

CARACTERIZAÇÃO DE CAMUNDONGO TRANSGÊNICO QUE EXPRESSA TONINA DE RATO. IMPORTÂNCIA DA IDADE NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE

Amanda Aparecida Ribeiro¹, Mércia de Paula Lima², Fernanda Rezende¹, Jorge Luiz Pesquero^{1,2}

¹UMC/ Núcleo de Ciências Ambientais, Av Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza 200, Mogi das Cruzes, SP
amandabio1@hotmail.com

²UFMG/ Depto. Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG
mercial@enf.ufmg.br

¹UMC/ Núcleo de Ciências Ambientais, Av Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza 200, Mogi das Cruzes, SP
fer.rezende@hotmail.com

²UFMG/ Depto. Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG
jlpesquero@yahoo.com.br

Resumo- Toninas são serino preteinases capazes de liberar, *in vitro*, o peptídeo vasoconstritor angiotensina II (Ang II), tanto a partir de angiotensina I (Ang I) como diretamente do angiotensinogênio (AG). Este trabalho tem como objetivo contribuir na caracterização fenotípica de camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)). Utilizou-se animais de 6 e 12 semanas de idade, sendo 8 animais para cada idade. Como controle foram utilizados camundongos da linhagem C57 bl 6. Realizou-se extração de RNA total de diversos órgãos e os níveis de expressão de tonina foram verificados por RT-PCR e eletrotransferência seguida de imunoblot. A atividade tonina foi determinada por radioimunoensaio. Após o teste de atividade, observou-se que o grupo transgênico apresentou maior atividade tonina comparado ao seu grupo controle. Os animais com 12 semanas de idade apresentaram níveis de atividade maiores em todos os tecidos estudados. Após a eletrotransferência, apenas a amostra do coração dos animais mais jovens apresentou uma banda de 28 kDa, referente a tonina. Já nos animais mais velhos a banda foi mais intensa na glândula submandibular dos transgênicos e dos animais controle.

Palavras-chave: Sistema renina angiotensina, angiotensina II, tonina, camundongo transgênico.

Área do Conhecimento: Bioquímica e Biologia Molecular

Introdução

Extensivos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se obter drogas efetivas para o tratamento de hipertensão, e neste aspecto, o sistema renina angiotensina, que, via angiotensina II (Ang II), apresenta diversos efeitos no sistema cardiovascular, tem sido o mais estudado (BALTATU et al., 2000; CAREY et al., 2005).

A produção de Ang II ocorre em duas etapas: primeiramente, o angiotensinogênio (AG), substrato natural da renina, é hidrolisado levando a formação da angiotensina I (Ang I), e esta é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (BRASIER et al., 2002). Enzimas semelhantes à renina, por exemplo, a catepsina D, a pepsina e outras aspartil-proteinases produzem Ang I a partir do AG. Por outro lado, catepsina G e tonina podem produzir Ang II diretamente do AG (BOUCHER et al., 1972; ARAÚJO et al., 2002; LOMEZ et al., 2002).

Toninas são serina-proteinases capazes de liberar o agente vasoconstritor, angiotensina II, não só a partir da angiotensina I, mas também do AG, pela hidrólise da ligação Phe.His destes substratos (BOUCHER et al., 1972; ARAÚJO et al., 1991; BORGES et al., 2003). Recentemente, nosso

grupo gerou camundongo transgênico que expressa tonina de rato (TGM(rTon)). Este animal apresenta pequeno, mas significativo aumento na pressão arterial. Afim de caracterizar o camundongo transgênico TGM(rTon) estamos apresentando resultados referentes a atividade tonina em diferentes tecidos deste com idades de 6 e 12 semanas.

Metodologia

Para a realização deste trabalho utilizamos camundongos TGM(rTon), com 6 e 12 semanas de idade, sendo 8 animais para cada idade. Como controle foram utilizados 16 camundongos selvagens, C57 bl 6, sendo 8 com idade de 6 semanas e 8 com 12 semanas. Inicialmente os animais passaram por processo de genotipagem.

Para tanto, 5 µg de DNA, extraído de um pedaço de cauda dos animais foram aplicados em reação de PCR utilizando-se de iniciadores específicos para o transgene. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (50 µg/mL).

Após a genotipagem os camundongos foram sacrificados por decapitação e tiveram os seguintes órgãos retirados: cérebro, glândula submandibular, coração, adrenais, rins, próstata e tecido adiposo inguinal.

Todos os órgãos foram lavados em salina 0,9% e em seguida homogeneizados separadamente em solução sacarose 0,25 M pH 7,0 contendo os inibidores dipiridil, EDTA, tetratoato de sódio a 10 mM, na proporção de 4 mL para cada grama de tecido. O homogenato foi centrifugado, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo, e o sedimento descartado.

Para determinação da atividade tonina incubou-se 2 µg de proteína de cada sobrenadante com 5 µg do peptídeo sintético AG(1-14), que corresponde a porção tetradecapeptídica N-terminal do AG. A angiotensina II liberada foi determinada por radioimunoensaio (GUALBERTO et al., 1992).

A concentração de proteína de cada sobrenadante foi determinada utilizando-se o método descrito por BRADFORD (1976).

Alternativamente, os tecidos foram homogeneizados em presença de Trizol na proporção de 100 mg de tecido por mililitro de Trizol de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen). A concentração de RNA foi determinada pela leitura espectrofotométrica em 260 nm.

Para a reação da transcrição reversa utilizamos o kit da Invitrogen para síntese da primeira fita (cDNA). O produto da reação da RT foi submetido à amplificação por meio da PCR. Como controle da quantidade de mRNA utilizado realizamos a PCR também para a β-actina de rato. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

Inicialmente amostras de homogenatos de cada tecido foram aplicadas em eletroforese em gel de poli-acrilamida 12%, em escala analítica, com tensão constante a 110 V, empregando-se o método descrito por LAEMMLI (1970). Foram aplicados 50 µg de proteína de cada homogenato dos diferentes tecidos. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após as lavagens a membrana foi incubada com anticorpo anti-tonina, e posteriormente incubada com IgG anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase. A revelação foi realizada com diaminobenzidina 0,05%, cloronaftol 0,025% (p/v) e peróxido de hidrogênio a 0,0125% (v/v).

Resultados

Para a confirmação da presença do transgene (genotipagem), os produtos da PCR foram analisados em agarose 1%. Obtivemos uma banda

de 215 pb, confirmando o genótipo dos animais geneticamente modificados. A Figura 1 mostra um dos resultados obtidos para animais negativos e positivos. Os animais 2, 3, 5, 6, 8, 9 e 11 eram positivos, enquanto os demais negativos.

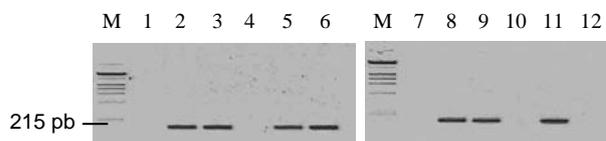


Figura 1. Géis de agarose 1% mostrando os produtos de PCR (gene da tonina amplificado) correspondendo a 215 pb. M, marcador de massa molecular.

Após a determinação dos níveis de angiotensina II formada durante incubação nos diferentes tecidos dos animais selvagens de 6 semanas de idade, encontramos atividade apenas no cérebro e na glândula submandibular. Para os animais transgênicos encontramos atividade no cérebro, glândula submandibular, coração, rins e próstata (Figura 2). O tecido que apresentou maior atividade foi a glândula submandibular, em ambos grupos. A Figura 2 mostra os níveis de atividade específica obtido para todos os tecidos estudados dos animais de 6 semanas de idade.

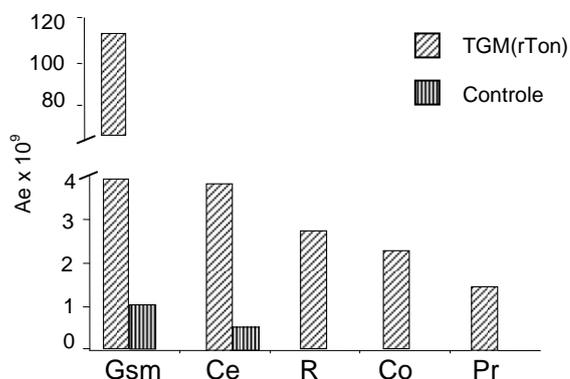


Figura 2. Atividade específica, expressa em moles de Ang II/h/mg proteína, das diferentes estruturas. GSM, glândula submandibular; Ce, cérebro; R, rim; Co, coração e P, próstata.

A atividade específica nos animais de 12 semanas de idade foi observamos em todos os tecidos de ambos os grupos (transgênicos e selvagens). A Glândula submandibular (Gsm) foi o órgão com maior atividade específica quando comparado com os outros tecidos. A atividade específica encontrada na Gsm foi de $38,47 \times 10^{-9}$ e $158,85 \times 10^{-9}$ moles de ang II liberados por hora e miligrama de proteína animais controle e transgênicos respectivamente. A Figura 3 mostra a atividade específica de cada tecido, mostrando que os animais transgênicos apresentaram

sempre maior atividade quando comparados com o grupo controle (selvagem).

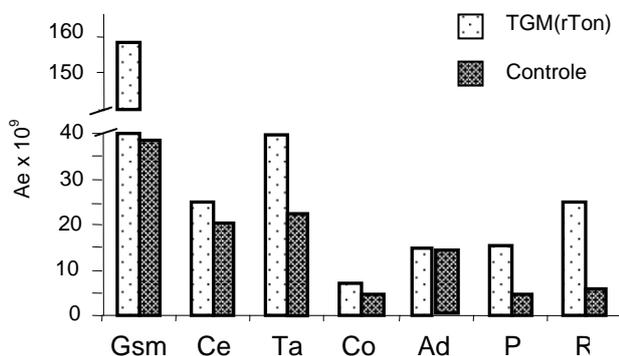


Figura 3. Atividade específica (Ae), expressa em moles/h/mg proteína, de diferentes estruturas, nos animais com 12 semanas de idade. Gsm, glândula submandibular; Ce, cérebro; Ta, tecido adiposo; Co, coração; Ad, adrenal; P, próstata e R, rim.

Comparando a atividade específica entre os animais de diferentes idades, observamos que tanto para o animal transgênico, quanto para seu controle, houve um aumento nos níveis de atividade em todos os órgãos, mostrando que a atividade tonina aumenta com a idade (Tabela 1).

Tabela 1
Atividade específica de estruturas de animais com idades diferentes

Órgão	Ae x 10 ⁹ moles por hora e miligrama de proteína			
	6 semanas		12 semanas	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Cérebro	3,82	0,46	24,97	20,25
Gsm	102,82	1,01	158,85	38,47
Coração	2,25	-	7,08	4,61
Rim	2,70	-	24,97	5,73
Próstata	1,46	-	15,95	4,61

Após reação de RT-PCR utilizando iniciadores específicos para tonina de rato, obtivemos uma banda de 215 pb, referente ao cDNA da tonina, para cada amostra. No tecido adiposo e próstata não apareceram bandas. A banda obtida no coração foi a mais intensa, mostrando que há uma grande quantidade de mRNA para a tonina neste órgão. Já na glândula submandibular, cérebro, rins e adrenal a intensidade da banda foi parecida, mostrando que a tonina possa estar igualmente presente nestes tecidos estudados. Os níveis expressão foram demonstrados através do gel de agarose 1%. A Figura 4 está mostrando os níveis

de expressão da tonina (figura de cima) e de β -actina (figura de baixo) utilizada como marcador endógeno da reação.

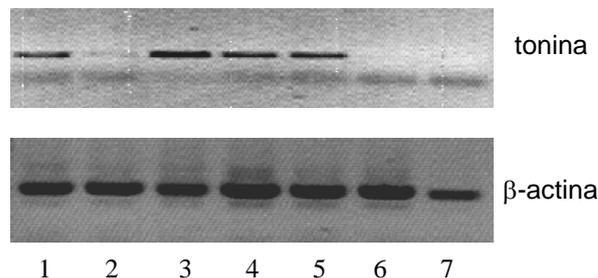


Figura 4. Níveis de expressão da tonina em diferentes tecidos determinados por meio da técnica de RT-PCR. Animais com 6 semanas de idade. 1, cérebro; 2, glândula submandibular; 3, coração; 4, rim; 5, adrenal; 6, tecido adiposo; 7, próstata.

Após a transferência das proteínas foi possível visualizar, apenas no homogenato do coração dos animais TGM(rTon) e controle, uma banda de 28 kDa (Figura 5), massa molecular que apresenta a tonina de rato, mostrando a semelhança das toninas de rato e de camundongo.

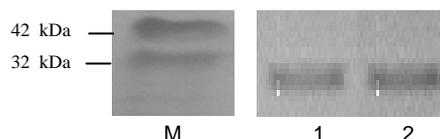


Figura 5. Imunoblote mostrando os diferentes níveis de expressão da tonina em coração do camundongo transgênico (1) e selvagem (2) com 6 semanas de idade. M, marcador de massa molecular.

Com os animais de 12 semanas de idade observamos bandas nos tecidos: rim, coração, glândula submandibular e cérebro. A banda de maior intensidade foi encontrada na glândula submandibular. No cérebro e rins a banda foi pouco intensa, mostrando que há pouca tonina nestes tecidos (Figura 6).

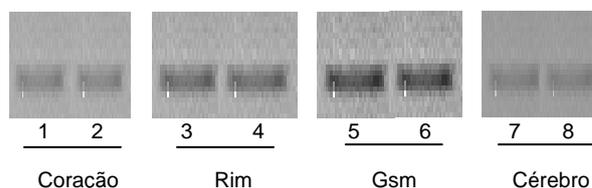


Figura 6. Imunoblote mostrando os níveis de expressão da tonina em diferentes tecidos de animais com 12 semanas de idade. Canaletas 1, 3, 5 e 7 animais transgênicos e canaletas 2, 4, 6 e 8 animais selvagens.

Discussão

Como descrito por GARCIA et al., (1977), tonina corresponde a 8% do conteúdo proteico da glândula submandibular do rato, sendo o órgão que mais apresenta esta atividade.

Segundo THIBAUT et al., (1981) não é possível verificar a atividade tonina no plasma, devido a uma α 2-macroglobulina que é um potente inibidor de tonina. Para algumas estruturas não detectamos atividade tonina, provavelmente devido a inibição por esta proteína.

A atividade tonina está em maior quantidade nos animais mais velhos, pois esta foi detectada em todos os tecidos estudados, corroborando com BOUCHER et al., (1972), que mostrou que os níveis de tonina na glândula submandibular aumenta com a idade.

Segundo ARAÚJO et al., (1991), a tonina de rato purificada apresenta uma banda de 28 kDa, o que mostra que o camundongo deve ter uma tonina de massa molecular semelhante a do rato.

Conclusões

A atividade específica foi maior na glândula submandibular para ambos grupos de 6 e 12 semanas de idade.

Ao compararmos a atividade específica entre os animais positivos e negativos de diferentes idades, podemos concluir que nos animais mais velhos a tonina está aumentada em todos os tecidos estudados.

Tanto o animal controle como no TGM(rTon), apresentaram uma banda imunoreativa de 28 kDa, semelhante à massa molecular da tonina de rato.

Referências

- ARAUJO, G. W; PESQUERO, J. B; LINDSEY, C. J; PAIVA, A. C. M; PESQUERO, J. L. Identification of serine proteinases with tonin-like activity in the rat submandibular and prostate glands. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1074, n.1, p.167-171, 1991.
- ARAUJO, R. C; KIMA, M.P; LOMEZ, E. S. L; BADER, M; PESQUERO, J. B; SUMITAMI, M; PESQUERO, J. L. Tonin expression in the rat brain and tonin-mediated central production of angiotensin II. **Physiology & Behavior**. V.76, n.2, p.327-333, 2002.
- BALATU, O; SILVA Jr, J. A; GANTEN, D; BADER, M. The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. **Hypertension**. V.35, n.1, p.409-412, 2000.
- BORGES, J. C; SILVA-Jr., J; GOMES, M. A; LOMEZ, E. S. L; ARAÚJO, R. C.; BADER, M.; PESQUERO, J. L. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**. V.284, n.6, p.2263-8, 2003.
- BOUCHER, R; SAIDI, M; GENEST, J. A new angiotensin I converting enzyme system. **Hypertension**. V.37, n.1, p.512-523, 1972.
- 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, n.2, p.248-254, 1976.
- BRASIER, A. R; RECINOS, A; ELEDRI, M. S. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**. V. 22, n.8, p.1257-1266, 2002.
- CAREY, R; SIRAGY, H, M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine**. V.24, n.3, p.261-271, 2005.
- GARCIA, R; KONDO, K; SCHOLKENS, B; BOUCHER, R; GENEST, J. Effect in vivo of beta-adrenergic stimulation, angiotensin II, dibutyl cyclic AMP, and theophylline on tonin concentration in rat saliva and submaxillary gland. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**. V.5, n.5, p.983-989, 1977.
- GUALBERTO, M. P; NUNES, R. L; BERALDO, W. T; PESQUERO, J. L. Tonin-like activity present in human submandibular gland. **Agents Actions**. V.38, n.1, p.392-400, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. V.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LOMEZ, E. S; ARAUJO, R. C; BADER, M; PESQUERO, J. B; PESQUERO, J. L. Tonin and kallikrein in the brain of transgenic rat line expressing human tissue kallikrein. **Hypertension**. V.39, n.2, p.229-232, 2002.
- THIBAUT G; GENEST J. Tonin, an esteroprotease from rat submaxillary glands. **Biochimica Biophysica Acta**. V.660, n.1, p.23-29, 1981.