

FERNANDA REZENDE

**HIPERTROFIA CARDÍACA DE CAMUNDONGO
TRANSGÊNICO QUE EXPRESSA TONINA DE
RATO**

MOGI DAS CRUZES

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

FERNANDA REZENDE

**HIPERTROFIA CARDÍACA DE CAMUNDONGO
TRANSGÊNICO QUE EXPRESSA TONINA DE RATO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração:
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

MOGI DAS CRUZES, SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Rezende, Fernanda

Hipertrofia cardíaca de camundongo transgênico que expressa tonina de rato / Fernanda Rezende. – 2008.

76 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, 2008.

1. Hipertrofia cardíaca 2. Angiotensina II 3. Isoproterenol 4. Tonina I. Título II. Pesquero, Jorge Luiz

UDD 619.93

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas do dia vinte e nove de fevereiro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da dissertação "HIPERTROFIA CARDÍACA DE CAMUNDONGO TRANSGÊNICO QUE EXPRESSA TONINA DE RATO" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Fernanda Rezende**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Jorge Luiz

do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a)

Dedico esse trabalho:

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero que aceitou ser meu orientador e sempre mostrou confiar, acreditar e principalmente incentivar meu trabalho.

Aos meus pais, meus irmãos e ao meu noivo, que conviveram intensamente comigo durante esse período me acalmando em momentos de ansiedade e também incentivando nos momentos que necessitavam de maior dedicação.

Amo todos
vocês!

Agradecimento especial

A Deus, por todas as bênçãos que tem me concedido durante toda a minha vida e por mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Jorge Pesquero pela oportunidade, por acreditar em mim e me incentivar, estar presente em todos os momentos, e mais ainda pela grande amizade. Jorge, te admiro muito, não só por ser um grande profissional mas também por ser uma pessoa maravilhosa.

Aos meus pais Fernando Rezende e Mayra da C. P. Rezende que sempre apoiaram e torceram durante mais essa etapa da minha vida. Amo vocês!

Ao meu noivo Sebastião Pedroza, pela imensa compreensão em todos os momentos, além do incentivo, força e amor. Te amo vida!

A toda minha família e aos amigos pelo apoio, sempre me incentivando, em especial às minhas tias Jussara, Fátima e Joana que tanto me apoiaram do início ao fim. Também amo muito vocês.

Aos Profs. Drs. Ronaldo de Carvalho Araújo e Cláudia Bincoletto Trindade pelas importantes informações e dicas sugeridas na qualificação. Muito obrigada.

A banca de defesa composta pelos professores Ronaldo de Carvalho Araújo e Mércia de Paula Lima por aceitarem o convite e também aos professores suplentes: Michelle Freitas, José Geraldo Araújo e Douglas Máscara.

A Amanda Ribeiro, quem me ensinou os primeiros passos sobre os animais e muitos experimentos e esteve por muitas vezes ao meu lado, seja em Mogi, seja em Belo Horizonte e é claro nos congressos maravilhosos.

A Prof^a Dr^a Mércia Paula de Lima da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela amizade e por me ensinar com tanta perfeição, além da enorme dedicação e paciência que teve comigo em todas as vezes que desenvolvi algumas das minhas atividades de laboratório em Belo Horizonte e também a Helen Cristine e a Michelle Freitas, que mesmo correndo com seus trabalhos paravam algumas vezes pra me dar alguma ajuda.

A Prof^a Dr^a Eliane de Sá Lopes Lomez de Belo Horizonte por ensinar e acompanhar os primeiros testes de injeções e concentrações com isoproterenol.

A Prof^a Dr^a Maria aparecida Gomes, também da UFMG por permitir o uso de alguns de seus equipamentos.

A Tatiane Faustino, pela amizade verdadeira que se fez logo na primeira vez em que nos conhecemos, alíás no dia da prova de seleção, e que perdura intensamente entre nós além da Universidade.

Ao grande Prof. Milton Rocha, pelo bom humor de sempre e pela atenção comigo em muitas vezes que precisei de algumas dicas.

A todos os colegas de laboratório da UMC e da Intec: Nélia, Débora, Viviane, Meire, Rodrigo, Eliane, Érika, Silvana, Sandro, Fernando, Thiago, Dani Nifoci e Adriessa, e também àqueles com quem convivi pouco tempo: Anderson, Dani Sgai e Elice, mas que de alguma forma me ajudaram respondendo uma pergunta ou ensinando com o manejo dos animais. Em especial a Meire pela amizade e por me ajudar em muitos experimentos e momentos difíceis, que se tornaram maravilhosos em sua presença; ao João e a Débora, pelas dicas e por alguns “quebra galhos”, ao Eurípedes pela enorme ajuda em alguns experimentos com os animais, a Elice pelas importantes dicas trocadas por emails e ao Prof. Dr. Douglas máscara por ceder reagentes e equipamentos e pelo convívio dia a dia em seu laboratório.

Ao veterinário do biotério Dr. Maurício Marques de Oliveira pelas dicas durante uma conversa e outra.

Aos técnicos do biotério Douglas e Paulo pela enorme ajuda com os animais e incentivo em momentos de preocupação.

Ao prof. Dr. Ivarne Tersariol por permitir o uso do fluorímetro de seu laboratório.

A prof^a Dr^a Adriana Karaoglanivic Carmona, que gentilmente cedeu o substrato Abz-FRK(Dnp)P.

Ao pessoal do laboratório das professoras Renata Guimarães Moreira e Elisa Espósito que por várias vezes nos emprestaram algum equipamento.

A todos os amigos da Diretoria de Ensino da Região de Jacareí, onde trabalhei durante o período do mestrado, pela compreensão e incentivo nas dificuldades que encontrei pelo caminho.

Aos amigos da USP: Rodrigo Martins, Rodrigo Labat, Luciano Ramos e Sócrates, pela ótima companhia durante o período em que cursei a disciplina externa e por abrir as portas várias vezes, em especial a Ana Paula Couto Davel, pessoa admirável que me recebeu tão bem e desde então sempre me ajudou a esclarecer dúvidas referentes aos tratamentos.

RESUMO

A hipertrofia cardíaca (HC) é uma manifestação pré-clínica de doenças cardiovasculares que fortemente predizem o infarto do miocárdio, derrame e morte em pacientes hipertensos e na população geral. De origem complexa e multifatorial, ela ocorre como resposta do miocárdio que procura se adaptar a sobrecargas de pressão crônica, a fim de manter a perfusão tecidual. Porém, por mecanismos ainda não completamente elucidados, ela progride para uma disfunção ventricular esquerda e falha cardíaca, e contribui fortemente para morbidade e mortalidade em humanos. A angiotensina II (Ang II), molécula gerada pelo sistema renina-angiotensina (SRA) medeia funções importantes como o tônus vascular coronário, efeito inotrópico e cronotrópico positivos e participa no desenvolvimento da HC por meio dos receptores AT₁. A Ang II pode ser gerada por outras vias enzimáticas, sendo a tonina uma serinil proteínase importante, pois é capaz de gerar Ang II tanto a partir da angiotensina I (Ang I) como diretamente do angiotensinogênio (AG). Com o objetivo de avaliar a participação da tonina na hipertrofia cardíaca utilizamos um modelo transgênico de camundongo que expressa tonina de rato TGM(rTon). Sabendo que tonina é dependente de estimulação adrenérgica, administramos isoproterenol (20 mg/kg/dia, s.c.), um agonista β -adrenérgico clássico, por 7 dias, para obter o modelo de hipertrofia cardíaca. Foram utilizados 34 camundongos TGM(rTon) e 35 selvagens (WT), machos com idade entre 10 e 12 semanas e subdivididos em 2 grupos, sendo um tratado com droga e outro apenas com veículo (óleo) para controle. Após tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os corações foram rapidamente removidos, lavados com salina e suas estruturas (átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo) separadas e utilizadas nos experimentos. Nenhum dos grupos estudados apresentou alterações significativas na massa corporal devido ao tratamento com isoproterenol. O grupo WT apresentou hipertrofia cardíaca significativa devido ao aumento do ventrículo esquerdo o que não foi observado no grupo TGM(rTon), o qual apresentou hipertrofia apenas nos átrios. O maior nível de mRNA tonina nos camundongos TGM(rTon) foi observada no VE e diminuiu nos átrios após o tratamento. A atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) sofreu alterações significativas somente nos átrios dos dois grupos, diminuiu no WT e aumentou no TGM(rTon). A atividade tonina-símile diminuiu significativamente no VE apenas dos animais WT. A presença da tonina, verificada por meio de Western blot, aumentou nos átrios e VD dos dois grupos mas diminuiu fortemente no VE do grupo WT. Nossos dados mostram que parece não haver correlação entre os parâmetros analisados com HC e que tonina pode ter gerado uma resposta fisiológica cardioprotetora na hipertrofia ventricular esquerda induzida por isoproterenol. Portanto, estudos futuros serão de grande importância para compreender melhor a possível participação dessa enzima em outras vias metabólicas, bem como sua interação no processo de hipertrofia cardíaca.

Palavras-chave: hipertrofia cardíaca, angiotensina II, isoproterenol, tonina.

ABSTRACT

The cardiac hypertrophy (CH) is a cardinal manifestation of preclinical cardiovascular disease that strongly predicts myocardial infarction, stroke, and car

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ativação da via β -adrenérgica e os efeitos fisiológicos no miocárdio	16
Figura 2	Esquema do sistema renina angiotensina clássico.....	20
Figura 3	Principais efeitos promovidos pela Ang II tanto na região central como periférica através do receptor AT ₁	21
Figura 4	Vias alternativas para geração de angiotensina II.....	24
Figura 5	Curva padrão do radioimunoensaio.....	39
Figura 6	Géis de agarose 1% mostrando os produtos de PCR de amostras provenientes de animais considerados transgênicos (TGM(rTon)) e selvagens (WT).....	43
Figura 7	Massa corporal dos animais tratados com isoproterenol (ISO) ou com óleo (C) no início (I) e no término (T) do tratamento.....	44
Figura 8	Relação entre a massa de cada estrutura cardíaca corrigida pela tibia (mg/cm) dos animais WT e TGM(rTon) dos grupos controle (óleo) e tratado (ISO).....	45
Figura 9	RT-PCR de RNA total das estruturas do coração dos animais TGM(rTon) e controle β -actina.....	46
Figura 10	Atividade tonina-símile expressa em moles de Ang II liberados por minuto e miligrama de proteína das estruturas cardíacas provenientes de WT (A) e TGM(rTon) (B), tratados com ISO ou óleo (CT).....	49
Figura 11	Imunoreatividade a tonina nas estruturas cardíacas utilizando-se de anticorpo anti-tonina.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Componentes utilizados para construção da curva-padrão do radioimunoensaio.....	39
TABELA 2	Atividade da ECA nos animais WT.....	47
TABELA 3	Atividade da ECA nos animais TGM(rTon).....	48
TABELA 4	Massa corporal expressa em gramas, de todos os grupos experimentais (APÊNDICE A).....	69
TABELA 5	Parâmetros de massa das estruturas com relação ao comprimento da tíbia após tratamento dos animais selvagens (WT) e TGM(rTon) com isoproterenol (ISO) e com óleo (APÊNDICE B).....	71
TABELA 6	Atividade tonina-símile expressa em moles de Ang II x 10 ¹⁰ liberados por minuto e miligrama de proteína das estruturas cardíacas provenientes de WT e TGM(rTon), tratados com ISO e óleo, utilizando a técnica de radioimunoensaio (APÊNDICE C).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HC	Hipertrofia Cardíaca
HVE	Hipertrofia Ventricular Esquerda
MVE	Massa Ventricular Esquerda
MEC	Matriz Extracelular
SRA	Sistema Renina Angiotensina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
AG	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina tipo 2
TDP	Tetradecapeptídeo – substrato sintético da renina
mRNA	RNA mensageiro
TGM(rTon)	Camundongo transgênico que expressa tonina de rato
WT	Camundongo selvagem
DFP	Diisopropilfluorofosfato
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
RIE	Radioimunoensaio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ISO	Isoproterenol
DEP	Água contendo dietilpirocarbonato
RT	Transcriptase reversa
TFA	Ácido trifluoroacético
LNE	Ligação não específica
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBST	Salina tamponada com fosfato contendo tween
BSA	Soroalbumina bovina
AT	Átrios (direito + esquerdo)
VD	Ventrículo direito

VE	Ventrículo esquerdo
G _s	Proteína G estimulatória
cAMP	AMP cíclico
PKA	Proteinoquinase A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Hipertrofia cardíaca.....	15
1.2 Sistema renina angiotensina (SRA).....	19
1.3 Sistema renina angiotensina cardíaco.....	22
1.4 Vias alternativas para geração da angiotensina II.....	23
1.5 Sistema tonina-angiotensina.....	24
1.6 Animais Transgênicos.....	26
1.7 Camundongo transgênico tonina.....	26
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3 MÉTODO.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Anticorpos	29
3.3 Iniciadores	29
3.3 Genotipagem de camundongos.....	30
3.3.1 Extração de DNA.....	30
3.3.2 Reação em cadeia da polimerase.....	31
3.3.3 Eletroforese em agarose.....	31
3.4 Hipertrofia cardíaca.....	32
3.4.1 Desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.....	32
3.4.2 Dissecção das estruturas do coração.....	32
3.4.3 Dissecção da tibia.....	33
3.5 Níveis de expressão.....	33
3.5.1 Extração de RNA total.....	33
3.5.2 Transcrição reversa (RT).....	34
3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese.....	34
3.6 Atividade da enzima conversora de angiotensina.....	35
3.7 Atividade tonina-símile.....	35
3.7.1 incubação.....	36
3.7.2 Radiomarcagem da angiotensina II.....	37

3.7.3 Radioimunoensaio para angiotensina II.....	37
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	40
3.8.1 Preparação do gel.....	40
3.8.2 Preparação das amostras.....	40
3.9 Eletrotransferência.....	41
3.10 Dosagem de proteína.....	41
3.11 Análise dos dados.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Genotipagem.....	43
4.2 Hipertrofia cardíaca.....	44
4.3 Análise de expressão de mRNA tonina.....	46
4.4 Atividade da enzima conversora de angiotensina.....	47
4.5 Atividade tonina-símile.....	48
4.6 Western blot.....	49
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICES.....	68
ANEXO.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertrofia cardíaca

O coração tem como função principal manter o débito cardíaco adequado a fim de satisfazer as necessidades metabólicas do organismo (KRIEGER, 1979). Ele é constituído por vários tipos de células incluindo fibroblastos, cardiomiócitos, células endoteliais, pericitos, células musculares lisas e células do sistema imunológico (CARRENO e cols, 2006). O aumento macroscópico do coração assim como o aumento da espessura da parede e/ou septo interventricular é denominado hipertrofia cardíaca (HC). Nas células, a HC é caracterizada pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos e síntese de proteínas e reativação do programa de genes fetais (AKASAWA e KOMURO, 2003). Alterações morfológicas significantes surgem com o aparecimento de fibrose e dilatação da câmara. (FREY e cols, 2004). A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é um evento multifatorial, sendo a causa mais comum a hipertensão (OLCAY e cols, 2007).

O aumento da massa ventricular esquerda (MVE) é causado pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos e seu conteúdo de proteínas, considerado uma resposta adaptativa do coração para manter os batimentos cardíacos e a perfusão tecidual (BOOZ, 2005). Portanto, a HC surge como resposta do miocárdio que procura se adaptar às sobrecargas sustentadas de trabalho (BREGAGNOLL e cols, 2005) e permite ao organismo manter ou aumentar seu rendimento cardíaco (CARRENO e cols. 2006). Um grande número de condições fisiológicas e patológicas são capazes de iniciar essa resposta (WIKINS e MOLKENTIN, 2002). Mutações das proteínas sarcoméricas, pressão ou volume de estresse, ou a perda da massa contrátil antes do infarto são alguns fatores que promovem o crescimento do coração (FREY e cols, 2004).

Diferentes métodos são utilizados para gerar modelos de animais com HC e assim possibilitar estudos visando melhores esclarecimentos sobre a doença. Entre eles está a administração de isoproterenol. Como mostra a figura 1, essa droga

interage, na membrana, com o receptor β -adrenérgico que promove a troca de GDP por GTP ativando a proteína G estimulatória (G_s), na qual está acoplado. A subunidade α da proteína G se dissocia do complexo $\beta\gamma$ e se fixa a uma molécula de adenil ciclase ativando-a a produzir AMP cíclico (cAMP). O cAMP então ativa a proteinoquinase dependente de cAMP (PKA) que promove a fosforilação de proteínas, acarretando ativação e desativação de diferentes enzimas, causando uma variedade de efeitos biológicos no músculo cardíaco. Tais efeitos têm sido chamados de efeitos β -adrenérgicos. A proteína G_s ativada pela ligação do isoproterenol atua também diretamente nos canais de cálcio do sarcolema, promovendo aumento de sua permeabilidade. A PKA ativada, por sua vez, também promove fosforilação dos canais de cálcio do sarcolema. O resultado é o aumento da concentração de cálcio do citosol, ocasionando efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração). Essa ação β -adrenérgica sobre o nó sinusal promove efeito cronotrópico (aumento da velocidade de geração de estímulos e portanto, aumento de batimentos cardíacos) e sobre o nó atrioventricular, feixe de His e fibras de Purkinje acarreta efeito dromotrópico (aumento da velocidade de condução do impulso) (BARROS e cols, 1999). No coração, esses efeitos são mediados pelos subtipos de receptores adrenérgicos β_1 e β_2 (BRUM e cols, 2006).

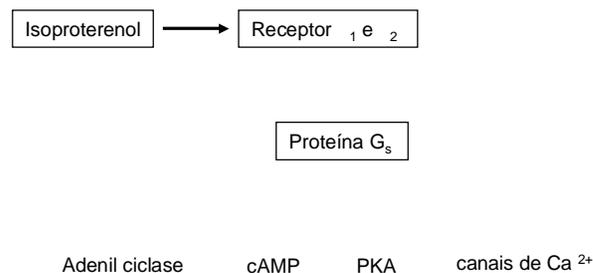


Figura 1. Ativação da via β -adrenérgica e os efeitos fisiológicos no miocárdio. Modificado de Barros e cols. 1999.

A hipertrofia é encontrada em várias condições patológicas do coração, como isquemia, hipertensão, falha cardíaca, problemas valvulares (FREY e cols, 2004) infarto do miocárdio, cardiomiopatia e estenose aórtica (BARAUNA, 2006), as quais impõem ao coração um trabalho demasiado e assim submetem os cardiomiócitos

pós-natais à hipertrofia cardíaca (AKASAWA e KOMURO, 2003). Em contraste com a hiperplasia, a qual envolve proliferação de células (KEE e cols, 2006), o aumento do tamanho do coração ou volume miofibrilar ocorre sem alteração no número dos miócitos (DEVEREUX e cols, 2004), os quais são células terminantemente diferenciadas e perdem sua habilidade de proliferação após o nascimento. Portanto, crescem individualmente, em tamanho (HEINEKE e MOLKENTIN, 2006), sem sofrer divisão celular para se adaptar ao aumento da demanda de trabalho (AKASAWA e KOMURO, 2003). O crescimento dos miócitos cardíacos em comprimento e/ou largura implica no aumento da função da bomba cardíaca, a fim de diminuir a tensão na parede ventricular, o que induz um estado de hipertrofia compensatória (HEINEKE e MOLKENTIN, 2006). Ao contrário dos miócitos cardíacos, os fibroblastos sofrem hiperplasia, ou seja, podem se proliferar no coração adulto (KEE e cols, 2006) e, além disso, possuem importante papel na produção de proteínas da matriz extracelular (MEC), tais como a fibronectina e colágeno, as quais participam criticamente no desenvolvimento da fibrose cardíaca (KIM e IWAHO, 2000).

Enquanto a hipertrofia cardíaca é vista como uma resposta tipicamente compensatória que normaliza o estresse na parede ventricular, a hipertrofia sustentada está correlacionada com o aumento de incidência de doenças cardiovasculares e mortalidade (WIKINS e MOLKENTIN, 2002). Inicialmente adaptável, a HVE pode progredir ao longo do tempo e, por mecanismos não completamente compreendidos, termina freqüentemente com disfunção sistólica ventricular esquerda e falha cardíaca (FAULX e cols, 2007). A longo prazo, a hipertrofia do miocárdio torna-se um fator de risco de grande importância para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (CARRENO e cols, 2006) e predispõe o indivíduo a falhas (PELLIEUX e cols, 2006), arritmia ventricular e atrial (ZHANG e cols, 2006) e morte súbita (BREGAGNOLLO e cols, 2005), devido ao prolongamento do potencial de ação dos miócitos (WIKINS e MOLKENTIN, 2002).

O desenvolvimento da HC e a progressão de doenças rumo à falha cardíaca incluem, além da hipertrofia dos cardiomiócitos, hiperplasia dos fibroblastos, alteração na composição do tecido intersticial e remodelamento ventricular, independente da etiologia. O remodelamento miocárdial inclui alteração na composição e distribuição da MEC, bem como alterações na orientação espacial de células e componentes intracelulares. O aumento da síntese e secreção das

proteínas de MEC, tais como, fibronectina, laminina, colágenos I e III, ocorre principalmente pelos fibroblastos e resultam em fibrose cardíaca (LISE e cols, 2000).

Segundo Osler (1901), a hipertrofia cardíaca é compreendida de três fases: 1) desenvolvimento da HC do ventrículo esquerdo; 2) fase de compensação completa, na qual o coração, mesmo com sua estrutura modificada consegue manter um fluxo sanguíneo tecidual adequado às necessidades metabólicas teciduais e 3) fase de perda da compensação completa e início do desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva. Em outras palavras, Frey e cols. (2004), também a definiram em três estágios: 1) desenvolvimento da hipertrofia, na qual a carga excede o rendimento; 2) hipertrofia compensatória, na qual a proporção carga de trabalho/massa é normalizada e a latência dos batimentos cardíacos é mantida e 3) falha cardíaca evidente, com dilatação ventricular e declínio progressivo nos batimentos cardíacos mesmo na contínua ativação do programa hipertrófico.

A HVE é uma manifestação pré-clínica de doenças cardiovasculares que fortemente predizem o infarto do miocárdio, derrame e morte cardiovascular em pacientes hipertensos, na população geral e em pacientes com doença na artéria coronária. Os eventos cardiovasculares aumentam entre duas a quatro vezes na presença da HVE. (DEVEREUX e cols, 2004). Porém, a HVE é um fator de risco independente em eventos cardiovasculares (TANIGUCH e cols, 2006). Sua presença em humanos contribui de forma independente para a mortalidade e morbidade cardiovascular, especialmente porque se relaciona à falha do coração (FAULX e cols, 2007).

A HVE é uma adaptação muito freqüente em pacientes hipertensos e em alguns aspectos ela parece ser um paradoxo. Ela atenua o efeito da sobrecarga de pressão que a hipertensão promove sobre a parede do ventrículo esquerdo e aumenta a função contrátil global do coração. Por outro lado, a sua presença está relacionada com o aumento de risco cardiovascular expresso por insuficiência cardíaca e morte súbita (SILVA e cols, 2002). A HVE ocorre em 15 a 20% dos pacientes hipertensos. Quando a HVE é considerada uma variável contínua, há uma relação direta e progressiva entre o risco cardiovascular e o valor absoluto da massa ventricular (DIAMOND e PHILLIPS, 2005). Diante disso, a redução da HC e da pressão sanguínea sistêmica são objetivos importantes na terapia anti-hipertensiva (TAKAHASHI e cols, 2006). No entanto, nem todas as formas de hipertrofia cardíaca são necessariamente patológicas (HEINEKE e MOLKENTIN, 2006). Condições

atléticas podem estimular o crescimento do coração sem gerar conseqüências deletérias (WILKINS e cols, 2004). O fenômeno clínico é conhecido como “coração de atleta” e definido como hipertrofia fisiológica, a qual é induzida por treinamento de exercícios regulares que promovem alterações no crescimento dos miócitos do coração, porém são reversíveis e não progridem para a descompensação (WIKINS e MOKKENTIN, 2002). A diferença entre hipertrofia adaptativa e não adaptativa tem sido descrita há mais de um século (FREY e cols, 2004).

Como dito anteriormente, a HVE é a complicação cardíaca mais comum causada pela hipertensão. Porém, tem sido mostrado que a HVE não é somente atribuível à pressão alta, mas também a fatores humorais, como a angiotensina II (Ang II) e a aldosterona (MATSUMURA e cols, 2006). Mais que 60% da variação da HVE pode ocorrer devido a fatores genéticos independentes da pressão sanguínea. A maioria parece estar relacionada ao sistema renina angiotensina (SRA), embora muitas variações genéticas identificadas parecem afetar outras vias (DIAMOND e PHILLIPS, 2005).

1.2 Sistema renina angiotensina

No sistema renina angiotensina clássico, como mostra a figura 2, a renina, uma enzima proteolítica produzida e armazenada no aparelho justaglomerular dos rins é liberada na circulação por meio de estímulos, como a diminuição do volume de fluido extracelular, do índice de sódio ou pressão de perfusão. A renina liberada catalisa a geração da angiotensina I (Ang I), um peptídeo inativo, a partir de seu substrato natural, o angiotensinogênio (AG) presente em quantidades abundantes no plasma circulante. A Ang I é rapidamente convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) no octapeptídeo Ang II. Essa conversão ocorre no plasma circulante bem como nos tecidos. As angiotensinas podem ser degradadas pelas angiotensinases, presentes nos tecidos e no plasma circulante (SONNENBLICK e cols, 1989).

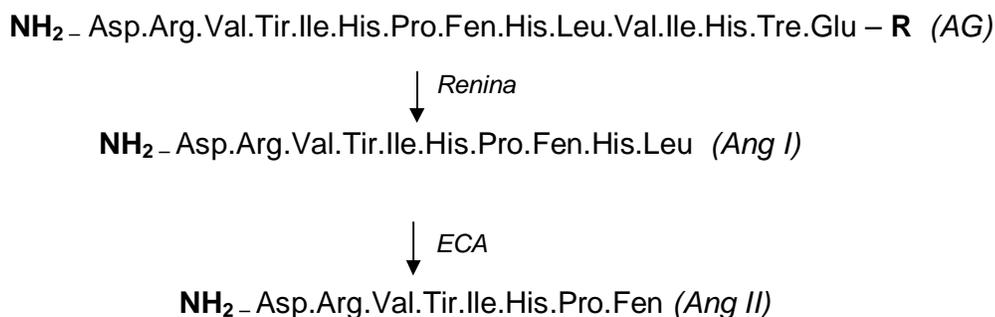


Figura 2. Esquema do sistema renina angiotensina clássico.

Estudos prévios mostram que inibidores da ECA previnem a progressão e induzem regressão da hipertrofia cardíaca em pacientes hipertensos. Em modelos animais experimentais os componentes do SRA, incluindo AG e a ECA, estão elevados no coração hipertrofiado. A ativação do SRA, resultando em elevação da pressão sanguínea, tem papel principal nas patogêneses da hipertensão, aterosclerose e hipertrofia cardíaca (GROTE e cols, 2006). O grau de ativação do SRA depende principalmente do nível de produção de renina pelos rins e AG pelo fígado. Em condições fisiológicas, a produção de renina pelo aparelho justaglomerular aumenta em resposta à diminuição do volume extracelular, redução do sódio plasmático, elevação de potássio, ou ainda, secundariamente à queda da pressão arterial. A regulação fisiológica da produção de AG é menos conhecida, sabendo-se apenas que seus níveis aumentam durante a gravidez ou em resposta ao uso de anticoncepcionais orais, ou ainda durante a administração de doses elevadas de corticosteróides (MILL e cols, 1997).

A Ang II é um peptídeo importante do SRA e exerce uma enorme variedade de ações. Devido a sua contribuição fisiológica na função endócrina, renal e cardiovascular, bem como seu papel osmoregulatório no sistema nervoso central, a Ang II tem sido envolvida na patogênese da hipertensão arterial e patologias cardiovasculares como a HVE, a hipertrofia média vascular ou formação de neoíntima e alterações estruturais do rim e coração, como nefrosclerose e remodelamento pós-infarto (MANCIA, 2000). Possui várias ações deletérias como vasoconstrição e elevação da pressão sanguínea, aumento da liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, aumento de retenção de sódio e água pelos rins, aumento da atividade sinérgica com relação às catecolaminas (noradrenalina e

adrenalina) liberadas pelos neurônios simpáticos, estimula a proliferação celular e a hipertrofia ventricular esquerda (MANCIA, 2000).

A Ang II medeia seus efeitos diretamente através dos receptores do tipo 1 (AT_1) ou do tipo 2 (AT_2). Alguns dos principais efeitos sobre os receptores AT_1 são mostrados na figura 3.

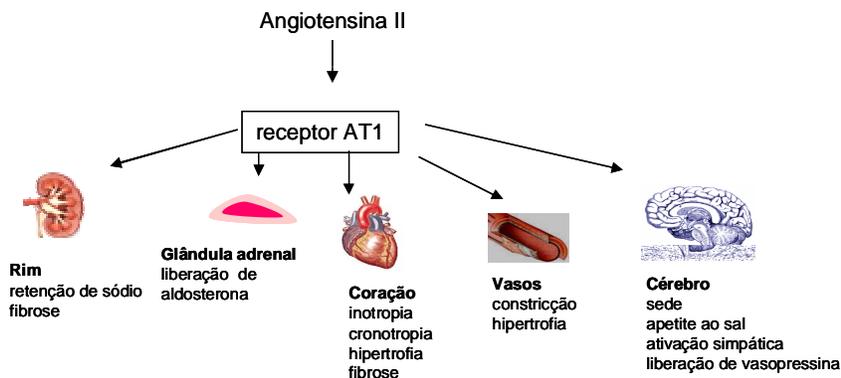


Figura 3. Principais efeitos promovidos pela Ang II na região central e periférica mediados pelos receptores AT_1 .

A Ang II se liga com alta afinidade nos receptores AT_1 e AT_2 , os quais são proteínas transmembranas acoplados a proteína G (AMORE e cols, 2005). O receptor AT_1 , em humanos, está distribuído nos sistemas cardiovascular, renal, endócrino e nervoso. Biópsias de miocárdio humano demonstraram que o AT_1 está presente nos miócitos atriais e ventriculares e também nos fibroblastos. Em roedores, existem dois subtipos funcionais de AT_1 , o AT_{1A} e o AT_{1B} , com mais de 95% de homologia na seqüência de aminoácidos.

A ativação do receptor AT_1 estimula a vasoconstrição, hipertrofia e hiperplasia de células vasculares e leva a retenção de sódio. Outros efeitos fisiológicos recentemente descritos incluem a estimulação e produção de espécies reativas de oxigênio e indução de processos fibróticos, trombóticos e inflamatórios, sendo este último mediado através da transcrição do fator nuclear κB . Além disso, alguns dos efeitos do AT_1 em alguns tipos de células têm sido opostos ao esperado, como por exemplo, estimular a apoptose (BERRY e cols, 2001). A Ang II age ainda por meio do receptor AT_1 para estimular o crescimento do tecido cardíaco e vascular, aumentar a deposição de colágeno e induzir disfunção endotelial vascular devido à diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (YOKOYAMA e cols, 2005).

A segunda maior isoforma de receptor de angiotensina é o AT₂. Ele possui baixa homologia (aproximadamente 34%) com os receptores AT_{1A} ou AT_{1B}. Sua expressão é detectável no pâncreas, coração, rins, adrenais, cérebro e vasos sanguíneos. Já foi detectado nos vasos sanguíneos mesentéricos de ratos adultos, mas não em todos os leitos vasculares. O AT₂ é altamente expresso na fase fetal e em células endoteliais, mas sua expressão diminui drasticamente após o nascimento. No entanto, em humanos adultos, baixos níveis de expressão de AT₂ aparecem nas artérias aorta e coronária. Já é sabido que esse receptor participa tanto dos processos fisiológicos como em doenças cardiovasculares (WATANABE e cols, 2005). Dados recentes sugerem que o AT₂ pode ter papel fisiológico na regulação da pressão sanguínea e função renal, contrabalançando as ações vasoconstritoras e anti-natriuréticas da Ang II. Em geral, os efeitos cardiovasculares do AT₂ parecem ser opostos aos efeitos do AT₁, devido as suas ações de vasodilatação, anti-crescimento celular e apoptose. Novos efeitos fisiológicos atribuídos ao AT₂ estão relacionados à modulação da sede, comportamento e atividade locomotora. Há necessidade de uma maior compreensão do papel do AT₂ no sistema cardiovascular. Evidências sugerem que uma longa estimulação do AT₂, resultante do bloqueio do AT₁, poderia exercer influências hipertróficas e anti-angiogênicas nos tecidos cardiovasculares, especialmente no miocárdio. Os efeitos fisiológicos e patológicos do AT₁ têm sido recentemente revistos, porém, o papel do receptor AT₂ no sistema cardiovascular permanece ainda não esclarecido (PAVEL, 2005).

Embora o SRA tenha sido inicialmente descrito como um sistema circulante, seus componentes estão localizados em vários tecidos de relevância cardiovascular como o cérebro, coração, adrenais e vasos sanguíneos (LEVY, 2005; MILL e cols, 1997). Provavelmente, a formação de angiotensina local depende, pelo menos em circunstâncias normais, da liberação da renina dos rins para a circulação. Assim, os tecidos podem regular suas concentrações locais de angiotensina pela variação nos níveis de renina ou proteínas ligada à renina, níveis de ECA, e densidade de receptor de angiotensina (LEVY, 2005).

1.3 SRA cardíaco

Todos os componentes do SRA têm sido encontrados nos cardiomiócitos (FLEMING, 2006). Fortes dados sugerem que o SRA local e não o circulante participa criticamente na HC induzida pela pressão alta (KOMURO, 2001). Evidências demonstram que a existência dos componentes do SRA no coração ocorre provavelmente a partir da síntese local de renina e AG. Dessa forma, os efeitos da Ang II no coração seriam decorrentes não só do grau de ativação do SRA endócrino, mas também desse sistema localizado no próprio coração. A Ang II apresenta múltiplas ações no coração, entre elas estão os efeitos inotrópico e cronotrópico positivo por sua ação direta nos miócitos cardíacos e pela estimulação da liberação de norepinefrina dos nervos simpáticos cardíacos (URATA e cols, 1993). Sabe-se que esse efeito inotrópico positivo ocorre por aumento do influxo de cálcio durante a excitação cardíaca, atuando diretamente em receptores AT_1 dos cardiomiócitos. A Ang II também facilita a transmissão adrenérgica ligando-se a receptores pré-juncionais (MILL e cols, 1997). Em resposta a pressão alta, o miocárdio secreta substâncias vasoativas, entre elas a Ang II, a qual induz diversas vias de sinalização intracelular que contribuem para a resposta hipertrófica (SATO e cols, 2006). Ela é responsável pelo aumento da síntese de proteína e o diâmetro celular em cultura de miócitos neonatais de rato, processo que leva diretamente a hipertrofia dos cardiomiócitos (YANG e cols, 2007).

1.4 Vias alternativas para geração de angiotensina II

Não se conhece claramente tudo sobre o SRA, e um grande número de informações nos últimos anos indicam que vários outros substratos da ECA têm marcantes efeitos na homeostase cardiovascular e que existem homólogos a ela que modulam a atividade do SRA clássico (FLEMING, 2006).

Embora os níveis de Ang II circulante diminuam em resposta ao tratamento agudo com inibidores da ECA, esses níveis tendem a aumentar em pacientes

tratados por longo período (FLEMING, 2006). Portanto, esse fenômeno reforça a idéia de que Ang I e Ang II possam ser geradas por outras vias enzimáticas. A Ang I pode ser formada não somente por renina, mas por outras enzimas como a catepsina D, e a Ang I pode ser convertida a Ang II por enzimas como tripsina, catepsina G, quimase e **tonina**, como mostra a figura 4.

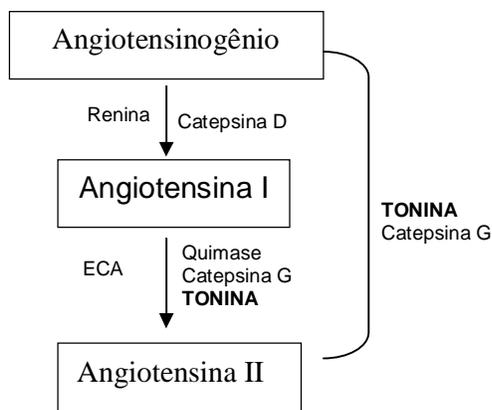


Figura 4. Vias alternativas para geração de angiotensina II.

Vias independentes da ECA podem representar um importante mecanismo para a conversão de Ang I a Ang II no coração, rins e vasos. No entanto, a contribuição dessas vias alternativas para a geração de Ang II circulante permanece não esclarecida (LEVY, 2005). Urata e cols. (1990) descreveram a completa purificação e caracterização da serina proteinase quimase de coração humano, enzima capaz de gerar Ang II que pertencente à família quimase de proteinase de leucócitos. Acredita-se que a quimase seja responsável por mais de 80% da geração da Ang II tecidual cardíaca e mais de 60% nas artérias (FLEMING, 2006). Ela pode representar um importante mecanismo de conversão de Ang I em Ang II no coração humano, rins e vasos, e ser particularmente importante para o desencadeamento de patologias do coração. (BERRY e cols, 2001).

1.5 Sistema tonina-angiotensina

Em 1974, Boucher e cols. mostraram a presença de uma nova enzima capaz de converter Ang I em Ang II na glândula submandibular de rato e por isso essa enzima foi denominada -enzima conversora. Mais tarde Seidah e cols. (1978) verificaram que essa enzima era capaz de hidrolisar também o AG e o tetradecapeptídeo (TDP), substrato sintético da renina, gerando o octapeptídeo Ang II. Esta enzima também mostrou ser diferente da renina ou isoreninas teciduais e da ECA, sendo por isso denominada tonina. Desde então, tonina foi purificada e apresentou ser um polipeptídeo de cadeia simples, composto de 272 aminoácidos, com dez resíduos de cisteína, contendo isoleucina e prolina nas posições N e C-terminais, respectivamente. Seu peso molecular é de 28700 Daltons e seu pH ótimo é 6,8 quando se utiliza como substrato a Ang I (SEIDAH e cols, 1978).

Essa habilidade da tonina em formar Ang II a partir da Ang I e em especial diretamente do AG, além de sua presença na maioria dos tecidos examinados sugeriu um papel fundamental para essa enzima na formação local da Ang II (BOUCHER e cols, 1974). Garcia e cols. (1975), investigaram o efeito de drogas simpatomiméticas e parassimpatomiméticas na liberação da tonina na saliva, e verificaram que o isoproterenol promoveu um aumento de setes vezes na concentração de tonina e cinco vezes no fluxo de saliva, efeitos que foram inibidos com uso prévio de propanolol. Esses resultados sugeriram que a presença da tonina na saliva do rato era dependente de receptores -adrenérgicos. Uma possível relação entre tonina e eletrólitos passou a ser especulada, já que a estimulação simpática da glândula submandibular induziu alterações significativas na concentração de eletrólitos na saliva. Por essa glândula ser essencial na ingestão de água induzida pela hipovolemia sugeriu-sea existência de um mecanismo de controle de volume regulado pela glândula salivar.

Tonina apresenta 75% de homologia na seqüência de aminoácidos com calicreína. No rato, essas duas enzimas estão presentes em locais comuns como glândula submandibular, rins e cérebro. Lopes e cols. (1997) mostraram que atividade tonina, calicreína e angiotensinases estão presentes em várias regiões do cérebro de rato que participam no controle da pressão sanguínea e homeostase de

fluidos biológicos, mostrando a existência de vias alternativas para a liberação de Ang II e cininas em algumas estruturas do cérebro desses animais.

Araujo e cols. (2002), demonstraram que a administração intracerebroventricular de tonina em rato estimulou a ingestão de água, o apetite ao sal e produziu uma elevação na pressão arterial e frequência cardíaca. Tais efeitos foram inibidos por administração prévia de losartan, sugerindo assim a formação de Ang II *in vivo* pela tonina.

Tonina está presente em diversos órgãos como o cérebro, rins, próstata e glândula submandibular e até há pouco tempo não havia informações sobre sua presença no coração de rato. Porém, dados recentes mostram que tanto atividade tonina como seu mRNA estão presentes no coração, sendo os maiores níveis encontrados no átrio. Os dados mostraram ainda que tonina pode estar envolvida com a hipertrofia desse órgão (BORGES e cols, 2003). Atividade elevada de conversão de Ang I em Ang II foi verificada em corações de ratos com HVE adaptativa (LIEB e cols, 2006).

1.6 Animais transgênicos

Diversas evidências para o envolvimento do SRA na modulação da estrutura cardíaca foram obtidas por meio de estudos genéticos (LIEB e cols, 2006). A tecnologia para produção de modelos de animais transgênicos pela integração de seqüência de genes já foi estabelecida há mais de 15 anos. Várias espécies de animais já foram utilizadas, porém a maioria é realizada em camundongos. Bader e Ganten (1996), descreveram a utilização de ratos transgênicos como importantes ferramentas para o estudo do SRA e em sua revisão, Bader (2000) reforçou a importância da tecnologia transgênica como instrumento para caracterização funcional de genes de relevância para regulação e patogênese de doenças cardiovasculares. A tecnologia transgênica permite avaliar o sistema cardiovascular *in vivo*, o que vem contribuindo para a descoberta de novos aspectos do SRA. Portanto, a geração de modelos animais permite ampliar o conhecimento sobre a regulação básica do sistema cardiovascular e dos mecanismos envolvidos na

gênese de doenças como a hipertensão e a HC, a fim de possibilitar a implementação de novas estratégias de terapias para as doenças cardiovasculares.

1.7 Camundongo transgênico tonina

Para uma melhor abordagem dos efeitos fisiológicos da tonina e com a finalidade de entender um pouco mais a respeito de sua participação no controle da função cardiovascular, na pressão arterial e no balanço hidroeletrolítico, um camundongo (linhagem black-6) que expressa tonina de glândula submandibular de rato denominado TGM(rTon) foi gerado por nosso grupo, no Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O animal vem sendo objeto de estudos de caracterização fenotípica, ainda em fase inicial, e apresentou o transgene expresso em diversos tecidos, sendo os maiores níveis no cérebro.

O camundongo TGM(rTon) apresentou tendência ao aumento da pressão arterial e nenhuma alteração na frequência cardíaca. Estes dados sugerem a participação da tonina no processo de formação de angiotensina II *in vivo*.

2 Objetivos

2.1 Geral

Considerando os dados pré-existentes, que mostram que tonina *in vitro* é capaz de liberar angiotensina II, e que esta enzima pode estar envolvida no processo de hipertrofia cardíaca, pretendemos induzir e estudar a resposta hipertrófica cardíaca em camundongo transgênico que expressa tonina de rato pelo tratamento com isoproterenol, um agonista β -adrenérgico.

2.2 Específicos

Pretendemos submeter os animais TGM(rTon) e seu controle, o animal selvagem, ao tratamento com isoproterenol, e em cada estrutura cardíaca:

1. Analisar a resposta hipertrófica cardíaca desse modelo experimental;
2. Determinar a expressão do mRNA tonina;
3. Determinar os níveis de atividade tonina-símile;
4. Determinar os níveis de atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA).

3. Método

3.1 Animais

Foram utilizados 69 camundongos machos, adultos (12 semanas), pesando em torno 25 a 30 g, sendo 34 TGM(rTon) e 35 selvagens, provenientes do biotério da Universidade de Mogi das Cruzes. Os animais foram genotipados quatro semanas após o nascimento, classificados em transgênicos tonina (positivos que possuem o transgene do rato) ou selvagens (negativos para o gene da tonina de rato), mantidos em caixas com temperatura ambiente, comida e água a vontade. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Manipulação e Experimentação Animal (CEMEA) (anexo A).

3.2 Anticorpos

O anticorpo anti-Ang II utilizado no radioimunoensaio (RIE), apresentando título de 1/4000 foi produzido no laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, conforme o método proposto por Lemos (1991). O anticorpo anti-tonina de rato também foi produzido neste laboratório utilizando-se tonina isolada de glândula submandibular de rato conforme método proposto por Araujo e cols. (1991).

3.3 Iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase foram os seguintes:

Para genotipagem dos animais:

Tonex 3 5'-AGGTGGTGTGAAGGTTATCG-3'

Tonex 4 5'-CCTCCTTCCATCTCTCCTGC-3'

Para determinação dos níveis de mRNA da tonina:

Tonin 52 5'-ACCTGAACCATGTGGCTCC-3'

Tonin 3 5'-CATGGTGGGTTTTATTGAGAC-3'

Beta-actina de camundongo:

5'-CGAGGCCAGAGCAAGAGAG-3'

5'-AGGAAGAGGATGCGGCAGTGG-3'

3.3 Genotipagem dos camundongos

3.3.1 Extração de DNA

Para a obtenção do DNA genômico foi retirado um pedaço de aproximadamente 0,5 cm da cauda dos camundongos. Cada pedaço de cauda foi colocado em um tubo eppendorf de 1,5 mL, e em seguida foram adicionados 80 µL de tampão tris-HCl 100 mM pH 8,5 contendo NaCl 200 mM e SDS 0,2%, e 8 µL de proteinase K 10 µg/mL. As amostras foram incubadas a 55°C, sob agitação de 550 rpm, por aproximadamente 14 horas. Em seguida foram incubadas a 95°C durante 10 minutos. Em cada amostra foram adicionados 700 µL de TE (tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo EDTA 1 mM) e 8 µL de RNase 4 mg/mL. Novamente as amostras incubadas por 10 minutos a 37°C. Posteriormente estas amostras foram utilizadas para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.3.2 Reação em cadeia da polimerase

Para a identificação dos animais geneticamente modificados foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isto, 1 μL (~0,8 μg de DNA) das amostras foi incubado, a 37°C, com iniciadores específicos para o gene da tonina (tonex 3 e tonex 4). Para a reação também foram utilizados 2,0 μL de tampão de PCR 10x, 0,6 μL de MgCl_2 50 mM, 0,8 μL de dNTPs 10 mM, 1,0 μL de cada iniciador 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 5 U/ μL . O volume foi ajustado para 20 μL com H_2O Milli-Q esterilizada. As amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a 36 ciclos de amplificação, nas seguintes condições: 94° C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 94° C por 1 minuto, 56° C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72° C por 1 minuto para extensão. No final do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72° C por 7 minutos a fim de garantir a extensão completa dos produtos amplificados. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Para a preparação do gel foram utilizados 40 mL de uma solução de agarose 1% e 16 μL de brometo de etídio 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta mistura foi colocada em cubas horizontais de eletroforese para polimerização, contendo tampão TAE (tampão Tris-acetato de sódio 0,04 M contendo EDTA 1 mM, pH ajustado para 7,2). Foram aplicados 10 μL do produto amplificado e 3 μL de tampão de amostra em cada poço do gel. A corrida foi realizada em aproximadamente 30 minutos a uma voltagem constante de 100 V.

3.4 Hipertrofia cardíaca

3.4.1 Desenvolvimento da hipertrofia cardíaca

Para obter o modelo de HC foi utilizado um agonista β -adrenérgico clássico, o isoproterenol (ISO) (JAFFRÉ e cols, 2004). Os animais TGM(rTon) e selvagens foram subdivididos em dois grupos: os tratados com isoproterenol (ISO) (n = 34) e os que receberam somente veículo (CT) (n = 35). A hipertrofia cardíaca foi desenvolvida nos animais do grupo ISO tanto nos animais transgênicos como nos selvagens através do tratamento com injeções subcutâneas do isoproterenol 20 mg/kg/dia. A droga foi diluída em óleo de soja (20 mg/0,1 mL), sonicada por aproximadamente 30 minutos e injetados 0,1 mL por dia durante sete dias consecutivos. Os animais do grupo CT receberam somente injeção de óleo de soja seguindo os mesmos padrões do grupo tratado. Os animais foram pesados antes e após o tratamento para verificação de possíveis alterações na massa corporal.

3.4.2. Dissecação das estruturas do coração

No oitavo dia após o tratamento, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical para excisão dos corações e verificação da hipertrofia cardíaca. O coração foi rapidamente removido, lavado com solução salina (NaCl 0,9%) e as estruturas cardíacas separadas em átrios [direito e esquerdo (AT)], ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE)].

3.4.3. Dissecação da tíbia

Após dissecação das estruturas do coração, a tíbia esquerda de cada animal foi removida e dissecada para servir como parâmetro na verificação da HC. A medição do comprimento da tíbia foi feita com o uso de um paquímetro. A razão entre o peso do coração total e de cada estrutura cardíaca separada (mg) e o comprimento da tíbia (cm) (FREUND e cols, 2005; JAFFRÉ e cols, 2004) foi determinada para estimar a ocorrência da hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com isoproterenol.

3.5. Níveis de expressão

3.5.1. Extração de RNA total

Todas as soluções utilizadas nesta etapa foram preparadas com água contendo dietilpirocarbonato (DEPC). Toda a vidraria foi lavada com água DEPC e submetida à esterilização. O reagente TRIzol (Life Technologies) foi utilizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Quatro animais TGM(rTon) foram sacrificados e os tecidos cardíacos separados foram congelados a -80°C (AT, VD e VE) Posteriormente foram homogeneizados na proporção de 0,1 g de tecido para 1,0 mL de TRIzol. Após homogeneização, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos para completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio a cada amostra, as quais foram incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, ocorreu separação de três fases, sendo a fase aquosa a que contém a mistura de RNAs. Coletou-se esta fase e a ela foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropílico para a

precipitação do RNA total. As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de etanol 75%. Após a lavagem do sedimento com etanol 75% com agitação suave, as amostras foram centrifugadas a 5.000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, após secagem, ressuspensão em água-DEPC. A concentração do RNA nas amostras foi determinada espectrofotometricamente, através da equação:

$$C (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{FD} \times 40$$

Sendo: A_{260} , a absorbância a 260 nm; FD, fator de diluição e 40 o coeficiente determinado considerando-se o coeficiente de extinção para RNA. Portanto, um valor de absorbância igual a 1, para solução contendo RNA fita simples, corresponde a concentração 40 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.2. Transcrição reversa

Para a reação da transcrição reversa (RT) utilizamos o kit da Promega para síntese da primeira fita (cDNA). Amostras contendo 2 μg de RNA total foram incubadas em um volume final de 20 μL de reação, constituída de 4 μL de tampão 5x (tris-HCl 254 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl_2 15 mM, DTT 50 mM), 2,5 μL de dNTPs (10 mM), 1,0 μL de M-MULV (transcriptase reversa - Invitrogen), 1,0 μL de random hexamer primer (50 U/ μL), 1,0 μL de inibidor de RNase (10 U/ μL) e água DEPC para completar o volume final. Utilizando-se de um aparelho termociclador da MJ Research (PTC – 100), esta mistura foi submetida à temperatura de 20°C por 10 minutos, 42°C por 45 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C por 10 minutos.

3.5.3. Reação em cadeia da polimerase e eletroforese

O produto da reação da RT (cDNA) foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em 25 µL de reação, constituída de 2,5 µL de tampão de PCR 10x (tris-HCl 20 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM), 1,25 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,0 mM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, 0,25 µL de Taq polimerase (0,3 U) e água milliq. As amostras foram submetidas a 36 ciclos de amplificação através do seguinte protocolo de incubação: 94°C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 95° C por 1 minuto, 56°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores, e 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final deste último passo, as amostras foram incubadas a 72°C por 7 minutos para assegurar o processo completo de extensão. O mesmo procedimento foi realizado com todas as amostras utilizando iniciadores para beta-actina de camundongo, a fim de utilizar este resultado para comparação da intensidade da expressão. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

3.6 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)

A determinação da atividade da ECA nas estruturas cardíacas foi realizada utilizando o substrato de supressão intramolecular de fluorescência contendo Abz (ácido *orto-aminobenzóico*) na extremidade N-terminal e Dnp acoplado ao grupo - amino do resíduo de lisina (Abz-FRK(Dnp)P-OH), que foi sintetizado pela metodologia da fase sólida (BARLOS e cols, 1989), e gentilmente fornecido pela Dr^a Adriana Carmona, do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Doze animais foram sacrificados e suas estruturas do coração (AT, VD e VE) foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (tris 0,1 M contendo NaCl 0,3 M, Triton X-100 0,2%, pH 7,2) na proporção de 4 mL para cada 1 g de tecido. Após centrifugação a 10.000xg por 10 minutos, amostras do sobrenadante, contendo de 50 a 100 µg de proteína foram incubadas com 15 µL do substrato Abz-FRK(Dnp)P 10 µM, em tampão tris-HCl 100 mM contendo NaCl 50 mM e 10 µM de

ZnCl₂, pH 7,0 em volume final de 2 mL, na ausência ou na presença do inibidor da ECA, captopril 2 µM. A hidrólise do substrato, a 37°C, foi acompanhada pela leitura da fluorescência em fluorímetro Hitachi F-2500, com excitação a 320 nm e emissão a 420 nm, com abertura de 5/5 a 700 V. Como controle da reação, a variação da fluorescência foi determinada na ausência da amostra. A atividade da ECA para cada tecido foi calculada dividindo-se o valor da fluorescência pelo coeficiente de extinção do grupamento Abz, igual a 12828 M⁻¹cm⁻¹ e expressa como atividade específica (moles de produto formado por minuto por miligrama de proteína).

3.7 Atividade tonina-símile

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório de Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio da Profa Dra Mércia de Paula Lima, do Depto de Enfermagem Básica da Escola de Enfermagem da UFMG.

3.7.1 Incubação

Para determinação da atividade tonina-símile, os animais foram sacrificados e os tecidos cardíacos foram retirados e homogeneizados na proporção de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização, constituído de solução sacarose 250 mM contendo os seguintes inibidores a 10 mM (0-fenantrolina, EDTA, tetrato de sódio e 2,2-dipiridil) e pH ajustado para 7,0. Amostras do sobrenadante do homogenato de cada estrutura do coração, contendo 2 µg de proteína, foram incubadas com 5 µg do substrato tetradecapeptídico sintético correspondente a porção N-terminal do AG. O volume final foi ajustado para 180 µL com adição de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 contendo os inibidores descritos acima. A angiotensina II liberada no meio de incubação foi determinada através de radioimunoensaio (GUALBERTO e cols, 1992).

3.7.2 Radiomarcção da angiotensina II

Para a radiomarcção da angiotensina II utilizamos o método proposto por Nielsen e cols, (1971), no qual emprega-se a cloramina T como agente oxidante. Para cada 50 µg de Ang II, que foi dissolvida em 10 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,4, foram adicionados 1,0 mCi de ^{125}I e 50 µg de cloramina T dissolvida em 500 µL de tampão fosfato 0,5 M pH 7,4. Após um minuto de reação e agitação em vórtex, a mesma foi interrompida pela adição de 150 µL de uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). A purificação da Ang II monoiodada foi realizada utilizando-se de coluna de fase reversa (MinoRPC) em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. A coluna foi eluída com uma solução de acetonitrila 25% (v/v) em TFA 0,1% (v/v) num fluxo de 1,0 mL por minuto. A radioatividade das frações coletadas foi determinada por meio de um cintilador gama. Em seguida foi determinada a capacidade de ligação das frações obtidas na cromatografia, incubando-as com o anticorpo anti-Ang II por um período de 18 horas à temperatura de 4°C. A capacidade de ligação foi determinada pela relação Bo/T, sendo Bo a radioatividade ligada ao anticorpo e T a radioatividade total utilizada na incubação. As frações que apresentaram capacidade de ligação entre 25 e 50% foram estocadas a -20°C e utilizadas para a realização dos ensaios para verificação de atividade tonina símile.

3.7.3 Radioimunoensaio para angiotensina II

Utilizamos solução padrão estoque de Ang II, em torno de 10^{-3} M, que foi diluída seriadamente até uma faixa de concentração de 10^{-8} a 10^{-10} M, como mostra a tabela 1, em tampão fosfato de sódio 0,02 M contendo gelatina 0,1% (p/v), azida sódica 0,1% (p/v), NaCl 150 mM e EDTA 1 mM e pH ajustado para 7,4 (tampão RIE), para a construção da curva padrão mostrada na figura 4. As amostras foram ensaiadas em triplicatas e os padrões de angiotensina em duplicata. O volume de angiotensina padrão foi pipetado a cada tubo da curva, onde variou de 40 a 240 µL.

A angiotensina marcada (^{125}I -Ang II) foi inicialmente diluída em tampão RIE de modo a ser obtido aproximadamente 7000 cpm em 100 μL de solução. Desta solução foram pipetados 100 μL em cada tubo do ensaio. A seguir, 50 μL das amostras (diluídas 50 x) provenientes das incubações prévias, como descrito anteriormente, foram pipetadas em triplicatas. Após esta etapa, foram pipetados 100 μL de anticorpo anti-angiotensina II (diluído 1/4000) em todos os tubos do ensaio, exceto nos referentes à ligação não específica (LNE) e total. O volume de cada tubo foi ajustado para 500 μL com tampão RIE. Após agitação dos tubos, estes foram incubados a 4°C por 20 horas. Transcorrido este período, fizemos a separação da

Tabela 1. Componentes utilizados para construção da curva-padrão do radioimunoensaio.

Ang II não marcada (M)	*Ang II-I ¹²⁵	**Anticorpo	Tampão	Volume final
$1,0 \times 10^{-8}$	100 μ L	100 μ L	180 μ L	500 μ L
$5,0 \times 10^{-9}$	100 μ L	100 μ L	60 μ L	500 μ L
$2,5 \times 10^{-9}$	100 μ L	100 μ L	252 μ L	500 μ L
$1,0 \times 10^{-9}$	100 μ L	100 μ L	220 μ L	500 μ L
$6,0 \times 10^{-10}$	100 μ L	100 μ L	100 μ L	500 μ L
$3,0 \times 10^{-10}$	100 μ L	100 μ L	260 μ L	500 μ L
$1,5 \times 10^{-10}$	100 μ L	100 μ L	220 μ L	500 μ L
$0,75 \times 10^{-10}$	100 μ L	100 μ L	100 μ L	500 μ L
B0	100 μ L	100 μ L	300 μ L	500 μ L
LNE	100 μ L	-	400 μ L	500 μ L
TOTAL	100 μ L	-	400 μ L	500 μ L

* 7.000 cpm/100 μ L; **Anticorpo diluído 150 vezes.

Os resultados foram projetados em papel log-logit (figura 5) para extrapolação dos valores referentes as amostras.

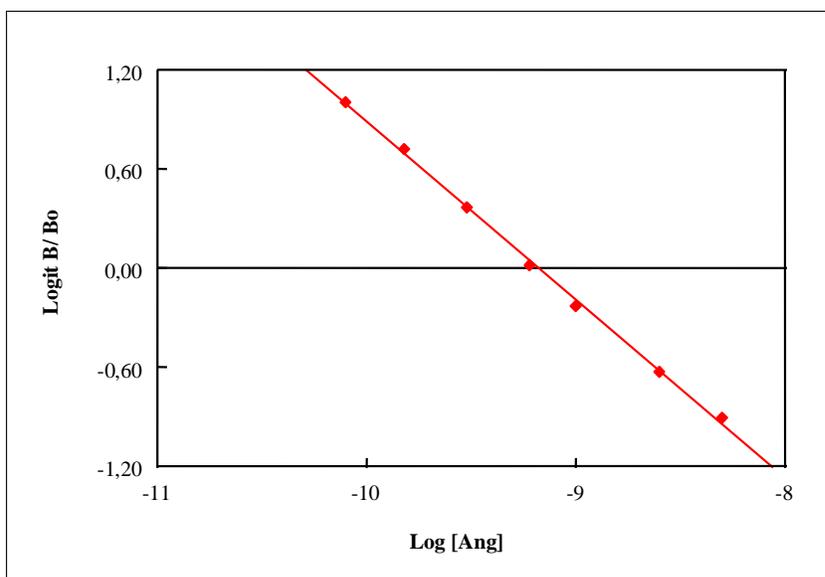


Figura 5. Curva padrão do radioimunoensaio.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A corrida eletroforética foi efetuada a temperatura ambiente, com o tampão de corrida (Tris-HCl 120 mM contendo SDS 17 mM e glicina 93 mM) e tensão constante de 100 volts durante duas horas. O gel de poliacrilamida, na concentração de 12,5%, foi preparado conforme o método descrito por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi efetuada em temperatura ambiente, com tampão Tris-glicina 0,02 M (pH 8,3), tanto para o ânodo quanto para o cátodo e tensão constante de 100 volts durante 50 minutos.

3.8.1 Preparação do gel

O gel de corrida foi constituído de uma solução de acrilamida-bisacrilamida a 12,5% em tampão tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, contendo SDS 0,1%. Foi acrescentada uma solução de persulfato de amônio a 10% e TEMED puro, que são os agentes responsáveis pela polimerização, em quantidades suficientes para concentração final destes reagentes em torno de 1%. O gel de concentração, constituído a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida 5% foi preparado de forma idêntica, sendo utilizado tampão tris-HCl 0,25(c)dHCl pH 2(6n)25(,)-19(8)4(.)] TJ ET Q q BT /F5 11.28 Tf amostras e o125(s)-9 p225(a)4(d)-16(r)-6ões de massa moeular foram leados erura durant

3.9 Eletrotransferência

Após a corrida, foi realizada a transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose Hybond-C, a 20 mA, pernoite, sendo a miliaperagem duplicada na última hora. A membrana foi incubada com tampão fosfato de sódio 35 mM contendo 150 mM de NaCl (PBS) e tween-20 0,3% (PBST) por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBST (tween 0,05%) de 5 minutos cada, sob agitação. Após as lavagens a membrana foi incubada com anticorpo anti-tonina, por duas horas, à temperatura ambiente. Novamente a membrana foi lavada por três vezes com o PBST 0,05% e incubada com IgG anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase, por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada novamente três vezes com o mesmo tampão, e duas lavagens com PBS. A revelação foi realizada com diaminobenzidina 0,05%, cloronaftol 0,025% (p/v) e peróxido de hidrogênio a 0,0125% (v/v).

3.10 Dosagem de proteína

A concentração de proteína das amostras provenientes dos homogenatos foi estimada utilizando-se o reagente Proteoquant (Proteobrás, SP), segundo método proposto por Bradford (1976). Como padrão utilizamos soroalbumina bovina (BSA). Um volume de amostra que variou de 10-100 μ L foi pipetado em tubo de ensaio, sendo que o volume final sempre foi ajustado para 100 μ L com água. A seguir, foi pipetado 1,0 mL da solução do reagente Proteoquant. A mistura dos tubos foi agitada em vórtex e após um período de repouso de 20 minutos a leitura foi realizada a 595 nm.

3.11 Análise dos dados

As análises dos dados de todos os grupos foram baseadas no test “t” não pareado. Foi adotado para todos os experimentos um $p = 0,05$ como nível de significância. Todos os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão.

4. Resultados

4.1 Genotipagem

Após extração de DNA de pedaço de cauda dos animais e reação em cadeia da polimerase, os produtos da PCR foram aplicados em eletroforese para determinar o tamanho e assim definir o genótipo do animal. Foi utilizado gel de agarose 1%. O fragmento esperado de 215 pb foi observado após revelação do gel de agarose, confirmando a presença do gene tonina no genoma dos camundongos considerados positivos. A agarose foi escolhida devido à facilidade na manipulação e rapidez dos resultados. A figura 6 abaixo mostra os resultados obtidos em um experimento que envolveu 30 animais.

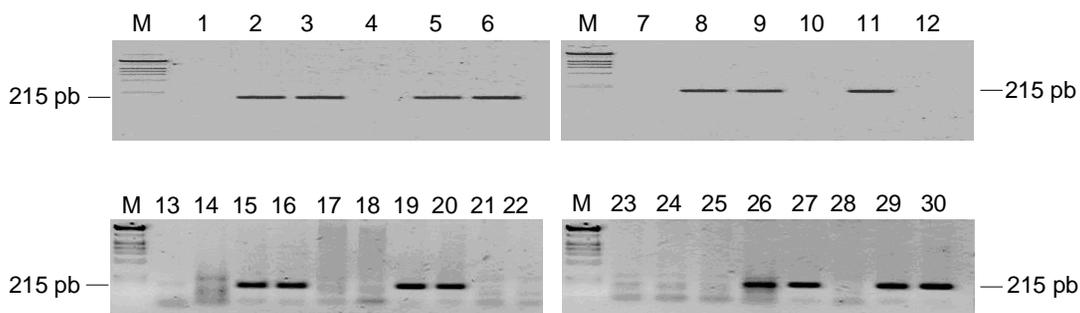


Figura 6. Géis de agarose 1% mostrando os produtos de PCR de amostras provenientes de animais considerados transgênicos e selvagens. M, marcador de massa molecular. O produto esperado, correspondente ao fragmento do gene da tonina apresenta 215 pb. Os números na parte superior correspondem aos animais testados.

Destes, 15 mostraram-se positivos para o transgene da tonina do rato e 15 negativos. A partir da verificação e classificação dos dois grupos, transgênicos (TGM(rTon)) e selvagens (WT), os animais foram submetidos a cruzamentos para obtenção de número suficiente para a realização dos experimentos.

4.2 Hipertrofia cardíaca

Tanto no início como no final do tratamento, todos os animais foram pesados para verificar se houve variação na massa corporal. A figura 7 apresenta os valores da massa corporal dos animais WT (n = 32) e (TGM(rTon)) (n = 21) no início e fim do tratamento. Os dados dessa figura estão na tabela 4 (apêndice A). Não observamos alteração significativa da massa corporal dos animais pelo tratamento.

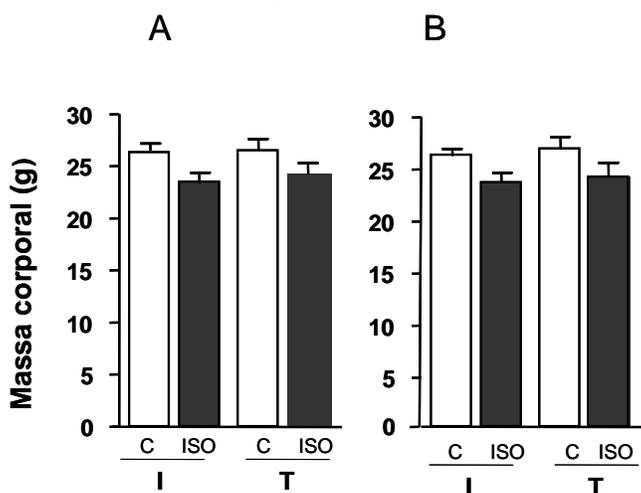


Figura 7. Massa corporal dos animais tratados com isoproterenol (Iso) ou com óleo (C) no início (I) e no término (T) do tratamento. A = WT e B = TGM(rTon). Os dados foram expressos como a média epm.

Os animais selvagens apresentaram aumento significativo na massa cardíaca após o tratamento com isoproterenol. A figura 8 mostra os resultados obtidos em termos de massa específica (relação massa da estrutura cardíaca/comprimento da tíbia) para as diferentes estruturas do coração nos dois grupos, selvagem e TGM(rTon), antes e após tratamento com isoproterenol. Os comprimentos das tíbias para os animais tratados com ISO foram $1,55 \pm 0,01$ cm e $1,56 \pm 0,01$ cm, para TGM(rTon) e WT respectivamente. Os valores observados quando os animais foram tratados com óleo são $1,60 \pm 0,02$ cm e $1,62 \pm 0,01$ cm, respectivamente para TGM(rTon) e WT.

Quando consideramos a massa específica, observamos em algumas estruturas, aumento significativo quando comparamos os dados obtidos entre animais tratados com isoproterenol e o grupo controle, ou seja, tratado com óleo. Os

valores obtidos e que foram utilizados na construção da figura 8 estão apresentados na tabela 5 (apêndice B).

Após o tratamento com isoproterenol observamos aumento significativo da massa específica cardíaca total e do ventrículo esquerdo nos animais WT. Já os animais TGM(rTon) apresentaram aumento da massa específica somente nos átrios do animais tratados com ISO quando comparados ao grupo controle.

Após tratamento com ISO, a massa cardíaca total específica do grupo transgênico mostrou-se significativamente menor que a observada para o WT ($82 \pm 3,2$ mg/cm vs $91,5 \pm 3,1$ mg/cm, respectivamente). Observamos uma maior diferença nas massas específicas cardíacas entre grupo tratado e controle para o animal WT que apresentou aumento de $7,7$ mg/cm na massa específica do coração total, quando comparado com o aumento de $1,3$ mg/cm verificado para o grupo TGM(rTon). Ou seja, aparentemente o animal TGM(rTon) apresenta maior resistência a desenvolver hipertrofia quando comparado com o animal selvagem.

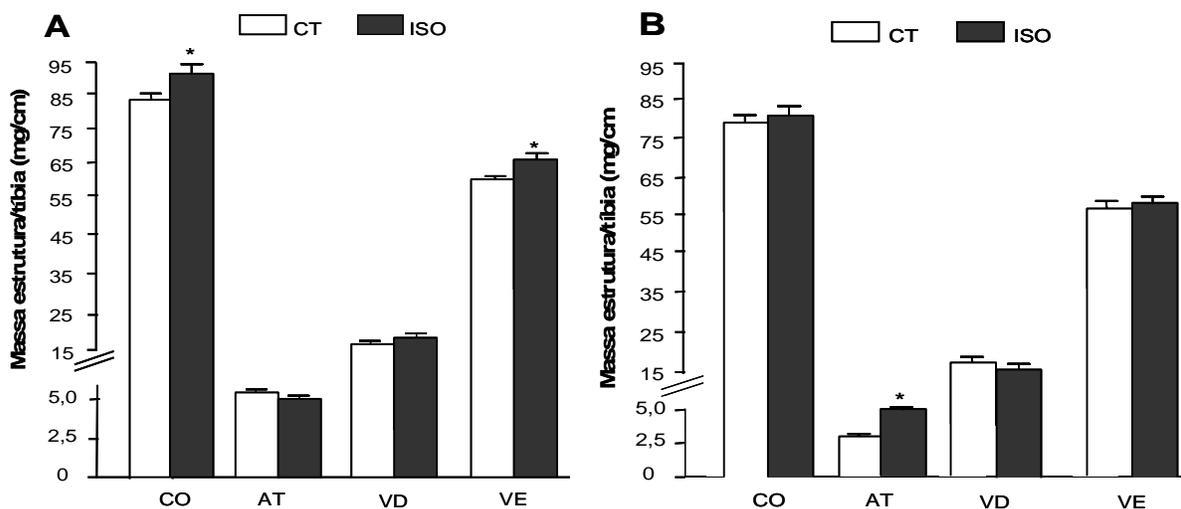


Figura 8. Relação entre a massa de cada estrutura cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia (mg/cm) dos animais dos grupos tratado com óleo (CT) e tratado com isoproterenol (ISO). A, grupo WT e B, TGM(rTon). Os dados foram expressos como a média \pm epm. * $p < 0,05$ vs óleo. CO, coração inteiro; AT, átrios; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo.

Com relação aos átrios, a massa específica para o grupo WT não foi diferente considerando-se os tratamentos, mas para o grupo transgênico o valor obtido para o tratamento com ISO é significativamente maior ($3,61 \pm 0,14$ mg/cm vs $5,07 \pm 0,40$ mg/cm, óleo vs ISO, respectivamente).

O aumento de massa total do coração devido ao tratamento, observada para os animais selvagens, ocorreu principalmente devido ao maior desenvolvimento da hipertrofia do ventrículo esquerdo. Enquanto que no grupo WT o tratamento com ISO elevou significativamente a massa específica do VE ($60,54 \pm 1,28$ mg/cm vs $65,7 \pm 1,97$ mg/cm, óleo vs ISO, respectivamente), no animal transgênico, os dados novamente mostram proteção contra a hipertrofia, sendo que os valores não são diferentes estatisticamente ($57,27 \pm 1,53$ mg/cm vs $58,03 \pm 2,07$ mg/cm, óleo vs ISO, respectivamente).

4.3. Análise de expressão mRNA tonina

Os níveis de mRNA da tonina no coração foram verificados somente entre os grupos CT e ISO dos animais TGM(rTon). Após a extração de RNA total de cada estrutura separadamente a análise foi feita pela técnica de RT-PCR. Os resultados estão apresentados na figura 9. Embora em intensidades diferentes, a banda de 740 pb, referente ao cDNA do gene da tonina de glândula submandibular de rato está presente em todas as estruturas estudadas.

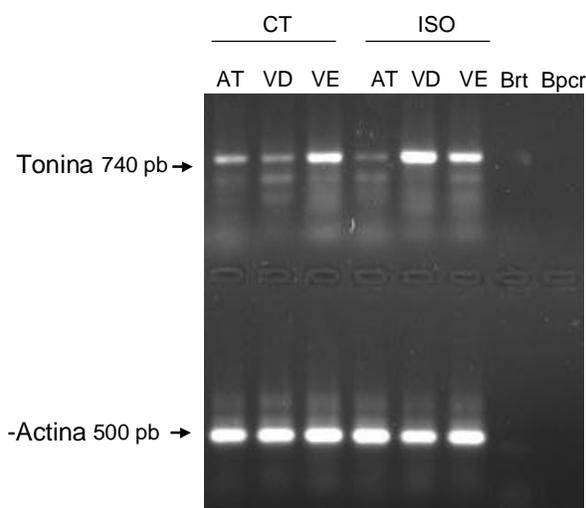


Figura 9. RT-PCR para tonina e β -actina das estruturas do coração dos animais TGM(rTon) tratados com óleo (CT) ou com isoproterenol (ISO). **AT:** átrios; **VD:** ventrículo direito; **VE:** ventrículo esquerdo; **Brt:** branco do RT; **Bpcc:** branco do PCR.

Pela figura 8 podemos observar que a banda da beta actina apresenta-se com intensidade semelhante para todas as estruturas. Desta forma podemos concluir que os níveis de mRNA tonina nas diferentes estruturas cardíacas são diferentes. No animal tratado com óleo (CT), os níveis de mRNA tonina foram maiores no VE, níveis semelhantes aos encontrados no VE do animal tratado com ISO. Alterações significativas nos níveis de mRNA tonina foram observadas para o AT e para o VD. Enquanto que para os átrios os maiores níveis foram observados para o animal tratado com óleo, para o ventrículo direito ocorreu o inverso, onde os níveis são muito maiores para o animal tratado com ISO.

4.4 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)

Os níveis da atividade da ECA foram determinados em todas as estruturas cardíacas nos animais WT e TGM(rTon) submetidos ao tratamento com ISO e com óleo, os controles. A tabela 2 apresenta os valores obtidos para os animais WT e mostra que os maiores níveis de atividade foram encontrados nos átrios e diminuíram significativamente nessa estrutura em função do tratamento. As outras estruturas não apresentaram alterações significativas.

Tabela 2. Atividade da ECA em estruturas cardíacas dos animais WT.

Estrutura	Óleo	ISO
AT	$4,33 \times 10^{-5} \pm 0,02$	$2,93 \times 10^{-5} \pm 0,15^*$
VD	$0,73 \times 10^{-5} \pm 0,04$	$1,60 \times 10^{-5} \pm 0,35$
VE	$1,57 \times 10^{-5} \pm 0,22$	$1,39 \times 10^{-5} \pm 0,27$

Os valores são expressos em moles de produto formado/mim/mg de proteína. Os dados foram expressos como a média epm. *p < 0,05.

Assim como os animais WT, os animais TGM(rTon) apresentaram alterações significativas da atividade ECA somente nos átrios, mas de forma contrária, a atividade se elevou após o tratamento. As outras estruturas também não apresentaram alterações significativas (tabela 3).

Tabela 3. Atividade da ECA nos animais TGM(rTon).

Estrutura	Óleo	ISO
AT	$2,28 \times 10^{-5} \pm 0,07$	$3,75 \times 10^{-5} \pm 0,25^*$
VD	$0,88 \times 10^{-5} \pm 0,02$	$1,24 \times 10^{-5} \pm 0,31$
VE	$0,83 \times 10^{-5} \pm 0,12$	$0,98 \times 10^{-5} \pm 0,12$

Os valores são expressos em moles de produto formado/mim/mg de proteína. Os dados foram expressos como a média epm. *p < 0,05.

Todas as amostras, tanto do grupo WT como TGM(rTon), ao serem incubadas com captopril apresentaram 100% de inibição da ECA.

4.5 Atividade tonina-símile

Embora tenha sido verificado, através do mRNA, que o transgene está expresso nas diferentes estruturas do coração, isto não significa necessariamente que a tonina, mesmo que expressa em determinada estrutura, esteja na forma ativa, ou seja pode não haver necessariamente correlação entre os níveis de mRNA e atividade tonina em um determinado tecido. Por isso, decidimos medir os níveis de atividade tonina-símile em cada uma dessas estruturas, tanto em animais WT como TGM(rTon). Esta atividade foi determinada incubando-se as amostras com o substrato tetraceptídeo sintético (TDP) correspondente à porção N-terminal do angiotensinogênio, e a Ang II liberada foi quantificada por RIE. Os resultados da atividade específica obtidos para as diferentes estruturas (AT, VD e VE) dos camundongos WT e TGM(rTon) estão apresentados na figura 9.

A figura 10 foi construída com os dados apresentados na tabela 6 em apêndice C. Comparando-se os níveis de atividade tonina-símile nas diferentes estruturas dos animais dos dois grupos, WT e TGM(rTon), observamos, para animais que receberam tratamento com óleo, que os níveis nos átrios são maiores para o animal transgênico. Para as demais estruturas os níveis são semelhantes. O tratamento com ISO não alterou significativamente os níveis da atividade tonina em qualquer uma das estruturas do animal transgênico. Para o animal selvagem, o tratamento levou a redução significativa dos níveis de atividade no ventrículo esquerdo.

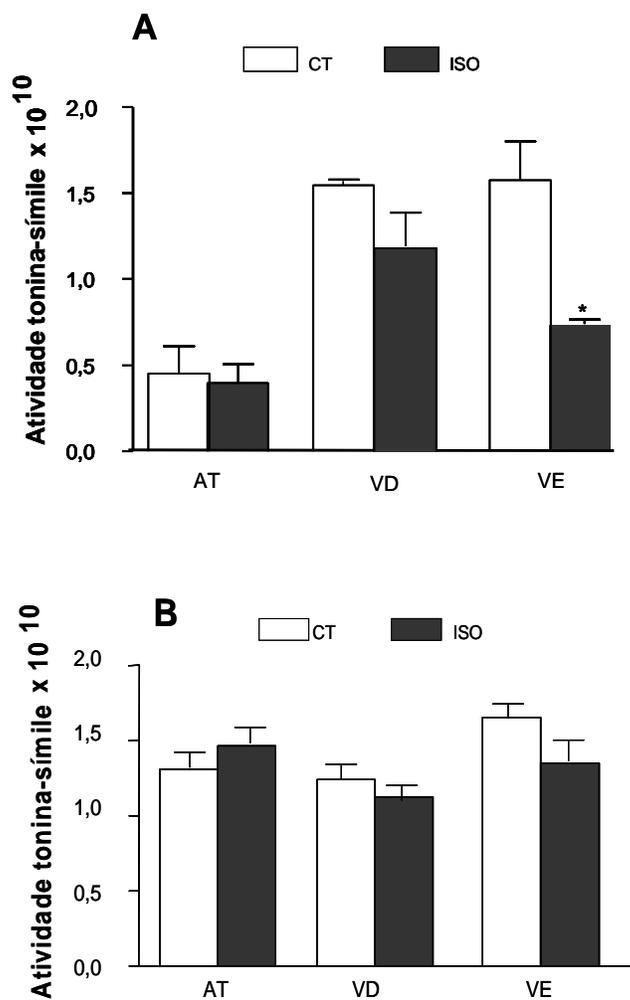


Figura 10. Atividade tonina-símile expressa em moles de Ang II liberados por minuto e miligrama de proteína das estruturas cardíacas provenientes de WT (**A**) e TGM(rTon) (**B**), tratados com ISO ou óleo (CT). Os dados foram expressos como a média \pm epm. * $p < 0,05$.

4.6 Western blot

Utilizando anticorpo específico para tonina de glândula submandibular de rato, analisamos a imunoreatividade tonina presente no homogenato de cada estrutura cardíaca dos animais WT e TGM(rTon) e seus respectivos controles. A figura 11 mostra o resultado obtido para todas as estruturas, onde se pode observar em algumas canaletas a banda de 28 kDa, correspondente a tonina.

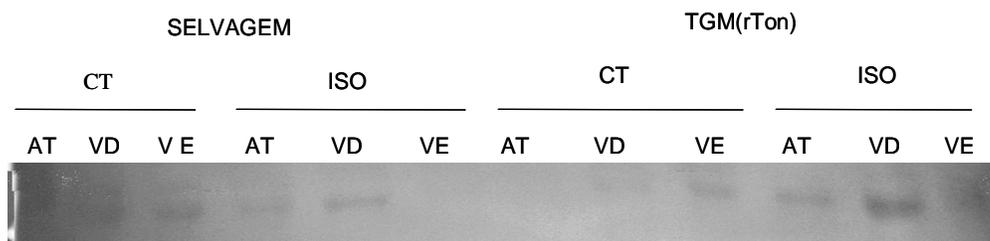


Figura 11. Imunoreatividade à tonina de amostras de proteínas de homogenato das estruturas cardíacas determinada utilizando-se de anticorpo anti-tonina.

Pode-se observar pela figura 11 que a banda está ausente nos átrios dos animais tratados com óleo em ambos grupos, selvagem e TGM(rTon) e aparece nesta estrutura dos animais tratados com ISO, novamente em ambos grupos. O tratamento com ISO levou a uma redução na intensidade da banda no ventrículo esquerdo do animal selvagem. O maior aumento foi observado no ventrículo direito dos animais TGM(rTon) pelo tratamento com ISO.

5 Discussão

A presença da hipertrofia ventricular esquerda em humanos contribui fortemente para morbidade e mortalidade. Ela ocorre em resposta à sobrecarga de pressão crônica vista em doenças cardíacas e hipertensão. Inicialmente adaptativa, a HVE pode progredir continuamente e, por mecanismos ainda não completamente elucidados, freqüentemente termina com disfunção ventricular esquerda e falha cardíaca evidente (FAULX e cols, 2007).

Um crescente conjunto de evidências indica que o SRA local possui importante papel no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Todos os componentes do SRA, tais como angiotensinogênio, renina e ECA, têm sido identificados no coração, tanto em níveis de mRNA, quanto em níveis de proteína (KOMURO, 2001).

No SRA clássico, a Ang II é gerada pela ação da ECA sobre a Ang I, a qual é formada pela clivagem do angiotensinogênio pela renina. No entanto, vias alternativas para a geração de Ang II podem ocorrer por ação de outras enzimas como tripsina, catepsina, quimase e tonina. Dentre essas, tonina pode ser uma via importante, pois, é capaz de gerar Ang II tanto da Ang I como diretamente do AG. Em 2002, verificamos que injeções intracerebroventriculares de tonina em rato produz efeitos fisiológicos atribuídos a Ang II, mostrando que essa enzima pode contribuir fisiologicamente para a formação desse peptídeo (ARAUJO e cols, 2002). A Ang II parece estar envolvida no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (MALHOTRA e cols, 1999). Acredita-se que a ativação do SRA local, com liberação de Ang II, no coração, possa contribuir para a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol, já que ratos nefrectomizados tratados com ISO apresentaram massa do VE e concentração de Ang II aumentadas (NAGANO e cols, 1992). No coração, esse peptídeo parece mediar várias funções importantes, como tônus vascular coronário, efeito inotrópico e cronotrópico positivos.

A presença de tonina no coração de rato foi mostrada pela primeira vez por nosso grupo através da atividade e dos níveis de mRNA para tonina, e ainda evidências indicam sua possível participação na hipertrofia cardíaca (BORGES e cols, 2003).

Para compreender melhor os efeitos fisiológicos da tonina, nosso grupo gerou um modelo transgênico, denominado TGM(rTon), um camundongo que expressa tonina de rato. A proposta inicial era de que o animal apresentasse expressão de tonina somente no encéfalo, especificamente nos astrócitos, uma vez que estas células produzem AG em maior quantidade. Para isso, foi utilizado um promotor específico para expressão em astrócitos, o promotor da Gfap, que é uma proteína codificada pelo gene gfa (glial fibrillary acidic), sendo um filamento intermediário encontrado abundantemente e quase que exclusivamente em astrócitos (ENG, 1980; BRENNER; MESSING, 1996; ENG e cols, 2000). Entretanto, a expressão do transgene da tonina não foi detectada somente no encéfalo como esperado, e sua expressão, em quantidades menores, também ocorreu em outros órgãos e tecidos, entre eles o coração (CARDOSO, 2002).

Para obtenção do modelo hipertrófico cardíaco, utilizamos injeções subcutâneas de isoproterenol na concentração final de 20 mg/kg/dia durante 7 dias consecutivos. Essa concentração é menor que a utilizada por Faulx e colaboradores (2007), os quais utilizaram 100 mg/kg durante 5 dias. Neste trabalho, Faulx verificou a resposta hipertrófica de camundongos com fenótipos cardiovasculares bem conhecidos em diferentes linhagens e, concluiu que a administração de ISO é específica de cada uma, já que as respostas foram diferentes. Os camundongos da espécie C57L/B6 são mais resistentes à hipertrofia cardíaca do que os camundongos A/J. Os camundongos A/J perderam peso em resposta ao ISO, e os autores descrevem que mesmo com a perda da massa corporal houve aumento da massa cardíaca.

Contrariamente a esses resultados, Kudej e cols. (1997), verificaram que animais da linhagem CD-1 tratados com ISO na dose de 30 mg/kg durante 13 dias exibiram aumento significativo no consumo de alimento e no ganho de peso em relação ao grupo controle. Esses autores observaram que a maioria dos estudos não tem verificado se o aumento obtido na massa cardíaca devido ao crescimento normal ou alterações tróficas e aumento na ingestão de alimento induzido pela estimulação do receptor beta-adrenérgico efetivamente refletem na HC. Os autores descrevem ainda que a resposta hipertrófica do VE pode ser influenciada por um aumento no estado anabólico sistêmico, demonstrado pelo aumento no ganho do peso desses animais. A influência do peso corporal na proporção massa do ventrículo esquerdo/massa corporal é importante, mas nem sempre tem sido notada.

Em comparação aos trabalhos de Kudej e colaboradores (1997) e Faulx e colaboradores (2007), nossos animais tratados com ISO não apresentaram alterações significativas na massa corporal quando comparados ao grupo controle (óleo), o que pode ter sido devido à resposta dessa linhagem (black-6), como dito anteriormente, e/ou devido a concentração da droga utilizada. É sabido que os adrenoceptores α_1 e α_3 parecem estar envolvidos no aumento da taxa de lipólise vista em adipócitos brancos e marrons, tanto em ratos como em camundongos (ARCH e KAUMANN, 1993), portanto, diferenças na regulação α -adrenérgica do metabolismo de gordura parecem não explicar as diferenças no ganho de massa corporal de alguns camundongos tratados com ISO.

Assim como nos trabalhos de Freund e cols. (2005) e Jaffré e cols. (2004), utilizamos a relação massa estrutura cardíaca/comprimento da tibia para verificação da HC e constatamos que o grupo selvagem tratado com ISO apresentou hipertrofia cardíaca significativa, ocasionada principalmente devido ao aumento do VE. Já o grupo de animais TGM(rTon) tratados com ISO não apresentou aumento significativo do coração ou mesmo do VE quando comparados ao grupo controle e de forma não ainda compreendida esse grupo apresentou hipertrofia significativa dos átrios.

No processo de hipertrofia cardíaca, o desgaste energético aumenta devido à baixa difusão do oxigênio para as fibras hipertrofiadas. A tensão intramiocárdica reduz a perfusão coronária e eleva a escassez de energia, o que ocasiona morte celular e aumento do trabalho dos cardiomiócitos, os quais hipertrofiam tentando manter a função, mas acabam desencadeando falência cardíaca (KATZ, 2000). A progressão da insuficiência cardíaca é acompanhada pelo aumento do colágeno intersticial (SCHAPER e cols, 1991), sendo que, nos estágios finais da insuficiência, o colágeno tipo I, mais rígido, se sobrepõe ao colágeno tipo III, mais elástico (WEBER, 1997).

O principal local de síntese de angiotensinogênio no coração são os átrios (OGIKU e cols, 1996) e, como verificado por Borges e cols (2003), após a administração de ISO em ratos, os níveis de mRNA dessa proteína se eleva nessa estrutura quando comparado ao VE. Esses autores também verificaram que os níveis de tonina não são detectáveis em quaisquer estruturas do coração, mas se elevam nos átrios após tratamento com isoproterenol. Nossos resultados mostraram que, além da hipertrofia, o grupo TGM(rTon) tratado com ISO apresentou aumento significativo da presença e da atividade tonina, também somente nos átrios.

Entretanto, ao fazermos uma análise geral dos dados considerando: a) atividade tonina-símile (liberadora de angiotensina II), determinada incubando-se as amostras das diferentes estruturas, em condições que a possível participação da ECA é mínima, devido à presença de inibidores específicos; b) os níveis da proteína, determinados através de Western blot utilizando-se anticorpo específico para tonina da glândula submandibular de rato; c) os níveis de expressão, determinados utilizando-se iniciadores específicos para o cDNA da tonina de rato e, d) a atividade ECA, observamos que parece não existir correlação entre qualquer um destes parâmetros isoladamente com a HC. Após serem tratados com ISO, os camundongos TGM(rTon) não apresentaram alterações significativas na massa do VE, bem como, na atividade tonina-símile dessa estrutura, porém, seus átrios apresentaram hipertrofia significativa juntamente com um aumento da atividade tonina-símile. Os animais selvagens apresentaram hipertrofia cardíaca significativa, relacionada principalmente com o aumento da massa do ventrículo esquerdo, onde observamos significativa redução da atividade tonina-símile. É importante ressaltar que este parâmetro, atividade tonina-símile, necessariamente não reflete os níveis de angiotensina II no tecido devido à presença de angiotensinas, que podem ser diferentes em cada estrutura e, portanto determinante dos níveis de Ang II local. Neste estudo não determinamos os níveis de Ang II tecidual ou os níveis de atividade angiotensinase.

Ocaranza e colaboradores (2002) observaram que a administração de ISO em ratos induz expressão da ECA, e correlacionou os níveis de mRNA da ECA com a atividade no VE e desenvolvimento paralelo da hipertrofia ventricular esquerda. Nossos dados não estão de acordo com os de Ocaranza e colaboradores, pois ao fazermos uma análise das estruturas que sofreram hipertrofia significativa e seu respectivo nível de atividade da ECA verificamos que, nos átrios hipertrofiados dos camundongos transgênicos a atividade da ECA está elevada em relação ao controle, no entanto, nos animais selvagens, onde a hipertrofia foi significativa no VE a atividade ECA está diminuída em comparação ao controle. Observamos que, os níveis de atividade da ECA na maioria das estruturas cardíacas dos animais TGM(rTon) tratados com óleo, são menores quando comparados aos níveis encontrados nos animais tratados com óleo do grupo WT. A possibilidade de a atividade da ECA estar sendo modulada pela tonina, nesse modelo transgênico, poderia explicar a cardioproteção do animal TGM(rTon). Há, entretanto,

controvérsias sobre a participação da ECA na hipertrofia cardíaca. Alguns autores sugeriram que o aumento da expressão local dessa enzima contribua para fibrose cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão, já que a ECA está presente principalmente nos fibroblastos (KUROSAWA e cols, 2002).

Os níveis de mRNA da tonina foram determinados somente para os animais TGM(rTon). Nos animais controle, tratados com óleo, os níveis mais altos foram encontrados no VE, mas o tratamento com ISO promoveu aumento evidente de expressão no VD. Esses dados diferem de resultados prévios obtidos em ratos, nos quais os animais controle apresentaram maiores níveis de mRNA tonina nos átrios, e esses níveis aumentaram significativamente nessa estrutura no grupo tratado com ISO (BORGES e cols, 2003). Notamos uma pequena redução nos níveis de mRNA tonina nos átrios tratados com ISO. No entanto, é sabido que, em determinados tecidos e condições, aumento nos níveis de mRNA nem sempre se traduz em aumento nos níveis da respectiva proteína.

Analisando a presença da tonina em cada estrutura cardíaca, através de sua imunoreatividade ao anticorpo específico, verificamos novamente ausência de correlação com hipertrofia. A imunoreatividade à tonina no animal selvagem certamente se deve a capacidade do anticorpo reconhecer também a tonina de camundongo. Foi utilizado para este estudo um antissoro anti-tonina, formado por diversos anticorpos, e que pode reconhecer a pró-forma da enzima, que não apresenta atividade. O animal selvagem tratado com ISO apresentou redução de imunoreatividade à tonina no ventrículo esquerdo, onde a hipertrofia foi significativa, porém o mesmo não foi observado para os animais TGM(rTon), onde a imunoreatividade a tonina se manteve presente no VE, mesmo não havendo hipertrofia dessa estrutura.

De acordo com nossos resultados fica clara a importância de futuros estudos para compreender melhor a função desta enzima, sua possível participação em outras vias metabólicas, bem como, sua interação no processo de hipertrofia cardíaca.

Tonina pode participar do metabolismo de outros peptídeos, tais como, substância P e ANP. Ela pode hidrolisar peptídeos sintéticos que reproduzem a seqüência do pró-ANP de rato na região do local de ativação. Como o ANP é armazenado como uma grande proteína precursora nos miócitos cardíacos, tonina pode estar envolvida na ativação deste peptídeo *in vivo* (MALHOTRA, 1999). O

local exato nos cardiomiócitos onde ocorre o processamento do pró-ANP permanece não demonstrado. Enquanto alguns grupos assumem que os grânulos atriais não contêm qualquer enzima que processe o pró-ANP (TOKI e cols, 1990; CORTHORN e THIBAUT, 1991; SHIONO e cols, 1991), outros acreditam que serinil proteinases são capazes de processar o pró-ANP presente em grânulos atriais. Embora várias enzimas que poderiam processar o pró-ANP *in vivo* tenham sido encontradas nos átrios, nenhuma dela foi claramente identificada (IMADA e cols, 1987; TOKI e cols, 1990; CORTHORN e THIBAUT, 1991; WYPIJ e HARRY, 1992). Em 1994, Moreau e colaboradores mostraram que a eficiência e especificidade da tonina em processar o pró-ANP sintético dependem fortemente da presença de resíduos mínimos no local de hidrólise, e que a seqüência do pró-ANP ao redor do seu principal local de ativação tem todo caráter especial necessário para ser processado por essa enzima.

Os dados da literatura mostram que o ANP tem efeito endócrino direto na homeostase de fluidos e pressão sanguínea, por meio de dois receptores localizados na membrana plasmática de miócitos e fibroblastos cardíacos (CAO e GARDNER, 1995; NEYSES e VETTER, 1989). O ANP e a Ang II tem efeitos opostos na homeostase cardiovascular. Enquanto os níveis circulantes do ANP e do SRA são basicamente determinados por alterações no balanço de sódio, o nível tecidual poderia ser afetado por fatores locais. A Ang II tem mostrado aumentar a secreção de ANP pelos miócitos cardíacos, o qual, no coração adulto, inibe o crescimento dos miócitos, a proliferação de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular (SANGHI e cols, 2005).

Apesar de estar bem estabelecido que tonina é capaz de gerar Ang II, nossos dados mostram que, por mecanismo(s) ainda não compreendido(s) tonina pode gerar uma resposta fisiológica cardioprotetora na HVE, contrária ao desenvolvimento hipertrófico. A sugestão de que o camundongo que apresenta expressão de tonina de rato possui uma tendência de cardioproteção à hipertrofia induzida pelo isoproterenol, certamente deverá levar a novos estudos no sentido de caracterizar melhor este efeito, o que deverá representar contribuição para o entendimento do processo de hipertrofia cardíaca.

6 Conclusões e sugestões

Apesar da capacidade da tonina em gerar Ang II e este peptídeo ter participação na hipertrofia cardíaca, o modelo transgênico de camundongo que expressa tonina de rato não apresentou hipertrofia ventricular esquerda induzida por isoproterenol como apresentou o camundongo selvagem.

A atividade e a expressão dessa enzima parece não ter correlação direta com os dados da hipertrofia cardíaca, visto que após a administração de isoproterenol somente os animais selvagens apresentam hipertrofia do VE, porém tanto os selvagens como os TGM(rTon) apresentaram redução da atividade da enzima nessa estrutura. Além disso, a hipertrofia significativa dos átrios presente nos TGM(rTon) tratados com ISO, foi acompanhada de uma diminuição da expressão de mRNA da tonina.

É importante verificar se existe, neste modelo transgênico, modulação da atividade da ECA pela tonina e conseqüentemente alteração nos níveis de Ang II.

O animal TGM(rTon) apresenta cardioproteção do ventrículo esquerdo em processo de indução de hipertrofia pelo isoproterenol, no entanto, o(s) mecanismo(s) envolvido(s) no processo não está(ão) ainda esclarecido(s). A possível participação de tonina neste processo deverá ser melhor esclarecida através de novos estudos.

Como sugestão seria importante verificar a hipertrofia dos cardiomiócitos e deposição de colágenos por meio de histologia, os níveis de Ang II circulantes, a atividade das angiotensinases no coração e a expressão do ANP nos átrios e ventrículo esquerdo desse modelo transgênico antes e após o tratamento com isoproterenol.

REFERÊNCIAS

AKASAWA, Hiroshi; KOMURO, Issei. Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy. **Circulation Research**, Dallas, v. 92, p.1079-1088, 30 may 2003.

AMORE, Angelo D'; BLACK, Jane M; THOMAS, Walter G. The Angiotensin II Type 2 Receptor Causes Constitutive Growth of Cardiomyocytes and Does Not Antagonize Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Hypertrophy. **Hypertension**, v. 46, p. 1347-1354, 2005.

ARAÚJO GW, PESQUERO JB, LINDSEY CJ, PAIVA AC, PESQUERO JL. Tonin-like activity in the rat submandibular and prostate glands. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1074, p. 167-171, 1991.

ARAUJO, R.C.; LIMA, M. P.; LOMEZ, E.S.L.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; SUMITANI, M; PESQUERO, J.L. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. **Physiology & Behavior**, v. 76, p. 327-333, 2002.

ARCH, J. R. S.; KAUMANN, A. J. α_3 and atypical α -adrenoceptores. **Medical Research Reviews**, v. 13, p. 663-729, 1993.

BADER, M; GANTEN, D. Transgenic rats. Tools to study the function of the renin-angiotensin system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. Suppl**, v. 2, p. 81-87, 1996.

BADER, M; BOHNEMEIER, H.; ZOLLMANN, F.S.; LOCKLEY-JONES, O.E.; GANTE, D. Transgenic animals in cardiovascular disease research. **Experimental Physiology**, v. 85, n.6, p. 713-731, 2000.

BARAUNA, Valério Garrone. Participação do sistema renina angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento resistido. 2006. Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARLOS, K.; GATOS, D.; KAPOLOS, S.; PAPAPHOTIU, G.; SCHAFER, W.; YAO, W.Q. Esterification of partially protected peptide-fragments with resins-utilization of 2-chlorotriylchloride for synthesis o leu-15-gastrin-I. **Tetrahedron Letters**, n.30,p. 3947-3950, 1989.

BARROS, Reginaldo de Almeida; OKOSHI, Marina Politi; CICOONA, Antonio Carlos. Via Beta-Adrenérgica em Corações Normais e Hipertrofiados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 72, n. 5, p. 641-648, 1999.

BERRY, C.; TOUYZ, A.; DOMINICZAK, A.F.; WEBB, R.C.; JOHNS, D.G. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, p. H2337-H2365, 2001.

BOOZ, G. W. Putting the Brakes on Cardiac Hypertrophy: Exploiting the NO-cGMP Counter-Regulatory System. **Hypertension**, v. 45, p. 341-346, 2005.

BORGES, Júlio César; SILVA JR, José Antônio; GOMES, Maria Aparecida; LOMEZ, Eliane Sá Lopes; LEITE, Kátia Moraes; ARAÚJO, Ronaldo Carvalho; BADER, Michael, PESQUERO, João Bosco, PESQUERO, Jorge Luiz. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, p. 2263-2268, 2003.

BOUCHER, Roger; ASSELIN, J.; GENEST, Jacques. A New Enzyme Leading to the Direct Formation of Angiotensin II. Supplement I to **Circulation Research**, v. XXXIV e XXXV, 1974.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREGAGNOLLO, Edson Antonio; OKOSHI, Katashi; BREGAGNOLLO, Isamara Fernanda; PADOVANI, Carlos Roberto; OKOSHI, Marina P.; CICOONA, Antonio Carlos. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. IN: **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.84, n. 3, p. 225-232, mar. 2005

BRENNER, M.; MESSING, A. GFAP transgenic mice. **Methods in Enzymology**, v. 10, p. 351-364, 1996.

BRUM, Patrícia, C.; ROLIM, Natale, P. L.; BACARAU, Aline, V. N.; MEDEIROS, Alessandra. Neurohumoral activation in the heart failure: the role of adrenergic receptors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 3, p. 486-498, 2006.

CAO, L.; GARDNER, D.G. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. **Hypertension**, v. 25, n.2, p. 227-234, 1995.

CARDOSO; Cibele, Campos. Geração e caracterização de rato e camundongo transgênico apresentando superexpressão de tonina de rato. 2002. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFMG.

CARRENO, Juan Eduardo; APABLAZA, Felipe; OCARANZA, María Paz; JALIL, Jorge E. Hipertrofia cardíaca: eventos moleculares y celulares. **Revista Española de Cardiología**, v. 59, n. 5, p. 473-86, 2006.

CORTHORN, J.; CANTIN, M.; THIBAUT, G. Rat atrial secretory granules and pro-ANF processing enzyme. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 103, p. 31-39, 1991.

DEVEREUX, Richard B.; DAHLOF, Bjorn; GERDTS, Eva; BOMAN, Kurt; NIEMINEN, Markku S.; PAPADEMETRIOU, Vasilios; ROKKEDAL, Jeans; HARRIS, Katherine E.; EDELMAN, Jonathan M.; WACHTELL, Kristian. Regression of Hypertensive Left Ventricular Hypertrophy by Losartan Compared With Atenolol. **Circulation**, v. 110, p. 1456-1462, 10 jun. 2004.

DIAMOND, Joseph A.; PHILLIPS, Robert A. Hypertensive Heart Disease. **Hypertension Research**, v. 28, n. 3, p. 191-202, 2005.

ENG, L. F. Proteins of the nervous system (Bradshaw, R. A. e Schneider, D. M. eds) 2ª Ed., Raven Press, New York, p. 85-117, 1980.

ENG, L. F.; GHIRNILKAR, R.S.; LEE, Y.L. Glial fibrillary acid protein: GFAP- thirty one years (1969-2000). **Neurochemical research**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-1451, 2000.

FAULX, Michael D.; CHANDLER, Margaret P.; ZAWANEH, Michael S.; STANLEY, William C.; HOIT, Brian D. Mouse Strain-Specific Differences in Cardiac Metabolic Enzyme Activities Observed in a Model of Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 77-80, 2007.

FLEMING, Ingrid. Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme. **Circulation Research**, v. 98, p. 887-896, 2006.

FREY, Norbert; KATUS, Hugo A.; OLSON, Eric N.; HILL, Joseph A. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? **Circulation**, v.109, p.1580-1589, 2004.

FREUND, Christian; ULLRICH, Ruth Schmidt; BAURAND, Anthony; DUNGER, Sandra; SCHNEIDER, Wolfgang; LOSER, Peter; EL-JAMALI, Amina; DIETZ, Rainer; SCHEIDEREIT, claus; BERGAMANN, Martin, W. Requirement of Nuclear Factor- B in Angiotensin II-and Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy In Vivo. **Circulation**, v. 111, p. 2319-2325, 2005.

GARCIA, R; BOUCHER, R.; GENEST, J. Tonin activity in rat saliva: effect of sympathomimetic and parasympathomimetic rugs. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, 1976.

GROTE, K.; ORTMANN, M.; SALGUERO, G.; DOERRIES, C.; LANDMESSER,U.; LUCHTEFELD, M.; BRANDS, R.P.; GWINNER, W.; TSCHERNIG, T.; BRABANT, E.G.; KLOS, A.; SCHAEFER, A.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B. Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 3, p. 596-605, 2006.

GUALBERTO, M.P.; NUNES, R.L.; PESQUERO, J.L. Tonin-like activity present in the human submandibular gland. **Agents and Actions Suppl**, v. 38, p. 392-400, 1992.

HEINEKE, Joerg; MOLKENTIN, Jeffery D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. **Nature Publishing Group**, v.7, p. 589-600, aug. 2006.

IMADA, T.; TAKAYANAGI, R.; INAGAMI, T. Identification of a peptidase which processes atrial natriuretic factor precursor to its active form with 28 amino acid residues in particulate fractions of rat atrial homogenate. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 143, p. 587-592, 1987.

JAFFRÉ, Fabrice; CALLEBERT, Jacques; SARRE, Alexandre; ETIENNE, Nelly; NEGIBIL, Canan, G.; LAUNAY, Jean-Marie; MAROTEAUX, Luc; MONASSIER, Laurent. Involvement of the Serotonin 5-HT_{2B} Receptor in Cardiac Hypertrophy Linked to Sympathetic stimulation Control of Interleukin-6, Interleukin-1, and Tumor Necrosis Factor- Cytokine Production by Ventricular Fibroblasts. **Circulation**, v. 110, p. 969-974, 2004.

KATZ, A. M. Heart failure: pathophysiology, molecular biology and chemical management. Philadelphia.: Lippincot William & Wilkins, 2000.

KEE, Hae Jim; SOHN, Suk; NAM, Kwang; PARK, Jong Eun; QIAN, Yong Ri; YIN, Zhan; AHN, Youngkeun; JEONG, Myung Ho; BANG, Yung-Jue; KIM, Nacksung; KIM, Jong-Keun; KIM, Kyung Keun; EPSTEIN, Jonathan A.; KOOK, Hyun. Inhibition of Histone Deacetylation Blocks Cardiac Hypertrophy Induced by Angiotensin II Infusion and Aortic Banding. **Circulation**, v.113, p. 51-59, 2006.

KIM, Shokei; IWAO, Hiroshi. Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 11-34, 2000.

KOMURO, Issei. Molecular Mechanism of Cardiac Hypertrophy and Development. **Japanese Circulation Journal**, v. 65, p. 353-358, 2001.

KRIEGER, Eduardo Moacyr. O coração como uma bomba. In: *Fisiologia Cardiovascular*. 1ª Edição. São Paulo: Fundo Editorial Byk Prociense, 1979. p.134.

KUDEJ, Raymond, K. IWASE, Mitsunori; UECHI, Masami; VATNER, Dorothy, E.; OKA, Naoki; ISHIKAWA, Yoshihiro; SHANNON, Richard, P.; BISHOP, Sandfor, P.; VATNER, Stephen, F. Effects of Chronic α -Adrenergic Receptor Stimulation in Mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 2735-2746, 1997.

KUROSAWA, Y.; KATOH, M.; DOI, H.; NARITA, H. Tissue Angiotensin-converting enzyme activity plays an important role in pressure overload-induced cardiac fibrosis in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, p. 600-609, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (Lond)**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEMOS, LHSD. Modulação iônica da atividade tonina. 1991. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.

LEVY, Bernard I. In: How to Explain the Differences Between Renin Angiotensin System Modulators. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p. 134D-141S, 2005.

LIEB, Wolfgang; GRAF, Jochen; GOTZ, Anika; KONIG, Inke R; MAYER, Björn; FISHER, Marcus; STRITZKE, Jan; HENGSTENBERG, Christian; HOMER, Stephan R.; DORING, Angela; LOWEL, Hannelore; SCHUNKERT, Heribert; ERDMANN, Jeanette. Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene

polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, p. 88–96, 2006.

LISE, Samuel Jane; CORDA, Stefano; CHASSAGNE, Catherine; RAPPAPORT, Lydie. The Extracellular Matrix and the Cytoskeleton in Heart Hypertrophy and Failure. **Heart Failure Reviews**, v. 5, p. 239-250, 2000.

LOPES, Eliane S.; SUMITANI, Marie; JULIANO, Luiz; BERALDO, Wilson T.; PESQUERO, Jorge L. Distribution of tonin- and Kallikrein-like activities in rat brain. **Brain Research**, v. 769, p. 152-157, 1997.

MALHOTRA, Ricky; SADOSHIMA, Junichi; BROSIUS, Frank, C. & IZUMO, Seigo. Mechanical Stretch and Angiotensin II Differentially Upregulate the Renin-

NAGANO M.; HIGAKI, J.; NAKAMURA, F.; HIGASHIMORI, K.; NAGANO N.; MIKAMI, H.; OGIHARA, T. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. **Hypertension**, v. 19, p. 708-712, 1992.

NEYSES, L.; VETTER, H. Action of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on the myocardium: studies in isolated rat ventricular cardiomyocytes. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 163, n. 3, p. 1435-1443, 1989.

NIELSEN, MD; JORGENSEN M, GIESE J. ¹²⁵I-Labeling of angiotensin I and II. **Acta Endocrinologica** 8(kbh), v. 67, p. 104-116, 1971.

OCARANZA, M. P.; DÍAZ-ARAIA, G.; CHIONG, M.; MUNÓZ, D., RIVEROS, J. P.; EBENSPERGER, R.; SABAT, S.; IRARRÁZAVAL, P.; JALIL, J. E.; LAVANDER, S. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricular, and plasma

SANGHI, S.; KUMAR, R.; SMITH, M.; BAKER, K. M.; DOSTAL, D. E. Activation of protein kinase A by atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiac fibroblasts: Role in regulation of the local renin-angiotensin system. **Regulatory Peptides**, v. 132, p. 1-8, 2005.

SATOH, Minoru; OGITA, Hizakasu; TAKESHITA, Kyosuke; MUKAI, Isushi; KWIATKOWSKI, David J.; LIAO, James K. Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 19, p. 7432-7437, 2006.

SCHAPER, J.; FROEDE, R.; HEIN, S.; BUCK, A.; HASHIZUME, H.; SPEIZER, B.; FRIELD, A.; BLEESE, N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 83, n. 2, p. 504-514, 1991.

SEIDAH, N. G.; ROUTHIER, R.; CARON, M.; CARÉTIEN, M. N-Terminal amino acid sequence of rat tonin: homology with serino proteases. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 56, p. 920-925, 1978.

SHIONO, S.; SUGANUMA, N.; BO, M.; BOIME, I.; SEIBERT, K.; NAKAO, K.; MUKOYAMA, M.; IMURA, H.; NEEDLEMAN, P. Post-translational processing and secretory pathway of human atriopeptin in rat pheochromocytoma cells. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 176, p. 1232-1238, 1991.

SILVA, Ricardo Pereira; AMODEO, Celso; RAMIRES, José Antônio Franchini. O Ventrículo Direito e a Hipertensão Arterial. Aspectos Ecocardiográficos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 3, p. 313-8, 2002.

SONNENBLICK, Edmund, H.; LARAGH, John, H.; LESCH, Michael. Actions of the renin-angiotensin-aldosterone system. In: *New Frontiers in Cardiovascular Therapy: Focus on Angiotensin Converting Enzyme Inhibition*. Princeton: **Excepta Médica**, 1989, p. 70-71.

TAKAHASHI, Masahiko; MINATOGUCHI, Shinya; NISHIGAKI, Kazuhiko; KAWASAKI, Masanori; ARAI, Masazumi; UNO, Yoshihiro; FUJIWARA, Hisayoshi. Long-Term and Strict Blood Pressure Lowering by Imidapril Reverses Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Essential Hypertension: An Evaluation Using a Novel Indicator of Burden on the Left Ventricle. **Hypertension Research**, v. 29, n.2, p. 89-94, 2006.

TANIGUCH, Ikuo; KAWA, Makoto; DATE, Taro; YOSHIDA, Satoru; SEKI, Shingo; TANIGUCH, Masayuki; SHIMIZU, Mitsuyuki; MOCHIZUKI, Seibu. Effects of

Spironolactone During an Angiotensin II Receptor Blocker Treatment on the Left Ventricular Mass Reduction in Hypertensive Patients With Concentric Left Ventricular Hypertrophy. **Circulation Journal**, v. 70, p. 995-1000, 2006.

TOKI, Y.; ITO, T.; SHIONO, S.; SIEGEL, N. R.; GIERSE, J. K.; WILKINS, M. R.; NEEDLEMAN, P. Alternative mechanisms for atriopeptin prohormone processing by isolated perfused rat hearts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 254, p. 228-235, 1990.

URATA, Hideroni; BOEHM, Keith D.; PHILIP, Annie; KINOSHITA, Akio; GABROVSEK, Janez; BUMPUS, F. Merlin; HUSAIN, Ahsan. Cellular Localization and Regional Distribution of an Angiotensin II-forming Chymase in the Heart. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 1269-1281, 1993.

URATA, Hideroni; KINOSHITA, Akio; MISONO, Kunio, S.; BUMPUS, F. Merlin; HUSAIN, Ahsan. Identification of a Highly Specific Chymase as the Major Angiotensin II forming Enzyme in the Human Heart. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22348-22357, 1990.

WATANABE, Tetsu; BARKER, Thomas A.; BERK, Bradford C. Angiotensin II and the Endothelium: Diverse Signals and Effects. **Hypertension**, v. 45, p. 163-169, 2005.

WEBER, K. T.; Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. **Seminars in Nephrology**, v. 17, n.5, p. 467-491, 1997.

WIKINS, Benjamim J.; MOLKENTIN, Jeffery D. Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? **Journal of Physiology**, v. 541, p.1-8, 12 Apr. 2002.

WILKINS, Benjamin J.; DAI, Yan-Shan, BUENO, Orlando F.; PARSONS, Stephanie A.; XU, Jian, PLANK, David M.; JONES, Fred; KIMBALL, Thomas R.; MOLKENTIN, Jeffery D. Calcineurin/NFAT Coupling Participates in Pathological, but not Physiological, Cardiac Hypertrophy. **Circulation Research**, v.94, p. 110-118, 2004.

WYPIJ, D. M.; HARRYIS, R. B. Characterization of homogeneous atrial granule serine proteinase, a candidate processing enzyme of pro-atrial natriuretic factor. **Life Sciences**, v. 50, p. 523-531, 1992.

YANG, Le; ZOU, Xiaoqing; LIANG, Qiansheng; CHEN, HAO; FENG, Jun; YAN, Li; WANG, Zhaohua; DAIXING, Zhou; LI, Shusheng; YAO, Shanglong; ZHENG, Zhi. Sodium tanshinone IIA sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte

hypertrophy through MEK/ERK pathway. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 39, n. 1, p. 65-73, 2007.

YOKOYAMA, Hiroshi; AVERILL, David B; BROSNIHAN, Bridget; SMITH, Ronald D.; SCHIFFRIN, Ernesto L; FERRARIO, Carlos M. Role of Blood Pressure Reduction in Prevention of Cardiac and Vascular Hypertrophy. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p. 922-929, 2005.

ZHANG, Cuntai; YASUNO, Shinji; KUWAHARA, Koichiro; ZANKOV, Dimitar P.; KOBORI, Atsushi; MAKIYAMA, Takeru; HORIE, Minoru. Blockade of Angiotensin II Type 1 Receptor Improves the Arrhythmia Morbidity in Mice With Left Ventricular Hypertrophy. **Circulation Journal**, v. 70, p. 335-341, mar. 2006.

APÊNDICE A – Tabela 4 Massa corporal, expressa em gramas, de todos os grupos experimentais (média erro padrão)

Tabela 4 Massa corporal expressa em gramas, de todos os grupos experimentais.

Animal	Óleo		ISO	
	Início	Término	Início	Término
WT	26,33±1,40	26,50±1,55	23,51±1,43	24,73±1,47
TGM(rTon)	26,11±1,24	26,72±1,52	23,46±1,42	24,02±1,68

Os valores são expressos como média ± erro padrão.

APÊNDICE B – Tabela 5 Parâmetros de massa das estruturas com relação ao comprimento da tíbia após tratamento dos animais selvagens (WT) e TGM(rTon) com isoproterenol (ISO) e com óleo (média erro padrão)

Tabela 5 Parâmetros de massa das estruturas com relação ao comprimento da tíbia após tratamento dos animais selvagens (WT) e TGM(rTon) com isoproterenol (ISO) e com óleo.

G R U P O	Valores de massa e massa específica*																	
	Óleo									ISO								
	Tibia	C	Ce	AT	ATe	VD	VDe	VE	VEe	Tibia	C	Ce	AT	ATe	VD	VDe	VE	VEe
WT	1,62 ±0,01	135 ±3,0	83,8 ±1,8	8,18 ±0,30	5,07 ±0,20	25,1 ±0,92	15,56 ±0,57	97,74 ±2,11	60,54 ±1,28	1,56 ±0,01	140 ±4,6	91,5* ±3,05	7,32 ±0,34	4,82 ±0,24	25,27 ±1,07	16,60 ±0,71	100,6 ±2,90	65,7* ±1,97
TGM (rTon)	1,60 ±0,02	130 ±3,2	80,7 ±2,28	5,86 ±0,24	3,61 ±0,14	25,55 ±1,04	15,9 ±0,76	92,16 ±2,47	57,27 ±1,53	1,55 ±0,01	130 ±5,9	82,0 ±3,2	8,00 ±0,62	5,07* ±0,40	23,98 ±1,34	15,16 ±0,79	90,45 ±3,51	58,03 ±2,07

Os valores de massa estão expressos em centímetros para o comprimento da tíbia. C = coração inteiro, AT = átrios, VD = ventrículo direito e VE = ventrículo esquerdo. Ce, ATe, VDe e VEe indicam as respectivas massas específicas e estão expressas em mg/cm nos tecidos. Os dados foram expressos como a média epm. *p < 0,05 vs óleo.

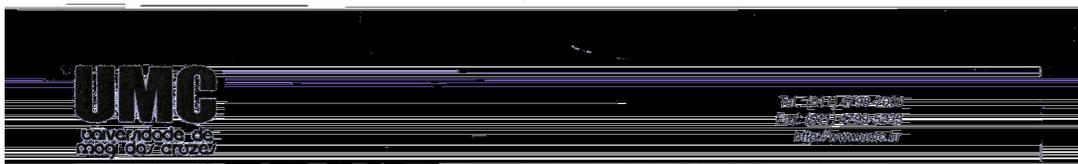
APÊNDICE C – Tabela 6 Atividade tonina-símile expressa em moles de Ang II x 10^{10} liberados por minuto e miligrama de proteína das estruturas cardíacas provenientes de WT e TGM(rTon), tratados com ISO e óleo, utilizando a técnica de radioimunoensaio (média erro padrão)

Tabela 6 Atividade específica (Ae) expressa em moles de Ang II x 10⁻¹⁰ liberados por minuto e miligrama de proteína das estruturas cardíacas provenientes de WT e TGM(rTon), tratados com ISO e óleo, utilizando a técnica de radioimunoensaio.

Animal	Óleo			ISO		
	AT	VD	VE	AT	VD	VE
WT	0,45±0,16	1,58±0,00	1,58±0,23	0,40±0,11	1,07±0,17	0,74±0,06*
TGM(rTon)	1,31±0,06	1,24±0,15	1,65±0,07	1,47±0,07	1,13±0,09	1,35±0,13

Os dados foram expressos como a média epm. *p < 0,05.

**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Manipulação e experimentação animal
(CEMEA/UMC)**



COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC

À Acadêmica
FERNANDA REZENDE

PARECER

DE CAMUNDONGO
autoridade acadêmica
JUIZ PESQUERO, foi
objeto de
éticos na

O trabalho intitulado: "HIPERTROFIA CARDÍACA
TRANSGÊNICO QUE EXPRESSA TONINA DE RATO" de
FERNANDA REZENDE, sob orientação do Prof. Dr. JORGE I
considerado APROVADO por esta comissão. Consideramos a seleção, a
manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bio
utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.


MAURICIO MARQUES DE OLIVEIRA
CEMEA/UMC

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)