

ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) NO INSETO *Tribolium castaneum*

Josiel Santos do Nascimento^{1,2}, Hugo Juarez Vieira Pereira³

Humberto de Araujo^{1,2}, Maria Elizabeth Costa^{1,2}, Camila Braga Dornelas² Luciano Aparecido Meireles Grillo²

1. Discentes Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular –SBBq - UFAL

2. ESENFAR – Escola de Enfermagem e Farmácia - UFAL

3. IQB – Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL

Resumo:

Antigamente, achava – se que a enzima conversora de angiotensina era um componente específico da fisiologia de mamíferos. Mas, vários homólogos da enzima foram encontrados em sequências de genomas de insetos. E essa enzima é importante no processo de fertilização dos insetos. O objetivo desse projeto é isolar e caracterizar a atividade conversora de angiotensina do inseto adulto *T. castaneum*, e estudar seu envolvimento no desenvolvimento do inseto. Cerca de 500 insetos foram utilizados para produção do homogenato utilizado nos testes de atividade enzimática. Utilizando Ang I como substrato, os produtos de hidrólise foram detectados através de HPLC. Após identificação de atividade enzimática no homogenato foi feito um fracionamento utilizando um sistema FPLC. AKTA. Três frações apresentaram atividade enzimática de ECA. Uma alíquota de cada fração foi aplicada em SDS – PAGE a 10%.

Autorização legal: Informe a autorização legal para execução da pesquisa: as referências do cumprimento das exigências legais, com expedição de autorizações junto a Comitês de Ética ou Órgãos Ambientais, número de autorizações ou protocolos expedidos pelo CEP/CONEP, CEUA, IBAMA, ICMBio, CGEN, IPHAN etc.).

Palavras-chave: ECA, *Tribolium castaneum*, coleóptera

Apoio financeiro: CAPES e FAPEAL.

Introdução:

A enzima conversora de angiotensina popularmente conhecida como ECA, é uma proteína integral membranar com importante papel no controle hemostático de mamíferos (Hopper et al, 1987; Hopper e Turner 1987; Wei et al, 1991; Ripka et al, 1993). Além disso, a enzima é uma metalopeptidase dependente de zinco que converte um peptídeo inativo ang I em um potente vasoconstritor ang II e, também inativa a bradicinina um potente vasodilatador (BERNSTEIN et al., 2013).

Os mamíferos apresentam duas isoformas de ECA: ECA somática (sECA) e ECA testicular (tECA). A sECA é distribuída nas maiorias dos tecidos, (Riordan, 2003). Já a tECA está presente unicamente nas células sexuais masculinas. (BALYASNIKOVA, et al 2002; PARKIN, et al 2004). Posteriormente, um grupo de pesquisa estudando genes envolvidos na insuficiência cardíaca descobriram um novo homólogo da ECA, que foi intitulada de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2). A ECA 2 é também uma metalopeptidase zinco dependente integrada a membrana (TIPNIS et al. 2000).

Ao longo de muitos anos, achava – se que a ECA era um componente específico da fisiologia de mamíferos. Mas, com os avanços nos estudos de genomas, vários homólogos da enzima foram encontrados em sequências de genomas de insetos analisadas até os dias atuais (LAMANGO & ISAAC, 1994; ISAAC et al, 2007). Ensaio *in vitro*, constataram que a ECA de insetos hidrolisa vários substratos específicos como a encefalina. Em várias espécies de insetos, essa enzima assume um papel importante no processo de fertilização e aparenta participar também no metabolismo digestivo. (ISAAC et al. 1998; LAMANGO et al., 1996; HOUARD et al., 1998; SIVITER et al., 2002a). Estudos em sequências homólogas de *D. melanogaster* identificaram que a enzima conversora de angiotensina deste inseto apresentava cerca de 45% de identidade de sequência com a tACE humana, desde então este inseto vem sendo utilizado como modelo para testes com inibidores da ECA (CORNELL et al.1995; TATEI et al.1995).

O estudo da biologia dos insetos, principalmente, análise do perfil de proteínas e enzimas importantes no desenvolvimento dos mesmos tem ajudado a elucidar mecanismos ainda desconhecidos sobre a sua fisiologia. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é isolar e caracterizar a atividade da enzima conversora de angiotensina do inseto adulto *T. castaneum*.

Metodologia:

Extração do extrato bruto:

Aproximadamente 500 insetos foram triturados e os tecidos homogeneizados em tampão Tris – HCl 50 mM, pH 8,0, e a concentração de proteína foi determinado utilizando albumina bovina como padrão (BSA). O cálculo da concentração proteica foi feito pelo método de Bradford (1976).

- Ensaio enzimático de atividade conversora de angiotensina

A atividade conversora de angiotensina no extrato proteico do inseto *Tribolium castaneum* foi testada com o decapeptídeo Ang I. A mistura de reação continha 30 µL de solução de Ang I 1 mM, 130 µL de tampão Tris – HCl 50 mM, pH 8,0 e 10 µL de extrato proteico e a reação ocorre por 4 horas à temperatura ambiente (25°C). Padrões para referência de Ang I e Ang II também são usados, sendo que cada tubo de reação contém 30 µL de solução do peptídeo a 1 mM de estoque e 140 µL de solução tampão Tris - HCl 50 mM, pH 8,0. As reações foram paradas com 40 µL de uma solução 5% de ácido trifluoracético (TFA). As amostras foram acondicionadas em banho gelado a 20°C até o momento da cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

- Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram aplicadas em um gel com 12 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Foram utilizadas alíquotas de 15 µL das frações. A eletroforese foi realizada a uma corrente constante de 85 V.

- Cromatografia líquida de alta eficiência

Os produtos de hidrólise foram detectados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um equipamento Shimadzu SCL – 6B acoplado a uma coluna C18 (0,45 x 15 cm), eluída com um gradiente de acetonitrila com 0,1 % TFA, a um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de absorbância em 215 nm.

- Purificação proteica

Para isolar e purificar a enzima conversora de angiotensina do extrato proteico do inseto 150 µL de solução proteica foi diluída em 4850 µL de tampão Tris – HCl 50 mM, pH 8,0. O volume total de amostra (5 mL) foi injetado em um cromatografo líquido do tipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA purê da GE, usando coluna de troca – iônica Hitrep CMFF16/10 de 55mL eluída com tampão Tris-HCl pH 8,0 e 0,75M de NaCl em 70 volumes da coluna. O volume de fração coletado foi de 5 mL a um fluxo de 0.500 mL por minuto a 25° C e monitorado a 280 nm de absorbância. Ensaio de atividade da enzima conversora de angiotensina foi feito para todos os picos de proteína obtidos.

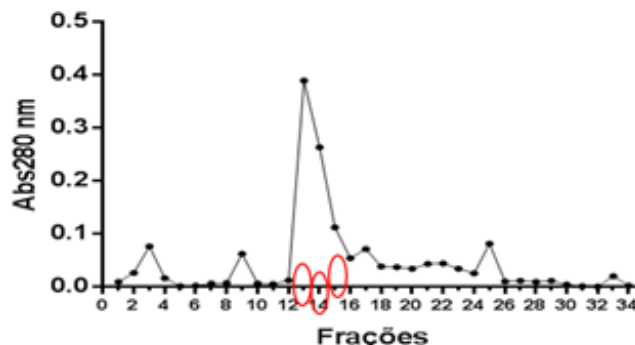
Resultados e Discussão:

Purificação protéica

O perfil do cromatográfico do extrato bruto apresentou seis picos a 280 nm. As frações 13, 14 e 15 (em vermelho na figura) por apresentarem maior quantidade de proteína foram utilizadas para análise da atividade de ECA com o objetivo de identificar a fração com maior atividade (Figura 1).

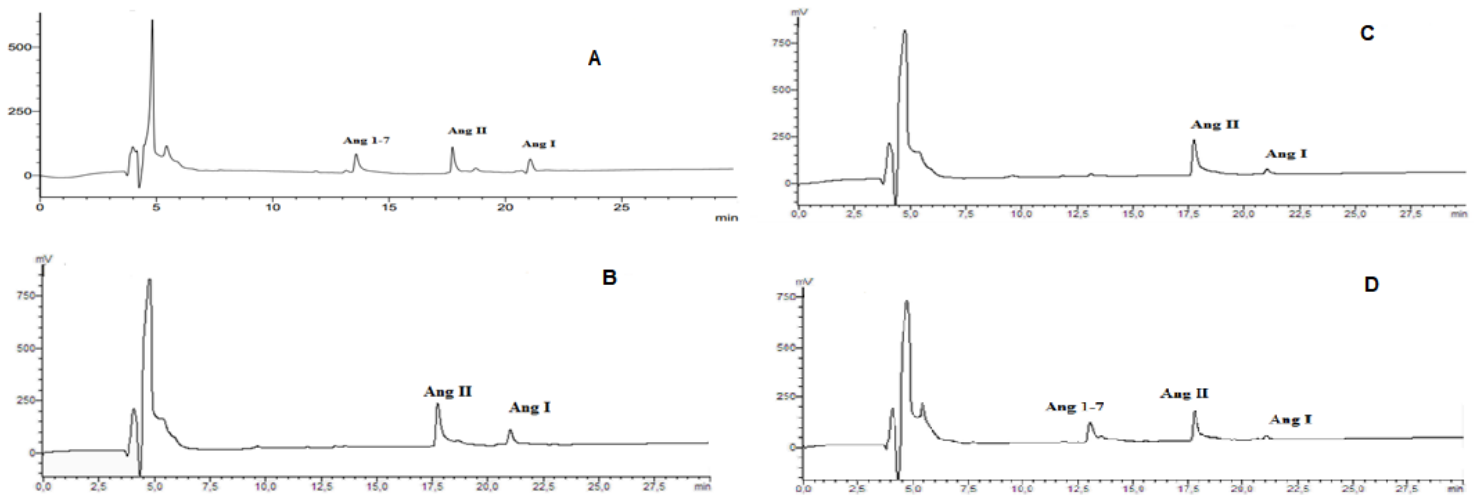
Uma alíquota de 30 µl de cada fração foi aplicada em SDS – PAGE a 10% em condições desnaturantes e redutoras onde foram visualizadas duas bandas na fração 13 (bem separadas - Figura 3 – linha A) e 15 como mostrado na figura 1. Posteriormente, a fração 13 será aplicada CM – sepharose em um próximo passo do isolamento da enzima.

Figura 1: Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato bruto (coluna sepharose S – 100 com volume 50mL de resina) diluído em tampão tris- HCl 50mM, pH 8,0, em EkTA – pure com fluxo de 0.05mL/min a 25°C monitorado a 280 nm.



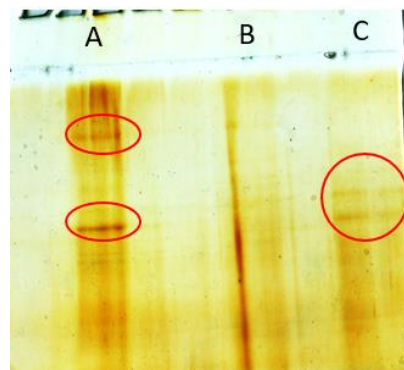
As frações citadas acima apresentaram atividade conversora de angiotensina, convertendo Ang I em Ang II (Figura 2). O principal produto da atividade enzimática é Ang II, quando Ang I é o substrato, em todas as amostras testadas, demonstrando atividade carboxipeptidase. Contudo, há formação de Ang (1 - 7) no extrato bruto e fração 15. Indicando a presença de outras peptidases no inseto adulto *Tribolium castaneum*. Estudos demonstram que Ang (1 - 7) pode ser formado pela ação ECA 2, quando Ang II é utilizado como substrato (CAREY R.M., 2013; REUDELHUBER T., 2006, SANTOS R. A., 2014). Ang 1 -7 também pode ser formado pela ação de endopeptidase como a neprilisina. A neprilisina utiliza Ang I como substrato (RICE G. I. et al, 2004).

Figura 2: Cromatografia líquida de alta eficiência dos produtos formados pela hidrólise de Ang I após incubação com extrato bruto proteico e frações obtidas por gel filtração. (A) extrato bruto, (B) fração 13 e (C) fração 14, (D) fração 15.



Uma alíquota de 30 μ l de cada fração foi aplicada em SDS – PAGE a 10% em condições desnaturantes e redutoras e foram visualizadas duas bandas na fração 13 e 15 (Linhas e C - Figura 3).

Figura 2: SDS – PAGE das frações coletadas. (A) fração 13, (B) fração 14, (C) fração 15.



Conclusões:

A enzima conversora de angiotensina de inseto é um componente importante no sistema fisiológicos dos animais invertebrados. Conseqüentemente, atua diretamente no processo de desenvolvimento do mesmo. Nesse estudo foi realizado o isolamento da enzima conversora de angiotensina do inseto adulto *T. castaneum*. As informações até agora disponíveis servirão como base nos próximos passos com relação a purificação e posteriormente, caracterização da enzima. Além disso, com relação a atividade enzimática. O inseto apresentou ter uma conversora do tipo carboxipeptidase (ECA), pois, utilizou Ang I para formar Ang II. Também houve a formação de Ang (1 -7) indicando a presença de outras peptidases como: ECA 2 (isoforma) ou neprilisina na biologia deste inseto. Assim, o próximo passo é utilizar Ang II como substrato para identificar a presença de ECA 2.

Referências bibliográficas

- BALYASNIKOVA I.V., KARRAN E.H., ALLBRECHT. 2nd – R.F, et al. Epitope specific antibody - induced cleavage of angiotensin converting enzyme from the cell surface. **Biochem J**, 362; 582 – 95, 2002.
- BERNESTEIN, K. E. ONG. F.S., BLACKWELL, W.L.B., SHAH, K, H., GIANI, J. F. GONZALEZ – VILALOBOS, R. A., SHEN, X. Z., FUNCHS, S. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin – converting enzyme. **Pharmacol, Rev** 65, p 1 – 46, 2013.
- CAREY R.M. Newly discovered components and actions of the renin – angiotensin system hypertension 62: 818 – 822, 2013.
- CORNELL et al. Cloning and expression of an evolutionary conserved single – domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. **J .Biol. Chem** , v 270, p 13613 – 13619, 1995.
- HOOPER N. M, TURNER A. J. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re – evaluation of their role in neuropeptide metabolism. **Biochem J**. v 241, p 625 – 633, 1987.
- HOOPER N. M, KEEN J., PAPPINT D. J. C., TUNER A. J. Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphiphatic and hydrophilic forms of the enzyme establishes c – terminal anchorage to the plasma membrane. **Biochem J**. v 247, p 85 – 93, 1987.
- HOUARD et al, The *Drosophila melanogaster* – related – 1 – converting enzymes Acer and Ance – distinct enzymic characteristics and alternative expression during pupal development. **Eur. J. Biochem** v 257 p 599 – 606, 1998.
- ISAAC, R.E., et al. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginy l-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. **Biochem. J**.v 330 p, 61–65,1998.
- ISAAC et al. Angiotensin – converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators. **Peptides**, v 28, p 153 – 162, 2007.
- LAMANGO & ISAAC. Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly, *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. **Biochem J** 299, 651–657, 1994
- LAMANGO N. J et al. The endopeptidase activity and the activation by cl – of angiotensin – converting enzyme is evolutionarily conserved: purification and properties of an an angiotensin – converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. **Biochem. J** v 314 p 651 – 657, 1996.
- PARKIN E.T, TURNER A.J, HOOPER N. M. Secretase mediated – cell – surface shedding of the angiotensin - converting enzyme. **Proten Pept Lett**. 11:423 32. 2004.
- Riordan J. F. Angiotensin – I – converting enzyme and its relatives. **Genome Biol**, 4:225, 2003..
- RIPKA J.E., RYAN JW, VALIDO FA, CHUNG AYK, PETERSON CM, Urry RL N-Glycosylation offorms of angiotensin converting enzyme from four mammalian species. **Biochem Biophys Res Commun**. V 196 p 503–508, 1993.
- SANTOS R.A..Angiotensin(1 -7) Hypertesion. 63: 1138 – 1147, 2014
- SIVITER, R, J, et al. Peptidyl dipeptidase (Ance and Ancer) of *Drosophila melanogaster* major differences in the substrate specificity of two homologs of human angiotensin I – converting enzyme. **Peptides** v 23 p 2025 – 2034, 2002a.
- TATEI et al. Race: a *Drosophila* homologue of the angiotensin converting enzyme. **Mech. Dev**. V 51 p 157 – 168, 1995.
- TIPNIS S.R, HOOPER N.M, HYDE R., KARRAN E., CHRISTIE G., TURNER A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Cem**, 2000.
- REUDELHUBER T.L.. A place in our hearts for the lowly angiotensin – 1 -7 peptide? **Hypertension**. 47: 811 – 815, 2006.RICE, G. I, THOMAS D.A., GRANT P.J. HOOP N.M.. Evaluation of angiotensin – converting enzyme (ECA), its homologue ECA 2 and neprylisin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem J**. 383 45 -51, 2004.
- WEI L, ALHENC-GELAS F, CORVOL P, CLAUSER E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **Biochem J**, v 266, p 9002–9008, 1991.