

Enzima Conversora de Angiotensina no Líquido Pericárdico: Estudo Comparativo com a Atividade Sérica

Angiotensin-Converting Enzyme in Pericardial Fluid: Comparative Study with Serum Activity

Roseli Aparecida da Silva Gomes¹, Lívia das Graças Vieito Lombardi Teodoro¹, Isabel Cristina Rezende Lopes¹, Patrícia Alessandra Bersanetti², Adriana Karaoglanovic Carmona², Valdemar Hial¹

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG¹, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP² - Brasil

Resumo

Fundamento: A caracterização de uma enzima conversora de angiotensina (ECA) no líquido pericárdico humano é relevante diante do seu papel na liberação de angiotensina II e, portanto, do papel do pericárdio na homeostase cardiovascular.

Objetivo: Isolar e caracterizar uma ECA do líquido pericárdico humano. Comparar as atividades conversoras de angiotensina I do fluido pericárdico e do soro de pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular.

Métodos: A enzima do líquido pericárdico humano foi purificada por meio de etapas cromatográficas e caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), hidrólise de angiotensina I, bradicinina, Hip-His-Leu e substratos sintéticos com supressão interna de fluorescência. Lisinopril foi usado como inibidor. A atividade de ECA foi determinada em amostras de sangue e líquido pericárdico de 23 pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular.

Resultados: A ECA purificada (MM = 140 kDa) libera angiotensina II, hidrolisa a bradicinina e o substrato Hip-His-Leu. Os parâmetros cinéticos k_{cat} (s⁻¹) e k_{cat}/K_m (μM⁻¹. s⁻¹) foram respectivamente: Hip-His-Leu (1,14 e 7×10^{-4}), Abz-YRK(Dnp)P-OH (2,60 e 0,77), Abz-LFK(Dnp)-OH (2,77 e 0,36) e Abz-SDK(Dnp)P-OH (1,92 e 0,19). As atividades conversoras de angiotensina I (média ± DP) do líquido pericárdico e no soro foram, respectivamente, $3,16 \pm 0,90$ mU x mg⁻¹x min⁻¹ e $0,33 \pm 0,11$ mU x mg⁻¹x min⁻¹. A diferença foi significativa entre os dois fluidos.

Conclusão: Uma ECA com grande similaridade com a enzima somática foi isolada do fluido pericárdico humano. A atividade conversora de angiotensina I é maior no líquido pericárdico quando comparada com a atividade do soro. Esses dados constituem importante evidência do papel do líquido pericárdico no metabolismo de peptídeos ativos. (Arq Bras Cardiol 2008;91(3):172-178)

Palavras-chave: Enzima conversora de angiotensina, pericardiocentese, lisinopril, estudo comparativo.

Summary

Background: The characterization of an angiotensin-converting enzyme (ACE) in human pericardial fluid is relevant, considering its role in the angiotensin II release and thus, the role of the pericardium in cardiovascular homeostasis.

Objective: To isolate and characterize an ACE from human pericardial fluid and to compare the angiotensin I converting activities of the pericardial fluid with that of the serum in patients submitted to cardiovascular surgery.

Methods: The enzyme from human pericardial fluid was purified through chromatographic steps and characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), hydrolysis of angiotensin I, bradykinin, Hip-His-Leu and synthetic substrates with internal fluorescence suppression. Lisinopril was used as inhibitor. The ACE activity was measured in blood and pericardial fluid samples of 23 patients submitted to cardiovascular surgery.

Results: The purified ACE (MM = 140 kDa), releases angiotensin II, hydrolyses bradykinin and the Hip-His-Leu substrate. The kinetic parameters k_{cat} (s⁻¹) and k_{cat}/K_m (μM⁻¹. s⁻¹) were, respectively: Hip-His-Leu (1.14 and 7×10^{-4}); Abz-YRK(Dnp)P-OH (2.60 and 0.77), Abz-LFK(Dnp)-OH (2.77 and 0.36) and Abz-SDK(Dnp)P-OH (1.92 and 0.19). The angiotensin I converting activities (mean ± SD) in the pericardial fluid and in blood, were, respectively: 3.16 ± 0.90 mU x mg⁻¹x min⁻¹ and 0.33 ± 0.11 mU x mg⁻¹x min⁻¹. The difference was significant between the two fluids.

Conclusion: An ACE that bears great similarity with the somatic enzyme was isolated from human pericardial fluid. The angiotensin I converting activity is higher in the pericardial fluid when compared to the serum activity. These data are important evidence of the role of the pericardial fluid in the metabolism of active peptides. (Arq Bras Cardiol 2008;91(3):156-161)

Key words: Peptidil dipeptidase A; pericardiocentesis; lisinopril; comparative study.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Roseli Aparecida da Silva Gomes •

Praça Manoel Terra, 330 – Abadia 38015-050, Uberaba, MG - Brasil

E-mail: bioq@dcb.ufm.edu.br

Artigo enviado em 26/11/07; revisado recebido em 14/2/08; aceito em 15/2/08.

Introdução

Os estudos com líquido pericárdico têm sido direcionados principalmente para estabelecer o diagnóstico de pericardites, dos derrames pericárdicos e também para o diagnóstico *post-mortem*¹⁻³. Elevados níveis de substâncias vasoativas e cardioprotetoras são descritos no fluido pericárdico humano^{4,5}. Esse líquido encontra-se numa posição estratégica para receber informações referentes à patologias que envolvem este espaço e o próprio coração. Nosso interesse quanto ao estudo bioquímico do líquido pericárdico tem como alvo algumas enzimas, em especial aquelas que possam servir como marcadores locais de alterações fisiopatológicas. Iniciamos este estudo com uma isoforma da enzima conversora de angiotensina (ECA).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1) cliva a angiotensina I, formando angiotensina II⁶, e hidrolisa bradicinina e calidina, gerando fragmentos inativos⁷. A ECA é uma proteína de membrana descrita no endotélio arterial, nos tecidos epiteliais e neuroepiteliais⁸⁻¹⁰. Várias isoformas de ECA estão presentes em tecidos de mamíferos. Uma isoforma somática (150-180 kDa), expressa em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais, possui dois domínios homólogos (N- e C- domínios), cada um com seu próprio sítio catalítico^{11,12}. Outra isoforma de menor massa molecular (90-110 kDa), encontrada exclusivamente nas células germinativas masculinas, contém um único sítio ativo que corresponde ao C-domínio da forma somática¹³. Formas solúveis da enzima são encontradas em vários líquidos corporais, como sangue, fluido amniótico, sêmen, líquido cefalorraquidiano e urina¹⁴⁻¹⁶. No fluido ileal, foi descrita uma forma constituída apenas de N-domínio¹⁷. Apesar do alto grau de homologia, os domínios C- e N- da ECA diferem em especificidade de substrato, perfis de inibição e de dependência de cloreto^{18,19}. Os dois sítios ativos clivam angiotensina I, substância P e bradicinina com eficiência similar¹⁹. Entretanto, o tetrapeptídeo natural N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina²⁰ e a angiotensina 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro)²¹ são mais específicos para o N-domínio catalítico. Peptídeos com supressão interna de fluorescência (peptídeos FRET – *fluorescence resonance energy transfer peptides*) e contendo seqüências suscetíveis à hidrólise pela ECA têm sido utilizados para caracterização de N- e C- domínios da enzima²²⁻²⁴.

Neste trabalho, apresentamos um estudo de uma isoforma da ECA, isolada pela primeira vez, do líquido pericárdico humano. Comparamos, também neste estudo, as atividades de ECA no fluido pericárdico e no soro de indivíduos submetidos à cirurgia cardiovascular.

Métodos

Reagentes

Angiotensina I, angiotensina II, lisinopril, padrões de massa molecular, bradicinina, *o*-ftalaldeído, Hip-His-Leu, Mes (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico), HEPES (ácido N-[2-hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]) foram adquiridos da Sigma. Os substratos com supressão interna de fluorescência (peptídeos FRET) Abz-YRK(Dnp)P-OH, Abz-LFK(Dnp)-OH e Abz-SDK(Dnp)P-OH (Abz = ácido *o*-aminobenzóico; Dnp = 2,4-dinitrofenol) foram sintetizados pelo Departamento de

Biofísica da Universidade Federal de São Paulo²²⁻²⁴. Outros reagentes foram de procedência Merck.

Obtenção do líquido pericárdico humano para purificação da enzima conversora de angiotensina (ECA)

O líquido pericárdico foi coletado, até doze horas após o óbito, de indivíduos sem doença cardíaca, durante a necropsia no Serviço de Verificação de Óbito da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais. Todas as amostras utilizadas estavam livres de contaminação com sangue.

Obtenção do líquido pericárdico humano e das amostras de sangue para determinação da atividade de enzima conversora de angiotensina (eca)

Líquido pericárdico e amostras de sangue venoso foram coletados de 23 pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Amostras de líquido pericárdico foram obtidas da cavidade pericárdica por aspiração através de seringa, durante a abertura da membrana pericárdica para a cirurgia cardíaca. O sangue foi obtido por punção venosa do braço. As amostras de líquido pericárdico e de soro foram centrifugadas (1000 g, 15 minutos) e armazenadas a -20°C. As amostras de líquido pericárdico não apresentavam contaminação com sangue. Todos os pacientes deram o consentimento informado para participação no estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (CEP/UFTM) e estão de acordo com a Declaração de Helsinqui.

Purificação da enzima conversora de angiotensina do líquido pericárdico

Líquido pericárdico (65 ml), sem contaminação visível com sangue ou tecido e contendo 1.550 mg de proteína, foi centrifugado a 3.500 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi submetido à ultrafiltração (Amicon, YM-100) para um volume final de 20 ml contendo 780 mg de proteína. O concentrado foi usado para purificação da enzima conversora de angiotensina, após diálise contra tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0. O protocolo de purificação incluiu três etapas cromatográficas:

- Filtração em gel em coluna Superdex 75 HR 10/30, Pharmacia, equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,05 M, contendo NaCl 0,5 M, pH 6,5 e fluxo de 1 ml por minuto. Alíquotas de 0,5 ml foram aplicadas à coluna e coletaram-se frações de 1 ml.

- Cromatografia de afinidade em coluna de Cibacron® azul agarose, 0,9 x 30 cm, (Bio Rad), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0 e fluxo de 0,5 ml/min. Alíquotas de 2,0 ml foram aplicadas e coletaram-se frações de 1 ml.

- Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q 5/5 HR, Pharmacia, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5 e eluída por um gradiente de NaCl (0 a 0,5 M) utilizando tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5 (tampão A) e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,5, contendo NaCl 0,5 M (tampão B). O fluxo foi mantido em 1 ml/min. Coletaram-se

alíquotas de 0,5 ml. Todas as etapas cromatográficas foram monitoradas em 280 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Pharmacia).

A atividade enzimática das frações obtidas nas etapas cromatográficas foi testada utilizando-se o substrato Hip-His-Leu, segundo Friedland e Silverstein²⁵. A presença de outras proteínas nas preparações obtidas após cada etapa cromatográfica foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE -7,5%) sob condições redutoras, como descrito por Laemmli²⁶ (sistema Bio-Rad). Alíquotas das preparações enzimáticas contendo de 2 a 10 μg de proteína foram aplicadas ao gel. Os géis foram corados pelo método da prata amoniacal²⁷. Para determinação da massa molecular, foram usados padrões de beta-amilase (200 kDa), albumina bovina (65 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e lactalbumina (14 kDa), todos de procedência Sigma. A massa molecular foi estimada por meio de interpolação gráfica.

Determinação das atividades enzimáticas Hidrólise angiotensina I

Angiotensina I (80 nmoles) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 (350 μl), contendo NaCl 0,3 M, foi incubada com ECA purificada do líquido pericárdico (4 ng em 10 μl) a 37°C. Aos 10 e 30 minutos de incubação, alíquotas foram submetidas à cromatografia em coluna de octadecilsilano (C-18), equilibrada em acetonitrila:água deionizada (1:5), contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, Shimadzu). Realizou-se a eluição com um gradiente feito com acetonitrila:água deionizada (1:5), contendo TFA 0,1% (tampão A) e acetonitrila contendo TFA 0,1% (tampão B). Os peptídeos foram monitorados em 214 nm por espectrofotômetro UV/VIS e identificados através dos tempos de retenção, utilizando angiotensina I e angiotensina II como padrões. O pico correspondente ao padrão de angiotensina II foi testado usando ensaio biológico em útero isolado de rata²⁸. A atividade biológica foi estimada com soluções de concentrações conhecidas de angiotensina I e angiotensina II como padrões. Os ensaios utilizando animais foram desenvolvidos de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, DC) e pelos Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Hidrólise de bradiginina

A bradiginina (BK, 5 nmoles) foi incubada com a enzima conversora purificada do líquido pericárdico (4 ng), em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 contendo NaCl 0,3 M, para um volume final de 300 μl , a 37°C, durante 10 minutos e testada em ensaio biológico em útero isolado de rata²⁸. Incubou-se um padrão de BK (5 nmoles) nas mesmas condições, na ausência da enzima e foi utilizado como controle. Uma curva dose-resposta de BK foi utilizada para avaliar quantitativamente a atividade biológica das misturas de incubação anteriormente citadas. O desaparecimento da atividade biológica da BK

utilizada foi considerado atividade cininásica. Ensaios de inibição foram realizados usando Na₂EDTA (40 mM) e lisinopril (2,5 μM).

Estudos cinéticos

Hidrólise do substrato Hip-His-Leu

A determinação do pH ótimo para hidrólise do substrato Hip-His-Leu foi realizada com os seguintes tampões: glicina-HCl 0,2 M (pH 3,0 a 4,0), acetato de sódio 0,2 M (pH 4,5 a 5,5), fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,0 a 7,5), Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0 a 8,5) e glicina-NaOH 0,2 M (pH 9,0), contendo NaCl 0,3 M, para um volume final de 490 μL , e a enzima purificada (4 ng). Realizou-se o ensaio como proposto por Friedland e Silverstein²⁵. Os parâmetros cinéticos (k_{cat} and K_m) para hidrólise do substrato Hip-His-Leu (0,25 – 3 mM) foram determinados usando a enzima purificada (4 ng) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,3, contendo NaCl 0,3 M, para um volume final de 490 μl . A mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 ml de NaOH 0,34 M, seguida pela adição de 200 μL de HCl 3 M, e o dipeptídeo His-Leu foi quantificado fluorimetricamente (Exc.365 nm; Em. 495 nm) pela formação de um produto fluorescente com 100 μl de uma solução de o-ftalaldeído 150 mM. Os resultados foram expressos como nmol x ml⁻¹ x min⁻¹. Lisinopril (2,5 μM) foi utilizado para os experimentos de inibição.

Hidrólise de Abz-YRK(Dnp)P-OH, Abz-LFK(Dnp)-OH e Abz-SDK(Dnp)P-OH

Os ensaios com substratos com supressão interna de fluorescência foram feitos como descrito previamente²²⁻²⁴. O pH ótimo foi determinado utilizando alíquotas (4 ng) da enzima purificada e uma solução tampão composta de: 25 mM de glicina, 25 mM de ácido acético, 25 mM de Mes e 75 mM de Tris na presença de 100 mM de NaCl e 10 μM de ZnCl₂ na faixa de pH de 5,0 a 9,5, para um volume final de 1 ml, a 37°C. Os parâmetros cinéticos foram determinados a 37°C, em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) contendo NaCl (0,05 M), ZnCl₂ (10 μM) e os substratos Abz-YRK(Dnp)P-OH, Abz-LFK(Dnp)-OH e Abz-SDK(Dnp)P-OH. A atividade enzimática foi continuamente acompanhada por meio de um fluorômetro (Hitachi F-2000) que mediu a fluorescência em 420 nm (λ_{em}) após excitação a 320 nm (λ_{exc}). A concentração de enzima para determinação da velocidade inicial da reação foi escolhida de tal forma que a hidrólise não fosse superior a 5% do substrato utilizado. A variação de fluorescência foi convertida em micromoles de substrato hidrolisado por minuto, baseando-se numa curva de calibração obtida após a completa hidrólise de cada peptídeo. Os valores de k_{cat}/K_m foram calculados a partir dos parâmetros cinéticos k_{cat} e K_m obtidos pela análise de regressão linear dos dados com o programa GraFit²⁹. Os desvios padrão para k_{cat} e K_m foram inferiores a 7%. A inibição das hidrólises foi realizada utilizando lisinopril (2,5 μM).

Influência de cloretos na atividade catalítica

A influência dos íons cloreto (0 – 500 nM) sobre a atividade catalítica da enzima isolada do fluido pericárdico humano foi

investigada utilizando o substrato Abz-YRK(Dnp)P-OH ($10 \mu\text{M}$) a 37°C em 1 ml de tampão HEPES 50 mM (pH 7,6) contendo ZnCl_2 ($10 \mu\text{M}$) e 4 ng da enzima. A hidrólise foi acompanhada fluorimetricamente, como descrito anteriormente²².

Atividade conversora de angiotensina no soro e no líquido pericárdico

As atividades conversoras de angiotensina I no soro e no líquido pericárdico foram determinadas utilizando Abz-YRK(Dnp)P-OH ($10 \mu\text{M}$) – substrato para N e C-domínios da enzima a 37°C em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6) contendo NaCl 0,05 M, ZnCl_2 $10 \mu\text{M}$. Cem microlitros das amostras de líquido pericárdico e de soro foram adicionados à solução de substrato para um volume final de 2,0 ml, e a atividade enzimática foi acompanhada fluorimetricamente, como descrito anteriormente²². Uma curva de fluorescência foi obtida com a utilização de padrões de peptídeos antes e após hidrólise total. A atividade enzimática foi expressa como miliunidade por miligrama de proteína por minuto de incubação ($\text{mU} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). As determinações foram feitas em duplicata. Inibiu-se totalmente a atividade hidrolítica da enzima por lisinopril $2,5 \mu\text{M}$. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado com um nível de significância de 0,05. As concentrações de proteínas no soro e no líquido pericárdico foram determinadas pelo método do biureto³⁰. Utilizou-se uma solução padrão de proteína nas mesmas condições das amostras e os resultados foram expressos como $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$.

Resultados

Purificação da ECA do líquido pericárdico

Uma enzima conversora de angiotensina foi purificada até a homogeneidade a partir do líquido pericárdico humano, por meio de uma etapa de filtração em membrana YM-100, para a eliminação de proteínas de massas moleculares inferiores a 100 kDa, e de três etapas cromatográficas, sendo uma de afinidade (Cibacron® azul agarose), com o intuito de retirar a albumina residual ainda presente no concentrado. A enzima foi purificada cerca de trezentas vezes. Pelo protocolo utilizado, obtiveram-se $200 \mu\text{g}$ de proteína purificada, com atividade específica de $3.975 \text{ nmol His-Leu} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) mostrou uma única banda protéica sob condições redutoras, com massa molecular aparente de 140 kDa (fig. 1).

A enzima purificada converte angiotensina I em angiotensina II como mostrado pela análise cromatográfica de fase reversa (C18-CLAE) (fig. 2) e pela atividade biológica sobre o útero isolado de rata (fig. 3).

A atividade cininásica da enzima foi demonstrada pelo desaparecimento da atividade biológica da bradicinina sobre o útero isolado de rata, após a incubação com a enzima purificada (fig. 4). Todas as atividades hidrolíticas mostradas pela enzima foram inibidas totalmente por lisinopril.

Os parâmetros cinéticos para a hidrólise dos substratos Hip-His-Leu, Abz-YRK(Dnp)P-OH, Abz-LFK(Dnp)-OH e Abz-SDK(Dnp)P-OH são mostrados na tabela 1.



Fig. 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE (7,5% de ligação cruzada), em condições redutoras, da ECA isolada do líquido pericárdico humano; Canaleta 1 - ECA do líquido pericárdico ($5 \mu\text{g}$); Canaleta 2 - Padrões de massa molecular (beta-amilase = 200 kDa; albumina bovina = 65 kDa; anidrase carbônica = 29 kDa; lactalbumina = 14 kDa).

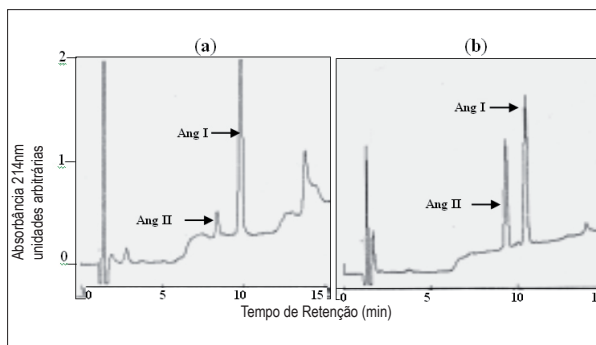


Fig. 2 - Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (fase reversa - C18) da mistura de incubação de ECA do líquido pericárdico humano e de angiotensina I (80 nmoles) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M, durante 10 minutos (a) e 30 minutos (b); A mistura foi aplicada em coluna Lichrospher RP-18 ($4,6 \times 125 \text{ mm}$, Merck), equilibrada em acetonitrila 20% em água, contendo 0,1% de ácido trifluoracético (0,1%) (solvente A) e eluída com acetonitrila 100% contendo 0,1% de ácido trifluoracético (0,1%) (solvente B) e fluxo = 1 ml/min ; Foi feito um gradiente linear de 0% a 80% de tampão B em 25 minutos. Ang I = angiotensina I; Ang II = angiotensina II.

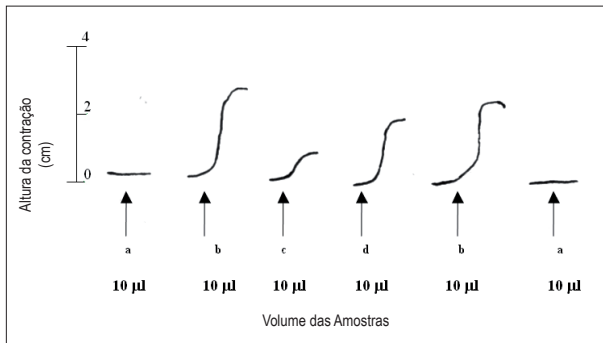


Fig. 3 - Ensaio biológico em útero isolado de rato; Formação de angiotensina II após incubação de ECA do líquido pericárdico humano com angiotensina I; (a) Angiotensina I (80 nmoles em 350 µl de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M, incubada por 10 minutos, 37 oC); (b) angiotensina II (80 nmoles – em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, incubada por 10 minutos, 37 oC); (c) angiotensina I (80 nmoles) e ECA do líquido pericárdico humano (4 ng) em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, 37 oC, incubada durante 10 minutos; (d) angiotensina I (80 nmoles) e ECA do líquido pericárdico humano (4 ng) em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, 37 oC, incubada durante 30 minutos. de tampão B em 25 minutos.

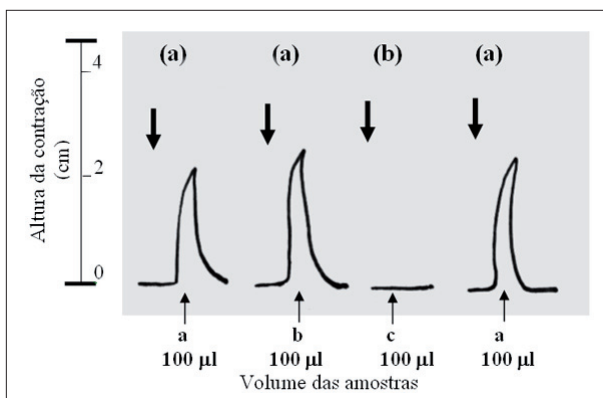


Fig. 4 - Ensaio biológico em útero isolado de rato; Formação de angiotensina II após incubação de ECA do líquido pericárdico humano com angiotensina I. (a) Angiotensina I (80 nmoles em 350 µl de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M, incubada por 10 minutos, 37 oC); (b) angiotensina II (80 nmoles – em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, incubada por 10 minutos, 37 oC); (c) angiotensina I (80 nmoles) e ECA do líquido pericárdico humano (4 ng) em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, 37 oC, incubada durante 10 minutos; (d) angiotensina I (80 nmoles) e ECA do líquido pericárdico humano (4 ng) em 350 µl tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, 37 oC, incubada durante 30 minutos. de tampão B em 25 minutos.

O efeito do pH na hidrólise do substrato fluorescente AbzYRK(Dnp)P-OH mostrou uma melhor atividade hidrolítica em pH 7,65. A curva obtida é similar ao perfil de hidrólise da enzima nativa para vários substratos.

O efeito da concentração de NaCl na hidrólise do substrato Abz-YRK(Dnp)P-OH foi determinado para avaliar a ativação do C-domínio pelos íons cloreto. A atividade máxima foi observada com NaCl 100 mM e mantida no mesmo nível até 500 mM.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos da ECA do líquido pericárdico humano

Substrato	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (µM)	k_{cat}/K_m (µM ⁻¹ s ⁻¹)
Hip-His-Leu	1,14	1654	7×10^{-4}
Abz-YRK(Dnp)P-OH	2,60	3,4	0,77
Abz-LFK(Dnp)-OH	2,77	7,7	0,36
Abz-SDK(Dnp)P-OH	1,92	10,2	0,19

Condições de ensaio: as hidrólises dos substratos com supressão interna de fluorescência pela ECA do líquido pericárdico humano foram realizadas a 37°C, pH 7,6 (tampão Tris-HCl 100 mM, contendo ZnCl₂ 10 µM); A atividade enzimática foi continuamente acompanhada medindo-se a fluorescência em 420 nm (λ_{em}) após excitação a 320 nm (λ_{exc}); Os parâmetros cinéticos da ECA purificada (k_{cat} e K_m), para hidrólise do substrato Hip-His-Leu (0,25 – 3 mM), foram determinados em pH 8,3 (tampão fosfato de potássio 0,1 M, contendo NaCl 0,3 M), a 37°C, utilizando 4 ng da enzima purificada; O dipeptídeo His-Leu foi quantificado fluorimetricamente (Exc.365 nm; Em. 495nm) após adição de o-ftalaldeído.

A atividade conversora de angiotensina no soro e no líquido pericárdico de pacientes é mostrada na tabela 2. A análise dos dados mostrou diferença significativa entre os dois fluidos. Quanto ao conteúdo protéico do líquido pericárdico, foi mantida uma relação que variou de 1/2 a 1/3 ao do plasma. Por essa razão, a atividade enzimática foi expressa como atividade específica (mU x mg⁻¹ x min⁻¹).

Condições de ensaio: a atividade de ECA em amostras de líquido pericárdico e no soro de pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular foi determinada utilizando o substrato Abz-

Tabela 2 – Atividade conversora de angiotensina I e teor de proteína no líquido pericárdico e no soro de pacientes

	Líquido pericárdico		Soro	
	Proteína mg x ml ⁻¹	ECA mU x mg ⁻¹ x min ⁻¹	Proteína mg x ml ⁻¹	ECA mU x mg ⁻¹ x min ⁻¹
Média (n = 23)	20,6#	3,16*	61,7	0,33
DP	5,6	0,90	8,3	0,11

Condições de ensaio: a atividade de ECA em amostras de líquido pericárdico e no soro de pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular foi determinada utilizando o substrato Abz-YRK(Dnp)P-OH (10 µM) a 37°C, em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,05 M e ZnCl 10 µM, em volume final de 2,0 ml. Abz = ácido o-aminobenzóico; Dnp = 2,4-dinitrofenol. Os ensaios foram feitos em duplicata. O teor de proteína foi determinado pelo método do biureto. DP = desvio padrão da média; *p < 0,05, #p < 0,05, comparado com o soro.

YRK(Dnp)P-OH (10 µM) a 37°C, em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,05 M e ZnCl 10 µM, em volume final de 2,0 ml. Abz = ácido o-aminobenzóico; Dnp = 2,4-dinitrofenol. Os ensaios foram feitos em duplicata. O teor de proteína foi determinado pelo método do biureto. DP = desvio padrão da média; *p < 0,05, #p < 0,05, comparado com o soro.

Discussão e conclusão

No presente estudo, isolamos e caracterizamos, pela primeira vez, uma enzima conversora de angiotensina do líquido pericárdico humano. A massa molecular (140 kDa) obtida por meio de eletroforese em gel de poli-acrilamida, para a isoforma isolada, mostrou ser diferente quando comparada aos dados da literatura, em que são descritas massas moleculares nas regiões de 90-110 e 150-180 kDa¹²⁻¹⁴. Essa diferença poderia ser decorrente de modificações pós-traducionais, tais como clivagens da cadeia polipeptídica e/ou glicosilação na isoforma do líquido pericárdico.

Nossos dados mostram que a enzima hidrolisa o substrato clássico para enzima conversora de angiotensina-I, Hip-His-Leu, cliva a ligação Phe-His na angiotensina I, gerando angiotensina II, e apresenta atividade cininásica, hidrolisando bradicinina a produtos inativos. Essas observações indicam que a enzima aqui isolada exibe grande similaridade hidrolítica com a enzima somática. Com o intuito de melhor caracterizar a enzima do líquido pericárdico humano, ensaios com substratos sintéticos suscetíveis à hidrólise pelos domínios C- e N- da ECA foram utilizados, e os resultados obtidos mostram que a isoforma isolada apresenta os dois sítios ativos como a ECA somática. O efeito de íons cloreto sobre a atividade catalítica mostrou um perfil de ativação muito similar à isoforma nativa²³. Com relação às constantes catalíticas obtidas para a enzima purificada, utilizando os vários substratos sintéticos, observamos dados para K_m , similares àqueles encontrados para a forma recombinante. Entretanto, os dados obtidos para k_{cat}/K_m mostram que a enzima do líquido pericárdico apresenta menor eficiência catalítica que a forma recombinante²³. A inibição de todas as atividades hidrolíticas testadas utilizando lisinopril reforçou o caráter de enzima conversora de angiotensina da isoforma aqui isolada.

Nossos achados tornam-se mais relevantes por tratar-se do líquido pericárdico humano, pois é sabido que estudos realizados *in vitro* no miocárdio de diferentes espécies mostram que a ECA constitui a principal via formadora de angiotensina II, constituindo exceção a esta regra o coração humano, do *hamster* e do cão. Em razão disso, redobrada cautela deve ser tomada ao se estenderem para o coração humano os dados colhidos em outras espécies³¹.

O endotélio tem sido considerado a principal fonte de ECA no coração normal^{32,33}. Entretanto, estudos experimentais têm mostrado uma forte marcação para ECA no pericárdio visceral fibrosado, tanto em miocárdio pós-infarto quanto no grupo-

controle em que foi feita apenas a abertura da membrana pericárdica, sugerindo que o tecido fibrosado cardíaco pode ser uma fonte de angiotensina II³⁴.

A possibilidade de síntese e secreção de macromoléculas pela camada mesotelial do pericárdio pode ser amparada pelos dados obtidos por Ishihara e cols.³⁵ que observaram junções intercelulares entre células mesoteliais adjacentes, que constituem barreiras à livre difusão de macromoléculas entre o sangue e a cavidade pericárdica³⁶.

Com o mesmo substrato suscetível aos domínios C- e N- da ECA, utilizado para caracterizar a isoforma isolada neste estudo, realizamos ainda um estudo comparativo para determinar a atividade conversora de angiotensina I no líquido pericárdico e no plasma, mostrando que a atividade no líquido pericárdico é maior que aquela do plasma. Isso corrobora a hipótese de uma isoforma de origem local, com propriedades hidrolíticas similares à ECA plasmática, não excluindo a possibilidade da presença de outras isoformas. O líquido pericárdico é um ultrafiltrado do plasma através do miocárdio, e é pouco provável que a isoforma isolada em nosso estudo tenha origem plasmática, uma vez que o processo de difusão está limitado a moléculas com massas moleculares menores que 40 kDa. É mais provável que ela se origine de células no interior do pericárdio ou da camada mesotelial.

Não devemos, portanto, considerar o pericárdio uma simples bolsa em cujo interior existe uma pequena quantidade de um líquido lubrificante. A presença de enzima conversora de angiotensina I na interface líquido pericárdico-miocárdio constitui importante evidência do papel do pericárdio na regulação da homeostase cardiovascular. É possível que parte dos efeitos da angiotensina II sobre o coração seja decorrente de sua produção pericárdica.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por CNPq.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Mestrado de Isabel Cristina Rezende Lopes pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Referências

1. Burgess LJ, Reuter H, Carstens ME, Taljaard JJ, Doubell AF. Cytokine production in patients with tuberculous pericarditis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 439-46.
2. Meyers DG, Meyers RE, Prendergast TW. The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. *Chest.* 1997; 111: 1213-21.
3. Reis VF, Gomes RAS, Almeida HO, Hial V. Study of the post-mortem proteic content of human pericardial fluid in normal and cirrhotic individuals. *Rev Med Minas Gerais.* 1991; 1: 15-7.
4. Horkay F, Szokodi I, Selmeci L, Merkely B, Kekesi V, Vesisey T, et al. Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life Sci.* 1998; 62: 267-74.
5. Mebazza A, Wetzel RC, Dodd-o JM, Redmond EM, Shah AM, Maeda K, et al. Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. *Cardiovasc Res.* 1998; 40: 332-42.
6. Skeggs LT Jr, Khan JR, Shumway NP. The purification of hypertensin II. *J Exp Med.* 1954; 103: 301-7.
7. Yang HI, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta.* 1970; 214: 373-6.
8. Hial V, Gimbrone MA Jr, Peyton MP, Wilcox GM, Pisano JJ. Angiotensin metabolism by cultured human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Microvasc Res.* 1979; 17: 314-29.
9. Erdös EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 1987; 56: 345-8.
10. Stevens BR, Phillips MI, Fernandez A. Ramipril inhibition of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) small intestinal brush border membrane angiotensin converting enzyme. *Comp Biochem Physiol C.* 1988; 91: 493-7.
11. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene: two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem.* 1991; 266: 15377-83.
12. Kumar RS, Thekkumkara TJ, Sen GC. The mRNAs encoding the two angiotensin-converting isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. *J Biol Chem.* 1991; 266: 3854-62.
13. Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isoenzyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1989; 86: 7741-5.
14. Oksanen V, Fyhrquist F, Somer H, Gronhagen-Riska C. Angiotensin converting enzyme in cerebrospinal fluid: a new assay. *Neurology.* 1985; 35: 1220-3.
15. Siems WE, Heder G, Hilde H, Baeger I, Engel S, Jenzsch KD. Angiotensin-converting enzyme and other peptidolytic enzymes in human semen and relations to its spermatologic parameters. *Andrologia.* 1991; 2: 185-9.
16. Casarini DE, Plavinik FL, Zanella MT, Marson O, Krieger JE, Hirata JY, et al. Angiotensin-converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33: 75-85.
17. Deddish PA, Wang J, Michel B. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1994; 91: 7807-11.
18. Ehlers MR, Chen YN, Riordan JF. Spontaneous solubilization of membrane-bound human testis angiotensin-converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1991; 88: 1009-13.
19. Jaspard E, Wei, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II): studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem.* 1993; 268: 9496-503.
20. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P. The haemoregulatory peptide N-acetyl-ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1995; 270: 3656-61.
21. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension.* 1998; 31: 912-7.
22. Alves M F, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 861-8.
23. Araujo MC, Melo RL, Cesari MH, Juliano MA, Juliano L, Carmona AK. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry.* 2000; 39: 8519-25.
24. Bersanetti PA, Andrade MC, Casarini DE, Juliano MA, Nchinda AT, Sturrock ED. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides for defining substrate specificity of the angiotensin I-converting enzyme and development of selective C-domain substrates. *Biochemistry.* 2004; 43: 15729-36.
25. Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol.* 1976; 66: 416-24.
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
27. Tuñon P, Johanson KE. Yet improved silver staining method for the detection of proteins in PAGE. *J Biochem Biophys Methods.* 1984; 9: 171-9.
28. University of Edinburg. Department of Pharmacology. Pharmacological experiments on isolated preparations. 2nd ed. Edinburg: Livingstone; 1970.
29. Leatherbarrow RJ. GraFit Version 3.0 Staines, UK: Erithacus Software Ltd; 1992.
30. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949; 177: 751-66.
31. Resende MM, Mill, JG. Alternate angiotensin II-forming pathways and their importance in physiological or pathophysiological conditions. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78: 432-8.
32. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 851-8.
33. Dostal DE, Rothblum KA, Chernin ML, Cooper GR, Baker KM. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol.* 1992; 263 (4 Pt 1): C838-50.
34. Yoneda T, Fujita M, Kihara Y, Hasegawa K, Sawamura T, Tanaka T, et al. Pericardial fluid from patients with ischemic heart disease accelerates the growth of human vascular smooth muscle cells. *Jpn Circ J.* 2000; 64: 495-8.
35. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol.* 1980; 46: 744-53.
36. Kluge T, Hovig T. The ultrastructure of human and rat pericardium. 2. Intercellular spaces and junctions. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1967; 71: 547-63.