

Hipertrofia cardíaca em camundongo transgênico que expressa tonina de rato

Rezende, F.¹; Ribeiro, A.A.¹; Lima, M.P.²; Araújo, R.C.³; Pesquero, J.B.³; Pesquero, J.L.²

¹UMC, NCA, Av. Dr. Cândido X. de A. Souza 200, Mogi das Cruzes, SP, fer.rezende@hotmail.com

²UFMG, Depto Biofísica, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, jlpesq@icb.ufmg.br

³UNIFESP, Depto Biofísica, Rua Botucatu 862, Vila Clementino, São Paulo, SP

Resumo- A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é a complicação cardíaca mais comum causada pela hipertensão, mas também ocorre devido a fatores humorais, como a angiotensina II (Ang II) e a aldosterona. A maioria dos casos parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina (SRA). A Ang II ao nível cardíaco possui efeito inotrópico positivo por aumentar o influxo de cálcio durante a excitação cardíaca. Tonina é uma serina proteinase capaz de gerar Ang II tanto da angiotensina I (Ang I) como diretamente do angiotensinogênio (AG). Neste trabalho determinamos a resposta hipertrófica cardíaca de camundongos transgênicos que expressam tonina de rato através do tratamento com isoproterenol.

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

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

O aumento macroscópico do coração, assim como o aumento da espessura da parede e/ou septo interventricular é denominada hipertrofia cardíaca (CARRENO et al., 2006). O crescimento hipertrófico acompanha muitas formas de doenças do coração, (AKASAWA, 2003; FREY et al., 2004; WILKINS et al., 2004; BARAUNA, 2006) incluindo doença isquêmica, hipertensão, falha cardíaca, doença valvular, infarto do miocárdio, cardiomiopatia e estenose aórtica que são condições patológicas que impõem ao coração um trabalho excessivo submetendo assim os cardiomiócitos pós-natais à hipertrofia cardíaca. A 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 outros caminhos (DIAMOND, 2005). No SRA clássico, o angiotensinogênio (AG) é o substrato para a produção da angiotensina II (Ang II), que, pela via clássica, ocorre através de duas etapas, sendo primeiramente, o AG hidrolisado pela renina a angiotensina I (Ang I), e esta convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), conforme mostra a Figura 1.

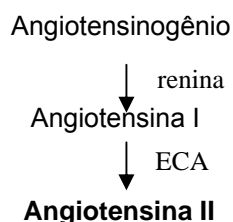


Figura 1. Esquema em cascata do sistema renina-angiotensina clássico.

A Ang II é a molécula chave do sistema, e no coração possui efeito inotrópico positivo por aumentar o influxo de cálcio durante a excitação cardíaca, atuando diretamente em receptores AT1 dos cardiomiócitos. A Ang II também facilita a transmissão adrenérgica ligando-se a receptores pré-juncionais (MILL et al., 1997). Estudos prévios mostram que inibidores da ECA previnem a progressão e induzem regressão da hipertrofia cardíaca em pacientes hipertensos, bem como em modelos animais experimentais. Apesar dos baixos níveis de renina no coração, os níveis de AG e ECA estão elevados no coração hipertrofiado (GROTE et al., 2006). Outras enzimas podem estar envolvidas na liberação da Ang II *in vivo*. Tonina é uma serina-proteinase capaz de liberar o peptídeo vasoativo Ang II tanto da Ang I como diretamente do AG (BOUCHER et al., 1974; GRISÉ et al., 1981), como mostra a Figura 2.

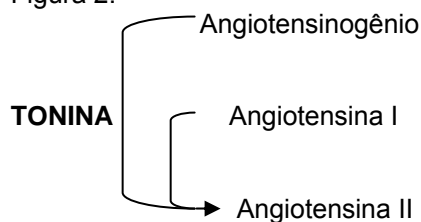


Figura 2. Esquema do sistema tonina-angiotensina.

Experimentos *in vivo* com injeção de isoproterenol, um agonista β -adrenérgico, demonstraram que o aumento na secreção de tonina ocorre pela estimulação β -adrenérgica (BORGES et al., 2003). Infusão crônica de isoproterenol induz hipertrofia cardíaca (NAGANO et al., 1992). No presente estudo, com o uso de pequenas doses repetidas de isoproterenol,

pretendemos evidenciar a participação da tonina na hipertrofia cardíaca de camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)).

Materiais e métodos

Genotipagem dos camundongos. O DNA genômico foi extraído das caudas dos animais, as quais foram incubadas a 55°C sob agitação com 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) por 14 horas e em seguida incubadas a 95°C durante 10 minutos. Foram adicionados 700 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,4 contendo EDTA 1 mM pH 8,0) e 5 µL de RNase (4 mg/mL) e novamente incubadas por 10 minutos a 37°C. O DNA foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) e os produtos analisados em agarose 1% contendo brometo de etídio.

Desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Os camundongos utilizados, provenientes do biotério da Universidade de Mogi das Cruzes, formaram quatro grupos: positivos (n = 7) (PISO) e negativos (n = 8) (NISO) tratados com isoproterenol e seus respectivos controles (PCT, n = 6 e NCT, n = 8). A hipertrofia cardíaca foi desenvolvida nos animais dos grupos ISO através do tratamento com isoproterenol (12 mg/kg/dia). A droga foi diluída em óleo de soja de forma a ser obtido concentração final de 12 mg/0,1 mL e 100 µL foram injetados na região subcutânea durante sete dias consecutivos. Os animais dos grupos CT receberam somente injeção de 100 µL de óleo de soja seguindo os mesmos padrões do grupo tratado.

Dissecação das estruturas do coração. No oitavo dia de 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 separadas em átrios [direito + esquerdo (AT)], ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). A relação entre o peso do coração e de suas estruturas com o peso corporal (peso do coração/peso corporal; peso dos átrios/peso corporal e peso dos ventrículos direito e esquerdo/peso corporal) foi determinada para estimar a ocorrência da hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com isoproterenol.

Análise dos dados. Os resultados foram expressos como média e ± erro padrão da média. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas pelo test “t” não pareado e ANOVA de uma via. O índice de significância excluída foi de 95% para erro do tipo I (p < 0,05).

Resultados

A Figura 3 mostra os resultados de genotipagem de 30 animais. O produto da PCR esperado de 215 pares de base (pb) foi observado confirmando a presença do gene tonina no genoma dos camundongos testados.

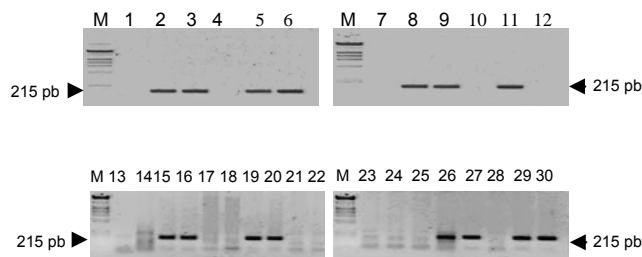


Figura 3. Géis de agarose 1% dos produtos de PCR (gene da tonina amplificado) correspondendo a 215 pb. M, marcador de massa molecular. Os números na parte superior correspondem aos animais testados.

Destes, 15 mostraram-se positivos e 15 negativos. A partir da verificação e obtenção dos animais positivos (geneticamente modificados) e negativos, pudemos formar os grupos e utilizá-los para o desenvolvimento e análise da hipertrofia cardíaca. A análise da hipertrofia do coração foi realizada através do peso úmido dos tecidos. A relação entre, o peso total do coração e o peso de cada estrutura foi dada em miligramas por grama de tecido e corrigido pelo peso corporal dos animais em gramas. No entanto, os dados sobre o peso corporal no início e no final do tratamento também foram coletados e estão representados na Figura 4.

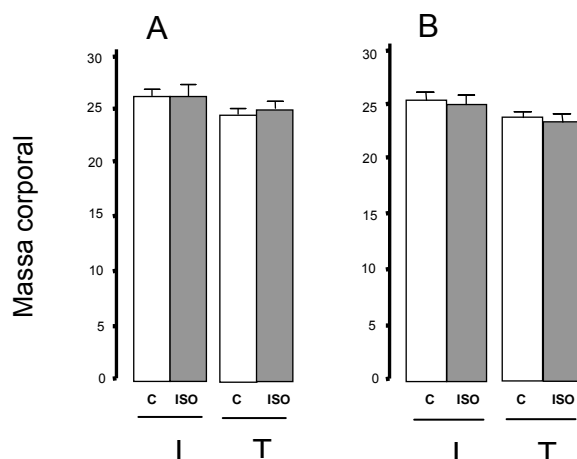


Figura 4. Massa corporal dos animais tratados com isoproterenol (ISO) ou com óleo (C) no início (I) e no término (T) do tratamento. **A**, selvagens e **B**, TGM(rTon). Os dados foram expressos como a média ± epm. *P<0,05.

Como mostrado na Figura 5, o isoproterenol ocasionou aumento da massa total do coração (5,79 ± 0,10 vs 4,52 ± 0,50), bem como do

ventrículo direito ($1,17 \pm 0,03$ vs $0,91 \pm 0,03$) e ventrículo esquerdo ($4,04 \pm 0,11$ vs $3,53 \pm 0,07$) somente nos animais negativos tratados (NISO). Os átrios não tiveram aumento significativo ($0,40 \pm 0,02$ vs. $0,30 \pm 0,00$).

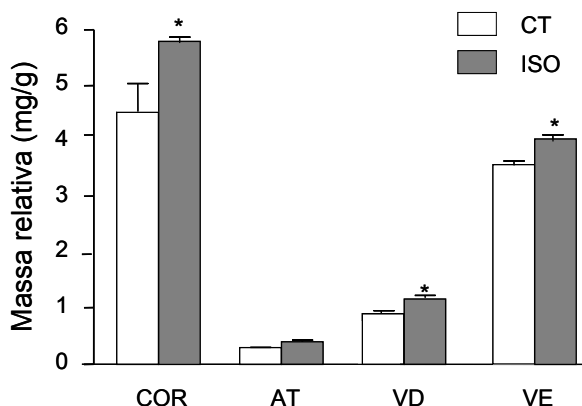


Figura 5. Relação entre a massa do coração e das estruturas corrigidas pela massa corporal dos animais negativos tratados com óleo (CT) ou isoproterenol (ISO). Os dados foram expressos como média \pm epm. * $P < 0,05$.

O mesmo não ocorreu nos animais positivos (PISO), nos quais não houve aumento significativo no coração total ou em quaisquer estruturas analisadas (Figura 6).

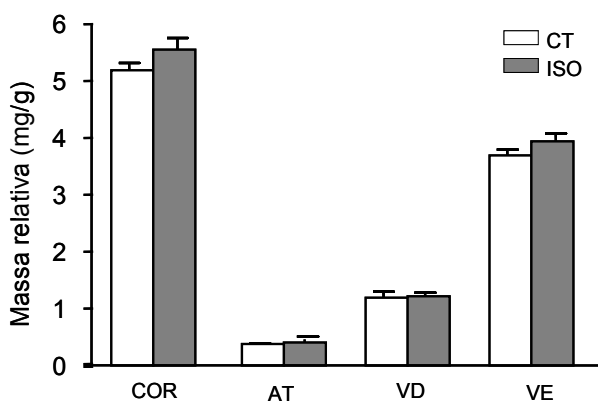


Figura 6. Relação entre a massa do coração e das estruturas corrigidas pela massa corporal dos animais positivos tratados com óleo (CT) ou com isoproterenol (ISO). Os dados foram expressos como média \pm epm. * $P < 0,05$.

Discussão

A ação direta da ang II na hipertrofia do miocárdio tem sido sugerida pelos seguintes achados: localização preferencial de angiotensina marcada em zonas nucleares de miócitos vasculares e cardíacos; estímulo da síntese protéica no miocárdio depois da infusão de angiotensina; redução na massa do ventrículo esquerdo em pacientes que usam inibidores da enzima de conversão (SILVA et al., 2002).

No coração, ECA é principalmente localizada nos fibroblastos e no endotélio (ZHANG, 1995) e há algumas controvérsias sobre sua participação no coração hipertrofiado. Tem-se sugerido que ocorre aumento da expressão da ECA na pressão alta induzida por fibrose cardíaca, mas não na hipertrofia (KUROSAWA, 2002), a qual pode ser mantida por diferentes mecanismos de ativação do SRA (SIMKO, 2002). Segundo Borges et al (2003) os níveis de mRNA e atividade tonina aumentaram significativamente nos átrios após o tratamento com isoproterenol e portanto tonina pode representar um dos sistemas de liberação de ang II que contribui para hipertrofia induzida por isoproterenol.

Borges et al. (2003) ainda descrevem que tonina nos átrios também pode participar em vias metabólicas de outros peptídeos tais como substância P e processamento de 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). ANP e ang II tem efeitos opostos na homeostase cardiovascular. No coração, os dois sistemas são altamente e simultaneamente regulados durante o crescimento cardíaco patológico e fisiológico, como remodelamento e desenvolvimento. Enquanto os níveis circulantes do ANP e SRA são fortemente determinados por alterações no balanço de sódio, os níveis teciduais poderiam ser afetados por fatores locais. A ang II tem mostrado aumentar a secreção de ANP pelos miócitos cardíacos; o qual então inibe o crescimento dos miócitos e a proliferação dos fibroblastos (SANGHI, 2005).

Nossos resultados mostram que após o tratamento com isoproterenol os animais (TGM(rTon)), ou seja, que expressam tonina de rato, não apresentaram resposta hipertrófica significativa quando comparados ao grupo controle, ao contrário dos animais negativos, os quais apresentaram hipertrofia cardíaca significativa após o tratamento. O aumento nos níveis de tonina observado por Borges et al. (2003), podem ser uma resposta fisiológica cardioprotetora, contrária ao desenvolvimento hipertrófico.

Conclusão

Tonina pode estar envolvida no processo de hipertrofia cardíaca. Nossos dados preliminares mostram que tonina pode ser cardioprotetora no que se refere ao processo hipertrófico.

Referências

- AKASAWA H.; KOMURO, I. Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy. **Circulation Research**. Dallas, V. 92, p.1079-088, 2003.
- BARAUNA, V.G. Participação do sistema renina angiotensina na hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento resistido. 2006. Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, 2006.
- BORGES, J.C.; SILVA JR, J.A.; GOMES, M.A.; LOMEZ, E.S.L.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M., PESQUERO, J.B., PESQUERO, J.L. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. V. 284, p. 2263-2268, 2003.
- BOUCHER, R.; ASSELIN, J.; GENEST, J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. **Circ Res**. V. 34/35, p. 203-209, 1974.
- CARRENO, J.E.; APABLAZA, F.; OCARANZA, M.P.; JALIL, J.E. Hipertrofia cardíaca: eventos moleculares y celulares. **Rev Esp Cardiol**. V. 59, p. 473-86, 2006.
- DIAMOND, J.A.; PHILLIPS, R.A. Hypertensive Heart Disease. **Hypertens Res**. V. 28, p.191-202, 2005.
- FREY, N.; KATUS, H.A.; OLSON, E.N.; HILL, J.A. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? **Circulation**. V.109, p.1580-1589, 2004.
- GRISÉ, C.; BOUCHER, R.; THIBAUT G.; GENEST, J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. **Can J Biochem**. V. 59, p. 250-255, 1981
- GROTE, K.; ORTMANN, M.; SALGUERO, G.; DOERRIES, C.; LANDMESSER, U.; LUCHTEFELD, M.; BRANDES, R.P.; GWINNER, W.; TSCHERNIG, T.; BRABANT, E.G.; KLOS A.; SCHAEFER, A., DREXLER, H., SHIEFFER, B. Critical role for p47phox in renin – angiotensin system activation and blood pressure regulation. **Cardiovascular Research**. V.71, p. 596-605, 2006.
- 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. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 39, p. 600-609, 2002.
- LEVY, B. I. How to Explain the Differences Between Renin Angiotensin System Modulators. **AJH**. V. 18, p. 134D-141S, 2005.
- MALHOTRA, R.; SADOSHIMA, J.; BROSIUS, F.C.; IZUMO, S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes in vitro. **Circ Res**. V. 85, p. 137-146, 1999.
- 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.
- SILVA, R. P.; AMODEO, C.; RAMIRES, J. A. F. O Ventrículo Direito e a Hipertensão Arterial. Aspectos Ecocardiográficos. **Arq Bras Cardiol**. V. 79, p. 313-8. 2002.
- SIMKO, F.; PELOUCH, V.; KYSELOVIC, J. Captopril fails to reverse hypertrophy of the left ventricle induced by aortic insufficiency in rabbits. **Physiol Res**. V. 51, p. 27-33, 2002.
- ZHANG, X.; DOSTAL, D.E.; REISS, K.; CHENG, W.; KAJSTURA, J.; LI, P.; HUANG, H.; SONNENBLICK, E.H.; MEGGS, L.G.; BAKER, K.M. Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. V. 269, p. 1791-1802, 1995.