub>2</sub>O – Água

Ile – I – Isoleusina

k – Kilo

Kcat – Constante catalítica

K<sub>m</sub> – Constante de Michaelis-Menten

Leu – L – Leucina

LH-RH – Hormônio liberador do hormônio luteinizante

Lisinopril – (N-[1(S)-carboxyl-3-phenylpropyl]-Lys-Pro)

Lys – K – Lisina

M – molar

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

---

N-terminal – Amino-terminal

NaCl – Cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng – nanograma

NH<sub>4</sub>OH – Hidróxido de Amônio

nm – nanômetro

*O* – orto

OH – Hidroxila

P – Fósforo

pH – potencial hidrogeniônico

Phe – F – Fenilalanina

PMSF – Fluoreto de fenil metilsulfonila

Pro – P – Prolina

SBTI – Soy bean trypsin inhibitor

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio

---

Ser – S – Serina

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano

TTNa – Tetracionato de sódio

Thr – T – Treonina

Tris – Tris[hidroximetil]aminometano

Tyr – Y – Tirosina

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Val – V – Valina

Zn – Zinco

ZnCl<sub>2</sub> – Cloreto de Zinco

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

λ<sub>ex</sub> – comprimento de onda da excitação

λ<sub>em</sub> – comprimento de onda da emissão

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema das etapas usadas na purificação das isoformas com atividade conversora de angiotensina do fluido ileal humano..... 37  
48
- FIGURA 2 - Cromatografia de Filtração Molecular do concentrado 1 em membrana YM 100, na coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), equilibrada e eluída com tampão 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,15 M de cloreto de sódio, pH 7. Frações de 0,5 mL foram coletadas. A atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato Hip-His-Leu. Os picos de atividade enzimática foram identificados como Pico 1 e Pico 2..... 49
- FIGURA 3 - Cromatografia de Troca Iônica, na coluna MONO™-Q (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) do pico 1 proveniente da Coluna SUPERDEX™ 200, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. Frações de 1 mL foram coletadas. O pico maior sobre o Hip-His-Leu está indicado pela seta..... 51
- FIGURA 4 - Cromatografia de Troca Iônica, na coluna MONO™-Q (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) do pico 2 proveniente da Coluna SUPERDEX™ 200, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. Frações de 1 mL foram coletadas. O pico maior sobre o Hip-His-Leu está indicado pela seta..... 52
- FIGURA 5 - Cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) do concentrado 2 em membrana YM10, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. As frações foram eluídas com gradiente de NaCl. Observou-se 3 picos de atividade enzimática sobre o substrato Hip-His-Leu, denominados de A, B e C..... 53
- FIGURA 6 - Cromatografia de filtração molecular, Coluna SUPERDEX™ 75 (Sistema - FPLC, PHARMACIA®), usando como tampão 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,15 M de cloreto de sódio, pH 7. Observou-se um pico de atividade enzimática com Hip-His-Leu..... 54
- FIGURA 7 - SDS-PAGE (10%) (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) proveniente do pico 1 e padrões de massa molecular específicos. Canaleta 1: padrões de massa molecular (66 kDa e 45 kDa), canaleta 2: alíquota da amostra e canaleta 3: padrão de massa molecular de 116 kDa..... 56



- FIGURA 8 - SDS-PAGE 10% (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), proveniente do pico 2 e padrões de massa molecular específicos. Canaleta 1: alíquota da amostra, Canaleta 2: padrões de massa molecular (66 kDa e 45 kDa)..... 56
- FIGURA 9 - SDS-PAGE 10% (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de filtração molecular, Coluna SUPERDEX™ 75 (Sistema- FPLC, PHARMACIA®) e padrão de massa molecular específico. Canaleta 1: padrão de massa molecular de 65 kDa e Canaleta 2: alíquota da amostra..... 57
- FIGURA 10- Hidrólise da Angiotensina I. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma..... 61
- FIGURA 11- Padrão da Bradicinina e padrão da bradicinina 1-7. Cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. . 61
- FIGURA 12- Hidrólise da Bradicinina. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma..... 62
- FIGURA 13- Padrão da Neurotensina. Cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%..... 62
- FIGURA 14- Hidrólise da Neurotensina. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma..... 63

- 
- FIGURA 15- Hidrólise da Substância P. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma..... 63

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Determinação das Massas Moleculares Aparentes dos picos 1 e 2 provenientes da cromatografia de Filtração Molecular SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), utilizando padrões de massas moleculares conhecidos.....	50
GRÁFICO 2 -	Determinação da Massa Molecular Aparente da fração proveniente da Coluna de Filtração Molecular SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	55
GRÁFICO 3 -	Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota do pico 1 proveniente da Coluna MONO™-Q. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.....	58
GRÁFICO 4 -	Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota do pico 2 proveniente da Coluna MONO™-Q. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.....	58
GRÁFICO 5 -	Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota da isoforma de 55 kDa proveniente do pico B da coluna de filtração molecular SUPERDEX™ 75. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.....	59
GRÁFICO 6 -	Determinação do pH ótimo para atividade enzimática da isoforma de massa molecular 55 KDa, utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M contendo 10 µM ZnCl <sub>2</sub> (pH 5,0 e 5,5); tampão fosfato de sódio 0,2 M contendo 10 µM ZnCl <sub>2</sub> (pH 6,0 e 6,5) e tampão tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl <sub>2</sub> (pH 7,0; 7,5 e 8,0) quantidade adequada do substrato sintético (1mg/mL) e alíquota da isoforma C-domínio purificada neste trabalho.....	60
GRÁFICO 7 -	Gráfico de Michaelis-Menten e Gráfico de Lineweaver-Burk obtido a partir das cinéticas realizadas com o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, para isoforma C-domínio purificada neste trabalho, incubado com tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 7, à 37°C.....	65
GRÁFICO 8 -	Gráfico de Michaelis-Menten e Gráfico de Lineweaver-Burk obtido a partir das cinéticas realizadas com o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH, para isoforma C-domínio purificada neste trabalho, incubado com tampão fosfato de Sódio 0,2 M contendo 10 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 6, à 37°C.....	65

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH pelos domínios catalíticos da isoforma C-domínio da ECA do fluido ileal humano purificada neste trabalho.....	64
--	----

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	Peptidases.....	22
1.1.1.	Metalopeptidases.....	22
1.2.	Enzima conversora de angiotensina I.....	23
1.2.1.	Genética.....	24
1.2.2.	Especificidade catalítica.....	24
1.2.3.	Substratos.....	25
1.2.4.	Efeito do cloreto na atividade catalítica.....	27
1.2.5.	Inibidores.....	27
1.2.6.	Isoformas.....	28
1.2.6.1.	Isoforma somática.....	28
1.2.6.2.	Isoforma testicular.....	28
1.2.6.3.	Isoformas solúveis.....	29
1.3.	Fluido ileal.....	30
2.	OBJETIVOS.....	32
3.	JUSTIFICATIVA.....	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1.	Obtenção da Amostra.....	37
4.2.	Etapas de Purificação.....	37
4.2.1.	Preparo das amostras.....	38
4.2.2.	Cromatografia de Filtração Molecular em Coluna SUPERDEX™ 200 10/300 GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	38
4.2.3.	Cromatografia de Troca Iônica em Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	38
4.2.4.	Preparo do filtrado 1.....	39
4.2.5.	Cromatografia de Troca Iônica em Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	39
4.2.6.	Cromatografia de Filtração Molecular em Coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	40
4.3.	Método Analítico-Químico.....	40
4.3.1.	Dosagem de proteínas.....	40
4.4.	Métodos Analíticos Físico-Químicos.....	41
4.4.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE).....	41
4.4.1.1.	Preparo dos géis.....	41
4.4.1.2.	Preparo das amostras.....	42
4.4.1.3.	Migração eletroforética.....	42
4.4.1.4.	Coloração dos géis pela prata amoniacal.....	42
4.4.1.5.	Secagem dos géis.....	43
4.4.2.	Determinação da atividade enzimática utilizando substratos sintéticos.....	43
4.4.2.1.	Atividade Hidrolítica sobre o substrato Hip-His-Leu.....	43
4.4.2.2.	Atividade sobre os substratos com supressão interna de fluorescência: Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH; Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-	

---

	Lys(Dnp)-OH.....	44
4.4.2.3.	Inibição da atividade conversora de angiotensina.....	44
4.4.2.4.	Hidrólise dos peptídeos Angiotensina I, Bradicinina, Neurotensina e Substância P pela isoforma C-domínio de enzima conversora de angiotensina.....	45
4.4.2.5.	Determinação da influência do pH na atividade catalítica da isoforma purificada.....	45
4.4.2.6.	Determinação dos parâmetros cinéticos para a hidrólise dos substratos sintéticos, Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH; Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH pela isoforma purificada.....	46
5.	RESULTADOS.....	47
5.1.	Purificação da enzima.....	48
5.1.1.	Filtração em membrana YM 100 (AMICON).....	48
5.1.2.	Cromatografia de Filtração Molecular em Coluna SUPERDEX™ 200 10/300 GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	49
5.1.3.	Estimativa da massa molecular aparente das isoformas separadas na filtração molecular em coluna SUPERDEX™ 200 10/300 GL.....	50
5.1.4.	Cromatografia de Troca Iônica em Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	50
5.1.5.	Diálise do Filtrado 1 em membrana YM 10 (AMICON).....	52
5.1.6.	Cromatografia de Troca Iônica em Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	52
5.1.7.	Cromatografia de Filtração Molecular em Coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®).....	53
5.1.8.	Estimativa da massa molecular aparente da isoforma separada na filtração molecular em coluna SUPERDEX™ 75 10/300 GL.....	54
5.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	55
5.3.	Determinação das atividades enzimáticas.....	57
5.3.1.	Determinação da atividade enzimática utilizando substratos sintéticos.....	57
5.4.	Caracterização da isoforma de 55 kDa proveniente do pico B.....	59
5.4.1.	Determinação da atividade enzimática.....	59
5.4.2.	Determinação do pH ótimo.....	59
5.4.3.	Hidrólise dos peptídeos: angiotensina I, bradicinina, neurotensina e substância P.....	60
5.4.4.	Determinação de parâmetros cinéticos de hidrólise de substratos sintéticos.....	64
6.	DISCUSSÃO.....	66
7.	CONCLUSÕES.....	69
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

# *Introdução*

---

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- Peptidases

As enzimas proteolíticas, também chamadas de peptidases, proteases ou proteinases atuam hidrolisando ligações peptídicas em proteínas ou em peptídeos. O *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) recomenda o uso do termo peptidase, uma vez que estas proteínas catalisam a clivagem de ligações peptídicas (revisado por MOSS, 2006).

As peptidases estão envolvidas em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo: digestão, ativação de zimogênios, regulação da pressão sanguínea, homeostase, imunidade celular e humoral, coagulação sanguínea, inflamação, fertilização, embriogênese, apoptose e outras (BARRETT, 1994).

BARRETT (1994) classificou as peptidases com base no tipo de reação catalisada, na natureza química do sítio catalítico e na origem evolucionária baseada na estrutura primária. As peptidases podem ser classificadas em exopeptidases ou endopeptidases. As primeiras clivam somente ligações situadas nas extremidades da cadeia polipeptídica, enquanto as endopeptidases clivam as cadeias polipeptídicas em regiões distantes das extremidades terminais do peptídeo ou da proteína (BARRETT e RAWLINGS, 1992).

A classificação baseada na natureza química do sítio catalítico agrupa as peptidases em: treonino-peptidases, serino-peptidases, aspartil-peptidases, cisteíno-peptidases, metalopeptidases. As treonino e serino-peptidases possuem no sítio ativo um resíduo de treonina e serina, respectivamente. As aspartil-peptidases dependem de dois resíduos de ácido aspártico para a catálise, enquanto as cisteíno-peptidases têm um resíduo de cisteína e as metalopeptidases contêm um íon metálico (geralmente zinco), indispensável ao seu mecanismo catalítico (BARRETT, 1994).

### 1.1.1- Metalopeptidases

São enzimas que fazem o ataque nucleofílico à ligação peptídica através de uma molécula de água. As metalopeptidases apresentam um cátion divalente, geralmente um íon  $Zn^{+2}$ , que é responsável pela ativação da molécula de água catalítica. Este íon metálico, na maioria dos casos, está coordenado no centro ativo com três resíduos de aminoácidos (His,



Glu, Asp ou Lys). Além destes, pelo menos um outro aminoácido é requerido para a catálise, geralmente outro resíduo de ácido glutâmico (Glu). A maioria das zinco metalopeptidases contém apenas um único cátion em seu sítio ativo, apesar de existirem algumas famílias de enzimas nas quais dois íons  $Zn^{+2}$  são co-catalíticos. (BARRETT e RAWLINGS, 1994)

## 1.2- Enzima conversora de angiotensina I

A enzima conversora de angiotensina I (EC 3.4.15.1) foi descrita por SKEGGS, KAHN e SHUMWAY (1956), no plasma de cavalo que continha uma enzima que era capaz de converter angiotensina I em angiotensina II. Essa enzima é uma zinco metalopeptidase que tem um papel importante na homeostase circulatória. A angiotensina I, (**Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu**), é um decapeptídeo que é convertido em um octapeptídeo, angiotensina II (**Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe**[His-Leu]), quando a ECA cliva o dipeptídeo histidil-leucina da extremidade C-terminal da angiotensina I (SKEGGS, 1956). A angiotensina II ligando-se a receptores específicos é um potente vasoconstrictor direto, atuando em veias e artérias levando ao aumento da pressão sanguínea. É, também, um potente liberador de norepinefrina por ação direta nas fibras simpáticas pós-ganglionares; no cérebro, age diminuindo o reflexo dos barorreceptores, aumentando o apetite por sal e aumentando a secreção de vasopressina e hormônio adenocorticotrófico (ACTH). Na adrenal, a angiotensina II causa a liberação de aldosterona e nos rins tem um efeito direto no túbulo proximal aumentando a reabsorção de sódio (revisto por ZAMAN, OPARIL e CALHOUN, 2002). A ECA também é responsável pela inativação da bradicinina, através da remoção do dipeptídeo C-terminal, abolindo a atividade vasodilatadora deste peptídeo (SKEGGS, KAHN e SHUMWAY, 1956 e YANG, ERDÖS e LEVIN, 1970). Dessa forma, a ECA aumenta a produção de um vasoconstrictor e diminui a viabilidade de um vasodilatador.

A atividade principal da ECA é catalisar a clivagem de dipeptídeos da extremidade C-terminal livre de vários substratos, sendo considerada uma peptidil-dipeptidase. A única restrição é que esta enzima não atua em substratos que possuem um resíduo de Prolina na penúltima posição da cadeia polipeptídica (YANG, JENSSEN e ERDÖS, 1970b). Entretanto, a especificidade desta metalopeptidase não está restrita somente a sua ação peptidil-dipeptidásica, mas a enzima também pode atuar como carboxitripeptidase ou endopeptidase sobre alguns substratos (revisto por SKIDGEL e ERDÖS, 1987).

### 1.2.1- Genética

Segundo RYAN e SIGMUND (2004) o gene da ECA resulta em duas diferentes proteínas devido ao uso de diferentes promotores formados durante a duplicação genética. Em humanos, o gene da ECA se encontra no cromossomo 17 e consiste de 25 exons. A ECA germinal, expressa somente em testículos, origina-se do promotor localizado dentro do intron 12 e produz uma proteína com somente um domínio e sítio catalítico. Sua expressão é importante para fertilidade masculina normal. A ECA somática é uma proteína com dois domínios homólogos e dois sítios catalíticos. Deleção no gene alvo da ECA somática, em camundongos, causa hipotensão, desenvolvimento impróprio dos rins e redução da fertilidade em machos.

### 1.2.2- Especificidade catalítica

Os primeiros estudos da ECA sugeriram a presença de um único sítio ativo, uma vez que, a análise do conteúdo de zinco da isoforma somática de pulmão de coelho mostrou a presença de um átomo-grama de zinco por mol de proteína (DAS e SOFFER, 1975). Os estudos mais recentes demonstraram a presença de dois sítios ativos denominados de domínio N e domínio C, que referem-se, respectivamente, às porções N- e C- terminais da molécula da enzima (WEI *et al*, 1991).

Apesar do alto grau de homologia, particularmente na região do sítio ativo, estes domínios apresentam diferenças na especificidade por substratos, ativação por cloreto e em seus perfis de inibição e desnaturação (JASPARD, WEI e ALHENC-GELAS, 1993; ROUSSEAU *et al*, 1995).

O domínio C da enzima hidrolisa o substrato Hip-His-Leu e a angiotensina I com eficiências catalíticas maiores do que o domínio N (WEI *et al*, 1991). FUCHS *et al* (2008) mostraram que o C-domínio da ECA é o sítio predominante na clivagem da angiotensina I *in vivo*. Quanto à bradicinina, ambos os sítios catalíticos a convertem em BK(1-7) e BK (1-5) com eficiências semelhantes. No entanto, somente a atividade do domínio C é estimulada de maneira significativa por cloreto (JASPARD, WEI e ALHENC-GELAS, 1993).

ROUSSEAU *et al* (1995) demonstraram a clivagem *in vitro* do peptídeo Acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP) pela ECA e constataram que o domínio N era 50 vezes mais eficiente do que o domínio C na hidrólise desse peptídeo.

A angiotensina 1-7 é um substrato natural específico para o domínio N da ECA podendo atuar também como inibidor do domínio C (DEDDISH *et al*, 1998). Este peptídeo encontra-se aumentado no plasma humano e de ratos tratados com inibidores da ECA e tem função oposta a da angiotensina II, apresentando ação anti-hipertensiva (LUQUE *et al*, 1996; FERRARIO e FLACK, 1996).

### 1.2.3- Substratos

A ECA é capaz de hidrolisar uma variedade enorme de peptídeos biologicamente ativos, além da angiotensina I e da bradicinina. Dentre estes substratos estão o N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), que é um fator regulador da hematopoiese (RIEGER *et al*, 1993), a substância P (SKIDGEL *et al*, 1984), o hormônio luteinizante (LH-RH) (SKIDGEL e ERDÖS, 1985), angiotensina 1-7 e a neurotensina (SKIDGEL *et al*, 1984; revisto por SKIDGEL e ERDÖS, 2004). A ECA hidrolisa ainda peptídeos com a extremidade C-terminal amidada, como a colescistocinina-8 e vários análogos da gastrina (DUBREUIL *et al*, 1989). No entanto, essas hidrólises foram observadas *in vitro*, com exceção da angiotensina I e da bradicinina.

A substância P é um potente vasodilatador cuja ação decorre aparentemente de um efeito inibitório direto do peptídeo do músculo liso arteriolar. Ela também estimula a secreção nas glândulas salivares, diurese e natriurese nos rins (SKIDGEL *et al*, 1984).

A neurotensina é um hormônio presente principalmente no sistema nervoso central, mas encontra-se, também, no intestino delgado. Mesmo tendo sido relacionada à hiperplasia do intestino delgado, sua principal função parece estar relacionada à regulação da motilidade intestinal. Assim como a secretina e a colescistocinina, tem aparente função na regulação hormonal da secreção biliar e pancreática (MIRANDA e NETO, 2003).

AZIZI *et al* (1996) mostraram que pacientes tratados com inibidores da ECA tiveram um aumento de sete vezes na concentração plasmática do acetil-SDKP, mostrando que a enzima também é responsável pelo metabolismo *in vivo* deste substrato.

O estudo da especificidade de uma enzima proteolítica utilizando substratos naturais gera informações qualitativas dos sítios de clivagem, mas não permite mapear em detalhe a especificidade destas peptidases. Avanço considerável nestes estudos deu-se com o desenvolvimento de substratos sintéticos que permitem detectar facilmente a atividade

enzimática, determinar as constantes cinéticas e comparar a especificidade primária de enzimas de uma mesma classe.

Em 1978, CARMEL E YARON desenvolveram a síntese de peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência, usando o ácido *orto*-aminobenzóico (Abz) como grupo fluorescente e o NO<sub>2</sub> como apagador. Este efeito de supressão intramolecular de fluorescência se dá pela transferência de energia por ressonância do grupo fluorescente para o grupo apagador. Antes da hidrólise, como estes dois grupamentos estão relativamente próximos, a intensidade de fluorescência resultante é baixa. A partir do momento que ocorre a clivagem de uma ligação peptídica por uma enzima proteolítica, a fluorescência da solução aumenta. Como este aumento é proporcional ao número de moléculas clivadas, o valor da variação desta propriedade é uma medida direta da velocidade de hidrólise, que pode ser utilizada na determinação das constantes cinéticas da reação enzima-substrato. O desenvolvimento desse tipo de composto permitiu o acompanhamento do aumento da fluorescência diretamente na cubeta do fluorímetro.

A síntese de peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência foi aperfeiçoada por CHAGAS, PRADO e JULIANO, 1991; HIRATA *et al*, 1994; ARAÚJO *et al*, 2000, 2005) e foram sintetizados diferentes tipos de substratos, contendo o grupo fluorescente Abz e o 2,4-dinitrofenil (Dnp) ou o N-etilenodiamino-2,4-dinitrofenil (EDDnp) como apagador.

ARAÚJO *et al* (2000) realizaram estudos de especificidade da ECA, empregando peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência análogos ao acetil-SDKP. Os substratos Abz-SDK(Dnp)P-OH e Abz-TDK(Dnp)P-OH apresentaram uma alta seletividade para o domínio N, sendo hidrolisados muito lentamente pelo domínio C. Além disso, os peptídeos Abz-YRK(Dnp)P-OH e Abz-FRK(Dnp)P-OH apresentaram parâmetros cinéticos altamente satisfatórios, sendo hidrolisados por ambos os domínios catalíticos da enzima com eficiências semelhantes. Estes compostos foram incorporados a literatura como ferramentas para o acompanhamento da atividade da ECA em ensaios cinéticos e para dosagem da enzima em soro, plasma e tecidos (ARAÚJO *et al*, 2005).

BERSANETTI *et al* (2004) sintetizou e ensaiou peptídeos contendo os resíduos de aminoácidos com maior seletividade para o domínio C da ECA, sendo eles Abz-GVIRFK (Dnp)-OH e Abz-GVILFK(Dnp)-OH. Esses peptídeos mostraram ser respectivamente, 13 e 20 vezes mais seletivos para o domínio C em relação ao domínio N. Com a redução gradativa das cadeias peptídicas foi possível aumentar a especificidade para o domínio C, sendo que o substrato Abz-LFK(Dnp)-OH passou a ser hidrolisado com eficiência catalítica de 70 vezes

maior pelo domínio C do que pelo domínio N. Estes resultados estão de acordo com os descritos por MICHAUD, CHAUVET e CORVOL (1999) para peptídeos derivados do Ac-SDKP. Estes autores mostraram que a razão da eficiência catalítica do domínio C em relação ao domínio N é maior para análogos do Ac-SDKP que contêm três aminoácidos.

#### 1.2.4- Efeito do cloreto na atividade catalítica

Desde que a ECA foi descrita em 1956, observou-se a dependência da presença do íon cloreto para sua atividade catalítica (SKEGGS, KAHN e SHUMWAY, 1956). SHAPIRO, HOLMQUIST e RIODAN (1983) realizaram alguns estudos com a isoforma de pulmão de coelho e verificaram que esta dependência estava associada à estrutura dos substratos empregados. Assim, a velocidade de hidrólise da angiotensina I foi muito mais dependente deste ânion do que a da bradicinina.

Posteriormente, experimentos realizados com os mutantes funcionais da ECA deixaram claro que o cloreto tem efeitos diferentes sobre os dois sítios ativos, sendo a atividade do domínio C mais dependente da presença deste íon. Nestes mutantes, este efeito também estava associado ao substrato (WEI *et al*, 1991; JASPARD, WEI e ALHENC-GELAS, 1993).

#### 1.2.5- Inibidores

Quando a enzima conversora de angiotensina foi descrita, foi observado que o Na<sub>2</sub>EDTA inibia a enzima plasmática. Outros inibidores foram encontrados nos estudos do metabolismo da bradicinina (ERDÖS e YANG, 1966). Entre os inibidores *in vitro* da enzima estão os agentes de ligação metálica tais como o *o*-fenanthrolina (ERDÖS e YANG, 1966; ERDÖS e YANG, 1970) ou o 8-OH-quinoline (BAKHLE, 1974), os quais sequestram o cofator da enzima. Produtos da clivagem enzimática da bradicinina e da angiotensina I, tais como o Phe-Arg ou His-Leu inibem a reação (YANG *et al*, 1971). Como esperado, substratos competitivos tais como bradicinina ou Substrato Hip-His-Leu bloqueiam a conversão de angiotensina I (YANG, ERDÖS e LEVIN, 1971; IGIC *et al*, 1972 e SANDER, WEST e HUGGINS, 1971).

Como a ECA está diretamente relacionada à regulação da pressão intensos esforços foram direcionados para o desenvolvimento de inibidores específicos desta enzima. Um

grande passo para o desenvolvimento de moléculas inibidoras foi a identificação de peptídeos potenciadores da bradicinina, presentes no veneno da cobra *Bothrops jararaca* (FERREIRA, BARTELT e GREENE, 1970; ONDETTI *et al*, 1971). As informações obtidas com os estudos destes peptídeos (CUSHMAN e CHEUNG, 1973) possibilitaram o desenvolvimento do captopril, (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl)-L-Pro, que foi o primeiro inibidor específico para a ECA, ativo por via oral (ONDETTI, RUBIN e CUSHMAN, 1977). Posteriormente, outros inibidores foram desenvolvidos, sendo os mais conhecidos o enalapril (PATCHETT *et al*, 1980) e o lisinopril (BIOLLAZ *et al*, 1981). Estas drogas foram largamente testadas e são comercializadas e usadas rotineiramente no combate à hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e nefropatia diabética.

#### 1.2.6- Isoformas

As isoformas da ECA em tecidos e nos fluidos corporais de mamíferos podem ser agrupadas em: somática, testicular e solúvel.

##### 1.2.6.1- Isoforma somática

A isoforma somática apresenta massa molecular de 150 a 180 kDa (SOFFER, 1981) e é expressa em células endoteliais, epiteliais e neuronais. A clonagem do gene que codifica a ECA revelou que esta isoforma é composta por dois domínios catalíticos (SOUBRIER *et al*, 1988).

HIAL *et al* (1979), demonstraram a presença de ECA em células endoteliais humanas cultivadas de veias umbilicais e sua ausência em células de músculo liso isoladas dos mesmos vasos sanguíneos. Esses autores mostraram sua similaridade com a enzima conversora de pulmão, rim e plasma humano.

A ECA somática humana é composta por 1306 resíduos de aminoácidos. A seqüência primária da ECA somática revela a existência na molécula de duas porções hidrofóbicas: um peptídeo de sinal N-terminal de 29 aminoácidos, que está ausente na enzima madura e um domínio transmembrana de 17 aminoácidos, situado próximo à região C-terminal (SOUBRIER *et al*, 1988).

##### 1.2.6.2- Isoforma testicular

Outra isoforma da ECA de aproximadamente 90 kDa é encontrada ancorada à membrana plasmática exclusivamente de espermátides e espermatozóides em desenvolvimento e nos espermatozóides diferenciados, sendo portanto testículo-específica (EL-DORRY *et al*, 1982).

A forma testicular da enzima (ECA germinal) é menor do que a ECA somática (732 versus 1306 resíduos) e contém somente o C-domínio, o qual é ancorado nas membranas celulares (SOUBRIER *et al*, 1988; EHLERS *et al*, 1989; LATTION *et al*, 1989). Os 67 aminoácidos da ECA germinal humana não estão presentes na enzima somática, entretanto, os últimos 665 resíduos são idênticos com a porção C-terminal da ECA somática; dessa maneira existe a falta do sítio ativo do N-domínio.

A isoforma testicular da ECA, bem como a enzima somática descrita anteriormente, apresentam atividades enzimáticas semelhantes, diferindo apenas no tamanho e nas propriedades imunológicas (WILLIAMS *et al*, 1992).

#### 1.2.6.3- Isoformas solúveis

Além das duas isoformas da ECA ligadas à membrana, existem formas solúveis, geradas a partir da clivagem da enzima somática, que aparecem em fluidos biológicos como soro (DAS, HARTLEY e SOFFER, 1977), fluido seminal (EL-DORRY, MACGREGOR e SOFFER, 1983), amniótico (YASUI *et al*, 1984) e cefalorraquiano (SCHWEISFURTH e SCHIOBERG-SCHIEGNITZ, 1984).

A concentração plasmática da ECA varia de uma espécie para outra, sendo o plasma de cobaia o mais rico nesta enzima (IBARRA-RUBIO, PENA e PEDRAZA-CHAVERRI, 1989). Em certas doenças, particularmente na sarcoidose, são observadas concentrações marcadamente elevadas de ECA solúvel (LIEBERMAN, 1975).

Além disso, em culturas de células endoteliais vasculares foi observada a presença de altos níveis de ECA. Como estas células podem liberar mais de quarenta vezes do seu conteúdo inicial de enzima no meio de cultura, a idéia de que o endotélio vascular é a principal fonte desta isoforma plasmática ficou reforçada (SOFFER, 1981).

A ECA intestinal humana existe na membrana da borda em escova como uma proteína monomérica de massa molecular aparente de 184 kDa. Está associada com a membrana via um segmento hidrofóbico e tem uma orientação transmembrana (NAIM, 1992).

A enzima ancorada à membrana é liberada da superfície das células endoteliais pela ação de uma secretase que cliva a ligação peptídica Arg1203-Ser1204, localizada próxima à região transmembrana (revisto por ACHARYA *et al*, 2003).

DEDDISH *et al* (1994) descreveram o isolamento e caracterização de uma enzima solúvel de ocorrência natural que consiste apenas do domínio N. Esta enzima, altamente glicosilada, apresenta a cadeia polipeptídica mais curta dentre todas as isoformas de ECA e foi isolada do fluido ileal humano de pacientes que foram submetidos à colostomia cirúrgica. Muito provavelmente esta isoforma enzimática é formada através da clivagem proteolítica da ECA somática, enquanto ainda ancorada à membrana da borda em escova ou após sua liberação no fluido ileal. Outra possibilidade ainda poderia envolver um processamento alternativo do RNA mensageiro, que levaria à produção direta da isoforma contendo somente o domínio N.

Em 1996, NAIM descreveu a secreção de ECA intestinal humana e sua associação com o estado de diferenciação de células intestinais, mostrando que existe ECA em células epiteliais intestinais de duas formas: a primeira sendo uma enzima de membrana (ECAm), e a outra uma glicoproteína secretória (ECAsec). O nível de expressão da ECAsec no intestino pode estar associada com o estado de diferenciação das células da mucosa. A ECAsec é mais abundante do que a ECAm nas criptas das células não epiteliais imaturas de pacientes com doença celíaca e, por contraste, em células epiteliais bem diferenciadas há predomínio de ECAm.

KOKUBU *et al* (1978) detectaram ainda a presença de ECA em urina humana. Estes autores descreveram três isoformas da enzima com massas moleculares de 400, 290 e 140 kDa. Ainda na urina de indivíduos normais, CASARINI *et al* (1995) identificaram outras duas isoformas da ECA: uma semelhante à enzima somática com massa molecular de 190 kDa e outra com 65 kDa, correspondente a seqüência de aminoácidos do domínio N.

GOMES *et al* (2004) detectaram uma atividade conversora de angiotensina I, de aproximadamente 140 kDa, no líquido pericárdico humano. A presença da ECA neste fluido sugere uma rota fisiológica importante da enzima neste ambiente.

### 1.3- Fluido Ileal

O fluido ileal é formado no íleo, que possui vilosidades curtas com maior quantidade de tecido linfóide, menor capacidade absorptiva e junções intercelulares menores, com menor



---

fluxo de água e eletrólitos do meio vascular para o lúmen intestinal, sendo mais eficiente na absorção de líquidos e eletrólitos. Apesar de absorver nutrientes mais lentamente, possui características próprias, como a capacidade de absorção de vitamina B<sub>12</sub> e sais biliares, através de receptores específicos. O íleo pode sofrer adaptação funcional e ser capaz de assumir a função jejunal, absorvendo macro e micronutrientes (MIRANDA e NETO, 2003).

DUGGAN, MENDELSON e LEVENS, 1989 demonstraram a presença de receptores de angiotensina II e enzima conversora de angiotensina no intestino de ratos. A quantidade de receptores de angiotensina II foi maior na cólon, seguida pelo íleo, duodeno e jejuno. Em cada segmento do intestino foram localizados sítios de ligação de angiotensina II exclusivamente na musculatura. Em contraste, a ECA estava presente tanto na mucosa quanto na musculatura. A localização dupla de receptores de angiotensina II e ECA pode sugerir como função a produção local de angiotensina II no controle da função intestinal. A ECA na mucosa do intestino pode sugerir que esta enzima sirva primariamente para a hidrólise de peptídeos provenientes da dieta.

A grande maioria dos hormônios que controlam as funções do sistema digestivo é produzida e liberada pelas células da mucosa do estômago e do intestino delgado. Estes hormônios são liberados na corrente sanguínea vão até o coração e retornam ao sistema digestivo onde estimulam a liberação dos sucos digestivos e os movimentos dos órgãos. Os principais hormônios que controlam a digestão são a gastrina, a secretina e a colecistoquinina (CCK) (GOLDMAN e AUSIELLO, 2005).

Sabemos que a enzima conversora de angiotensina também hidrolisa *in vitro* esses hormônios, então acreditamos que *in vivo* ela também tenha alguma função importante na hidrólise de substâncias que se encontram no fluido ileal humano. De posse de substratos sintéticos suscetíveis à clivagem pelos N e C-domínios da ECA nos propusemos a isolar e caracterizar a atividade catalítica da ECA do fluido ileal humano.

# Objetivos

---

## 2- OBJETIVOS

2.1- Purificar até a homogeneidade uma isoforma C-domínio da enzima conversora de angiotensina;

2.2- Verificar a capacidade hidrolítica da isoforma purificada utilizando os peptídeos: Angiotensina I, Bradicinina, Neurotensina e Substância P;

2.3- Verificar a capacidade hidrolítica da isoforma purificada utilizando substratos sintéticos para os C e N-domínios da enzima conversora de angiotensina;

2.4- Caracterizar físico-quimicamente a isoforma purificada de enzima conversora de angiotensina utilizando substratos sintéticos.

# *Justificativa*

---

---

### 3- JUSTIFICATIVA

Sabendo que a enzima conversora de angiotensina possui diversas funções relativas aos órgãos onde se encontra, este trabalho busca purificar e caracterizar a enzima do fluido ileal.

Já é bem conhecida a ação da ECA quanto à liberação e hidrólise dos peptídeos angiotensina e bradicinina. Entretanto, outros substratos são suscetíveis à sua ação. Sabemos que a enzima cliva *in vitro* outros peptídeos e entre eles a neurotensina, a substância P e a colecistocinina, que se encontram no intestino. A hidrólise *in vivo* desses substratos no íleo ainda não foi descrita.

Os peptídeos ativos atuam localmente em receptores específicos nos tecidos. O resultado dessa ação varia de acordo com a função tecidual. O controle da ação desses peptídeos, em parte, se deve a sua síntese como pré-propeptídeos, os quais são hidrolisados a peptídeos ativos por enzimas co-localizadas nos locais de liberação. Além disso, a presença de enzimas que hidrolisam esses peptídeos após sua liberação também pode ter um papel importante na função tecidual.

Diante dos dados da literatura quanto à importância biológica da enzima conversora de angiotensina e a sua presença no fluido ileal, e ainda de posse de substratos que permitem a sua caracterização, nos propusemos a isolar e a caracterizar enzima (s) com atividade conversora de angiotensina neste fluido.

# *Materiais e Métodos*

---

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – Obtenção da Amostra

O fluido ileal foi obtido a partir de bolsas de coleta do conteúdo ileal de pacientes submetidos à cirurgia intestinal, no prazo de um mês, realizadas pelo departamento de cirurgia no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, após obtenção do consentimento livre e esclarecido e aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP/UFTM), protocolo número 0680 .

### 4.2 – Etapas de Purificação

O protocolo utilizado para a purificação da enzima está esquematizado na figura 1.

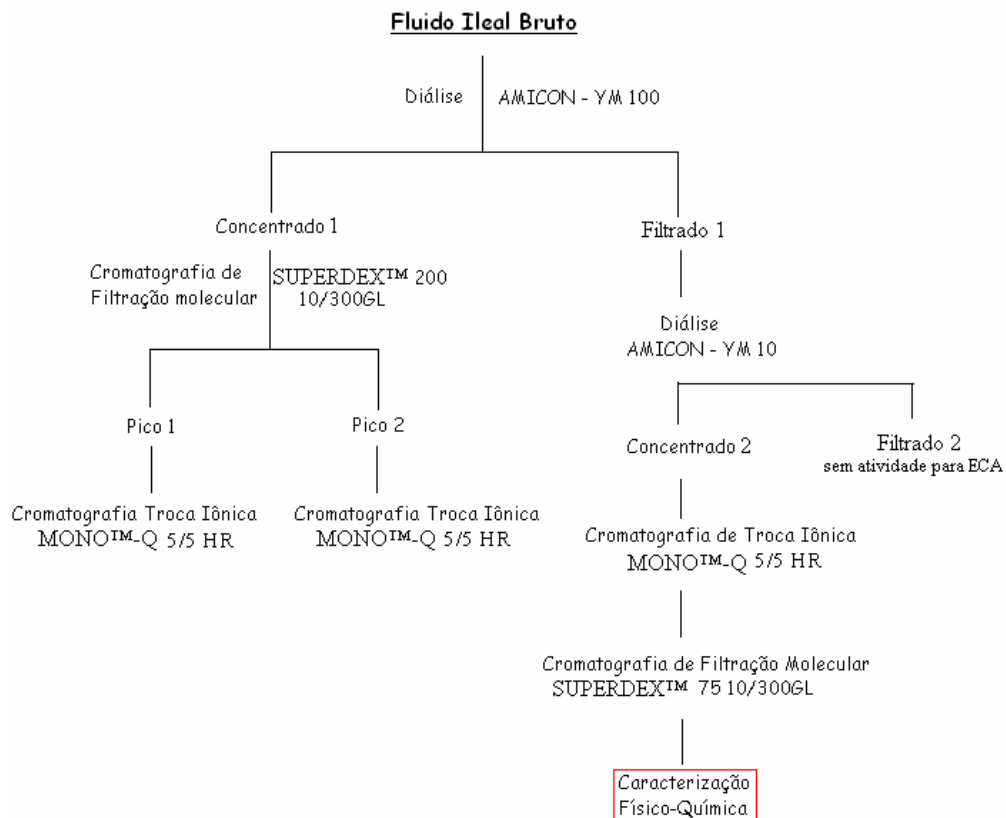


FIGURA 1: Esquema das etapas usadas na purificação das isoformas com atividade conversora de angiotensina do fluido ileal humano.

#### 4.2.1 – Preparo das amostras

Dois (2) mL de fluido ileal humano bruto foi dialisado contra 8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7, contendo 0,05 M de NaCl (Merck), 0,2  $\mu$ M PMSF, 0,6  $\mu$ M TTNa, 1  $\mu$ M Pepstatina A e 1  $\mu$ M SBTI, utilizando membrana de filtração YM100 (AMICON) até um volume final de 2 mL, a 4°C.

#### 4.2.2 – Cromatografia de Filtração Molecular em Coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®)

O fluido ileal concentrado 1 (2 mL) da etapa anterior foi centrifugado e aplicado em alíquotas de 0,5 mL em coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (PHARMACIA®), acoplada em um sistema de duas bombas de fluxo modelo P500 (PHARMACIA®), equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo NaCl 0,15 M (Merck), pH 7,0. O fluxo foi mantido em 1,0 mL/min, totalizando 35 minutos. Foram coletadas 60 frações de 0,5 mL em um coletor modelo LKB FRAC-200, PHARMACIA® e utilizadas para determinar a atividade enzimática e o teor de proteínas através da leitura das absorvâncias em 280 nm. Dois picos de atividade enzimática foram identificados.

#### 4.2.3 – Cromatografia de Troca Iônica em Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

As frações referentes aos dois picos com atividade enzimática obtidas na etapa anterior foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna MONO™-Q 5/5 HR (PHARMACIA®), equilibrada em tampão (A) fosfato de sódio 0,05 M pH 8,0 e tampão (B) fosfato de sódio 0,05 M e 0,25 M NaCl (Merck) pH 8,0 em sistema FPLC (PHARMACIA®), com fluxo de 0,5 mL/min. Aplicou-se 2 mL da amostra por cromatografia. Frações de 1,0 mL foram coletadas em um coletor modelo LKB FRAC-200, PHARMACIA®.



Posteriormente, as frações coletadas foram utilizadas para se determinar a atividade enzimática, o teor de proteínas através da leitura das absorbâncias em 280 nm, e então foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, contendo SDS (SDS-PAGE). As frações contendo atividade hidrolítica sobre o substrato Hip-His-Leu foram testadas também utilizando os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH e Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH.

#### 4.2.4 – Preparo do filtrado 1

Quatro (4) mL do filtrado 1 do fluido ileal humano obtido pela filtração em YM100 (AMICON) foi dialisado contra água e posteriormente contra tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 8,0 (Merck), contendo 1  $\mu$ M Pepstatina A e 1  $\mu$ M SBTI, utilizando membrana de filtração YM10 (AMICON) até um volume final de 4 mL, a 4°C.

#### 4.2.5 – Cromatografia de Troca Iônica em coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

O concentrado 2 obtido da membrana de filtração YM 10 (AMICON) foi aplicado em alíquotas de 2 mL em coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema FPLC-PHARMACIA®), equilibrada em tampão (A) fosfato de sódio 0,05 M pH 8,0 e tampão (B) Fosfato de sódio 0,05 M e 0,25 M NaCl (Merck) pH 8,0 em sistema FPLC (PHARMACIA®), com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas em um coletor modelo LKB FRAC-200, PHARMACIA®. Posteriormente, as frações coletadas foram utilizadas para determinar a atividade enzimática e o teor de proteínas através da leitura das absorbâncias em 280nm e então foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, contendo SDS (SDS-PAGE). As frações contendo atividade hidrolítica sobre o substrato Hip-His-Leu foram testadas também utilizando os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH e Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH.

#### 4.2.6 – Cromatografia de Filtração Molecular em coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®)

As frações obtidas na etapa anterior com maior atividade sobre o substrato Hip-His-Leu foram dialisadas contra água destilada e contra tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7 e, depois, submetidas à cromatografia de filtração molecular em coluna SUPERDEX 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), acoplada em um sistema de duas bombas de fluxo modelo P500 (PHARMACIA®), equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo NaCl 0,15 M, pH 7,0. O fluxo foi mantido em 1,0 mL/min, totalizando 35 minutos. Foram coletadas frações de 0,25 mL sendo utilizadas para determinar a atividade enzimática sobre o substrato Hip-His-Leu, o teor de proteínas através da leitura das absorvâncias em 280 nm e para estimar a massa molecular aparente.

#### 4.3 – Método Analítico-Químico

##### 4.3.1 – Dosagem de proteínas

A determinação do teor de proteínas das amostras e das frações obtidas nas cromatografias foi realizada através do método de LOWRY *et al*, 1951.

Para determinação da concentração de proteínas, misturou-se 0,1 mL da amostra ou padrões com 1,0 mL da solução de trabalho. Agitou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou à mistura 0,2 mL do reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção de 1:1 com água destilada (preparado no momento do uso). Agitou-se cuidadosamente o tubo e deixou-se a mistura em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi realizada em 650 nm. Determinou-se as concentrações utilizando uma curva padrão de albumina obtida nas mesmas condições do ensaio.

Solução de trabalho:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2% em NaOH 0,5 N-----14,7 mL

---

Tartarato de sódio e potássio-----0,15 mL

CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O a 6,4%-----0,15 mL

#### 4.4 – Métodos Analíticos Físico-Químicos

##### 4.4.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE)

A cada etapa de purificação foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE) para analisar o grau de pureza e avaliar a massa molecular aparente da(s) enzima(s) purificada(s) (LAEMMLI,1970).

###### 4.4.1.1 – Preparo dos géis

Os géis foram preparados da seguinte maneira:

###### Gel de separação (10%)

A solução de acrilamida 30% (10 mL) foi misturada ao tampão Tris-HCl 0,9 M pH 8,8 (13 mL), TEMED (Merck) 1%(10 µL), água destilada (2 mL), SDS (Sigma) 2% (1,5 mL) e persulfato de amônio (Sigma) 1% (200 µL). Após agitação suave, a mistura foi distribuída em placas de vidro medindo 15 x 16 cm.

###### Gel de concentração (4%)

Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração, contendo solução de acrilamida (1,9 mL), tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (8 mL), SDS (Sigma) 10% (0,1 mL), TEMED (Merck) 1% (10 µL) e persulfato de amônio (Sigma) 1% (200 µL). Essa mistura foi colocada sobre o gel de separação e, posteriormente foi colocado um pente para formação das canaletas até a polimerização do gel.

#### 4.4.1.2– Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 2 M, pH 6,8 (100 µL), contendo 120 µL de azul de bromofenol 0,05% em água destilada, 1,0 mL de glicerol 60% e 0,6 mL de SDS (Sigma) 10%. A seguir foram colocados em banho-maria em ebulição por 2 minutos.

O tampão dos eletrodos utilizado foi tris-hidroximetilaminometano 0,025 M (Sigma), glicina 0,192 M (Sigma) e 0,1% de SDS (Sigma), pH 8,4.

#### 4.4.1.3 – Migração eletroforética

As amostras foram aplicadas nas canaletas e os géis foram submetidos a uma diferença de potencial de 100V. Terminada a corrida, os géis foram lavados em água destilada e em seguida colocados em uma cuba contendo pré-fixador I (500 mL de metanol, 70 mL de ácido acético e 430 mL de água destilada) durante 4 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução de pré-fixador I foi substituída pela solução de pré-fixador II (100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 800 mL de água destilada), na qual os géis permaneceram por 2 horas. Após a retirada do pré-fixador II, os géis foram lavados três vezes durante 15 minutos com água destilada e colocados durante 45 minutos em solução de glutaraldeído 25% (Merck) diluído 1:2 com água destilada. Os géis foram bem lavados com água destilada durante um dia e no dia seguinte foram corados pela prata amoniacal.

#### 4.4.1.4 – Coloração dos géis pela prata amoniacal

Os géis após a corrida foram corados pela prata amoniacal (TUNÓN E JOHANSON,1984).

Solução 1

NaOH 0,5 N-----5,0 mL

NH<sub>4</sub>OH 14,8 M-----0,7 mL

Água deionizada----375 mL

#### Solução 2

Nitrato de prata-----0,45 g

Água deionizada----20 mL

Adicionou-se a solução 2 lentamente à solução 1.

Colocou-se os géis nessa solução por um período de 45 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se essa solução e adicionou-se uma solução reveladora (100 mL de água destilada, 0,1 mL de formaldeído 37% e 25 µL de ácido cítrico 2,3 M) sob agitação suave até que as bandas correspondentes às proteínas atingissem a coloração desejada. Neste momento, a solução reveladora foi substituída pela solução inativadora (100 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético). Os géis foram mantidos nessa solução por um período de 4 horas.

#### 4.4.1.5 – Secagem dos géis

Retirou-se a solução inativadora e colocou-se a solução de secagem (100 mL de água destilada, 1 mL de glicerol, 10 mL de ácido acético e 40 mL de metanol) e, então os géis permaneceram nessa solução por 12 horas. Após este período, os géis foram colocados entre duas folhas de papel celofane sobre uma placa de vidro até que secassem completamente.

#### 4.4.2 – Determinação da atividade enzimática utilizando substratos sintéticos

##### 4.4.2.1 – Atividade Hidrolítica sobre o substrato Hip-His-Leu

Todas as frações obtidas em cada etapa cromatográfica foram submetidas à hidrólise sobre o substrato Hip-His-Leu, segundo CUSHMAN e CHEUNG (1971).

O ensaio foi realizado incubando-se 100  $\mu\text{L}$  da fração coletada em cada etapa cromatográfica com 500  $\mu\text{L}$  da solução de ensaio por 1 hora à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de NaOH 0,34 M. O produto da reação foi medido fluorimetricamente (Excitação:365 nm e Emissão:495 nm) em Espectrofluorômetro Hitachi, modelo F-2000, após adição de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de *o*-ftalaldeído (20 mg/dL) em metanol. Dez minutos antes do uso desse foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de HCl 3 N e submetido à centrifugação. O controle da reação foi preparado invertendo a ordem da adição da enzima e do NaOH 0,34 N.

Soluções para determinação da atividade:

-Tampão Borato de Sódio 0,5 M pH 8,3 contendo NaCl 1,125 M (31 g de  $\text{HBO}_3$  e 65,7 g de NaCl).

-Tampão estoque do substrato Hip-His-Leu 25 mM (448 mg em 40 mL de NaOH 25 mM e estocado a -22°C).

-Solução de ensaio: tampão estoque: solução estoque do substrato(4:1).

4.4.2.2 – Atividade sobre os substratos com supressão interna de fluorescência: Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH; Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH.

As amostras com atividade sobre o substrato Hip-His-Leu foram submetidas à atividade com substratos com supressão interna de fluorescência (CARMONA, 2002), incubando-se 1880  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , pH 7,0 com 20  $\mu\text{L}$  do substrato (1mg/mL) e 50  $\mu\text{L}$  da amostra incubado por 1 hora à 37°C, fazendo a leitura em espectrofluorômetro Hitachi 2000, (emissão=420 nm e excitação=320 nm). As atividades foram expressas como micromoles de substrato hidrolisado por mililitro em cada minuto de incubação ( $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ )

4.4.2.3 – Inibição da atividade conversora de angiotensina

Para verificação da inibição da atividade conversora de angiotensina foi utilizado captopril numa concentração final na cubeta de  $1 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$  e volume adequado da enzima.

#### 4.4.2.4 – Hidrólise dos peptídeos Angiotensina I, Bradicinina, Neurotensina e Substância P pela isoforma C-domínio da enzima conversora de angiotensina

A isoforma purificada pelo protocolo proposto foi analisada quanto à hidrólise de peptídeos naturais. A hidrólise desses peptídeos pela isoforma C-domínio da ECA isolada do fluido ileal foi verificada através da incubação da enzima seguindo o seguinte protocolo:

250  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,5

50  $\mu$ L de solução do peptídeo (1mg/mL)

5 ng da enzima purificada neste trabalho

50  $\mu$ L de NaCl 2 M

Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas de 10  $\mu$ L foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18, Lichrocart Hibar, 125 x 4 mm, Merck) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu), equilibrada em acetonitrila:água (1/5, v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético- (TFA, Aldrich) e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm por espectrofotômetro UV/VIS e identificados através dos tempos de retenção utilizando angiotensina I, angiotensina II, bradicinina, bradicinina 1-7, substância P e neurotensina (todos de procedência Sigma) como padrões.

#### 4.4.2.5 – Determinação da influência do pH na atividade catalítica da isoforma purificada

A determinação do pH ótimo para hidrólise dos substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH foi realizada utilizando os seguintes tampões: tampão acetato de Sódio 0,1 M contendo 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (pH 5,0 e 5,5); tampão fosfato de sódio 0,2 M contendo 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (pH 6,0 e 6,5) e tampão tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (pH 7,0; 7,5 e 8,0). A atividade enzimática foi medida à 37°C, através da determinação da velocidade pelo ensaio fluorimétrico, no espectrofluorímetro Hitachi F-2000 ( $\lambda_{\text{ex}} = 320$  nm

e  $\lambda_{em} = 420$  nm), após adição da enzima purificada (5 ng). A leitura da fluorescência foi acompanhada por um período de 600 segundos.

#### 4.4.2.6 – Determinação dos parâmetros cinéticos na hidrólise dos substratos sintéticos, Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH, pela isoforma purificada

Para a determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_{cat}$  e  $K_m$ ) para a hidrólise do Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH pela isoforma purificada do fluido ileal humano foi utilizada a metodologia descrita por FRIEDLAND e SILVERSTEIN (1976). Diferentes concentrações do substrato foram incubadas com a enzima em tampão tris 0,1M contendo 50mM NaCl e 10 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7, à 37°C e a atividade acompanhada no espectrofluorímetro Hitachi F-2000 ( $\lambda_{ex} = 320$ nm e  $\lambda_{em} = 420$ nm).

Na determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_{cat}$  e  $K_m$ ) para a hidrólise do Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH pela isoforma purificada do fluido ileal humano foi utilizada a mesma metodologia descrita acima incubada em tampão fosfato de sódio 0,2M contendo 10 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 6, à 37°C e a atividade acompanhada no espectrofluorímetro Hitachi F-2000 ( $\lambda_{ex} = 320$ nm e  $\lambda_{em} = 420$ nm).

A concentração dos substratos foram determinadas após hidrólise total utilizando fluido ileal bruto. A concentração de enzima para determinação da velocidade inicial da reação foi escolhida de tal forma que a hidrólise não fosse superior a 5% do substrato utilizado.

Os parâmetros cinéticos ( $K_{cat}$  e  $K_m$ ) foram calculados a partir das velocidades iniciais de hidrólise, utilizando a equação descrita por Michaelies-Menten no programa GRAFIT versão 6.0 (LEARTHERBARROW, 1992).



# Resultados

---

## 5 - RESULTADOS

5.1 - Purificação da enzima: Uma isoforma C-domínio foi purificada do fluido ileal bruto.

O esquema abaixo facilita o entendimento das etapas seguidas na purificação das isoformas com atividade conversora de angiotensina do fluido ileal humano.

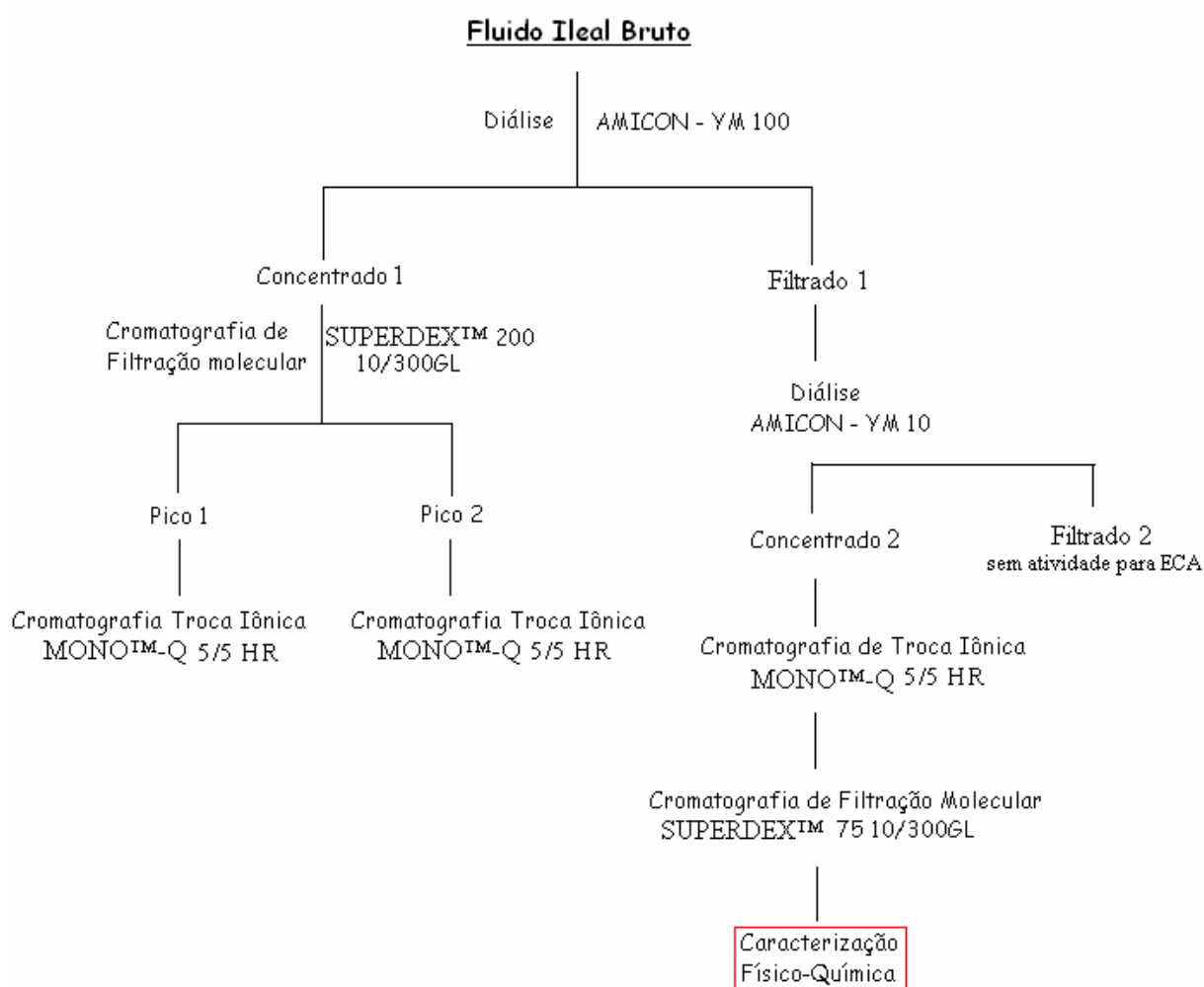


FIGURA 1: Esquema das etapas usadas na purificação das isoformas com atividade conversora de angiotensina do fluido ileal humano.

### 5.1.1- Filtração em membrana YM 100 (AMICON)

Nesta etapa foram obtidos um filtrado 1 e um concentrado 1. Foi detectada atividade de enzima conversora de angiotensina nas duas amostras sobre os substratos Hip-His-Leu e

Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH. A utilização de captopril ( $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ) levou a uma inibição de 90% da atividade enzimática, em ambas as amostras.

A atividade enzimática para o concentrado 1 foi de  $219 \mu\text{molmin}^{-1}$  e para o filtrado foi de  $9,4 \mu\text{molmin}^{-1}$ , utilizando o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH.

### 5.1.2 – Cromatografia de Filtração Molecular em coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

Após a diálise, o concentrado 1 em membrana YM 100 foi submetido à cromatografia de filtração molecular, em coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), apresentando dois picos de atividade enzimática com o substrato Hip-His-Leu, como mostrado na figura 2.

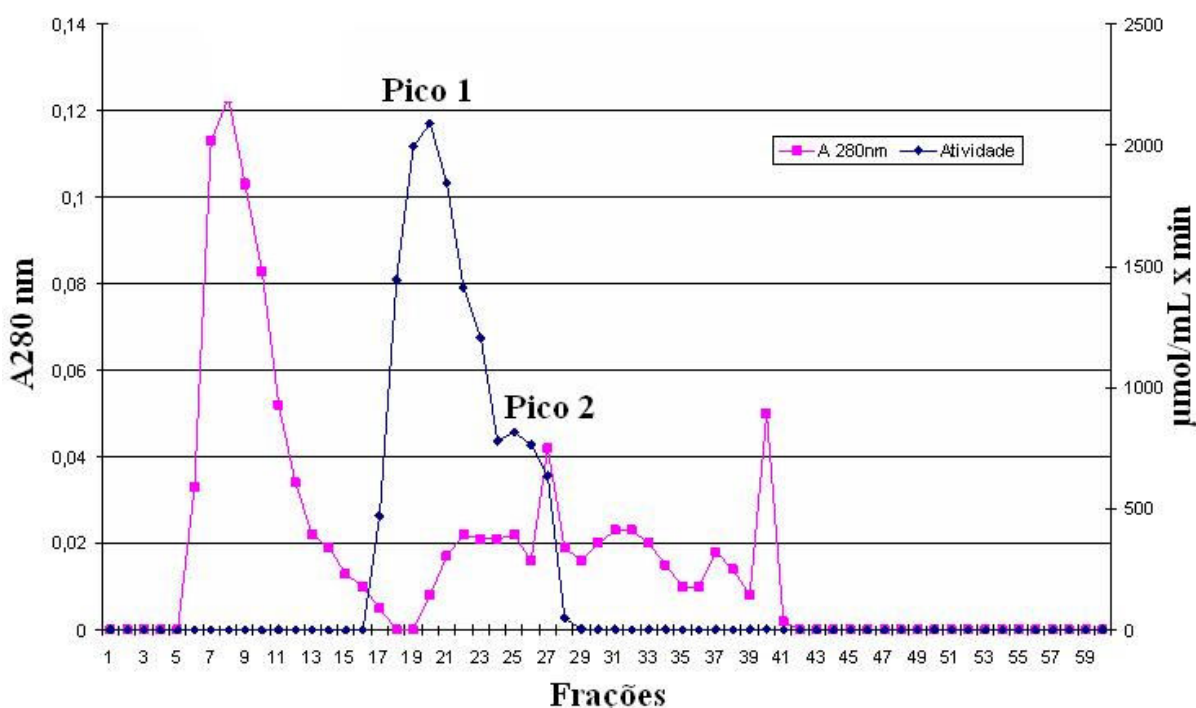


FIGURA 2: Cromatografia de Filtração Molecular do concentrado 1 em membrana YM 100, na coluna SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), equilibrada e eluída com tampão 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,15 M de cloreto de sódio, pH 7. Frações de 0,5 mL foram coletadas. A atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato Hip-His-Leu. Os picos de atividade enzimática foram identificados como Pico 1 e Pico 2.

### 5.1.3 – Estimativa da Massa Molecular Aparente das isoformas separadas na Filtração Molecular (SUPERDEX™ 200 10/300GL)

As massas moleculares estimadas pela Filtração Molecular em coluna (SUPERDEX™ 200 10/300GL), foram de 108 kDa para o pico 1 e de 55 kDa para o pico 2 (gráfico 1).

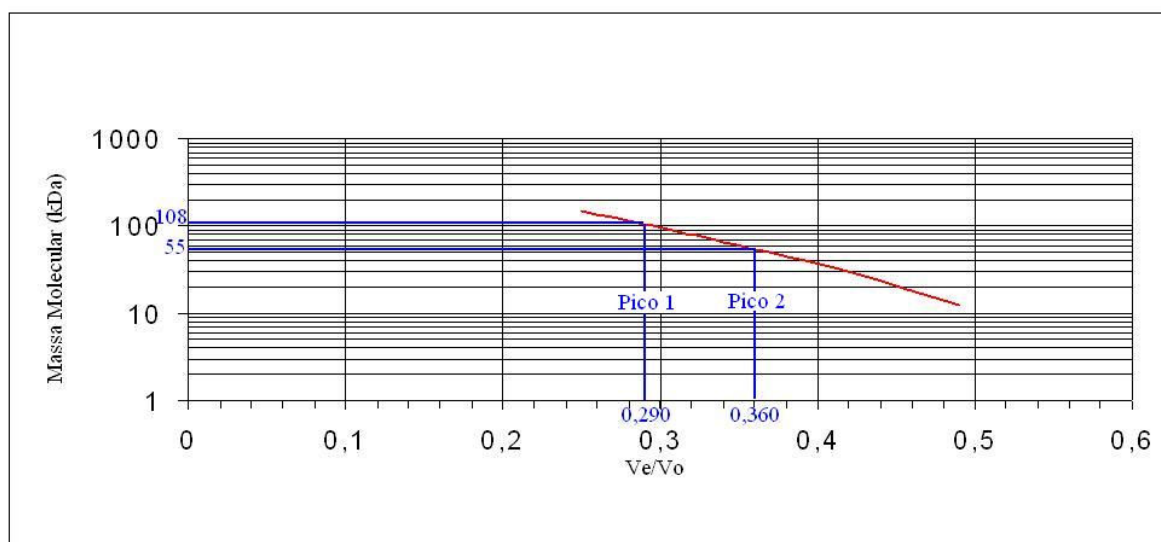


GRÁFICO 1: Determinação das Massas Moleculares Aparentes dos picos 1 e 2 provenientes da cromatografia de Filtração Molecular SUPERDEX™ 200 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), utilizando padrões de massas moleculares conhecidos. Sendo  $V_e$  o volume de eluição e  $V_o$  o volume vazio da coluna.

### 5.1.4- Cromatografia de Troca Iônica em coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

As cromatografias em coluna MONO™-Q dos picos 1 e 2 obtidos na etapa anterior são mostradas nas figuras 3 e 4.

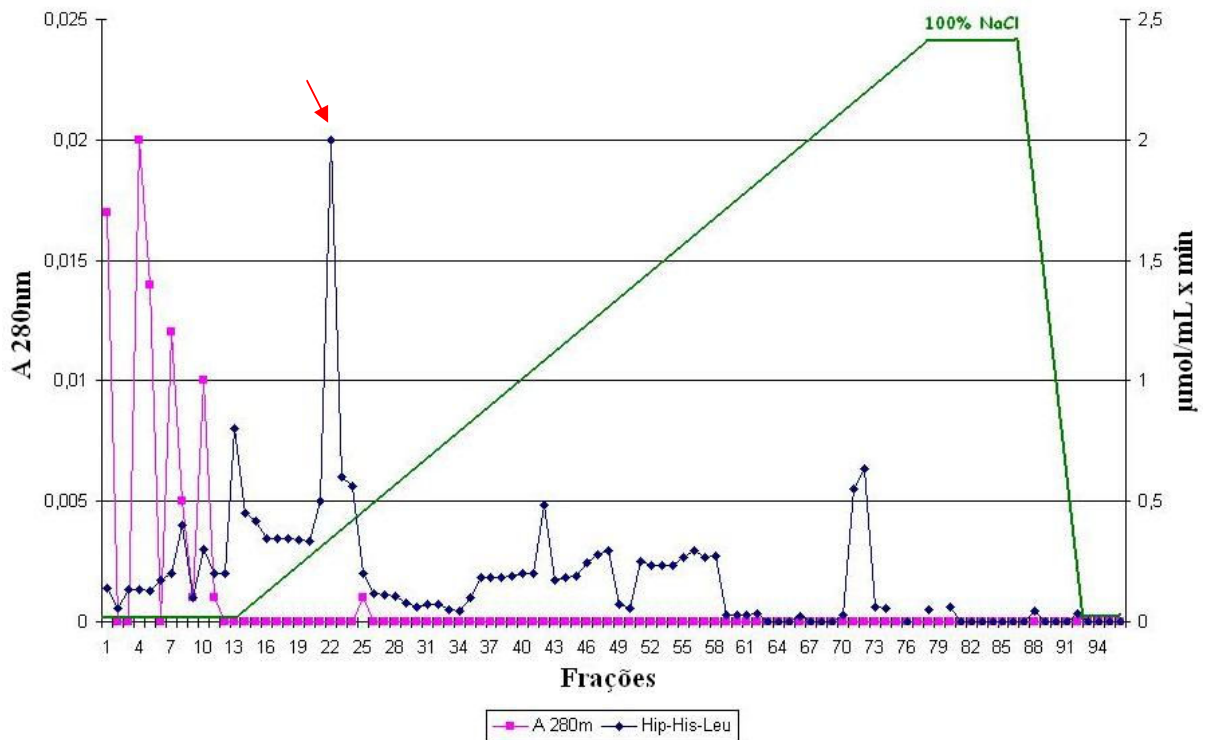


FIGURA 3: Cromatografia de Troca Iônica, na coluna MONO™-Q (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) do pico 1 proveniente da Coluna SUPERDEX™ 200, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. Frações de 1 mL foram coletadas. O pico maior sobre o Hip-His-Leu está indicado pela seta.

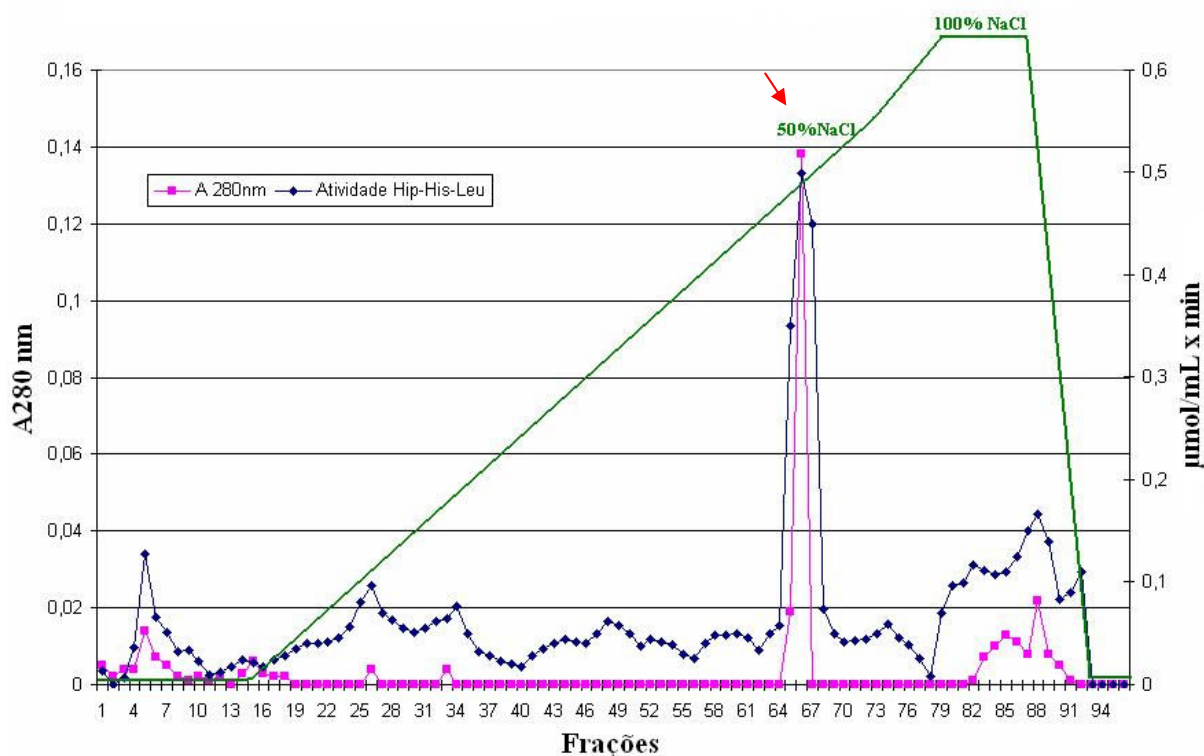


FIGURA 4: Cromatografia de Troca Iônica, na coluna MONO™-Q (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) do pico 2 proveniente da Coluna SUPERDEX™ 200, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. Frações de 1 mL foram coletadas. O pico maior sobre o Hip-His-Leu está indicado pela seta.

Observa-se que a isoforma de 108 kDa eluiu da coluna com 6% de NaCl, enquanto a isoforma de 55 kDa eluiu com cerca de 42% de NaCl mostrando que as duas isoformas apresentam diferentes pontos isoelétricos.

#### 5.1.5- Diálise do Filtrado 1 em membrana YM10 (AMICON)

Nesta etapa foram obtidos um concentrado 2 com atividade de enzima conversora de angiotensina e um filtrado 2 isento de atividade enzimática, determinada com os substratos Hip-His-Leu e Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH.

#### 5.1.6- Cromatografia de Troca Iônica em coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

A cromatografia do concentrado 2 mostrou três regiões de atividade enzimática. As frações de cada região foram reunidas e foram identificadas como picos A, B e C (Figura 5).

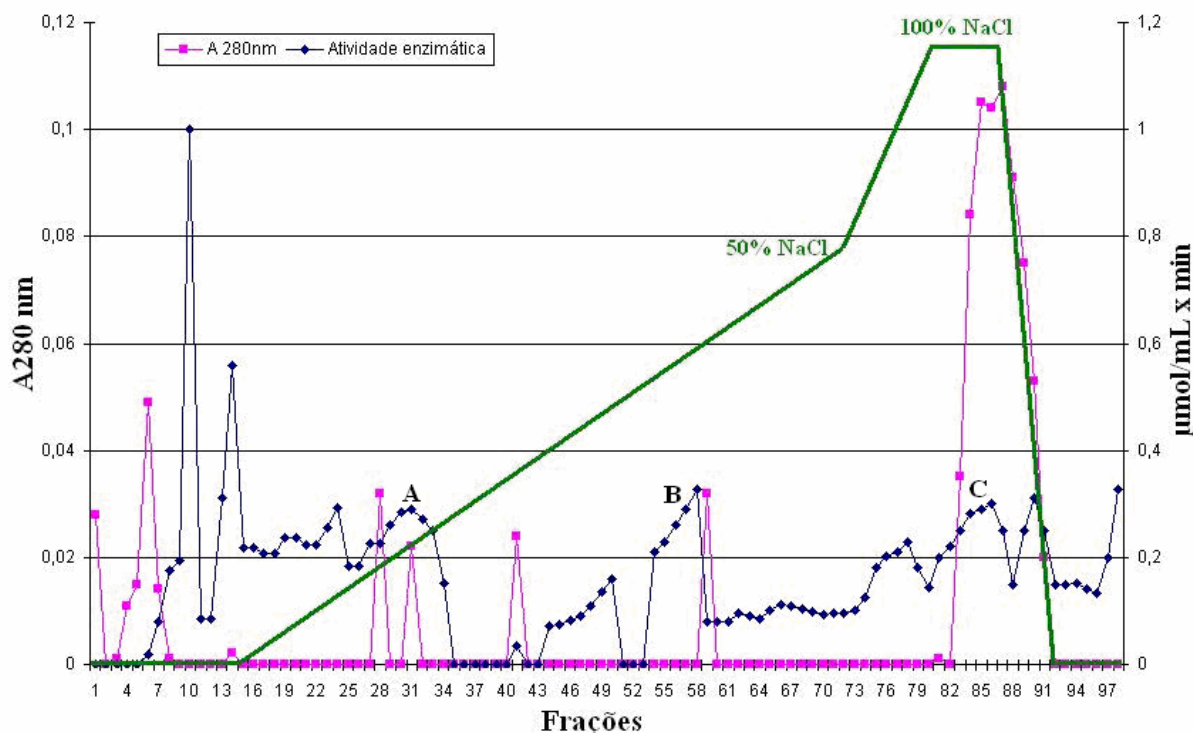


FIGURA 5: Cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (Sistema- FPLC, PHARMACIA®) do concentrado 2 em membrana YM10, usando como tampão A: 0,05 M fosfato de sódio e como tampão B: 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,25 M de cloreto de sódio, pH 8. As frações foram eluídas com gradiente de NaCl. Observou-se 3 picos de atividade enzimática sobre o substrato Hip-His-Leu, denominados de A, B e C.

#### 5.1.7 – Cromatografia de Filtração Molecular em coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema- FPLC, PHARMACIA®)

Cada um dos picos obtidos na etapa anterior foram submetidos a filtração molecular em coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®) e apresentaram um pico de atividade enzimática sobre o substrato Hip-His-Leu, como mostrado na figura 6.

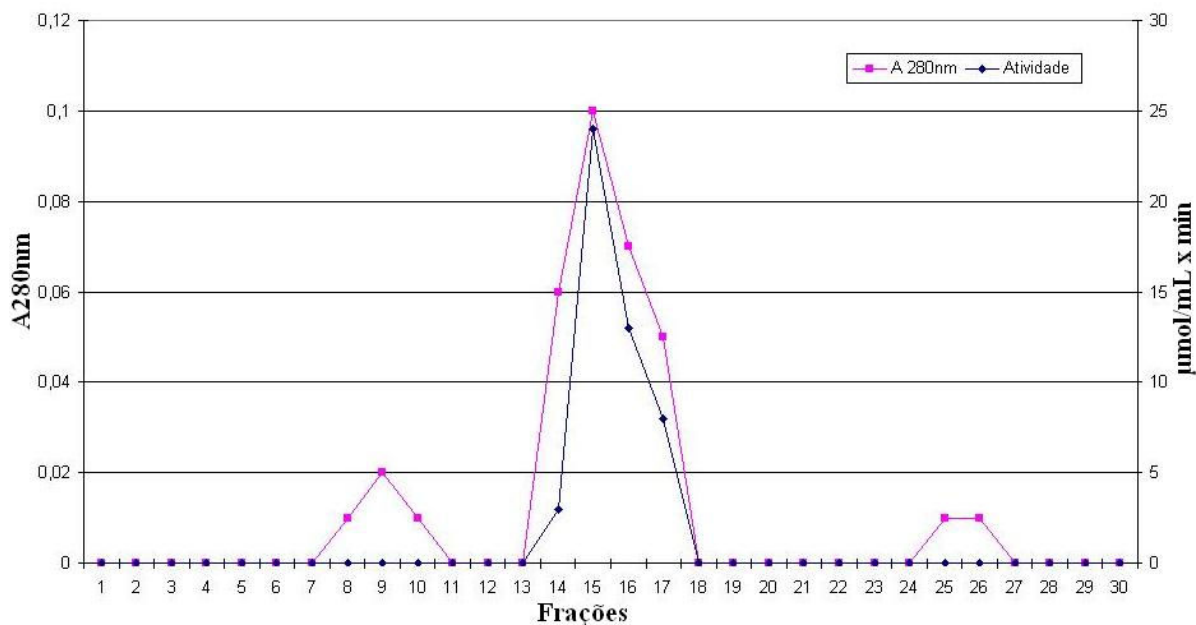


FIGURA 6: Cromatografia de filtração molecular, Coluna SUPERDEX™ 75 (Sistema - FPLC, PHARMACIA®), usando como tampão 0,05 M fosfato de sódio contendo 0,15 M de cloreto de sódio, pH 7. Observou-se um pico de atividade enzimática com Hip-His-Leu.

O pico B, proveniente da cromatografia de troca iônica, com maior atividade específica utilizando o substrato Hip-His-Leu foi escolhido para caracterização.

#### 5.1.8 – Estimativa da Massa Molecular Aparente da isoforma separada na Filtração Molecular (SUPERDEX™ 75 10/300GL)

A massa molecular estimada pela Filtração Molecular em coluna SUPERDEX™ 75 10/300GL, foi de 55 kDa (gráfico 2).



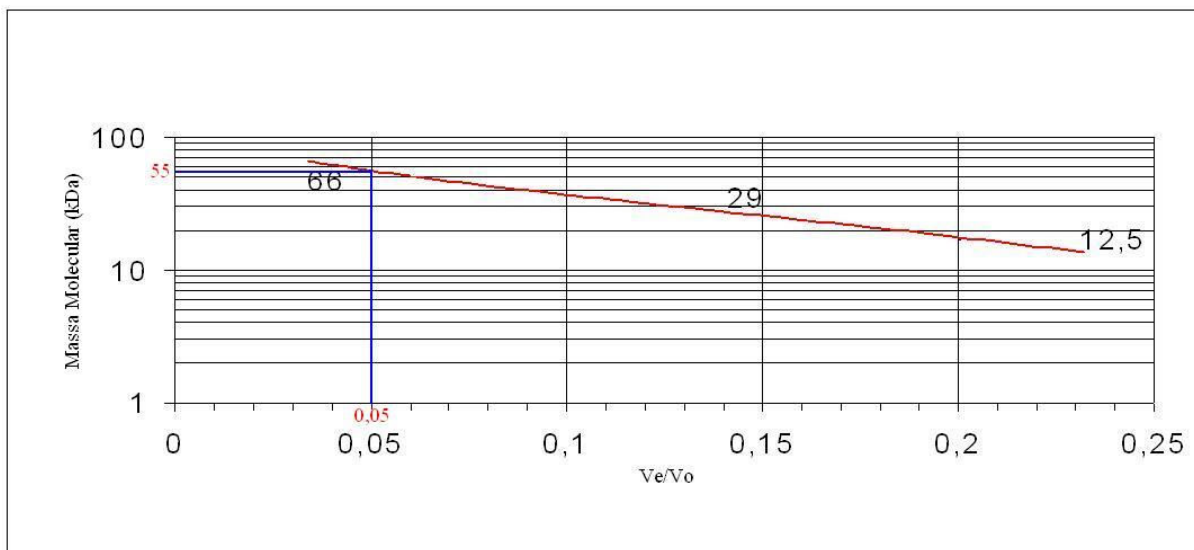


GRÁFICO 2: Determinação da Massa Molecular Aparente da fração proveniente da Coluna de Filtração Molecular SUPERDEX™ 75 10/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®). Sendo  $V_e$  o volume de eluição e  $V_o$  o volume vazio da coluna.

## 5.2- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese SDS-PAGE dos picos 1 e 2 originadas do concentrado 1 é mostrado nas figuras 7 e 8. Amostra referente ao pico 1 apresentou uma massa molecular aparente de 108 kDa (figura 7), enquanto o pico 2 apresentou uma massa molecular aparente de 55 kDa (figura 8).

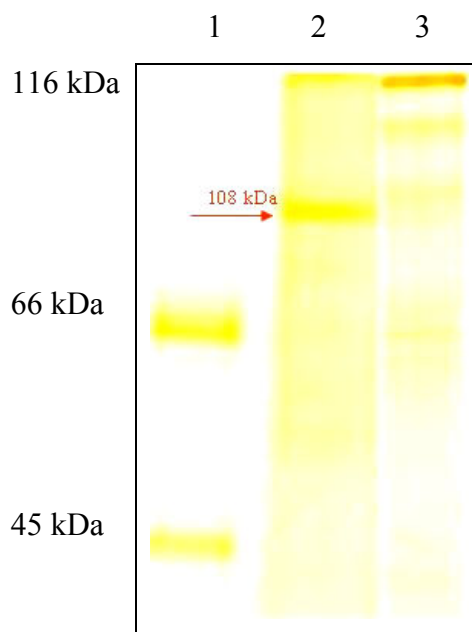


FIGURA 7: SDS-PAGE (10%) (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (SISTEMA- FPLC, PHARMACIA®) proveniente do pico 1 e padrões de massa molecular específicos. Canaleta 1: padrões de massa molecular (66 kDa e 45 kDa), canaleta 2: alíquota da amostra e canaleta 3: padrão de massa molecular de 116 kDa.

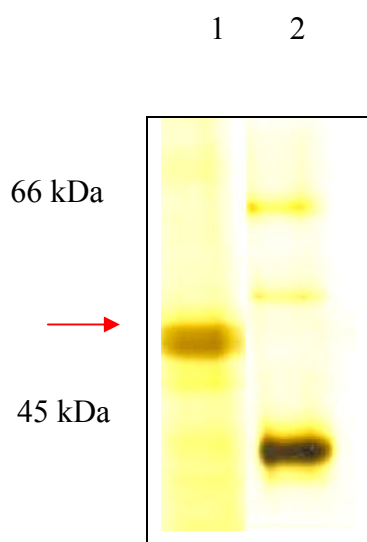


FIGURA 8: SDS-PAGE 10% (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de troca iônica, Coluna MONO™-Q 5/5 HR (SISTEMA- FPLC, PHARMACIA®), proveniente do pico 2 e padrões de massa molecular específicos. Canaleta 1: alíquota da amostra, Canaleta 2: padrões de massa molecular (66 kDa e 45 kDa).

A eletroforese SDS-PAGE do pico B proveniente do concentrado 2 mostrou uma massa molecular aparente de 55 kDa (Figura 9).

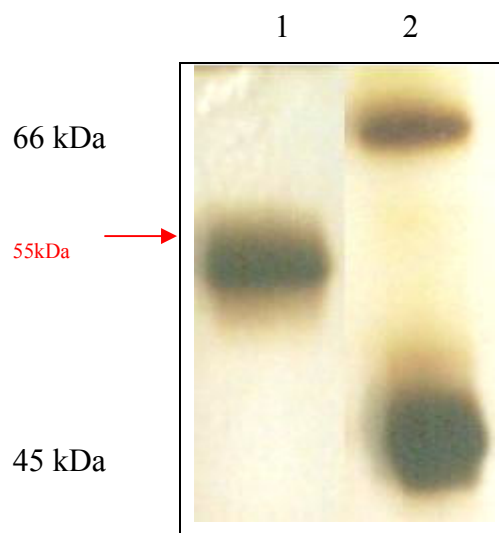


FIGURA 9: SDS-PAGE 10% (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio) da fração com atividade para ECA que saiu da cromatografia de filtração molecular, Coluna SUPERDEX™ 75 (SISTEMA- FPLC, PHARMACIA®) e padrões de massas moleculares específicos. Canaleta 1: alíquota da amostra e Canaleta 2: padrões de massa molecular (66 kDa e 45 kDa).

### 5.3 - Determinação das atividades enzimáticas

#### 5.3.1- Determinação da atividade enzimática utilizando substratos sintéticos

A isoforma de 108 kDa proveniente do pico 1 hidrolisou os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH e Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH em pH 7,0 (Gráfico 3). Todas as atividades foram abolidas totalmente pelo uso do inibidor captopril.

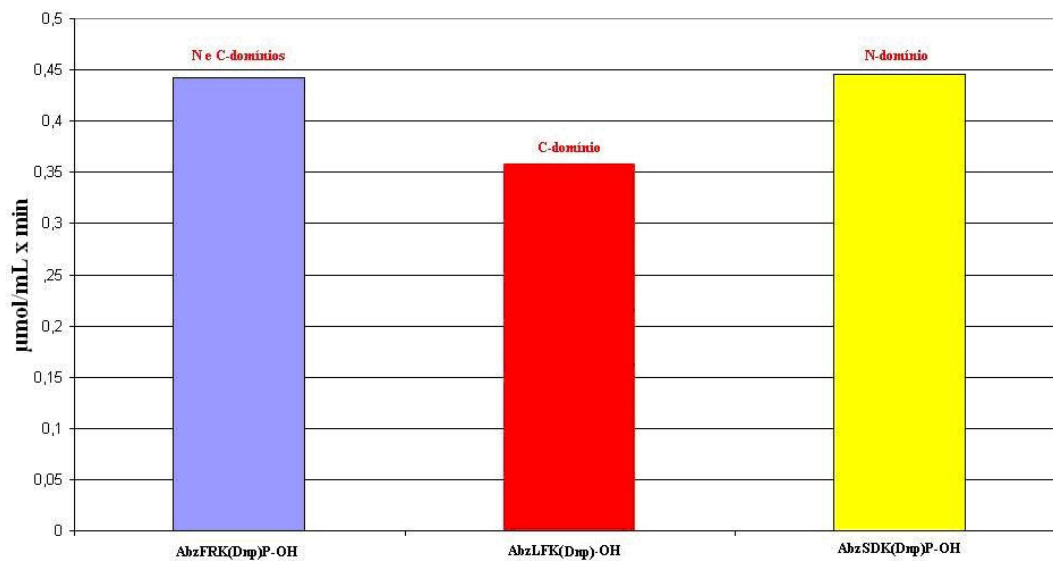


GRÁFICO 3: Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota do pico 1 proveniente da Coluna MONO™-Q. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.

A isoforma de 55 kDa proveniente do pico 2 hidrolisou os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH cerca de 47 e 32 vezes, respectivamente mais rápido que o substrato Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH, mostrando que a atividade predominante dessa isoforma se deve ao C-domínio (Gráfico 4).

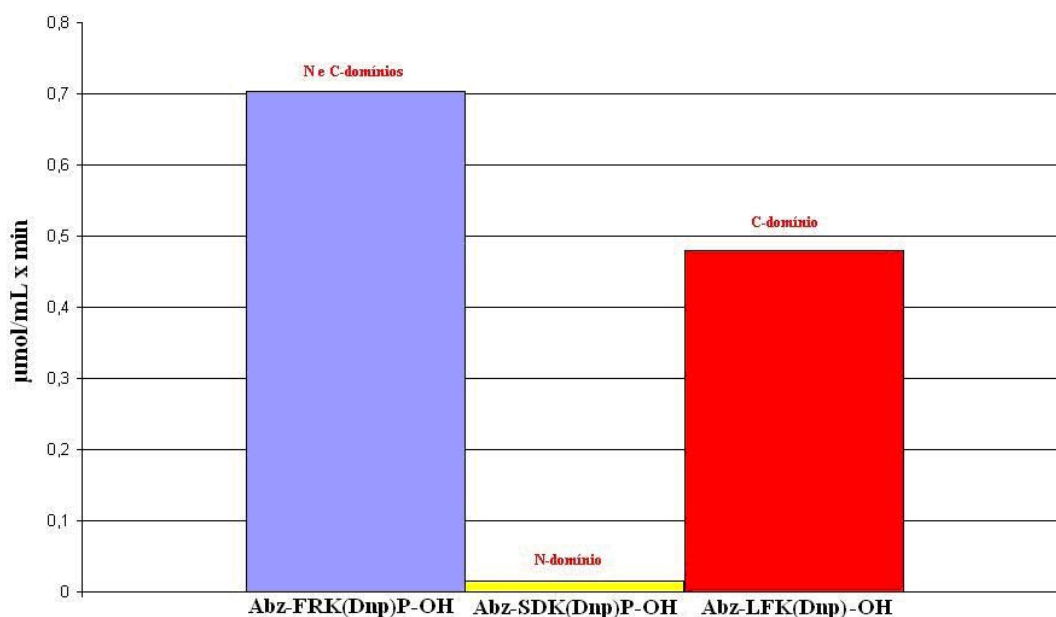


GRÁFICO 4: Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota do pico 2 proveniente da Coluna MONO™-Q. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.

## 5.4 – Caracterização da isoforma de 55 kDa proveniente do pico B

### 5.4.1 – Determinação da atividade enzimática

A isoforma hidrolisou os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH cerca de 62 e 26 vezes, respectivamente mais rápido que o substrato Abz-Ser-Asp-Lys(Dnp)P-OH, mostrando à semelhança da isoforma de 55 kDa do pico 2 há um predomínio de atividade tipo C-domínio (Gráfico 5).

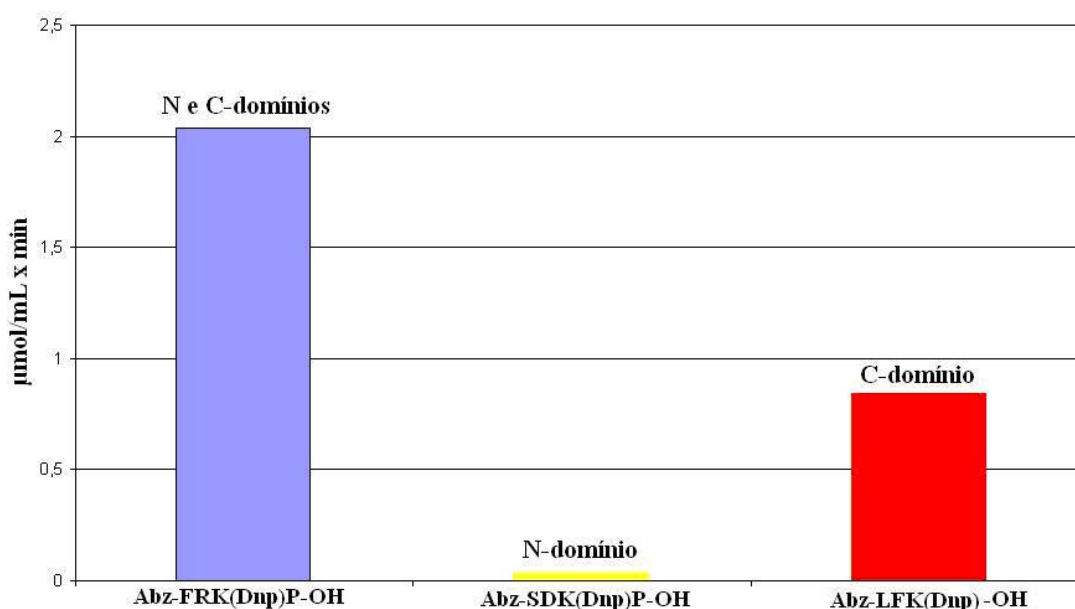


GRÁFICO 5: Atividade enzimática sobre substratos sintéticos para os N e C-domínios da ECA, usando tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 µM ZnCl<sub>2</sub> pH 7, o substrato testado (1 mg/mL) e alíquota da isoforma de 55 kDa proveniente do pico B da coluna de filtração molecular SUPERDEX™ 75. Incubado por 1 hora em banho-maria à 37°C.

### 5.4.2 – Determinação do pH ótimo

A isoforma de 55 kDa mostrou melhor atividade enzimática em pH 7,0 para o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e em pH 6,0 e 7,5 para o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH (Gráfico 6).

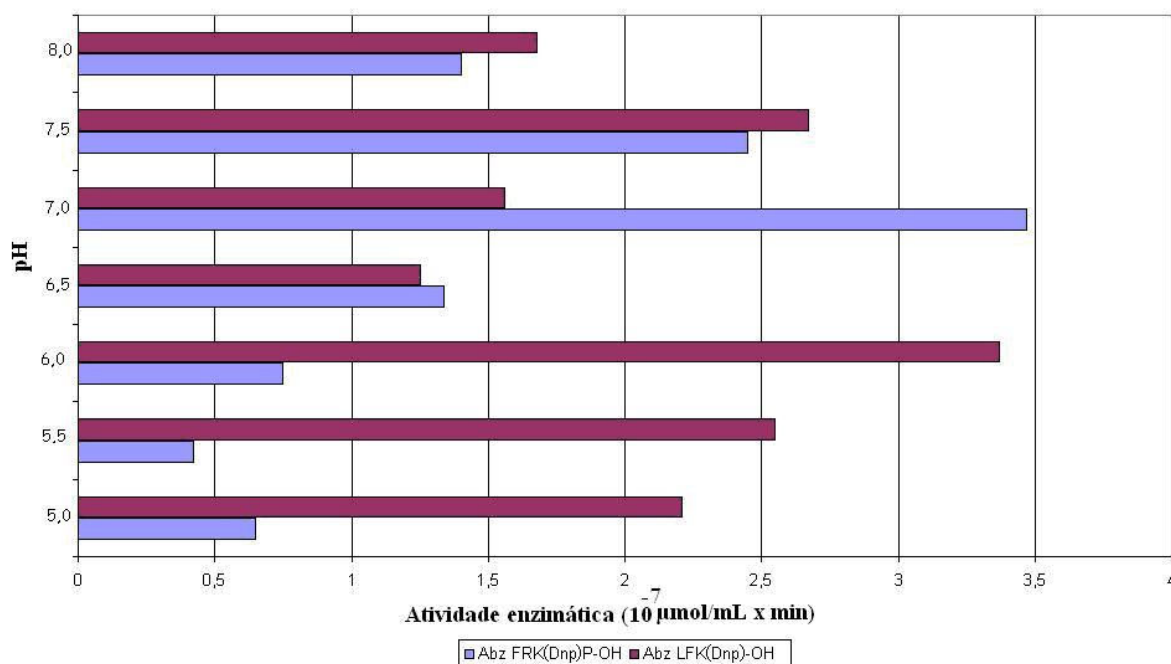


GRÁFICO 6 - Determinação do pH ótimo para atividade enzimática da isoforma de massa molecular 55 KDa, utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M contendo 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (pH 5,0 e 5,5); tampão fosfato de sódio 0,2 M contendo 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (pH 6,0 e 6,5) e tampão tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (pH 7,0; 7,5 e 8,0) quantidade adequada do substrato sintético (1mg/mL) e alíquota da isoforma C-domínio purificada neste trabalho.

#### 5.4.3 – Hidrólise dos peptídeos: Angiotensina I, Bradicinina, Neurotensina e Substância P

Analizamos a hidrólise dessa isoforma purificada sobre os substratos: angiotensina I, bradicinina, neurotensina e substância P. A hidrólise foi realizada em Coluna de octadecilsilano (C-18) acoplada a CLAE, Shimadzu.

Pudemos observar que essa isoforma hidrolisou todos os peptídeos acima, como mostrado nas figuras 10, 12, 14 e 15.

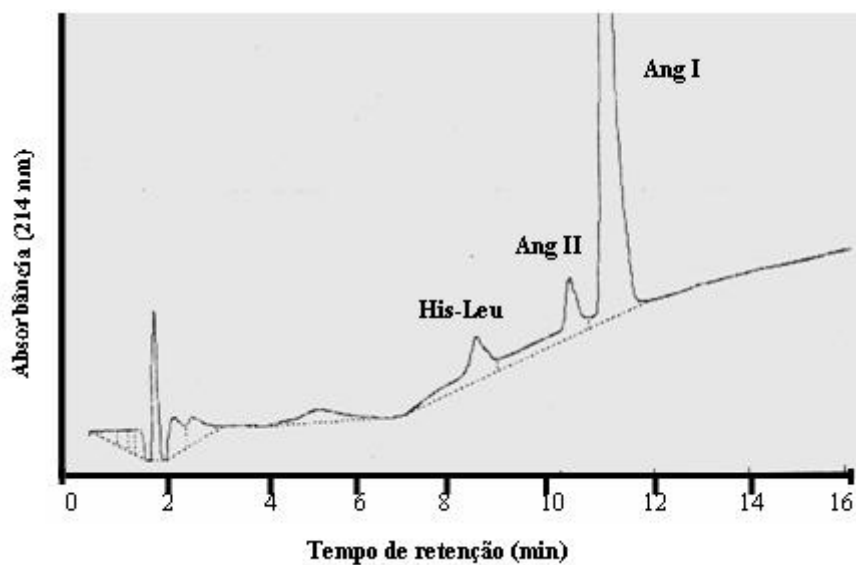


FIGURA 10: Hidrólise da Angiotensina I. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma.

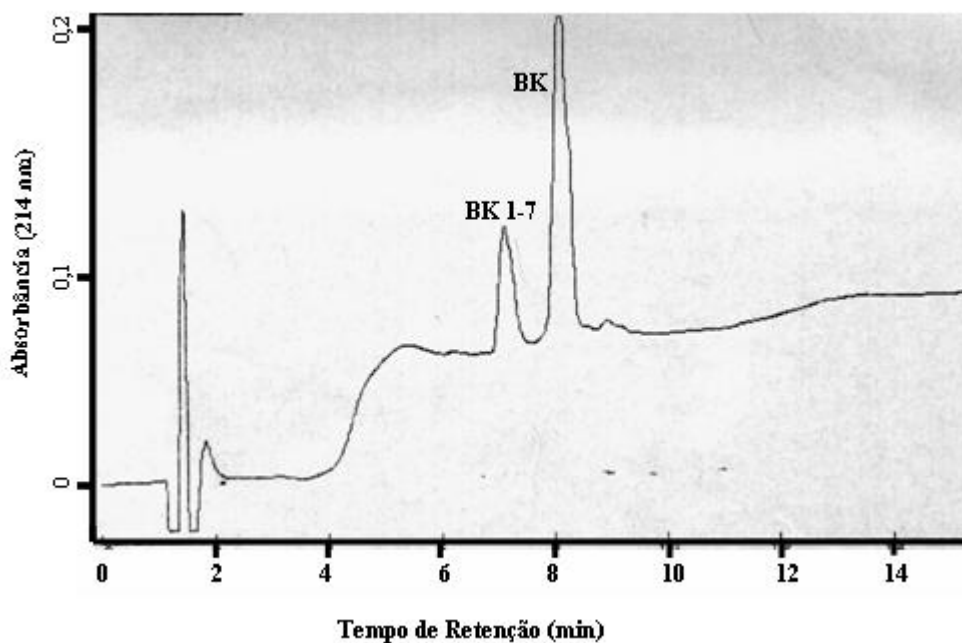


FIGURA 11: Padrão da Bradicicina e padrão da bradicicina 1-7. Cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%.

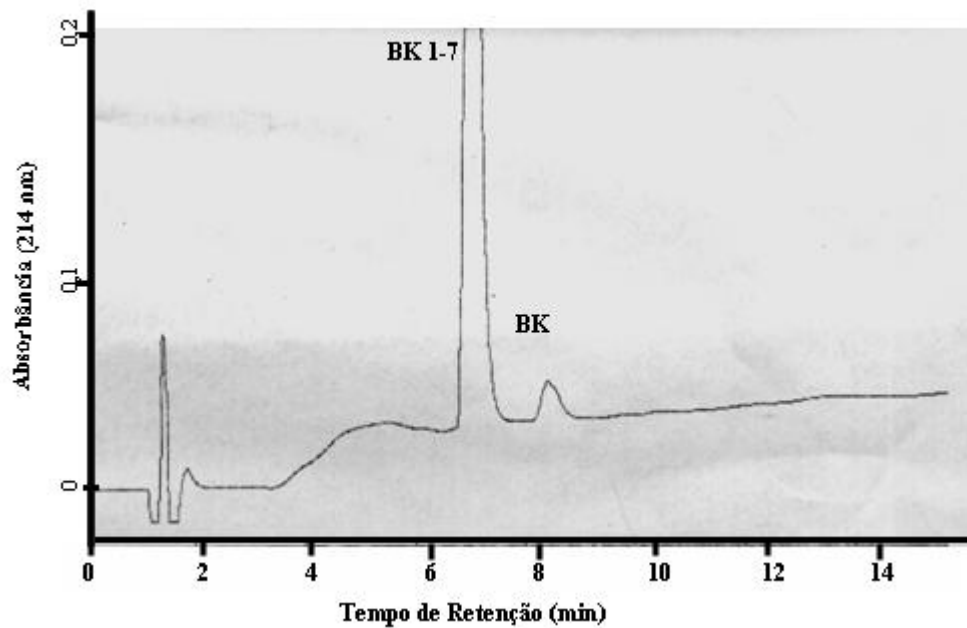


FIGURA 12: Hidrólise da Bradicicnina. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma.

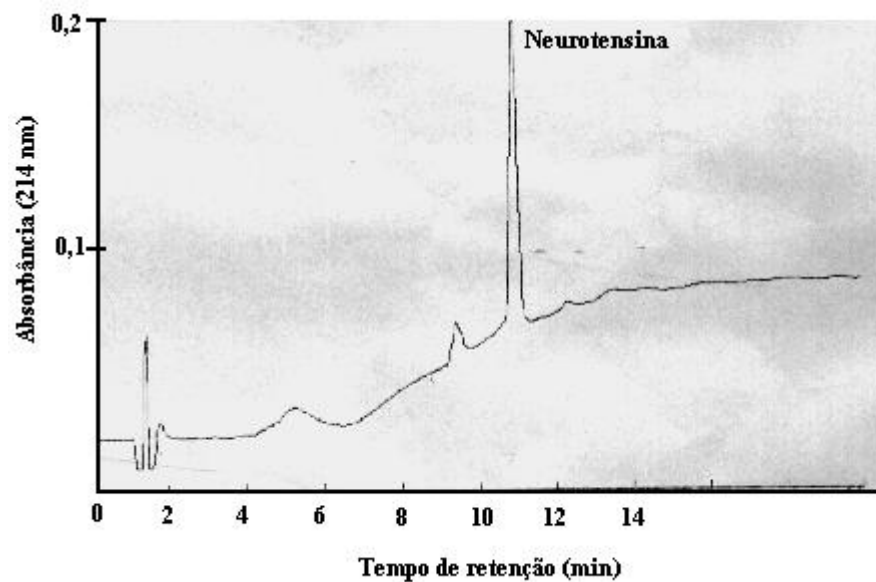


FIGURA 13: Padrão da Neurotensina. Cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%.



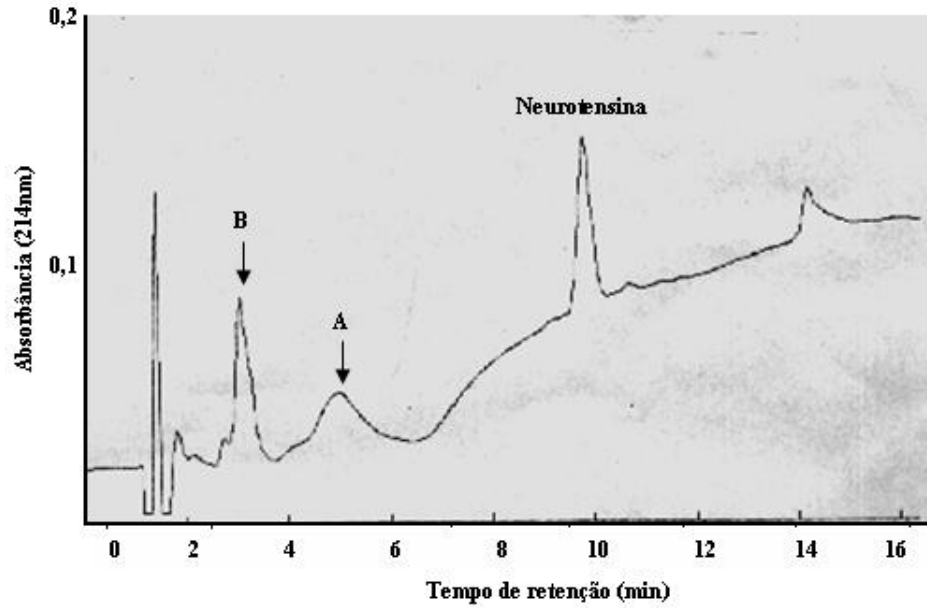


FIGURA 14: Hidrólise da Neurotensina. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma.

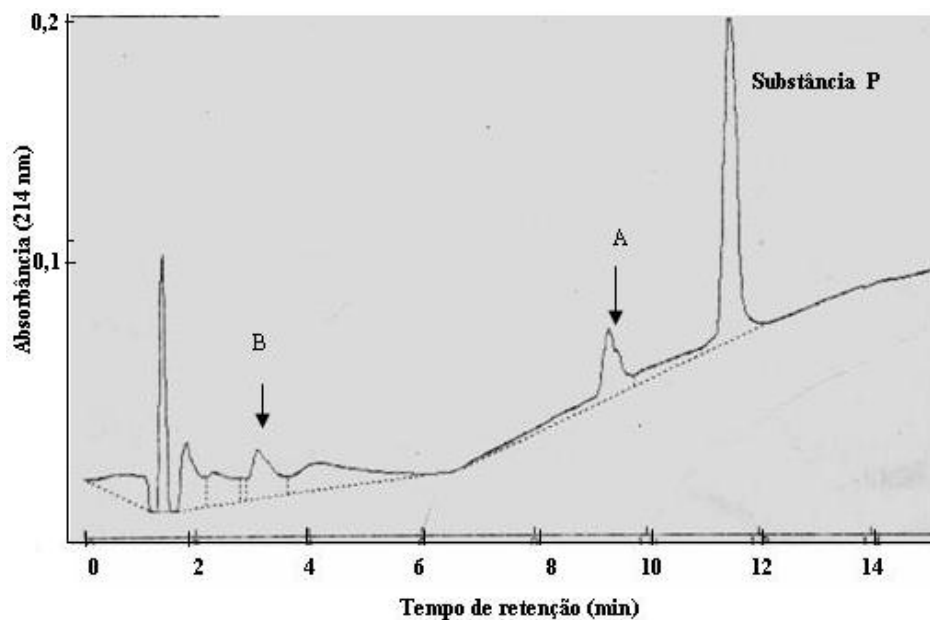


FIGURA 15: Hidrólise da Substância P. Incubou-se a mistura à 37° C por 30 minutos e alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18) em CLAE, equilibrada em acetonitrila:água (1/5 v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoracético-TFA e eluída com um gradiente de acetonitrila a 100% contendo TFA 0,1%. Os peptídeos foram monitorados em 214 nm e identificados através dos tempos de retenção utilizando padrões Sigma.

#### 5.4.4 – Determinação de parâmetros cinéticos de hidrólise de substratos sintéticos

Os parâmetros cinéticos para a isoforma aqui isolada utilizando os substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos da hidrólise dos substratos Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH e Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH pelos domínios catalíticos da isoforma C-domínio da ECA do fluido ileal humano purificada neste trabalho.

Substrato	Kcat (s <sup>-1</sup> )	Km (μM)	Kcat/Km (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH	154,5	1,95	79
Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH	854,0	3,64	234

TABELA 1: Parâmetros cinéticos. Condições do ensaio - As hidrólises dos substratos com supressão intramolecular de fluorescência foram determinadas a 37°C. Para o Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH foi usado tampão tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7. Para o Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH foi usado tampão fosfato de sódio 0,2 M contendo 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 6.

A enzima foi mais eficiente em hidrolisar o peptídeo Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH que o Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH cerca de 3 vezes como observado pela relação Kcat/Km.

Os dados obtidos indicam que a enzima obedece a cinética de Michaelis, como mostrado nos gráficos 7 e 8, similar a ECA plasmática.

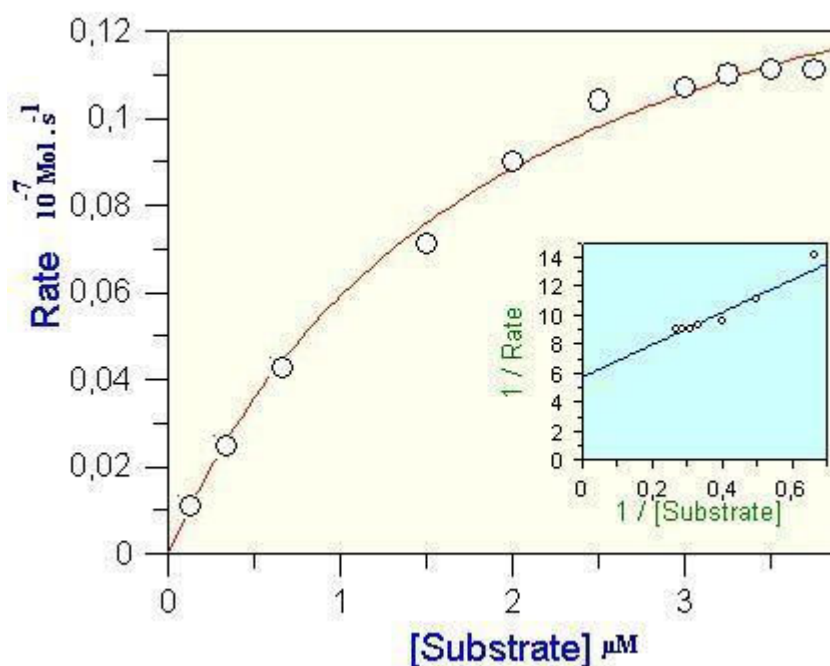


GRÁFICO 7 – Gráfico de Michaelis-Menten e Gráfico de Lineweaver-Burk obtido a partir das cinéticas realizadas com o substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH, para isoforma C-domínio purificada neste trabalho, incubado com tampão Tris 0,1 M contendo 50 mM NaCl e 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7, à 37°C.

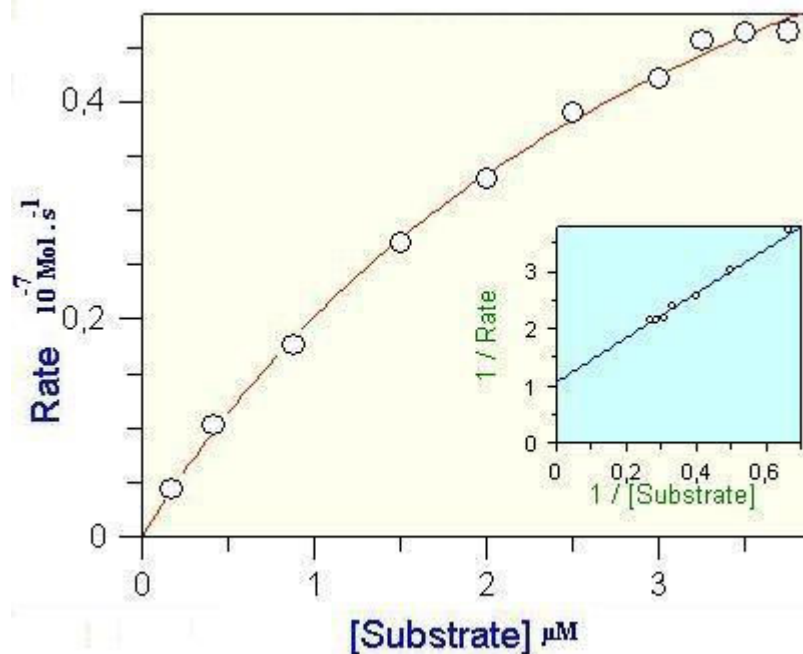


GRÁFICO 8 – Gráfico de Michaelis-Menten e Gráfico de Lineweaver-Burk obtido a partir das cinéticas realizadas com o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH, para isoforma C-domínio purificada neste trabalho, incubado com tampão fosfato de Sódio 0,2 M contendo 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, pH 6, à 37°C.

# *Discussão*

---

## 6- Discussão

Uma isoforma C-domínio de enzima conversora de angiotensina do fluido ileal humano foi purificada e caracterizada neste trabalho. A atividade conversora de angiotensina no fluido ileal humano foi detectada inicialmente através da hidrólise do substrato Hip-His-Leu e pela inibição da atividade enzimática por captopril.

A utilização de substratos sintéticos suscetíveis à hidrólise pelos N e C-domínios da ECA permitiu a caracterização da enzima isolada como uma isoforma C-domínio.

Nossos achados também mostraram a presença de uma isoforma de massa molecular em torno de 108 kDa, que apresentou atividade hidrolítica sobre os substratos suscetíveis aos N e C-domínios da ECA. Esses dados contrapõem aqueles de DEDDISH *et al* (1994) que afirmaram que a atividade conversora de angiotensina presente no fluido ileal humano se devia unicamente à uma isoforma N-domínio.

Quanto à isoforma C-domínio isolada por nós, observamos que a enzima foi capaz de hidrolisar também os peptídeos naturais, angiotensina I, bradicinina, neurotensina e substância P, à semelhança da ECA clássica, reforçando o caráter de enzima conversora de angiotensina dessa isoforma, descrita pela primeira vez no fluido ileal humano.

Além da ação hidrolítica sobre peptídeos biologicamente importantes, este trabalho também aborda algumas propriedades catalíticas da isoforma C-domínio isolada do fluido ileal humano.

A hidrólise do substrato Abz-Phe-Arg-Lys(Dnp)P-OH pela ECA ileal mostrou similaridade com os parâmetros cinéticos determinados para uma ECA recombinante humana (ARAÚJO *et al*, 2000).

A atividade da enzima ileal sobre o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH (seletivo para o C-domínio) foi significativamente mais eficiente que a atividade para a forma recombinante humana descrita por BERSANETTI *et al* (2004), que encontraram um  $K_{cat} = 82,6 \text{ s}^{-1}$  e  $K_{cat}/K_m = 20,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Quando comparamos nossos dados com aqueles descritos por BERSANETTI *et al* (2004) para a isoforma recombinante C-domínio utilizando o substrato Abz-Leu-Phe-Lys(Dnp)-OH, novamente observamos uma eficiência catalítica cerca de dez vezes maior para a forma ileal.

---

Isoformas solúveis da ECA tem sido descritas em vários fluidos biológicos (DAS, HARTLEY e SOFFER, 1977; EL-DORRY, MACGREGOR e SOFFER, 1983; YASUI *et al*, 1984; SCHWEISFURTH e SCHIOBERG-SCHIEGNITZ, 1984; GOMES *et al*, 2008).

. A ECA plasmática tem seu papel relacionado principalmente à conversão de angiotensina I em angiotensina II (DAS, HARTLEY e SOFFER, 1977). Entretanto, outras isoformas solúveis ainda não têm função fisiológica esclarecida nos fluidos biológicos onde se encontram (GOMES *et al*, 2008).

A presença de receptores no intestino delgado para peptídeos biologicamente ativos, tais como angiotensina II, substância P, bradicinina, neurotensina (SPAK *et al*, 2008; TERBEEK *et al*, 2007; SCHULZ *et al*, 2006) e outros sugerem um papel local para essas substâncias. Por outro lado, a presença simultânea de ECA tanto no fluido como na mucosa intestinais pode estar relacionada com o controle das funções do sistema digestivo que decorrem da ação desses peptídeos.

# Conclusões

---

---

## 7- Conclusões

7.1 – O fluido ileal humano contém enzimas com atividade conversora de angiotensina;

7.2 – Foram isoladas duas isoformas (108 kDa e 55 kDa) de enzima conversora de angiotensina a partir do fluido ileal humano;

7.3 – A isoforma de 55 kDa se comportou como uma isoforma C-domínio quanto às propriedades hidrolíticas utilizando um substrato seletivo para o C-domínio da enzima conversora de angiotensina;

7.4 – A isoforma de 55 kDa hidrolisou angiotensina I, bradicinina, neurotensina e substância P;

7.5 – O papel fisiológico da enzima estudada ainda não foi determinado.



# Referências

---

---

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, K. R. *et al.* ACE revisited: a new target for structure-based drug design. Nat. Rev. Drug Discov. 2: 891-902, 2003.

ARAÚJO, M.C. *et al.* Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. Biochemistry, 39, 8519-8525, 2000.

ARAÚJO, M.C. *et al.* A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. Brazillian Journal of medical and Biological Research, 38? 861-868, 2005.

AZIZI, M. *et al.* Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator n-acetyl-serul-aspartyl-lysyl-proline. J. Clin. Invest. 97, 839-844, 1996.

BAKHLE Y.S. Converting enzyme *in vitro* measurement and properties. In Angiotensin, Handbook of Experimental Pharmacology, vol 37, edited by IH Page and FM Bumpus. New York, Springer-Verlag, 41-80, 1974.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl ologopeptidase family. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373, 353-360, 1992.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In Methods in Enzymology, 244, Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases, 1-15, Academic Press, New York, 1994.

BARRET, A. J.; RAWLING, N.D. Families of metallopeptidases. In Methods in Enzymology, 248:183-228, 1994.

BERSANETTI, P.A. *et al.* Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides for defining substrate specificity of the angiotensin I-converting enzyme and development of selective C-domain substrates. Biochemistry, 43, 15729-15736, 2004.

BIOLLAZ, J. *et al.* Three new long-acting converting-enzyme inhibitors: relationship between plasma converting-enzyme activity and response to angiotensin I. Clin. Pharmacol. Ther. 29: 665-670, 1981.

---

CARMEL, A.; YARON, A. Intramolecularly quenched fluorescent tripeptide as a fluorogenic substrate of angiotensin I-converting enzyme and of bacterial dipeptidyl carboxypeptidase. Eur. J. Biochem. 87: 265-273, 1978.

CARMONA, A.K. Uso dos peptídeos Abz-FRK(Dnp)P-OH, Abz-YRK(Dnp)P-OH e Abz-SDK(Dnp)P-OH como substratos para a dosagem da enzima conversora da angiotensina I em plasma e tecidos. Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, 2002.

CASARINI, D. E. *et al.* Calcium channel blockers as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. Hypertension 26: 1145-1148, 1995.

CHAGAS, J.R.; PRADO, E.; JULIANO, L. Intramolecularly quenched fluoregenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikrein. Analytical Biochemistry, 3:39-45, 1991.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochemical Pharmacology, 20: 1637-1648, 1971.

CUSHMAN D.W.; CHEUNG, H. S. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of Bothrops jararaca. Biochim Biophys Acta. 293(2):451-63,1973.

DAS, M.; SOFFER, R.L. Pulmonary angiotensin converting enzyme. Structural and catalytic properties. J.Biol. Chem. 250, 6762-6768, 1975.

DAS, M.; HARTLEY, J.L.; SOFFER, R.L. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. J. Biol. Chem. 252, 1316-1319, 1977.

DEDDISH, P.A. *et al.*, Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7807-7811, August, 1994.

DEDDISH, P.A. *et al.* N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. Hypertension 31, 912-917, 1998.

DUBREUIL, P. *et al.* Novel activity of angiotensin converting enzyme. Hidrolysis of colecystokinin and gastrin analogues with release of the amidated C-terminal dipeptide. Biochem. J. 262: 15-130, 1989.

---

DUGGAN, K.A., MENDELSON, F.A., LEVENS, N.R. Angiotensin receptors and angiotensin I-converting enzyme in rat intestine. Am.J. Physiol. Oct;257. 1989.

EHLERS, M.R.W. *et al.* Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: The testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 7741-7745, 1989.

EL-DORRY, H. A. *et al.* Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 257: 14128-14133, 1982.

EL-DORRY, H. A.; MACGREGOR, J.S.; SOFFER, R. L. Dipeptidyl carboxypeptidase from seminal fluid resembles the pulmonary rather than the testicular isoenzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 1096-1100, 1983.

ERDÖS, E.G.; YANG, H.Y.T. Inactivation and potentiation of the effects of bradykinin. In Hypotensive Peptides, edited by EG Erdös, N Back, F Sicuteri, and AF Wilde. New York, Springer-Verlang, 235-250, 1966.

ERDÖS, E.G.; YANG, H.Y.T. kininases. In Handbook of Experimental Pharmacology, vol 25, edited by EG Erdös, Heidelberg, Springer-Verlang, 289, 1970.

FERRARIO, C. M.; FLACK, J. M. Pathologic consequences of increased angiotensin II activity. Cardiovasc. Drugs Ther. 10: 511-518, 1996.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jarara* venom. Biochemistry 9, 2583-2593, 1970.

FRIEDLAND, J.; SILVERTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin converting enzyme. Am. J. Clin. Pathol. 66, 416-424, 1976.

FUCHS, S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage *in vivo*. Hypertension, Feb;51(2):267-74, 2008.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22ª edição. Editora Elsevier. 2 volumes, 2005.

GOMES, R. A.; CARMONA, A. K.; REZENDE LOPES, I. C. Characterization of human pericardial fluid angiotensin converting enzyme activity. J. Hypertens. 22: S-70, 2004.

---

GOMES, R.A.S *et al.* Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2008. (no prelo)

HIAL, V. *et al.* Angiotensin Metabolism by Cultured Human Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. Microvascular Research, 1979.

HIRATA, I.Y. *et al.* Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescent spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoil-dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. Lett. Peptide Sci. 1: 299-308, 1994.

IBARRA-RUBIO, M.E.; PENA, J.C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Kinetic and inhibitory characteristics of serum angiotensin-converting enzyme from nine mammalian species. Comp. Biochem. Physiol. B. 92: 399-403, 1989.

IGIC R. *et al.* Angiotensin I converting enzyme of the lung. Circulation Research 31 (suppl II): 51-61, 1972.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the active sites of angiotensin I-converting enzyme (Kininase II). J. Biol. Chem. 268, 9496-9503, 1993.

KOKUBU, T. *et al.* Angiotensin I-converting enzyme in human urine. Clin. Chim. Acta 89: 375-379, 1978.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-5, 1970.

LATTION, A.L. *et al.* The testicular transcription of the angiotensin I converting enzyme encodes for the ancestral, non duplicated form of the enzyme. FEBS Lett. 252: 99-104, 1989.

LEATHERBARROW, R.J. Grafit 6.0.5. Erithacus Software Ltda. Staines, U.K, 1992.

LIEBERMAN, J. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. Am. J. med. 59: 365-372, 1975.

LOWRY, O. H. *et al.* J.Biochem. 193:265-275, 1951.

---

LUQUE, M. *et al.* Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin (1-7) in essential hypertension. J. Hypertens. 14: 799-805, 1996.

MICHAUD, A.; CHAUVET, M. T.; CORVOL, P. N-domain selectivity of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies of its highly selective substrate, N-acetyl-seryl-aspartyl, lysyl-proline. Biochem. Pharmacol. 57: 611-618, 1999.

MIRANDA, E.S.G.; NETO, U.F. SÍNDROME DO INTESTINO CURTO. The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases, Junho 2003.

MOSS, G. P. Enzyme Nomenclature: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Revisado em 2006. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 23 set. 2006.

NAIM, H.Y. Angiotensin-converting enzyme of the human small intestine. Biochem. J. 286, 451-457, 1992.

NAIM, H. Y. Secretion of human intestinal angiotensin-converting enzyme and its association with the differentiation state of intestinal cells. Protein Secretion Group, Biochem. J., 316: 259-264, 1996.

ONDETTI, M.A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. Biochemistry 10, 4033-4039, 1971.

ONDETTI, M.A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D.W. Design of specific inhibitor of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science 196, 441-444, 1977.

PATCHETT, A.A. *et al.* A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Nature 288: 280-283, 1980.

RIEGER, K.J. *et al.* Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the hemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. Biochem. J. 296, 373-378, 1993.

RYAN, M.J.; SIGMUND, C.D. ACE, ACE inhibitors, and Other JNK. Circulation Research, 94; 1-3; 2004.

---

ROSSEAU, A. *et al.* The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. J. Biol. Chem. 270, 3656-3661, 1995.

SANDER G.E.; WEST D.W.; HUGGINS C.G. Peptide inhibitors of pulmonary angiotensin I converting enzyme. Biochim Biophys Acta 242: 662-667, 1971.

SCHULZ, S. *et al.* Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. Journal of Endocrinology. 191, 121-128, 2006.

SCHWEISFURTH, H.; SCHIOBERG-SCHIEGNITZ, S. Assay and biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid. Enzyme, 32: 12-19, 1984.

SHAPIRO, R.; HOLMQUIST, B.; RIODAN, J.F. Anion activation of angiotensin converting enzyme: dependence of the nature of the substrate. Biochemistry 22, 3850-3857, 1983.

SKEGGS, L.T.; KAHN J.R.; SHUMWAY N.P. Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. J. Exp. Med. 103:295-299, 1956.

SKIDGEL, R.A. *et al.* Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. Peptides 5, 769-776, 1984.

SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH<sub>2</sub> and COOH terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,1025-1029, 1985.

SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. Clin. Exp. Hypertens. A. 9, 243-259, 1987.

SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyse neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. Peptides 25,521-525, 2004.

SPAK, E. *et al.* Angiotensin II-induced contractions in human jejunal wall musculature *in vitro*. Acta Physiol (Oxf) Jun; 193 (2): 181-90, 2008.

---

SOFFER, R.L. Biochemical Regulation of Blood Pressure, 123, John Wiley & Sons, New York, 1981.

SOUBRIER, F. *et al.* Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:9386-9390, 1988.

TUNÕN, P.; JOHANSON, K.E. Yet another improved silver stining meted for the detection of proteins in PAGE. J. Biochem. Biophys. Methods, 9:171-179, 1984.

TER BEEK, W.P. *et al.* Substance P receptor expression in patientes with inflammatory bowel disease. Determination by three different techniques, i.e., storage phosphor autoradiography, RT-PCR and immunohistochemistry. Neuropeptides Oct; 41 (5): 301-6, 2007.

WEI, L. *et al.* The two homologous domains of human angiotensin I converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. J. Biol. Chem. 267: 13398-13405, 1991.

WILLIAMS, T. A. *et al.* A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. Biochem. J. 288: 875-881, 1992.

YANG, H.Y.T.; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. Adipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. Biochim. Biophys. Acta 214: 374-376, 1970.

YANG, H.Y.T.; JENSSEN, T.A.; ERDÖS, E.G. Conversion of angiotensin I by a kininase preparation. Clin. Res. 18:88, 1970.

YANG, H.Y.T.; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (Kininase II; angiotensin I converting enzyme). J. Pharmacol Exp Ther 117: 291-300, 1971.

YASUI, T. *et al.* Angiotensin I-converting enzyme in amniotic fluid. J. Lab. Clin. Med. 104: 741-751, 1984.

ZAMAN, M.A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D.A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. Nat. Rev. Drug. Discov. 1, 621-636, 2002.