

TATIANA DE SOUSA DA CUNHA

**RELAÇÃO ENTRE DIABETES E HIPERTENSÃO:
UM ESTUDO EM MODELOS ANIMAIS**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.**

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

**PIRACICABA
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C914r Cunha, Tatiana de Sousa da.
Relação entre diabetes e hipertensão: um estudo em modelos animais. / Tatiana de Sousa da Cunha. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Fernanda Klein Marcondes, Maria Cláudia Irigoyen.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sistema renina-angiotensina. 2. Pressão arterial. 3. Exercício. 4. Proteinúria. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Irigoyen, Maria Cláudia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Relationship between diabetes and hypertension: a study on animal models.

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Renin angiotensin-system. 2. Blood pressure. 3. Exercise. 4. Proteinuria

Área de Concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Fernanda Klein Marcondes, Luiz Carlos Marques Vanderlei, Sérgio Eduardo de Andrade Perez, Maria Cecilia Ferraz Arruda Veiga, Ana Paula Tanno

Data da Defesa: 20-07-2007

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 20 de Julho de 2007, considerou a candidata TATIANA DE SOUSA DA CUNHA aprovada.

Fernanda Kle Marcond

PROFa. DRa. FERNANDA KLEIN MARCONDES

Luz Carlos Marques Vanderlei

PROF. DR. LUIZ CARLOS MARQUES VANDERLEI

Sérgio Eduardo de Andrade Perez

PROF. DR. SÉRGIO EDUARDO DE ANDRADE PEREZ

Maria Cecília Ferraz Arruda Veiga

PROFa. DRa. MARIA CECÍLIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

Ana Paula Tanno

PROFa. DRa. ANA PAULA TANNO

DEDICO

Aos meus pais, **Solange e José**, por terem enchido a minha vida de amor e alegria. Por terem respeitado as minhas decisões e o meu tempo, sempre. Por terem me ensinado que *a humildade precede qualquer tipo de reconhecimento*, um dos mais importantes valores que carrego comigo. A minha mãe, porque é minha mãe, minha amiga, minha heroína, e isso bastaria... Mas ela sempre fez questão de fazer muito mais. A meu pai, pela calma nos momentos de dificuldade. Pelos abraços nos momentos inesperados. Por mais razões do que eu poderia enumerar.

A minha irmã **Nádia**, pela compreensão incondicional. Pela cumplicidade e pelo amor. Por me estimular e encorajar. Por acreditar em mim quando eu mesma não acreditei. Por se orgulhar desde as coisas mais simples que faço. Você é uma estrela que sempre brilhará ao meu lado...

Ao meu irmão **Júlio**, por ser o meu porto seguro, o meu exemplo. Por estar sempre presente em minha vida, me orientando e me ajudando a ser uma pessoa melhor. Por ter me ensinado que tudo vem a seu tempo. Por sua fé, em todos os momentos. E principalmente por ter me mostrado que *ELE nunca faz nada pela metade*.

Aos meus cunhados **Daniela e Reinaldo**, por amarem meus irmãos e os fazerem pessoas felizes. E as nossas princesas, **Maria Júlia, Catarina e Bebezinha**, por toda a felicidade, que sem saber, trouxeram e continuam trazendo as nossas vidas.

Ao **Gui**, meu amor. Por ter vivido minhas angústias e ter me transmitido esperança e otimismo nos momentos difíceis. Por ter compartilhado comigo momentos de alegria. Por ter aceitado e suportado, ainda que contra sua vontade, a distância física que nos separou, para que eu pudesse concretizar este sonho. Por se orgulhar do que eu sou. Por me fazer muito feliz.

A minha amiga de todas as horas, **Aninha**, com quem dividi sonhos, realizações e decepções. Por ter me ajudado desde o início, mesmo sem me conhecer. Por entender as minhas limitações e ter me ajudado a superá-las. Pela inestimável amizade cultivada durante estes cinco anos de convívio e por compartilhar comigo a enorme vontade de chegarmos juntas até o final. Se não fosse você, isto não teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas marcam nossa vida para sempre. Umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Sendo assim, a vocês, meus sinceros agradecimentos.

A **Deus**, a quem tudo devo. Por ter me concedido a Vida e por me abençoar todos os dias. Por ter me dado coragem, paciência e força para enfrentar os problemas e seguir em frente. Pelos incontáveis momentos de felicidade, porque tudo é por TI.

Aos meus familiares, por terem torcido por mim, mesmo sem às vezes compreenderem o que eu fazia. Agradeço especialmente aos meus avós maternos, **vó Rita e vô Dito**, não só pelas orações, mas também pelo exemplo de vida. E aos meus avós paternos, **vó Ivete e vô Cunha** (*in memoriam*), para quem sempre peço luz.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes**, exemplo de dedicação, doação e dignidade, por quem sinto profunda admiração, respeito e gratidão. Agradeço-te por ter dado forma aos meus ideais e conduzido cuidadosamente meus passos, ajudando-me a decidir pelos melhores caminhos. Obrigada por estar sempre presente, pelo incentivo e, principalmente, pelas oportunidades a mim oferecidas.

A minha co-orientadora, **Profa. Maria Cláudia Irigoyen**, que além de mestre foi instrutora e companheira. Obrigada pela habilidade de nos fazer sorrir nos momentos em que tudo parece perdido. Sou grata pelos ensinamentos transmitidos, principalmente os de vida, me mostrando que *só os fortes sobrevivem* e que, inevitavelmente, *toda escolha sempre envolverá uma renúncia*.

À **Profa. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**, pelo carinho, pelo exemplo e por me estimular a trilhar novos caminhos.

Aos meus co-orientadores durante o Programa de Estágio de Doutorado no Exterior, **Mariana Morris**, Ph.D., e **Khalid M. Elased**, Ph.D., pelo estímulo e pela confiança em mim depositados.

À **Profa. Dra. Kátia de Angelis, Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura, Prof. Edson Moreira**, pela ajuda no delineamento experimental, execução do projeto e sugestões apresentadas na versão preliminar desta tese.

Aos amigos do Instituto do Coração, sem os quais não teria sido possível desenvolver este projeto: **Bruno, Christiane, Cristiano, Geórgia, Ivana, Janaína, Karin, Leandro, Mariana, Mateus, Sílvia e Raquel**. Muito obrigada por tudo o que fizeram por mim. Ao **Kaleizu**, por ter me apresentado à Profa. Maria Cláudia Irigoyen e pela realização dos exames ecocardiográficos.

À família Piracicabana: **Luciano, Gustavo, Leonardo, Paula, Cristina, Stella Márcia e Luciane**, por todos os momentos de alegria que passamos juntos. Sentirei muitas saudades de nosso convívio.

À querida **Fernanda Cristina**, pela amizade sincera e companheirismo.

Às famílias e pessoas especiais que me acolheram com tanto amor em Dayton: **família Farah (em especial Verita e Luís), família Loureiro, família Siqueira, Marcolino, Karin, Jana, Mari P, Danóca, Mari B, Dri, Martita, Fabi, Lê**. Vocês fizeram meus dias longe do Brasil menos saudosos.

Aos colegas da Wright State University **Charles, Terry, Mary Key, Chris, Billy, Judy, Carolyn.**

Aos colegas de Pós Graduação **Juliana, Maria Cláudia e Vander.**

Às amigas de Porto Alegre, **Mariane e Roberta**, por toda a ajuda e carinho.

Às amigas **Érica, Fabiana, Ana Amélia e Adriana** por sempre torcerem por mim.

Ao técnico do laboratório de Fisiologia da FOP, **Feliciano**, pela alegria e amizade.

Aos funcionários do Instituto do Coração, especialmente à **Edna e Dona Antônia.**

À **Eliete, Elisa, Eliane e Érica**, secretárias da FOP, por terem me atendido sempre com muita atenção e carinho.

Ao **FAEPEX/UNICAMP, CAPES e CNPq**, pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, por ter oferecido condições para o desenvolvimento desta tese.

“Semeia, semeia.
O que importa é semear.
Pouco, muito, tudo.
Semeia a semente da esperança.
Semeia energia para poder enfrentar as lutas da vida.
Semeia coragem, para poder encorajar os outros.
Semeia entusiasmo, fé, amor.
Semeia coisas pequeninas, insignificantes.
Semeia e confia.
Pois cada semente há de enriquecer um pedaço de chão.”

Clarissa Pinkola Estés

RESUMO

O diabetes mellitus, bem como suas complicações, tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública dos países Ocidentais. Estima-se que existam aproximadamente 200 milhões de pacientes diabéticos no mundo, e que a incidência da doença vai aumentar não somente no Ocidente, mas também em países emergentes, por causa das mudanças relacionadas aos hábitos alimentares. Sendo assim, a previsão é de que nos próximos anos, o diabetes se torne a causa mais importante de morbidade e mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares. Buscando alcançar maior entendimento a respeito das complicações decorrentes do diabetes mellitus, apresentamos nos Capítulos 1 e 2 os resultados de estudos *in vivo* utilizando diferentes modelos animais. No Capítulo 1, foi mostrado que o consumo de frutose causa disfunção renal em camundongos, estando o grau de disfunção positivamente correlacionado tanto com a variabilidade pressão arterial, como com o componente *low frequency* da mesma, importantes preditores de lesões em órgãos-alvo. No Capítulo 2, utilizamos o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com a substância diabetogênica estreptozotocina (STZ) para estudar os efeitos do treinamento físico sobre as alterações metabólicas e cardiovasculares presentes na associação hipertensão-diabetes. Neste estudo, mostramos que a ocorrência simultânea destas doenças promove efeitos deletérios sobre a função cardiovascular, e que o treinamento físico moderado atenua a progressão de tais alterações, aumentando significativamente o índice de sobrevivência de animais hipertensos-diabéticos. Sabe-se que as respostas benéficas sobre a hipertensão e o diabetes, induzidas pelo treinamento físico, estão relacionadas a fatores hemodinâmicos, neurais e humorais, incluindo alterações dinâmicas em sistemas que produzem e secretam substâncias vasoativas, como o Sistema Renina Angiotensina (SRA). Como o SRA desempenha importante papel na regulação da pressão arterial e no equilíbrio hidro-eletrolítico, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas, existe especial interesse no monitoramento de componentes deste sistema como marcadores de doenças cardiovasculares. Sendo assim, no Capítulo 3 apresentamos os resultados referentes à padronização de uma metodologia rápida, sensível

e precisa, alternativa aos ensaios já existentes. Este novo ensaio foi utilizado para quantificação da atividade proteolítica da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), importante componente do SRA. Com a utilização da espectrofotometria de massa (MS) foi possível monitorar de maneira eficaz a atividade enzimática da ECA2 recombinante e renal de camundongos controle. E finalmente, no Capítulo 4, utilizando o mesmo ensaio citado anteriormente, mostramos que em condições fisiológicas, as enzimas ECA2 e endopeptidase 24.11 (NEP) cerebrais parecem exercer papel predominante sobre a enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1) na metabolização das angiotensinas, contribuindo de maneira significativa para a formação de angiotensina (1-7), principal metabólito produzido em extratos hipotalâmicos de camundongos. Com base nos resultados apresentados nesta tese, concluímos que a utilização de modelos animais e de novas tecnologias, bem como a padronização de ensaios alternativos, são essenciais para a compreensão da fisiopatologia e medidas de prevenção e tratamento do diabetes e hipertensão.

Palavras-chave: sistema renina angiotensina, pressão arterial, exercício, proteinúria.

ABSTRACT

The diabetes mellitus, as well as its complications, has becoming the major health problem of Western Countries. It is estimated that 200 million people are diabetic in the world, and that the prevalence of the disease will increase not only in the West, but also in emerging countries, because of the changes on diet. Therefore, it is believed that in the next few years, diabetes will become the most important cause of morbidity and mortality related with cardiovascular disease. With the aim to understand the complications of diabetes mellitus, we present in Chapter 1 and 2 the results from *in vivo* studies using different animal models. In Chapter 1, it was shown that fructose diet induces renal dysfunction in mice, which is positively correlated with both variability and low frequency component of blood pressure, important predictors of end organ damage. In chapter 2, the model of spontaneous hypertensive rats (SHR) treated with streptozotocin (STZ) was used to study the effects of exercise training on metabolic and cardiovascular alterations induced by hypertension and diabetes. In this study, it was shown that the concomitant occurrence of the diseases causes deleterious effects on cardiovascular function, and moderate exercise training attenuates the progression of complications, increasing the survival in SHR-STZ model. It is known the benefic effects of exercise training on hypertension and diabetes are induced by hemodynamic, neural and humoral factors, including adaptations of some systems that produce and secret vasoactive substances, like Renin Angiotensin System (RAS). The RAS has an important role on blood pressure regulation and hydroelectrolytic balance, under physiological and pathological conditions, and because of this there is special interest on monitoring its components as markers for cardiovascular diseases. Therefore, in Chapter 3, we presented a rapid, sensitive, and precise assay, as an alternative method to the existing assays to quantify the proteolytic activity of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), an important component of RAS. Using mass spectrometry (MS) it was possible to monitor in a precise manner the activity of recombinant and renal ACE2 in mice. And finally in Chapter 4, using the same MS assay, it was shown that under physiological conditions, brain ACE2 and neutral endopeptidase 24.11 activities seem to be

predominant over angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) on the metabolism of angiotensins, contributing to the generation of angiotensin (1-7), the main peptide present in mice hypothalamic extracts. Based on the results, we conclude that the use of animal models and new technologies are essential for the comprehension of physiopathology of hypertension and diabetes and also for the study of therapeutic interventions to prevent and treat the diseases.

Key-words: renin angiotensin-system, blood pressure, exercise, proteinuria.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 1: <i>Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance</i>	08
CAPÍTULO 2: <i>O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade melhora a função cardíaca e a taxa de sobrevivência de ratos hipertensos diabéticos</i>	21
CAPÍTULO 3: <i>New mass spectrometric assay for angiotensin-converting enzyme 2 activity</i>	50
CAPÍTULO 4: <i>Predominant role of angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) in mouse brain</i>	76
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	100
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO (Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa).....	114

INTRODUÇÃO

O estilo de vida sedentário é um dos mais importantes fatores de risco cardiovascular nas sociedades modernas. Segundo o *National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*, mais de 60% dos adultos americanos são sedentários (CDC, 1999a). No Brasil, pesquisas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que a prevalência do sedentarismo é de 80% (IBGE, 1998) e em grandes centros como na cidade de São Paulo, 68% dos indivíduos adultos são sedentários (Mello *et al.*, 1998). As conseqüências diretas do sedentarismo incluem índices elevados de morbidade e mortalidade, que podem acometer crianças, adultos e idosos, obesos ou não (Wei *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Blair & Wei, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003).

Além do sedentarismo, sabe-se que a ingestão calórica inadequada contribui para o desenvolvimento de diversas doenças. De acordo com dados da literatura, observa-se que nas últimas duas décadas houve um aumento no consumo total de carboidratos (energia), principalmente de dietas ricas em frutose (Elliot *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2004), fenômeno decorrente da crescente ingestão de refrigerantes, cereais, guloseimas, condimentos e sobremesas industrializadas (Elliot *et al.*, 2002). De acordo com Basciano *et al.* (2005), este hábito também exerce impacto negativo sobre a saúde, podendo desencadear o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus, obesidade, hipertensão arterial e anormalidades lipídicas.

Dados oficiais de órgãos públicos na área da saúde, pesquisas básicas, estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a associação entre sedentarismo e excesso de peso também exerce efeito devastador sobre a saúde, sendo responsável por pelo menos 300.000 mortes prematuras (Allison *et al.*, 1999), morbidade substancial, e por gastos superiores a 90 bilhões de dólares por ano em tratamento de pacientes, somente nos Estados Unidos da América (EUA) (Colditz, 1999). Porém, apesar de seu impacto negativo sobre a saúde ser semelhante àquele causado pelo tabagismo, a inatividade física e o excesso de peso não têm recebido a mesma atenção em programas oficiais de promoção da saúde (Shephard, 2002).

Dentre as doenças desencadeadas pelo estilo de vida inadequado da sociedade moderna, o diabetes mellitus tipo 2 pode ser considerado uma das mais alarmantes, afetando aproximadamente 5% da população ocidental (CDC, 1999b). Juntamente com a doença, surge o risco de complicações que incluem cegueira, neuropatia, nefropatia, insuficiência renal e doenças cardiovasculares (Group, 1993). Por este motivo, este é um tema que merece atenção especial. Entretanto, nota-se que as investigações experimentais acerca do diabetes tipo 2 ainda são menos frequentes do que aquelas sobre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do diabetes tipo 1. Em parte, isto decorre da escassez de modelos experimentais satisfatórios a serem utilizados nas pesquisas (Noonan & Banks, 2000). Os ratos Zucker geneticamente obesos, por exemplo, são um modelo de manifestação espontânea de diabetes mellitus tipo 2 (Zucker & Zucker, 1961). Entretanto, observa-se uma grande variação interanimal referente ao grau de obesidade e disfunção renal apresentadas (Fiske *et al.*, 1986), além do alto custo. Outros exemplos de mutações genéticas para o estudo da doença incluem os camundongos diabéticos db/db (Lee *et al.*, 1996) e os camundongos obesos ob/ob (MacDougald *et al.*, 1995), mas que também apresentam custo elevado.

Uma alternativa à utilização destes animais é o emprego de manipulações dietéticas que induzam alterações metabólicas e mimetizem os sintomas típicos da doença a ser estudada. A dieta rica em frutose é um dos modelos utilizados em estudos sobre intolerância à glicose, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2. Ratos alimentados com frutose desenvolvem hipertensão arterial moderada e intolerância à glicose, associada à concentrações sanguíneas elevadas de insulina, glicose, colesterol e triglicerídeos (Dai & McNeill, 1995; Katovich *et al.*, 2001; Kamide *et al.*, 2002; Hsieh, 2005). Em camundongos, apesar de existirem poucos estudos, evidências mostram que a dieta altera o metabolismo da glicose e as concentrações plasmáticas de lipídeos (Nagata *et al.*, 2004; Farah *et al.*, 2006).

Com relação à associação entre diabetes e alterações cardiovasculares, estudos clínicos e populacionais têm mostrado que a hipertensão arterial é mais prevalente em diabéticos tipo 1 e tipo 2 do que na população não-diabética (Fuller, 1985; Frohlich, 1993).

Além disso, observa-se que dentre as complicações cardíacas apresentadas por pacientes hipertensos-diabéticos estão a fibrose do miocárdio, lise de miócitos, deposição de tecido conectivo intersticial, alterações ultraestruturais (Factor *et al.*, 1981; Factor *et al.*, 1984), depressão da contratilidade cardíaca (Rodgers 1986; Rodrigues & McNeill, 1986), e conseqüente disfunção sistólica e diastólica (Venco *et al.*, 1987; Grossman *et al.*, 1992). Todas estas alterações manifestam-se de forma mais severa em hipertensos-diabéticos do que naqueles que apresentam hipertensão isoladamente, ressaltando a gravidade da associação entre as duas doenças. Além disto, já foi demonstrado que estes pacientes apresentam índices mais elevados de mortalidade do que indivíduos diabéticos ou hipertensos (Rossing *et al.*, 1996).

A maioria das alterações metabólicas e cardiovasculares, que acometem pacientes hipertensos-diabéticos, podem ser reproduzidas em modelos experimentais que combinam a hipertensão e o diabetes tipo 1. Um dos modelos mais utilizados é o de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), tratados com a substância diabetogênica estreptozotocina (STZ). O tratamento de ratos adulto-jovens com STZ produz um estado diabético caracterizado pela perda de peso, polidipsia, poliúria, glicosúria, polifagia, hipoinsulinemia e hiperglicemia (Ganda *et al.*, 1976). O local de ação da STZ são as células beta pancreáticas, sendo que a droga entra nestas células com o auxílio do transportador de glicose denominado GLUT-2. Uma vez no interior das células beta, a STZ causa alquilação do DNA e ativação da ribosilação-poli-ADP, levando à depleção de NAD^+ e ATP. A defosforilação acentuada do ATP, após a administração de STZ, fornece um substrato para a ação da xantina oxidase, resultando na formação de radicais superóxido. Além disto, a administração de STZ induz a liberação de quantidades tóxicas de óxido nítrico que inibem a atividade da aconitase e participam também do dano ao DNA. As ações conjuntas da STZ resultam então em destruição das células beta pancreáticas, levando conseqüentemente à hipoinsulinemia e hiperglicemia (Szkudelski, 2001). Este modelo, além de permitir investigar os mecanismos fisiopatológicos da associação diabetes-hipertensão, também pode ser utilizado para o estudo do efeito de diferentes abordagens no tratamento destas doenças.

Desde a última década, vem sendo cada vez mais freqüente o emprego de medidas alternativas para o tratamento de doenças degenerativas, como o diabetes e a hipertensão. Dentre elas, podemos citar a restrição dietética e a perda de peso. Além disto, as constantes evidências a respeito dos benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos decorrentes da prática regular de exercício físico agudo e crônico, têm levado à indicação do treinamento físico como conduta não-farmacológica importante na prevenção e no tratamento destas doenças. Já no século XVIII a utilidade terapêutica do exercício foi reconhecida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (Rollo, 1798), e também na edição de 1935 do *The Treatment of Diabetes Mellitus*, exercícios diários foram recomendados para o tratamento da doença (Joslin *et al.*, 1935). Atualmente o exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, também tem sido considerado uma das principais abordagens no tratamento do diabetes mellitus (De Angelis *et al.*, 2006), já que o exercício aumenta a captação de glicose pelos tecidos, diminuindo a hiperglicemia. Assim, a prática de exercício físico regular tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo diabético de um estado fisiológico normal, prevenindo ou retardando as complicações crônicas inerentes ao curso temporal da doença. Efeitos benéficos adicionais do exercício no tratamento do diabetes incluem redução da hiperlipidemia (Stefanick *et al.*, 1998), da hipertensão (De Angelis *et al.*, 2006; Gaesser, 2007) e dos fatores de risco cardíaco (Sherman *et al.*, 1999).

Com relação à hipertensão arterial, é vasta a literatura que mostra que o exercício aeróbio, realizado regularmente, promove importantes adaptações cardiovasculares, resultando em redução significativa da pressão arterial tanto em humanos como em animais de experimentação (Gordon *et al.*, 1997; Wallberg-Henriksson *et al.*, 1998; Rondon & Brum, 2003; Libonati & Gaughan, 2006). Apesar de existir um número bem menor de informações a respeito dos efeitos do treinamento físico na associação entre hipertensão arterial e diabetes mellitus, estudos sugerem que o exercício também exerce efeitos positivos sobre os sintomas decorrentes da manifestação concomitante das duas doenças (Stewart 2002; Neuhouser *et al.*, 2002; Stewart 2004).

As respostas adaptativas benéficas sobre a hipertensão arterial e o diabetes, induzidas pela prática regular de exercícios moderados, parecem estar relacionadas a fatores hemodinâmicos, neurais e humorais, incluindo normalização do tônus simpático (Hagberg *et al.*, 1989; Veras-Silva *et al.*, 1997; De Angelis *et al.*, 2000), melhora da sensibilidade dos pressoreceptores (Harthmann *et al.*, 2006; Brum *et al.*, 2000; O'Sullivan & Bell, 2000) e alterações dinâmicas em sistemas que produzem e secretam substâncias vasoativas, como o Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Kinugawa *et al.* 1997; Hayashi *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2006).

Há muito tempo foi determinado o importante papel que o SRA desempenha não só na regulação da pressão arterial como também na manutenção do equilíbrio hidro-eletrolítico, sendo então considerado um importante regulador das funções cardiovascular e renal, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas (revisão - de Gasparo *et al.*, 2000). O rápido avanço das técnicas de biologia molecular permitiu que os componentes deste sistema fossem clonados e seqüenciados, possibilitando a determinação da distribuição tecidual dos mesmos. Por este motivo, diferentemente da visão endócrina clássica, hoje se fala em SRA teciduais (Irigoyen *et al.*, 2003), que expressam todos ou quase todos os componentes do sistema. Exemplos de tecidos onde o SRA está presente incluem o pâncreas, coração, fígado, pulmões, tecido adiposo, rim e cérebro (Stock *et al.*, 1995; Ye & Duggan, 2000; Imai *et al.*, 2005). Além disto, estes estudos trouxeram novos conhecimentos a respeito do funcionamento do SRA, sugerindo a existência de um sistema muito mais complexo e dinâmico do que suposto anteriormente.

Em 2000, um novo componente do SRA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), homóloga à enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1), foi clonada em diferentes tecidos, por dois grupos independentes (Tipnis *et al.*, 2000; Donoghue *et al.*, 2000). A verificação da habilidade da ECA2 em inativar o potente vasoconstritor angiotensina II, e gerar o metabólito cardioprotetor angiotensina (1-7), evidenciou o importante papel desta enzima na homeostase cardiovascular (Vickers *et al.*, 2002; Guy *et al.*, 2003; Ferrario *et al.*, 2005). Além disto, estudos sobre as alterações cardíacas malélicas observadas em camundongos *knock-out* para o gene da ECA2 mostraram a

importância da enzima no controle da função cardiovascular (Huang *et al.*, 2001; Crackower *et al.*, 2002).

Sabe-se que tão importante quanto a determinação da expressão de novos componentes envolvidos no controle da função cardiovascular, como a ECA2, é a quantificação de sua atividade proteolítica, uma vez que nem sempre a enzima que se expressa está ativa. Sendo assim, por meio da determinação da atividade enzimática, é possível correlacionar expressão e função, evitando interpretações inadequadas e possibilitando o avanço na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas manifestações fenotípicas da doença. Neste sentido, a disponibilidade de metodologias seletivas, sensíveis e rápidas é extremamente importante.

A maior parte do entendimento sobre o SRA foi obtido a partir de estudos farmacológicos clássicos. Entretanto, o desenvolvimento de novas tecnologias vem possibilitando o entendimento deste sistema peptídico com maior especificidade e facilidade. O método clássico para mensuração da atividade tissular da ECA2 é baseado no uso de substratos peptídicos fluorogênicos (Guy *et al.*, 2003; Vickers *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2004; Huentelman *et al.*, 2004) especialmente delineados para este fim ou não, cuja cinética pode não corresponder àquela dos substratos naturais. Outro método atualmente disponível, que apresenta alta precisão, mas é tempo-dispendioso, é a utilização de precursores peptídeos radiomarcados seguida da aplicação da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para separação e análise dos produtos peptídicos (Ferrario *et al.*, 2005). Logo, o desenvolvimento de métodos que possibilitem alcançar maior conhecimento a respeito do funcionamento do SRA também é de fundamental importância para o estudo da relação entre diabetes, doenças cardiovasculares e alterações renais.

Com base nas considerações apresentadas, o objetivo deste estudo foi avaliar, em diferentes modelos animais, a influência do diabetes melitus e hipertensão sobre o sistema renal e cardiovascular, o efeito do treinamento físico sobre o curso temporal da associação entre diabetes e hipertensão, bem como apresentar um método alternativo para avaliação da atividade proteolítica da ECA2.

Para tanto, esta tese será apresentada na forma de quatro capítulos, que correspondem aos artigos redigidos durante o desenvolvimento deste estudo.

CAPÍTULO 1

Cunha TS, Farah V, Paulini J, Pazzine M, Elased KM, Marcondes FK, Irigoyen MC, De Angelis K, Mirkin LD, Morris M. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. *Regulatory Peptides*. 2007; 139(1-3):1-4.

Neste capítulo, descrevemos as alterações renais que ocorrem quando camundongos são alimentados com dieta rica em frutose e correlacionamos o grau de proteinúria, importante marcador de lesão renal, com as alterações cardiovasculares presentes no modelo.

A Elsevier reserva aos autores o direito de utilização do material, desde que a finalidade esteja dentre aquelas especificadas pela Editora. O documento que descreve estas condições está apresentado na página 09.

Normas para utilização dos manuscritos publicados pela Editora Elsevier*.



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

WHAT RIGHTS DO I RETAIN AS AN AUTHOR?

As an author, you retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. These include:

- the right to make copies of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- the right to make copies and distribute copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g. via an e-mail list or list serve);
- the right to post a pre-print version of the article on Internet web sites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites (see also our information on [electronic preprints](#) for a more detailed discussion on these points.);
- the right to post a revised personal version of the text of the final article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on the author's personal or institutional web site or server, with a link to the journal home page (on [elsevier.com](#));
- the right to present the article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article;
- **the right to include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially);**
- the right to use the article or any part thereof in a printed compilation of works of the author, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and
- the right to prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other work.

*Informações obtidas no site www.elsevier.com



Short communication

Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance

Tatiana S. Cunha ^{a,b}, Vera Farah ^a, Janaina Paulini ^a, Mariana Pazzine ^a, Khalid M. Elased ^a,
Fernanda K. Marcondes ^b, Maria Cláudia Irigoyen ^{c,*}, Kátia De Angelis ^{c,d},
L. David Mirkin ^a, Mariana Morris ^a

^a Wright State University, Boonshoft School of Medicine, Dayton/OH, USA

^b State University of Campinas, Faculty of Dentistry of Piracicaba, Piracicaba/SP, Brazil

^c Heart Institute, Hypertension Unit, School of Medicine FMUSP, São Paulo/SP, Brazil

^d São Judas Tadeu University, Human Movement Laboratory, São Paulo/SP, Brazil

Received 8 June 2006; received in revised form 28 October 2006; accepted 10 November 2006

Available online 4 January 2007

ABSTRACT

Nutrition is an important variable which may affect the risk for renal disease. We previously showed that a high fructose diet in mice produced hypertension and sympathetic activation. The purpose of this study was to determine if a fructose diet altered renal function. A high fructose diet for 12 weeks impaired glucose tolerance, but caused no change in body weight, blood glucose or plasma insulin. Impairment in renal function was documented by the almost two fold increase in urinary protein excretion (Control: 6.6 ± 0.6 vs. Fructose: 15.0 ± 0.7 mmol protein/mmol creatinine; $p < 0.05$) which was also accompanied by increases in urinary volume. The diet produced little change in renal histology, kidney weight or kidney weight/body weight ratio. Urinary excretion of angiotensin II/creatinine (Control: 78.9 ± 16.6 vs. Fructose: 80.5 ± 14.2 pg/mmol) and renal angiotensin converting enzyme activity (Control: 9.2 ± 1.6 vs. Fructose: 7.6 ± 1.0 ACE units) were not different between groups. There was a positive correlation between mean arterial pressure ($r = 0.7$, $p = 0.01$), blood pressure variability (BPV) ($r = 0.7$, $p = 0.02$), low frequency BPV component ($r = 0.677$, $p = 0.03$) and urinary protein excretion. Results show that

consumption of a high fructose diet in mice had deleterious effects on renal function, which were correlated with cardiovascular changes.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome is a multi-factorial disorder, with symptoms clustering on abnormalities that include obesity, hypertension, dyslipidemia, glucose intolerance and insulin resistance [1]. Metabolic syndrome is also referred to as “Diabesity” [2], highlighting the incidence of diabetes in combination with obesity as a result of changes in human behavior. With the disease, there comes an increased risk of long term complications, including cardiovascular disease and nephropathy [3].

With regard to diabetes-induced renal dysfunction, approximately 30% of new cases of end-stage renal failure are attributable to the disease [4]. One of the consequences of renal damage is the development of arterial hypertension [5], emphasizing the important role of kidney in blood pressure regulation. However, it is difficult to discern whether hypertension is a consequence of renal disease or a determinant for renal damage. Certainly, it is well established that hypertension plays a negative prognostic role in the development and progression of diabetic nephropathy [6] and that the association between these two chronic diseases increases the risks of complications [3].

Nutrition is an important variable which may alter the risk for renal disease and hypertension-induced kidney damage. Experimental and epidemiological studies have demonstrated that consumption of fructose may lead to insulin resistance, obesity, hypertension and lipid abnormalities [7,8]. Thus, we conducted studies to determine the effect of high fructose diet on renal function. We monitored urinary excretion of protein and angiotensin II (Ang II) and evaluated renal histology, as indicators of kidney dysfunction and compared these endpoints to the cardiovascular changes.

MATERIAL AND METHODS

General Procedures - C57BL male mice were assigned to either a standard or high fructose diet (67% carbohydrate - 98% of which is fructose). Carotid arterial telemetric catheters were inserted as described elsewhere [22]. Wright State University's Laboratory Animal Care and Use Committee approved all experiments.

Renal Function - At week 12, mice were housed in metabolic cages, and after 4 days of adaptation, 24 hr urine volume was measured. Total protein (BioRad Protein Assay Reagent, BioRad Labs, Hercules, CA), Ang II (ALPCO Diagnostics, Windham, NH), and creatinine (Quidel Corporation, San Diego, CA) were assayed using urine aliquots.

Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Measurement - GTT was performed at week 12, using an i.p. injection of glucose (1.5 g/Kg), and after decapitation, plasma was obtained for insulin measurement, as previously described [22].

Renal ACE1 measurements - Renal ACE1 activity was determined (BUHLMANN ACE Colorimetric Assay, ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA), and results expressed as ACE1 units (enzyme amount required to release 1 μ M of hippuric acid, per min and per liter of tissue extract).

Histological Analysis - After conclusion of physiological measurements, mice were euthanized; kidneys were fixed in formalin, embedded in paraffin, and 3 μ m sections were stained with hematoxylin-eosin, PAS-hematoxylin, PAS-methenamine-silver or Gomori trichrome. Tissues were evaluated using light microscopic methods.

Statistical Analysis - Results are expressed as means \pm SEM. The data were compared using unpaired Student's *t*-test. Pearson correlation was used to study the association between variables. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Metabolic responses - Body weights were not different between the groups (Control: 31.7 ± 0.7 vs. Fructose: 30.8 ± 1.0 g). Non-fasting blood glucose levels (Control: 150 ± 1.5 vs. Fructose: 152 ± 1.5 mg/dL) and plasma insulin (Control: 0.99 ± 0.2 vs. Fructose: 0.75 ± 0.40 ng/mL) were not different between control and fructose groups. However, high fructose produced impairment in glucose tolerance, evidenced by the increase on the area under the glucose curve (Control: 235 ± 22.9 vs. Fructose: 330 ± 21.3 mg/dL/min; $p < 0.05$).

Renal function - Urinary volume (Control: 1.59 ± 0.14 vs. Fructose: 2.68 ± 0.34 mL/24h) and protein excretion (Control: 6.6 ± 0.6 vs. Fructose: 15.0 ± 0.7 mmol/mmol creatinine) were significantly increased in fructose-fed mice. Urinary Ang II levels (Control: 78.9 ± 16.6 vs. Fructose: 80.5 ± 14.2 μ g/mmol creatinine), kidney weight (Control: 212.3 ± 8.2 vs. Fructose: 215.2 ± 8.9 mg), kidney weight/body weight ratio (Control: 6.7 ± 0.2 vs. Fructose: 7 ± 0.3 mg/g) and renal ACE1 activity (Control: 9.2 ± 1.6 vs. Fructose: 7.6 ± 1.0 ACE1 units) were similar between the groups.

Histological evaluation revealed no evidence for extensive renal damage even in the face of proteinuria. PAS stained sections from fructose-fed animals showed that there was negative mild to intense vacuolation of proximal convoluted tubular epithelium (Figure 1).

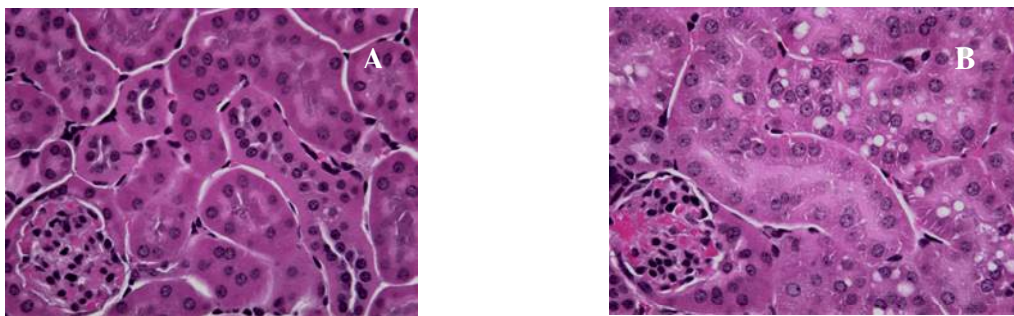


Figure 1 - Representative renal sections from control (A) and fructose-fed (B) mice show intense negative vacuolation in proximal tubular epithelium in fructose kidney (B). (Hematoxylin-eosin 40 X original magnification).

Correlation between renal and cardiovascular function - To evaluate the relationship between renal and cardiovascular function, we determined the correlation between mean arterial pressure (MAP), blood pressure variability (BPV) and low frequency (LF) spectral domain and the urinary protein/creatinine ratio (Figure 2). There was a significant positive relationship for all parameters: MAP ($r=0.7$, $p=0.01$; Figure 2A); BPV ($r=0.7$, $p=0.02$; Figure 2B) and LF ($r=0.7$, $p=0.03$; Figure 2C).

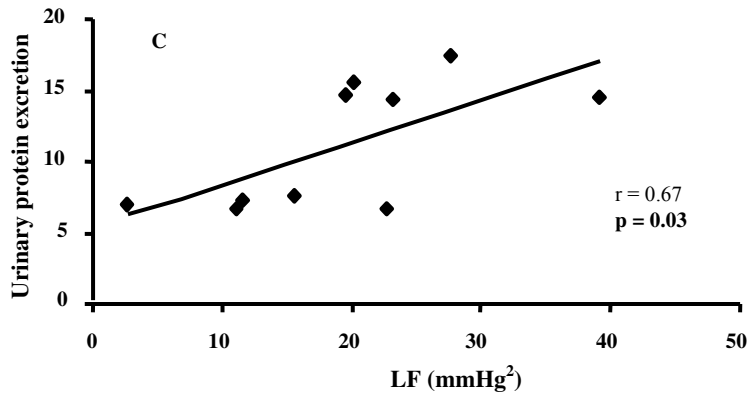
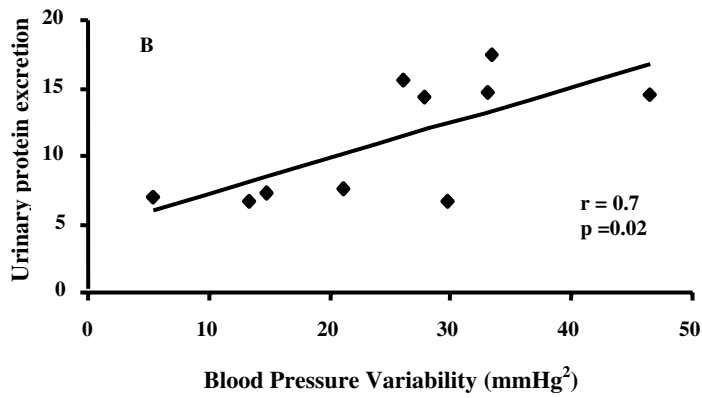
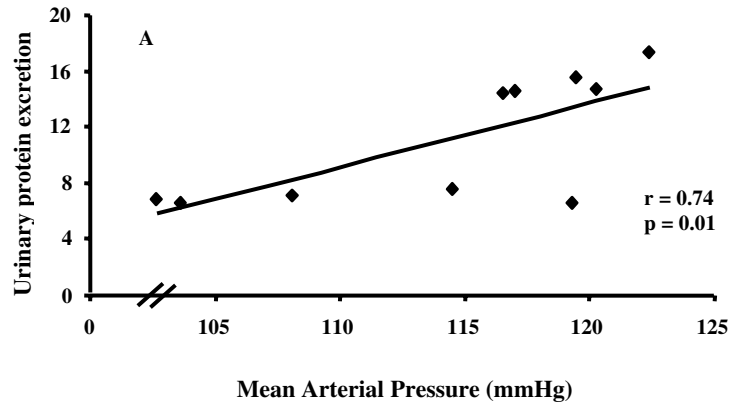


Figure 2 – Positive correlation obtained by linear regression in control and high fructose groups between: (A) Urinary protein excretion (mmol/mmol) and MAP (mmHg). (B) Urinary protein excretion (mmol/mmol) and BPV (mmHg²). (C) Urinary protein excretion (mmol/mmol) and LF (mmHg²).

DISCUSSION

Previous studies from our laboratory showed that a high fructose diet in mice led to nocturnal hypertension and increased sympathetic activity [8]. We extended these findings to show that fructose feeding also led to renal dysfunction with a positive correlation between the cardiovascular and renal changes.

Increased urinary protein excretion is a well-established predictor of renal disease [9]. Our results suggested impairment in renal function as seen by the increase in urinary protein excretion. However, there were only minor renal histological changes, indicating that the damage process was at the initial stage. This is probably related to the time on the diet and the fact that blood pressure was only mildly elevated [8]. Another study using mice also showed a small increase in protein excretion in animals fed a high fat, high carbohydrate diet [10]. In db/db mice there was a more than 3 fold increase in urinary albumin excretion [11] and results were similar in insulin deficient diabetes induced by streptozotocin [12].

It has been suggested that overactivity of the polyol pathway is involved in the renal damage induced by high fructose diet in rats [13]. It may also contribute to the development of renal impairment observed in our mouse model. Renal dysfunction produced by fructose loading could also be related to increased non-enzymatic fructosylation of plasma proteins, since there is evidence that fructose is more reactive than glucose in protein glycation [14].

Another component of the renal changes associated with fructose loading may be related to the renin angiotensin system (RAS). The RAS is a regulator of renal function and its overactivation has been implicated in changes at both the renal glomerular and tubular interstitial levels [15]. Recent studies have proved that blockade of the system with ACE1 inhibitors and Ang receptor blockers retards the progression of diabetic nephropathy [16], suggesting that Ang II is one of the RAS components involved on the development of kidney disease. We also conducted studies in Ang AT1a deficient mice and found that diabetes associated hypertension was absent, suggesting a causative role for Ang input [17].

To address the participation of local RAS in the development of kidney dysfunction associated with high fructose diet, Ang II levels were measured in urine and ACE1 activity was measured in kidney. There were no differences in either component of the RAS. The lack of change in urinary Ang II occurred in the face of higher plasma Ang II levels, as previously reported [8]. This indicates that there may be changes in peptide metabolism, resulting in greater peptide degradation and perhaps greater intrarenal levels of Ang II. There is no information on the vasodilator ACE2 side of the equation. However, it is possible that Ang (1-7) levels are reduced in the fructose model and that the balance favors Ang II. In fact, it has been reported that kidneys from streptozotocin diabetic rats show reduced protein expression of ACE2 [18].

Our previous study demonstrated that mice fed a high fructose diet develop hypertension and increases in BPV [8]. These alterations could contribute to renal dysfunction, and because of this we correlated cardiovascular parameters (blood pressure, BPV and low frequency domain of BPV) with protein excretion. Results showed a positive correlation for these parameters. Since it has been established that the low frequency oscillations of BPV are related to sympathetic modulation of the circulation [19], these results suggest not only that increase in blood pressure can lead to organ damage, but also that overactivation of sympathetic nervous system is involved on the development and/or progression of kidney disease.

The mere fact that sympathetic activity contributes to high blood pressure means that it may also contribute to kidney damage [20]. The condition may be worse in fructose fed mice which have both increased sympathetic and Ang II. Ang II facilitates sympathetic transmission in the heart and kidney [21]. Another indication that the sympathetic nervous system is involved in the development of renal disease, is that the inhibition of sympathetic action attenuates the progression of renal disease [22]. Moreover, renoprotection by ACE1 inhibitors and Ang receptor blockers has been proved without doubt [23].

Although it is well known that the blood pressure is an important determinant of organ damage, this is not the unique determinant. The spontaneous variation of blood pressure over time is positively related to the severity of organ damage [24]. The positive

correlation between BPV and protein excretion found in the present work is in accordance with the literature, and shows that this cardiovascular alteration induced by high fructose consumption is also a predictor of renal disease.

In conclusion, our data show that consumption of a high fructose diet in mice produced impairment of renal function that is positively correlated with cardiovascular changes, induced by overactivation of the renin angiotensin and sympathetic nervous systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of NIH R01HL69319 (MM) and Projeto Temático FAPESP 01/00009-0 (MCI). TSC was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (CAPES/PDEE). JP and MP were supported by U.S. Brazil Consortium, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Foundation for the Improvement of Postsecondary Education (FIPSE) of the U.S. Department of Education. The authors also express thanks to Mary P. Key for technical assistance.

REFERENCE LIST*

- [1] Tanaka H, Shiohira Y, Uezu Y, Higa A, Iseki K. Metabolic syndrome and chronic kidney disease in Okinawa, Japan. *Kidney Int.* 2006;69:369-74.
- [2] Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes. Rev.* 2000;1:57-59.
- [3] Group DCCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:977-986.
- [4] Borch-Johnsen K, Kreiner S. Proteinuria: value as predictor of cardiovascular mortality in insulin-dependent diabetes mellitus. *BMJ.* 1987;294:1651-54.
- [5] Ruilope LM, Campo C, Rodriguez-Artalejo F, Lahera V, Garcia-Robles R, Rodicio JL. Blood pressure and renal function: therapeutic implications. *J. Hypertens.* 1996;14:1259-63.

- [6] *Apresentada de acordo com as exigências do periódico *Regulatory Peptides*. Auren M, Bjorck S. Determinants of progressive renal disease in diabetes mellitus. *Kidney Int. Suppl.* 1992;36:S38-42.
- [7] Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes.* 1992;41:715-22.
- [8] Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC, Morris M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci.* 2006;July 12. [Epub ahead of print].
- [9] Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2003;63:1468-74.
- [10] Noonan WT, Banks RO. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;225:221-30.
- [11] Teixeira SR, Tappenden KA, Erdman JW Jr. Altering dietary protein type and quantity reduces urinary albumin excretion without affecting plasma glucose concentrations in BKS.cg-m +Lepr db/+Lepr db (db/db) mice. *J Nutr.* 2003;133:673-8.
- [12] Menne J, Park JK, Boehne M, Elger M, Lindschau C, Kirsch T, Meier M, Gueler F, Fiebeler A, Bahlmann FH, Leitges M, Haller H. Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C- α -deficient diabetic mice. *Diabetes.* 2004;53:2101-9.
- [13] Bernobich E, Cosenzi A, Campa C, Zennaro C, Sasso F, Paoletti S, Bellini G. Antihypertensive treatment and renal damage: amlodipine exerts protective effect through the polyol pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:401-6.
- [14] McPherson JD, Shilton BH, Walton DJ. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry.* 1988;27(6):1901-7.
- [15] Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:785-96.
- [16] Randomized placebo-controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. The EUCLID Study Group. *Lancet.* 1997;349:1787-92.
- [17] Wichi RB, Farah V, Chen Y, Irigoyen MC and Morris M. Deficiency in angiotensin AT1a receptors is cardioprotective in a model of type-1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;submitted.
- [18] Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 2003;41:392-7.
- [19] Stauss HM, Mrowka R, Nafz B, Patzak A, Unger T and Persson PB. Does low frequency power of arterial blood pressure reflect sympathetic tone? *J Auton Nerv Syst* 1995; 54:145-154.

- [20] Adamczak M, Zeier M, Dikow R, Ritz E. Kidney and hypertension. *Kidney Int Suppl.* 2002;62-7.
- [21] Fabiani ME, Sourial M, Thomas WG, Johnston CI, Johnston CI, Frauman AG. Angiotensin II enhances noradrenaline release from sympathetic nerves of the rat prostate via a novel angiotensin receptor: implications for the pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *J Endocrinol.* 2001;171: 97-108.
- [22] Reddi AS, Nimmagadda VR, Lefkowitz A, Kuo HR, Bollineni JS. Effect of antihypertensive therapy on renal injury in type 2 diabetic rats with hypertension. *Hypertension.* 2000;36:233-8.
- [23] Jafar TH, Schmid CH, Landa M, Giatras I, Toto R, Remuzzi G, Maschio G, Brenner BM, Kamper A, Zucchelli P, Becker G, Himmelmann A, Bannister K, Landais P, Shahinfar S, de Jong PE, de Zeeuw D, Lau J, Levey AS. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. *Ann Intern Med.* 2001;135:73-87.
- [24] Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28:709-15.

CAPÍTULO 2

Cunha TS, De Angelis KLD, Rosa KT, Irigoyen MC, Marcondes FK. O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade melhora a função cardíaca e a taxa de sobrevivência de ratos hipertensos-diabéticos.

O artigo apresentado neste capítulo encontra-se em fase de redação e deverá ser submetido para a publicação no periódico *Hypertension*, após as sugestões da banca examinadora. Como a tese será disponibilizada na Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, optamos por apresentar o artigo redigido em português, para facilitar a sua consulta por estudantes e possíveis leitores em fase inicial em atividades de pesquisa.

INTRODUÇÃO

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que a hipertensão arterial é mais prevalente entre indivíduos diabéticos do que na população não-diabética, da mesma idade e sexo (Fuller, 1985; Jonhston *et al.*, 1992; Frohlich, 1993). De forma semelhante, observa-se que aproximadamente 50% dos indivíduos diabéticos há mais de 30 anos desenvolvem hipertensão arterial (Chukwuma, 1992). Um aspecto importante, decorrente da manifestação simultânea da hipertensão e diabetes, é o efeito sinergista prejudicial que as duas doenças exercem sobre o sistema cardiovascular (Rossing *et al.*, 1996; Alderman *et al.*, 1999). Considerando-se a alta prevalência da manifestação destas duas doenças, bem como as conseqüências malélicas da condição, tem-se observado crescente interesse pelas pesquisas nesta área, envolvendo tanto seres humanos como modelos experimentais.

A doença hipertensiva pode ser mimetizada por modelos animais, sendo que os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Okamoto & Aoki, 1963) são atualmente os mais utilizados em pesquisas científicas. O diabetes mellitus pode ser induzido em ratos por meio da administração de aloxona ou de estreptozotocina (STZ) (Rerup 1970; Ganda *et al.*, 1976). O modelo experimental da associação hipertensão-diabetes (SHR-STZ), além de ser facilmente reproduzível, é adequado para ser utilizado em investigações farmacológicas e bioquímicas, possibilitando o avanço na compreensão sobre a fisiopatologia destas doenças.

As complicações do sistema cardiovascular, decorrentes principalmente de alterações estruturais e funcionais do músculo cardíaco (Factor *et al.*, 1981; Factor *et al.*, 1984; Rodgers 1986; Rodrigues & McNeill, 1986; Venco *et al.*, 1987; Grossman *et al.*, 1992), representam a maior causa de mortalidade e morbidade entre os pacientes hipertensos-diabéticos (Rossing *et al.*, 1996; Alderman *et al.*, 1999). Além disto, sabe-se que estas alterações manifestam-se de forma mais severa em hipertensos-diabéticos do que naqueles que apresentam a doença isoladamente, ressaltando a gravidade do quadro.

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos, decorrentes do exercício físico, têm levado muitos investigadores a indicar o treinamento físico como uma conduta não-farmacológica importante no tratamento de diversas patologias como o diabetes, a

hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca (Wallberg-Henriksson *et al.*, 1998; Tipton *et al.*, 1991, Jennings *et al.*, 1986). Além das respostas agudas observadas durante a realização do exercício físico, diversos estudos verificaram adaptações do sistema cardiovascular em resposta à prática regular de atividade física. Estas alterações podem envolver bradicardia de repouso em ratos jovens (Negrão *et al.*, 1992) ou velhos (De Angelis *et al.*, 1997) e em humanos (Buttrick & Scheuer, 1987), hipertrofia cardíaca (Natali, 2004) e modificação da resistência vascular sistêmica (Noma *et al.*, 1987; Overton *et al.*, 1988; Collins & DiCarlo, 1997).

Apesar de diversas organizações mundiais ligadas à área da saúde também recomendarem a prática de exercício físico como tratamento para o diabetes mellitus, a maior parte dos estudos relacionados aos efeitos do treinamento sobre a doença buscaram investigar os efeitos desta conduta não-farmacológica sobre o controle glicêmico, e não sobre alterações cardiovasculares. É vasta a literatura que mostra que o exercício aeróbio, realizado regularmente, promove importantes adaptações cardiovasculares em indivíduos hipertensos não-diabéticos, resultando em redução significativa da pressão arterial tanto em seres humanos como em animais de experimentação (Wallberg-Henriksson *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1997; Rondon & Brum, 2003; Libonati & Gaughan, 2006). Entretanto, até o momento, pouco se sabe a respeito dos efeitos que o treinamento físico exerce sobre a pressão arterial ou sobre a estrutura e função do miocárdio, quando hipertensão e diabetes mellitus manifestam-se simultaneamente.

Sendo assim, no presente estudo utilizamos o modelo SHR-STZ para avaliar três hipóteses: (1) os efeitos deletérios decorrentes da associação entre hipertensão-diabetes tornam-se mais intensos durante a evolução simultânea destas doenças; (2) o treinamento físico aeróbio moderado melhora o controle autonômico do sistema cardiovascular, bem como a estrutura e função do músculo cardíaco, de animais hipertensos-diabéticos e (3) as adaptações hemodinâmicas e morfofuncionais, induzidas pelo treinamento físico, estariam associadas à redução da taxa de mortalidade de animais hipertensos-diabéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais - Foram utilizados ratos SHR machos (200-220 g antes da indução do diabetes mellitus) fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto do Coração de São Paulo - InCor / FMUSP, alojados em gaiolas coletivas, contendo no máximo quatro animais em cada uma, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12/12 h invertido (luzes acendendo às 6:00 h). Receberam, durante todo o período, água e ração para ratos padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração, HC - São Paulo, SP (protocolo 1034/02 – Anexo).

Indução do diabetes – No terceiro mês de idade, o diabetes experimental foi induzido em todos os animais (n=40). Para a realização do procedimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. Em seguida, foram anestesiados superficialmente por meio de inalação de halotano e o diabetes foi induzido por meio da administração endovenosa da substância diabetogênica estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg, ev, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) via veia caudal (Rerup, 1970). A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de 5 minutos após a diluição.

Delineamento experimental – Quinze dias após a administração da STZ, os animais sobreviventes (n=30) foram submetidos à avaliação da glicemia de jejum para confirmação da eficácia da indução do diabetes. Todos os animais apresentaram glicemia de jejum superior a 250 mg/dL. Em seguida, foram submetidos a registro do peso corporal, teste de esforço em esteira ergométrica e ecodopplercardiograma para avaliações basais (15 dias após a indução do diabetes). Em seguida, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais (n=15/grupo):

Grupo I – Hipertenso diabético sedentário (SHR-STZ sedentário): estes animais foram submetidos aos procedimentos relativos à rotina diária do biotério de experimentação, durante a duração do protocolo experimental (10 semanas). Além disto, durante este período, eram diariamente transportados à sala de treinamento e suas gaiolas posicionadas

ao lado da esteira ergométrica no modo operante com objetivo de serem submetidos ao mesmo estresse sonoro que o grupo treinado;

Grupo II – Hipertenso diabético treinado (SHR-STZ treinado): estes animais foram submetidos a treinamento físico aeróbio, 1 hora por dia, 5 vezes por semana, por 10 semanas consecutivas em esteira ergométrica (Imbramed TK-01), conforme protocolo de Tancrede *et al.* (1982).

Ao final do período de treinamento (10 semanas) ou do período correspondente para o grupo SHR-STZ sedentário (75 dias após a indução do diabetes), todos os animais foram submetidos a novas avaliações, de acordo com as metodologias descritas nos tópicos seguintes.

Determinação da glicemia de jejum - Os animais foram mantidos em jejum por 4 horas e foi coletada uma gota de sangue via veia caudal. A concentração de glicose foi determinada nesta alíquota sanguínea por um monitor digital (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).

Avaliação da capacidade física máxima e protocolo de treinamento aeróbio – Para que os animais se desloquem na esteira ergométrica, é necessário realizar um período de adaptação, uma semana antes das avaliações basais e novamente uma semana antes do fim do período experimental (0,3 Km/h; 10 minutos/dia). Após o período de adaptação, os animais foram submetidos ao teste de esforço em esteira ergométrica no início (15 dias após a indução do diabetes), na quinta semana de treinamento e ao final (75 dias após a indução do diabetes) do período experimental, conforme descrito por Brooks & White (1978) e Rodrigues *et al.* (2006). O objetivo da realização do teste de esforço em diferentes tempos do protocolo experimental foi ajustar a intensidade do treinamento, permitindo assim que os animais fossem expostos a sobrecargas crescentes de exercício físico ao longo das 10 semanas de treinamento. Resumidamente, o teste de esforço consistiu em um protocolo de exercício aeróbio escalonado, com incrementos de velocidade de 0,3 Km/h, a cada 3 minutos, até que os animais atingissem a exaustão (permanência maior do que 50% do tempo na porção distal da raia de corrida). Com base nos resultados, foi possível determinar a capacidade física dos animais e também prescrever o treinamento físico do

grupo treinado. O treinamento físico foi desenvolvido em esteira ergométrica, com intensidade baixa-moderada (\approx 50% a 70% da velocidade máxima atingida no teste de esforço), 1 hora por dia, 5 vezes por semana, por 10 semanas consecutivas.

Avaliação da morfologia e função cardíaca - Para avaliação da função cardíaca foram realizadas medidas ecodopplercardiográficas no início (15 dias após a indução do diabetes) e ao final (75 dias após a indução do diabetes) do período experimental, de acordo com as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Os exames transtorácicos foram realizados por um único observador previamente calibrado, que desconhecia a que tratamento havia sido submetido cada animal. Em cada exame foram coletadas cinco medidas consecutivas por variável e calculada a média das mesmas.

Para realização dos exames (SEQUOIA 512, ACUSON Corporation, Mountain View, CA), os animais foram anestesiados com ketamina (Ketalar, 50mg/Kg, i.p., Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (Rompum, 12mg/Kg, i.p., Bayer), e o transdutor (10-14 MHz) foi posicionado no hemitórax direito do animal. Para otimização da resolução e penetração do feixe ultra-sonográfico no animal, as imagens foram feitas a uma frequência de 13 MHz utilizando-se gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal), ao nível dos músculos papilares, foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) em diástole. Após a realização das medidas foi calculada a massa do ventrículo esquerdo ($LVM = [(DDVE+SIV+PP)^3-(DDVE)^3] \times 1,047$, onde 1,047 (mg/mm^3) corresponde à densidade do miocárdio. Além da massa do ventrículo esquerdo, foi calculada a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ($\Delta D\% = [(DDVE-DSVE)/DDVE] \times 100$).

As análises do Doppler foram realizadas por meio do estudo dos fluxos transmitral (picos E e A, relação E/A e tempo de desaceleração de E, importantes índices da função diastólica). Estas análises geram um índice que complementa o estudo da função cardíaca:

velocidade de encurtamento circunferencial (VCF) = ($\{[\text{volume diastólico do VE}] - [\text{volume sistólico do VE}] / [\text{volume diastólico do VE}]\}^3 - [\text{tempo de ejeção}]$).

Avaliação hemodinâmica – No dia seguinte à última sessão de treinamento, os animais foram anestesiados com ketamina (Ketalar, 50mg/Kg, i.p., Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (Rompum, 12mg/Kg, i.p., Bayer). Dois catéteres, contendo 0,06 mL de solução salina heparinizada, foram implantados na artéria carótida e veia jugular (PE-10, tubo de polietileno; Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA) para registro direto da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e administração de compostos vasoativos. Vinte e quatro horas após a implantação das cânulas, os animais foram submetidos aos procedimentos para avaliação hemodinâmica. Durante a realização dos registros, os animais estavam acordados e movimentavam-se livremente pela gaiola individual. A cânula foi conectada a um transdutor eletromagnético (P23 Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, EUA) e os sinais de pressão arterial basal foram gravados durante um período de 30 minutos. A FC e a pressão arterial foram analisadas batimento a batimento no programa AT/CODAS, numa frequência de amostragem de 1000 Hz por canal, com o objetivo de quantificar as mudanças relacionadas aos dois parâmetros. A FC foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Para avaliação da sensibilidade do barorreflexo, doses crescentes e consecutivas de fenilefrina (0,25-32 µg/kg, e.v.; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e de nitroprussiato de sódio (0,05 to 1,6 µg/kg, e.v.; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foram administradas, obtendo-se variações pressóricas de 10 a 40 mmHg. A sensibilidade do barorreflexo foi determinada por meio do índice que correlaciona as alterações de FC com as alterações de PA, permitindo uma análise isolada do padrão de bradicardia e taquicardia reflexas. O índice foi expresso como bpm/mmHg, como descrito anteriormente (Farah *et al.*, 1999; De Angelis *et al.*, 2004).

Concentração cardíaca de glicogênio – No dia seguinte ao término das análises hemodinâmicas (96 horas após a última sessão de treinamento), os animais foram mortos por decapitação e amostras do músculo cardíaco (200 mg) foram cuidadosamente isoladas e pesadas para a determinação da concentração de glicogênio pelo método do fenol sulfúrico

(Lo *et al.*, 1970; Cunha *et al.*, 2005). As amostras foram digeridas em KOH 30% (1 mL) durante 15 minutos em banho fervente. O glicogênio foi precipitado pela adição de Na₂SO₄ saturado (100 µL) e etanol absoluto (3,5 mL) e centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos. Após a extração do glicogênio e descarte do sobrenadante, o precipitado foi suspenso em água deionizada (5 mL). Desta solução, foi retirada uma alíquota (200 µL) à qual foram adicionados 800 µL de água deionizada e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi mantida em fervura por 15 minutos. Simultaneamente foi preparada uma curva padrão de glicose (0,01 a 0,06 mg/mL) que foi lida junto com as amostras, em duplicata, em espectrofotômetro a 490nm. As concentrações de glicogênio foram apresentadas em mg/100 mg de tecido úmido.

Mortalidade - Para delineamento das curvas de sobrevivência livre de eventos, os animais foram acompanhados desde o início do protocolo experimental (15 dias após a indução do diabetes) até a data da morte ou final do protocolo. As mortes foram computadas semanalmente, as curvas estimadas pelo método de Kaplan-Meier (Bland & Altman, 1998).

Análise estatística - Todos os resultados foram expressos como média acompanhada do erro padrão. Para comparações entre os animais SHR-STZ 15 dias e os grupos SHR-STZ 75 dias sedentário e treinado, foi utilizada Análise de Variância, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Para análise dos parâmetros obtidos somente no final do período experimental, foi utilizado o teste t de *Student* não pareado, comparando os grupos SHR-STZ sedentário e treinado. As curvas de mortalidade foram analisadas pelo teste log-rank qui quadrado. Valores de p menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

RESULTADOS

Peso corporal, glicemia e capacidade física aeróbia – Na tabela 1, observa-se que 15 dias após a indução do diabetes, todos os animais apresentaram valores de glicemia próximo a 350 mg/dL, caracterizando hiperglicemia, em relação aos valores considerados normais para ratos de laboratório (100-120 mg/dL). A hiperglicemia acentuou-se significativamente no grupo SHR-STZ 75 dias sedentário (Tabela 1, $p < 0,05$), efeito não observado no grupo SHR-STZ 75 dias treinado, que apresentou hiperglicemia semelhante àquela observada 15 dias após a indução do diabetes (Tabela 1). Os dados da Tabela 1 também mostram que 75 dias após a indução do diabetes, animais hipertensos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) apresentaram redução significativa do peso corporal, em relação aos valores observados 15 dias após a indução de diabetes. De acordo com a resposta ao teste de esforço em esteira ergométrica, foi possível observar que, o grupo SHR-STZ 75 dias sedentário apresentou redução da velocidade máxima atingida em relação ao início do período experimental. Por outro lado, o treinamento físico aumentou a velocidade máxima atingida dos animais SHR-STZ 75 dias treinado, não só em relação ao início do período experimental, mas também em relação ao grupo SHR-STZ 75 dias sedentário.

Tabela 1 – Peso corporal, glicemia e capacidade física dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes (controle) e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes.

Grupos	Peso Corporal (g)	Glicemia (mg / dL)	Teste de esforço (Km/h)
SHR-STZ 15 dias	203 ± 5^a	352 ± 9^a	$1,2 \pm 0,04^a$
SHR-STZ 75 dias sedentário	165 ± 6^b	455 ± 16^b	$0,9 \pm 0,04^b$
SHR-STZ 75 dias treinado	178 ± 4^b	390 ± 30^a	$2,1 \pm 0,08^c$

Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

Avaliação hemodinâmica – De acordo com os parâmetros cardiovasculares avaliados ao final do protocolo experimental e apresentados na tabela 2, observamos que o treinamento físico promoveu redução significativa da PAS, PAD e PAM de animais hipertensos-diabéticos ($p<0,05$). Além disto, o treinamento físico induziu redução significativa da FC de animais hipertensos-diabéticos (Tabela 2, $p<0,05$).

Tabela 2 – Valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes.

Grupos	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
SHR-STZ 75 dias sedentário	142 ± 6^a	110 ± 6^a	125 ± 5^a	286 ± 23^a
SHR-STZ 75 dias treinado	113 ± 6^b	91 ± 5^b	103 ± 5^b	231 ± 3^b

Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$; teste t de *Student* não pareado).

Na Figura 1, estão apresentadas as respostas bradicárdica e taquicárdica reflexas, desencadeadas pela administração de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Em ambos os grupos, a infusão de fenilefrina promoveu aumento da pressão arterial e resposta reflexa de queda da frequência cardíaca (bradicardia reflexa), e de maneira inversa, o nitroprussiato de sódio promoveu queda da pressão arterial e aumento reflexo da frequência cardíaca (taquicardia reflexa). Além disto, observa-se que no grupo treinado, tanto o índice de bradicardia como o de taquicardia foram significativamente maiores do que no grupo sedentário ($p<0,05$).

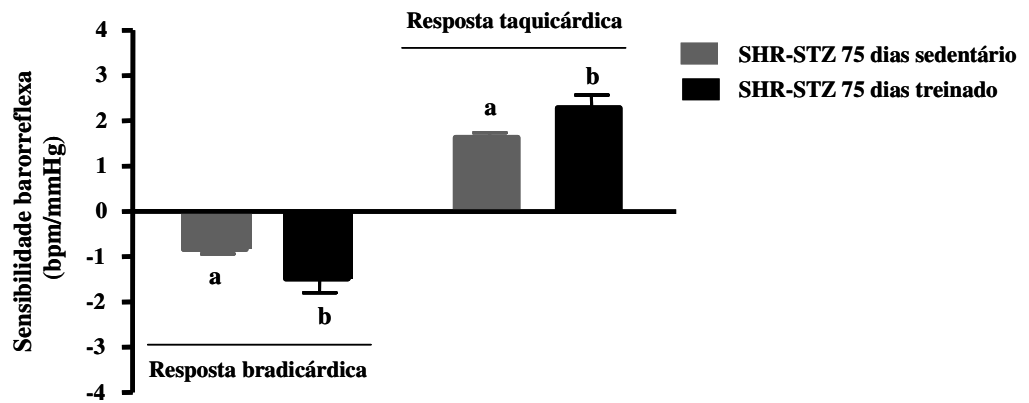
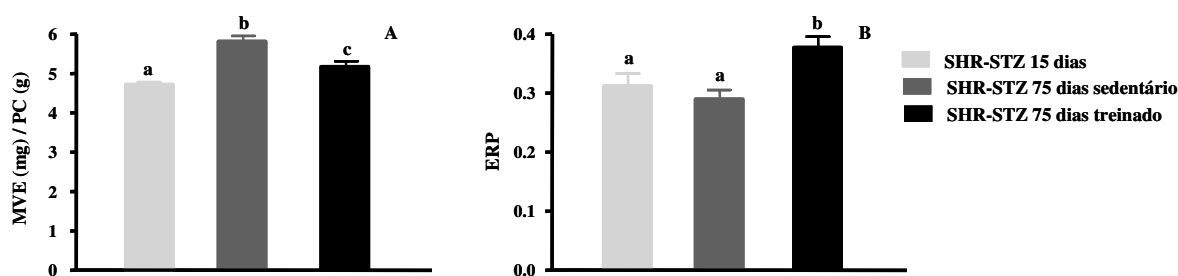


Figura 1 – Resposta barorreflexa bradicárdica e taquicárdica dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Valores apresentados como média \pm erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; teste t de *Student* não pareado).

Morfologia e função cardíaca - Na Figura 2 estão apresentados parâmetros morfológicos do músculo cardíaco, obtidos por meio do ecodopplercardiograma. Observou-se que 75 dias após do indução do diabetes, animais sedentários apresentaram hipertrofia ventricular esquerda (relação massa ventrículo esquerdo - MVE/peso corporal - PC), em comparação aos valores iniciais, obtidos 15 dias após a indução do diabetes (Figura 2A). O treinamento físico diminuiu o grau de hipertrofia; entretanto esta redução não foi suficiente para tornar o índice semelhante àquele observado no período inicial (Figura 2A; $p < 0,05$).

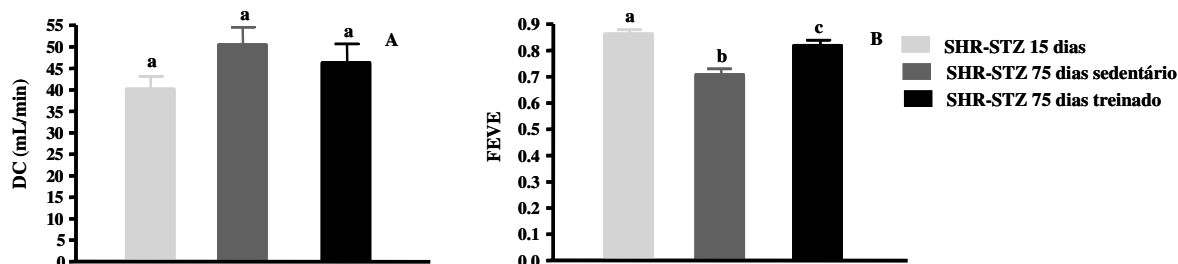
Com o objetivo de investigar as alterações morfológicas associadas à hipertrofia, foi calculada a espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (ERP). Observou-se que 75 dias após a indução do diabetes, não houve diferença entre a ERP do grupo SHR-STZ 75 dias sedentário e aquela observada no período inicial. Por outro lado, a ERP do grupo SHR-STZ 75 dias treinado foi maior do que a do período inicial e do que a do grupo sedentário (Figura 2B; $p < 0,05$).



Figuras 2A e 2B – Índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo (massa do ventrículo esquerdo (MVE) / peso corporal (PC)) e Espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (ERP) dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

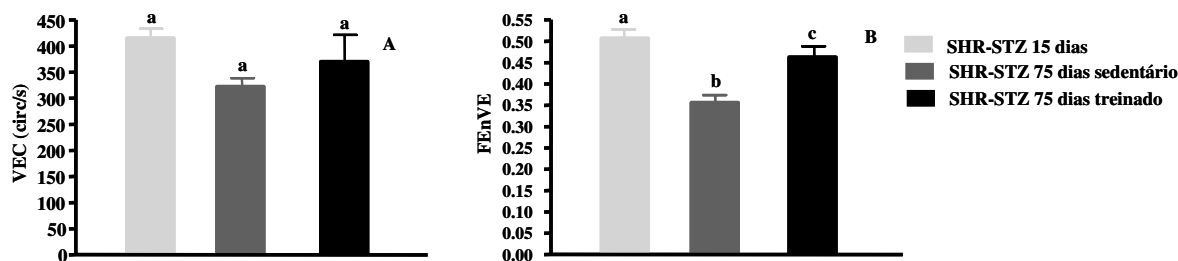
Além da análise morfológica, foram avaliadas as funções sistólica, diastólica e global do músculo cardíaco. Com relação à função sistólica, não houve diferença nos valores de débito cardíaco entre 15 e 75 dias após indução do diabetes, ou entre ratos sedentários e treinados (Figura 3A). Entretanto, animais SHR-STZ 75 dias sedentários e treinados apresentaram redução significativa da fração de ejeção do ventrículo esquerdo

(FEVE) em comparação ao grupo SHR-STZ 15 dias, e o treinamento físico aeróbio atenuou este efeito no grupo SHR-STZ 75 dias treinado (Figura 3B; $p < 0,05$).



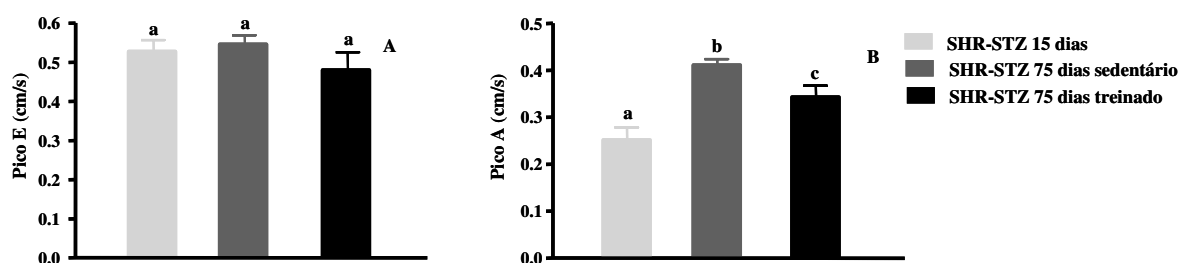
Figuras 3A e 3B – Débito cardíaco (DC) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes (controle) e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

Dois outros índices de função sistólica também foram analisados neste trabalho. De acordo com a Figura 4A, observa-se que a velocidade de encurtamento circunferencial do músculo cardíaco não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, houve alteração na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FenVE - Figura 4B). Animais SHR-STZ 75 dias sedentários e treinados apresentaram redução da FenVE, em relação aos valores iniciais, e o treinamento físico aeróbio atenuou esta redução (Figura 4B).



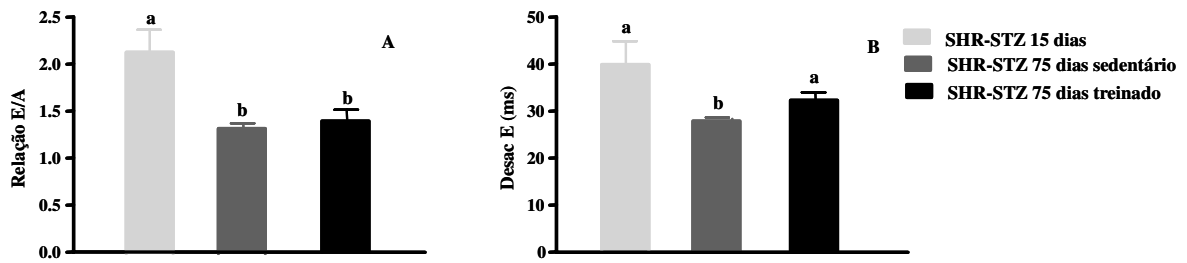
Figuras 4A e 4B – Velocidade de encurtamento circunferencial (VEC) e fração de encurtamento do ventrículo esquerdo dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes (controle) e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

A velocidade máxima do Pico E (enchimento ventricular rápido) e do Pico A (contração atrial) foram calculadas para avaliação da função diastólica. Não foi observada nenhuma alteração significativa com relação à velocidade máxima do Pico E entre os grupos (Figura 5A, $p > 0,05$). Entretanto, a velocidade máxima do Pico A foi significativamente maior nos grupos SHR-STZ 75 dias sedentário e treinado, quando comparada aos valores iniciais, sendo este efeito significativamente menor no grupo treinado quando comparado ao sedentário (Figura 5B, $p < 0,05$).



Figuras 5A e 5B – Velocidade máxima do Pico E (Pico E) e Velocidade máxima do Pico A (Pico A) dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes (controle) e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

A relação entre as velocidades máximas dos picos E e A foi significativamente menor nos grupos SHR-STZ 75 dias sedentário e treinado, em comparação ao período inicial (Figura 6A, $p < 0,05$), sem diferença entre animais sedentários e treinados, ao final do período experimental (Figura 6A, $p > 0,05$). O tempo de desaceleração do pico E (Desac E) foi significativamente menor no grupo SHR-STZ 75 dias sedentário comparado ao período inicial e também aos animais treinados (Figura 6B, $p < 0,05$).



Figuras 6A e 6B – Relação entre as velocidades máximas dos picos E e A (relação E/A) e tempo de desaceleração do pico E (Desac E) dos animais hipertensos-diabéticos 15 dias após a indução do diabetes (controle) e dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + Bonferroni).

Além de avaliar o efeito do treinamento sobre a morfologia e função cardíaca, analisamos a influência do exercício físico sobre a concentração de glicogênio neste tecido. De acordo com a Figura 7, observa-se que o treinamento físico aeróbio promoveu aumento significativo da concentração tecidual de glicogênio no músculo cardíaco de ratos hipertensos-diabéticos (Figura 7, $p < 0,05$).

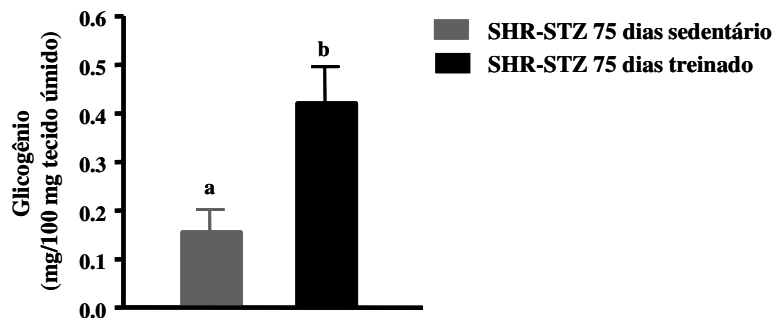


Figura 7 – Concentração tecidual de glicogênio em tecido cardíaco dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado) 75 dias após a indução do diabetes. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA + teste t de *Student* não pareado).

Mortalidade – De acordo com a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, observa-se que o treinamento físico aeróbio aumentou significativamente a sobrevivência de animais hipertensos-diabéticos (qui-quadrado=5,0; p=0,026).

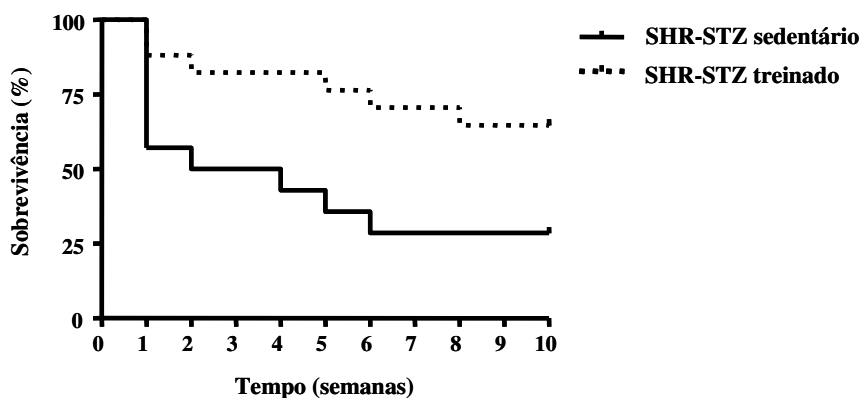


Figura 8 - Curva de sobrevivência livre de eventos (Kaplan-Meier) dos animais hipertensos-diabéticos sedentários (SHR-STZ sedentário) e treinados (SHR-STZ treinado). Mortes computadas semanalmente e curvas analisadas pelo teste log-rank qui-quadrado ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que a associação entre diabetes e hipertensão induz efeitos deletérios sobre o metabolismo e parâmetros cardiovasculares de ratos, que se intensificam durante o curso temporal de evolução destas doenças. Além disto, foi pela primeira vez demonstrado que o treinamento físico moderado não só induziu melhora dos parâmetros metabólicos gerais e hemodinâmicos, como também atenuou a progressão das alterações morfológicas e funcionais do músculo cardíaco, aumentando significativamente o índice de sobrevida dos animais hipertensos-diabéticos.

Para o estudo das alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela associação hipertensão-diabetes, bem como sobre os efeitos do treinamento físico sobre as mesmas, utilizamos o modelo de ratos SHR-STZ. Neste estudo, foi observado que 15 dias após a administração de STZ, todos os animais apresentaram concentração sanguínea elevada de glicose, confirmando a eficácia da indução e o desenvolvimento do diabetes experimental. Cabe ressaltar que apesar da hiperglicemia apresentada, os animais não receberam tratamento à base de insulina, pois este não se faz necessário para sobrevivência dos mesmos durante as primeiras 10-12 semanas pós-indução. Além da alteração na concentração sanguínea de glicose, todos os animais apresentaram perda de peso, um dos sintomas típicos do diabetes mellitus tipo I, o que foi acompanhado de poliúria, desidratação, diarreia, e perda pronunciada de gordura abdominal (dados não apresentados), resultados semelhantes aos presentes na literatura (Tonlimson *et al.*, 1992).

Sabe-se que a atividade física regular é recomendada no tratamento de pacientes com diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica, em razão de seus vários efeitos benéficos sobre o risco cardiovascular, controle metabólico e prevenção das complicações crônicas decorrentes destas doenças (De Angelis *et al.*, 2006; Libonati & Gaughan, 2006; Gaesser, 2007). No presente estudo, foi observado que animais SHR-STZ treinados apresentaram menores concentrações circulantes de glicose do que animais sedentários. Sabe-se que durante o exercício físico o transporte de glicose na célula muscular aumenta, bem como a sensibilidade à ação da insulina (Holloszy, 2005; Jessen & Goodyear, 2005).

Muitos fatores determinam a maior taxa de captação de glicose durante e após o exercício, mas sem dúvida, o aumento do aporte sanguíneo é um importante fator regulador, permitindo disponibilização deste substrato para a musculatura. Acreditamos que o treinamento físico aeróbio ao qual os animais foram submetidos tenha estimulado a translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) para a superfície da membrana celular, aumentando a captação de glicose e diminuindo conseqüentemente os níveis circulantes do substrato (Roy & Marette, 1996).

Já foi demonstrado que a prática de exercício físico regular reduz a incidência e gravidade da hipertensão entre indivíduos diabéticos (De Angelis *et al.*, 2006; Gaesser, 2007), reduzindo também os fatores de risco cardíaco (Sherman *et al.*, 1999). No presente estudo, os resultados mostram que o treinamento físico promoveu redução da PAS, PAD, PAM e da FC de animais hipertensos-diabéticos. Além disto, promoveu melhora da sensibilidade do barorreflexo tanto para respostas taquicárdicas, como para respostas bradicárdicas, evidenciando assim o efeito benéfico do treinamento físico moderado sobre esta condição. Estes resultados são semelhantes àqueles observados em modelos animais de manifestação isolada da hipertensão ou diabetes. Ratos SHR apresentam bradicardia e atenuação da hipertensão em resposta ao TF (Gava *et al.*, 1995; Vêras-Silva *et al.*, 1997), sendo que a redução dos níveis pressóricos está relacionada à normalização do exacerbado tônus simpático para o coração (Vêras-Silva *et al.*, 1997). Além disto, estudos recentes de nosso laboratório demonstraram que o treinamento físico também melhorou as respostas taquicárdica e bradicárdica desencadeadas pelos pressoreceptores em animais diabéticos por STZ (Harthmann *et al.*, 2006). Em ratos SHR, Silva *et al.* (1997) verificaram melhora da sensibilidade reflexa para a bradicardia e taquicardia após o treinamento físico. Apesar dos mecanismos responsáveis pela redução da PA não terem sido investigados no presente estudo, sabe-se que estes podem estar relacionados ao aumento do tônus vagal, redução do tônus simpático ou à mudanças relacionadas à frequência cardíaca intrínseca. Outro fator que poderia estar contribuindo para a redução da PA seria a bradicardia observada no grupo treinado, reduzindo o débito cardíaco. Entretanto, analisando o débito cardíaco de repouso destes animais, determinado por meio do ecodopplercardiograma, descartamos

momentaneamente esta hipótese, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Inicialmente, acreditava-se que a doença cardiovascular, associada ao diabetes e à hipertensão, estava relacionada à alta incidência de aterosclerose, afetando grandes artérias e capilares. Entretanto, recentemente, estudos experimentais demonstraram que o desenvolvimento de cardiomiopatias decorrentes destas doenças pode ser o fator causal do aumento das taxas de morbidade e mortalidade associado a elas (Robert, 2001). As cardiomiopatias associadas à hipertensão e ao diabetes dividem certas semelhanças, especialmente no que diz respeito à disfunção diastólica (Ren *et al.*, 1999), e podem ser estudadas e analisadas por meio de várias técnicas invasivas e não-invasivas.

Apesar dos animais hipertensos-diabéticos representarem um modelo potencialmente útil para o estudo da função cardiovascular quando da associação entre as duas doenças, ainda não havia sido estudada a função cardíaca de forma detalhada, neste modelo experimental, utilizando-se o ecodopplercardiograma. O uso deste método possibilita o estudo da função cardiovascular *in vivo*, evitando a manutenção do coração em condições consideradas não-fisiológicas, como ocorre por exemplo, em estudos envolvendo órgãos isolados em que a glicose é utilizada como único substrato energético para a contração muscular (Hoit *et al.*, 1999). Além disto, como se trata de um método não-invasivo, é possível a realização de medidas repetidas ao longo do período de tratamento, possibilitando não somente o monitoramento da progressão da disfunção cardíaca em diversos modelos experimentais, mas também a análise da eficácia das intervenções terapêuticas sobre a evolução das mesmas.

De acordo com os resultados do presente estudo, observa-se que os efeitos deletérios promovidos sobre a função cardíaca acentuaram-se no curso temporal de evolução do diabetes e da hipertensão. A análise morfológica do ventrículo esquerdo mostra que os animais SHR-STZ sedentários e treinados apresentaram hipertrofia decorrente da evolução do quadro hipertensão-diabetes. Entretanto, de acordo Ganau *et al.* (1992), para compreensão do padrão de hipertrofia que se desenvolve, é necessária a análise conjunta de dois fatores: índice massa do ventrículo esquerdo / peso corporal e

espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo. Neste sentido, observa-se que animais SHR-STZ 75 dias sedentários apresentaram hipertrofia ventricular esquerda, sem alteração da espessura relativa da parede, o que aponta para o desenvolvimento de hipertrofia excêntrica. Estes resultados são similares aos obtidos por Van Zwieten *et al.* (1996), que analisaram a morfologia do músculo cardíaco histologicamente, e aos obtidos por Wold *et al.* (2001) que estudaram o grau de hipertrofia do ventrículo esquerdo em cultura de células isoladas de animais hipertensos-diabéticos.

Por outro lado, observamos que animais SHR-STZ 75 dias treinados apresentaram aumento do índice massa do ventrículo esquerdo / peso corporal e da espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo, em comparação com animais sedentários e também com relação ao período inicial. Isto sugere que o treinamento físico esteja promovendo remodelamento concêntrico ventricular, adaptação que favoreceria o trabalho de bombeamento sanguíneo. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta é a alteração no controle autonômico da função cardíaca, promovida pelo treinamento físico, contribuindo assim para melhora do desempenho do órgão. Sabe-se que o treinamento físico modula o exacerbado tônus simpático para o coração, como demonstrado em animais SHR submetidos ao treinamento físico aeróbio (Véras-Silva *et al.*, 1997), e a estimulação nervosa simpática desempenha importante papel nas fases iniciais de desenvolvimento há hipertrofia ventricular esquerda (Lee *et al.*, 1987).

Os efeitos benéficos decorrentes do treinamento físico também foram evidenciados pela da melhora de parâmetros relacionados tanto à função sistólica quanto diastólica. Com relação à função sistólica, observa-se que apesar do débito cardíaco não ter sido alterado, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi negativamente afetada pelo tempo de evolução do diabetes em animais SHR-STZ sedentários e treinados. Por outro lado, o treinamento físico desencadeou melhora deste índice. O estudo de Wold *et al.* (2001) mostrou que, em cultura de células isoladas, os miócitos de animais SHR-STZ apresentam menor resposta de encurtamento frente ao incremento da frequência de estimulação, fator que pode contribuir para a diminuição na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Além disto, os autores não

observaram alterações frente ao incremento das concentrações extracelulares de cálcio, demonstrando que os animais parecem não desenvolver dessensibilização ao íon.

De acordo com o estudo de DeBlieux *et al.* (1993), o exercício físico melhora a contratilidade cardíaca, fator diretamente relacionado à fração de ejeção. Ao analisarmos a velocidade de encurtamento circunferencial, índice relacionado à função sistólica, observa-se que nem o curso temporal de evolução da hipertensão e diabetes, nem o treinamento físico o influenciaram. Entretanto, a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo diminuiu em função da evolução das doenças, tanto no grupo SHR-STZ sedentário, quanto no grupo treinado, em relação ao período inicial de análise. Um dos fatores que poderia estar contribuindo para a piora do índice em ambos os grupos seria alteração na expressão gênica e nas proteínas contráteis do músculo cardíaco, que possuem um papel importante no desenvolvimento da cardiomiopatia hipertrófica (Wold *et al.*, 2001). Sendo assim, o exercício mostrou ser capaz de reduzir os efeitos deletérios desencadeados sobre este parâmetro.

As cardiomiopatias decorrentes tanto da hipertensão quanto do diabetes dividem algumas semelhanças especialmente relacionadas à disfunção diastólica que se manifestam principalmente por meio do aumento da duração do potencial de ação e taxa reduzida de relaxamento ventricular (Broderick *et al.*, 1994), em todo o músculo cardíaco, nos músculos papilares e em miócitos ventriculares isolados (Ren *et al.*, 1998), com proeminente deterioração ao longo do tempo (Ren *et al.*, 1999). No presente estudo demonstramos que animais SHR-STZ desenvolveram não somente alterações relacionadas à função sistólica mas também outras relacionadas à função diastólica.

A velocidade máxima dos picos E e A são usadas como índices de avaliação da função diastólica, e apesar da dificuldade em isolar, com precisão, estes parâmetros em modelos animais, neste estudo foi possível a identificação dos picos por meio da diminuição da frequência cardíaca dos animais, obtida após administração do anestésico. Os dados do presente trabalho mostram que a velocidade máxima do pico E não foi alterada em nenhum dos grupos experimentais. Entretanto, observa-se um aumento na velocidade máxima do pico A, bem como diminuição da relação E/A, nos grupos SHR-STZ

sedentário e treinado, quando comparados ao período inicial. Também houve diminuição no tempo de desaceleração do pico E nos grupos SHR-STZ sedentário e treinado, evidenciando a disfunção diastólica. A interpretação conjunta destes dados mostra que a associação entre hipertensão e diabetes ocasionou mudança no padrão de enchimento do ventrículo esquerdo, favorecendo a fase de contração atrial para promover o enchimento ventricular. Estas são alterações comumente encontradas em pacientes hipertensos e diabéticos, e acredita-se que tais anormalidades possam estar relacionadas ao seguinte fator. Devido à exposição do átrio esquerdo a uma possível pós-carga, causada por alteração na complacência do ventrículo esquerdo (alteração comprovada pelo aumento do tempo de desaceleração do pico E), houve um aumento nas dimensões do átrio esquerdo, contribuindo para o aumento da participação atrial no enchimento ventricular esquerdo, como demonstrado por Hiramatsu *et al.* (1992) no diabetes mellitus. Além disto, o fato de termos observado diminuição no tempo de desaceleração do pico E sugere que o ventrículo esquerdo de animais diabéticos SHR-STZ apresente maior rigidez do que o dos animais controle.

Algumas limitações relacionadas às análises ecodopplercardiográficas devem ser mencionadas. Sabe-se que a maioria dos anestésicos promovem depressão dos sistemas cardiovascular e respiratório, e justamente graças à diminuição da frequência cardíaca dos animais, é que foi possível a identificação e análise dos picos E e A no presente estudo. Além disto, a combinação entre ketamina e xilazina produz hipotermia, além de exercer efeitos inotrópicos negativos sobre o músculo cardíaco. Apesar do cuidado com a utilização de doses mínimas de anestésicos para realização dos exames, sabe-se que as análises foram feitas sob condições consideradas não-fisiológicas, o que pode ter influenciado os resultados apresentados. Porém considerando que as mesmas doses de anestésicos foram utilizadas no tempo inicial e final, em animais sedentários e treinados, as diferenças observadas parecem estar mais relacionadas ao efeito da evolução temporal da hipertensão-diabetes e ao treinamento físico aeróbio, do que aos procedimentos experimentais mencionados acima.

Evidências sugerem que a cardiomiopatia associada ao diabetes pode também estar relacionada à alterações no metabolismo energético do músculo cardíaco (Rodrigues *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 1997; Scheuermann-Freestone *et al.*, 2003). A deficiência crônica na secreção de insulina ocasiona redução marcante da capacidade de utilização de glicose, fazendo com que o coração utilize somente ácidos graxos para gerar energia (Lopaschik & Spafford, 1989; Belke *et al.*, 2000). Esta alteração pode prejudicar a função cardíaca, por promover o acúmulo acentuado de intermediários lipídicos e por aumentar a utilização de oxigênio do músculo cardíaco. Sendo assim, quantificamos as concentrações teciduais de glicogênio do músculo cardíaco de animais hipertensos-diabéticos, com o objetivo de avaliar o efeito que o treinamento físico estava exercendo sobre este parâmetro. De acordo com os resultados obtidos, observamos que animais hipertensos-diabéticos treinados apresentam concentração tecidual de glicogênio aproximadamente duas vezes maior do que a dos animais sedentários. Esta adaptação indica o desenvolvimento de supercompensação do glicogênio no músculo cardíaco de animais treinados, sugerindo que este também seja um dos fatores responsáveis pela melhora da função cardíaca dos animais. Adaptação semelhante foi observada por nosso grupo em músculo esquelético de ratos Wistar submetidos a treinamento físico de alta intensidade (Cunha *et al.*, 2005).

Analisando da análise das curvas de sobrevivência livre de eventos, delineadas tanto para o grupo SHR-STZ sedentário quanto para o grupo treinado, observamos que o treinamento físico promove aumento significativo da taxa de sobrevivência dos animais hipertensos-diabéticos. Acreditamos que esta adaptação seja resultante da somatória dos efeitos produzidos pelo treinamento físico sobre diversos parâmetros, como mostrado neste estudo: redução da pressão arterial, melhora da sensibilidade do barorreflexo e das alterações morfofuncionais induzidas pelo treinamento físico.

Sendo assim, os resultados do presente estudo sugerem que as alterações relacionadas ao controle da pressão arterial, bem como as alterações morfofuncionais do músculo cardíaco sejam, em parte, responsáveis pelos elevados índices de mortalidade, observados em pacientes hipertensos-diabéticos. Além disto, sugerem que os mecanismos pelos quais o treinamento físico apresenta eficácia terapêutica no tratamento da

manifestação concomitante das duas doenças, parecem incluir efeitos sobre o músculo cardíaco e o reflexo baroreceptor, sendo capaz de reduzir significativamente o índice de mortalidade destes pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderman MH, Cohen H, Madhavan S. Diabetes and cardiovascular events in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999; 33(5): 1130-4.
- Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(5): E1104-13.
- Bland JM, Altman DG. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ*. 1998; 317(7172):1572.
- Broderick TL, Kopp SJ, Daar JT, Romano FD, Paulson DJ. Relation of glycosylated hemoglobin to in vivo cardiac function in response to dobutamine in spontaneously diabetic BB Wor rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994; 72(7): 722-37.
- Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol*. 1978; 45: 1009-1015.
- Buttrick PM, Scheuer J. Biochemical, and coronary adaptation to exercise conditioning. *Cardiol Clin J Physiologic*. 1987; 5(2): 259-270.
- Chukwuma CJ. Comments on the clinical impact of hypertension in type I diabetes. *J. Diab. Comp*. 1992; 6: 197-202.
- Collins HJ, Di Carlo SE. Daily exercise attenuates the sympathetic component of the arterial baroreflex control of heart rate. *Am J Physiol*. 1997; 273(6): 2613-2619.
- Cunha TS, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci*. 2005; 77(9):1030-43.
- De Angelis K, Pureza DY, Flores LJ, Rodrigues B, Melo KF, Schaan BD *et al*. Physiological effects of exercise training in patients with type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50(6): 1005-13.
- De Angelis KLD, Gadonski G, Fang J, Dall'ago P, Albuquerque VL, Peixoto LRA *et al*. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34(2): 768-772.
- De Angelis KLD, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Belló-Klein A, Irigoyen MC. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*. 1997; 30(3): 767-771.
- DeBlieux PM, Barbee RW, McDonough KH, Shepherd RE. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993; 203(2): 209-13.
- Factor SM, Bhan R, Minase T, Wolinsky H, Sonnenblick EH. Hypertensive-diabetic cardiomyopathy in the rat: an experimental model of human disease. *Am J Pathol*. 1981; 102(2): 219-28.

- Factor SM, Borczuk A, Charron MJ, Fein FS, van Hoeven KH, Sonnenblick EH. Myocardial alterations in diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996; Suppl: S133-42.
- Factor SM, Minase T, Cho S, Fein F, Capasso JM, Sonnenblick EH. Coronary microvascular abnormalities in the hypertensive-diabetic rat. A primary cause of cardiomyopathy? *Am J Pathol.* 1984; 116(1): 9-20.
- Frohlich ED. Detection, evaluation, and treatment of hypertension: JNC-5 (Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Heart Dis Stroke.* 1993; 2(6): 459-60.
- Fuller JH. Epidemiology of hypertension associated with diabetes mellitus. *Hypertension.* 1985; 7(6 Pt 2): II3-7.
- Gaesser GA. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep.* 2007; 7(1): 14-9.
- Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS *et al.* Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 19(7): 1550-8.
- Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976; 25(7): 595-603.
- Gava NS, Vêras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac β -adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 26(6): 1129-1133.
- Gordon NF, Scott CB, Levine BD. Comparison of single versus multiple lifestyle interventions: are the antihypertensive effects of exercise training and diet-induced weight loss additive? *Am J Cardiol.* 1997; 79(6): 763-7.
- Grossman E, Shemesh J, Shamiss A, Thaler M, Carroll J, Rosenthal T. Left ventricular mass in diabetes-hypertension. *Arch Intern Med.* 1992; 152(5): 1001-4.
- Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM *et al.* Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci.* 2006 – *in press*
- Hiramatsu K, Ohara N, Shigematsu S, Aizawa T, Ishihara F, Niwa A *et al.* Left ventricular filling abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus and improvement by a short-term glycemic control. *Am J Cardiol.* 1992; 70(13): 1185-9.
- Hoit BD, Castro C, Bultron G, Knight S, Matlib MA. Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail.* 1999; 5(4): 324-33.
- Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol.* 2005; 99(1): 338-43.

- Jennings G, Nelson L, Dewar E, Korner P, Esler M, Laufer E. Antihypertensive and hemodynamic effects of one year's regular exercise. *J Hypertens*. 1986; 4: 659-661.
- Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005; 99(1): 330-7.
- Johnston CI, Cooper ME, Nicholld, GM. Meeting report of the International Society of Hypertension Conference on Hypertension and Diabetes. *J Hypertens*. 1992; 10:393-397.
- Libonati JR, Gaughan JP. Low-intensity exercise training improves survival in Dahl salt hypertension. *Med Sci Sports Exerc*. 2006; 38(5): 856-8.
- Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970; 28(2):234-6.
- Lopaschuk GD, Spafford M. Response of isolated working hearts to fatty acids and carnitine palmitoyltransferase I inhibition during reduction of coronary flow in acutely and chronically diabetic rats. *Circ Res*. 1989; 65(2): 378-87.
- Natali AJ. Efeitos do exercício crônico sobre os miócitos cardíacos: uma revisão das adaptações mecânicas. *Rev Bras Cienc Mov*. 2004; 12(1): 91-6.
- Negrão CE, Moreira ED, Brum PC, Denadai MLDR, Krieger EM. Effect of vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25: 1045-1052.
- Noma K, Rupp H, Jacob R. Subacute and long term effect of swimming training on blood pressure in young and old spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1987; 21: 871-877.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27: 282-93
- Overton JM, Joyner MJ, Tipton CM. Reductions in blood pressure after acute exercise by hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 1988; 64: 748-752.
- Ren J, Jefferson L, Sowers JR, Brown RA. Influence of age on contractile response to insulin-like growth factor 1 in ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34(6): 1215-22.
- Ren J, Walsh MF, Hamaty M, Sowers JR, Brown RA. Altered inotropic response to IGF-I in diabetic rat heart: influence of intracellular Ca²⁺ and NO. *Am J Physiol*. 1998; 275(3 Pt 2): H823-30.
- Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970; 22(4); 485-518.
- Rodgers RL. Depressor effect of diabetes in the spontaneously hypertensive rat: associated changes in heart performance. *Can J Physiol Pharmacol*. 1986; 64(9): 1177-84.
- Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27(1): 169-79.

- Rodrigues B, Irigoyen MC, De Angelis K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO₂) in rats submitted to maximum exercise test. *Fiep Bulletin*. 2006; 76: 231-233.
- Rodrigues B, McNeill JH. Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *Am J Physiol*. 1986; 251(3 Pt 2): H571-80.
- Roeske WR, O'Rourke RA, Klein A. Noninvasive evaluation of ventricular hypertrophy in professional athletes. *Circulation*. 1976; 53: 286-291.
- Rondon MUPR, Brum PC. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. *Ver Bras Hipertens*. 2003; 10(2): 134-139.
- Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. *BMJ*. 1996; 313(7060): 779-84.
- Roy D, Marette A. Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 223(1): 147-52.
- Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D, Blamire AM, Buckingham RE, Styles P *et al*. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003; 107(24): 3040-6.
- Sherman SE, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB. Comparison of past versus recent physical activity in the prevention of premature death and coronary artery disease. *Am Heart J*. 1999; 138(5 Pt 1): 900-7.
- Silva GJJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic affects of exercise on baroreflex in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens*. 1997; 30: 714-719.
- Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich ED. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286(1): H181-5.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res*. 1997; 34(1): 25-33.
- Tancrede G, Rousseau-Mignerou S, Nadeau A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes*. 1982; 31(5): 406-409.
- Tipton CM. Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc Sport Sci Rev*. 1991; 19: 447-505.
- Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev*. 1992; 44(1): 103-50.
- Van Zwieten PA, Kam KL, Pijl AJ, Hendriks MG, Beenen OH, Pfaffendorf M. Hypertensive diabetic rats in pharmacological studies. *Pharmacol Res*. 1996; 33(2): 95-105.
- Venco A, Grandi A, Barzizza F, Finardi G. Echocardiographic features of hypertensive-diabetic heart muscle disease. *Cardiology*. 1987; 74(1): 28-34.

Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertension rats. *Am J Physiol.* 1997; 42: 2627-31.

Wallberg-Henriksson H, Rincon J, Zierath JR. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med.* 1998; 25(1): 25-35.

Wold LE, Relling DP, Colligan PB, Scott GI, Hintz KK, Ren BH *et al.* Characterization of contractile function in diabetic hypertensive cardiomyopathy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33(9): 1719-26.

CAPÍTULO 3

Elased KM, Cunha TS, Gurley SB, Coffman TM, Morris M. New mass spectrometric assay for angiotensin-converting enzyme 2 activity. *Hypertension*. 2006; 47(5):1010-1017.

Neste capítulo, serão apresentados os dados referentes á padronização de um novo ensaio para a determinação da atividade proteolítica da ECA2, utilizando a espectrometria de massa.

A autorização eletrônica para inclusão do artigo na tese (página 51) foi gentilmente cedida pela editora Lippincott Williams & Wilkins, que detém os direitos autorais sobre o material, em favor da American Heart Association.

Impresso da autorização eletrônica para inclusão do artigo intitulado:
“New mass spectrometric assay for angiotensin-converting enzyme 2 activity”.



January 23, 2007

State University of Campinas
Faculty of Dentistry of Piracicaba
Department of Physiology
Av Limeira, 901 – Vila Areião
13414-903 – Piracicaba – São Paulo / Brazil
Tatiana Sousa Cunha

VIA EMAIL TO: cunhats@yahoo.com.br January 24, 2007

FEE: NONE

RE: Elased KM, Cunha TS, Gurley SB, Coffman TM, Morris M. “New Mass Spectrometric Assay for Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity” Hypertension, 2006 May;47(5):1010-7

USE: Thesis

CONDITION OF AGREEMENT

Permission is granted upon the return of this signed agreement to Lippincott Williams & Wilkins (LWW). Please sign and date this form and return to:

Lippincott Williams & Wilkins
David O’Brien, Worldwide Copyright Management
351 W Camden Street, 4 North
Baltimore, MD 21201
USA

Permission is granted and is subject to the following conditions:

- 1) A credit line will be prominently placed and include the journal article author and article title, journal title, volume number, issue number, and the inclusive pages.
- 2) The requestor warrants that the material shall not be used in any manner, which may be derogatory to the title, content, or authors of the material or to LWW.
- 3) Permission is granted for use only as specified in your correspondence. Rights herein do not apply to future reproductions, editions, revisions, or other derivative works.
- 4) Permission granted is non-exclusive, and is valid throughout the world in the English language.
- 5) LWW cannot supply the requestor with the original artwork or a “clean copy”.
- 6) Permission is valid if the borrowed material is original to a LWW imprint (Lippincott-Raven Publishers, Williams & Wilkins, Lea & Febiger, Harwal, Igaku-Shoin, Rapid Science, Little Brown & Company, Harper & Row Medical, American Journal of Nursing Co., and Urban & Schwarzenberg-English language.)

New Mass Spectrometric Assay for Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity

Khalid M. Elased, Tatiana S. Cunha, Susan B. Gurley, Thomas M. Coffman and
Mariana Morris

Hypertension 2006;47:1010-1017; originally published online Apr 3, 2006;

DOI: 10.1161/01.HYP.0000215588.38536.30

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX
72514

Copyright © 2006 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online
ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/47/5/1010>

ABSTRACT

A novel assay was developed for evaluation of mouse angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and recombinant human ACE2 (rACE2) activity. Using surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) with ProteinChip® Array technology, ACE1 and localized tissue ACE2 activity could be measured using natural peptide substrates. Plasma from C57BL/6 mice, kidney from wildtype and ACE2 knockout mice and rACE2, were used for assay validation. Plasma or tissue extracts were incubated with angiotensin I (Ang I, 1296, *m/z*) or angiotensin II (Ang II, 1045, *m/z*). Reaction mixtures were spotted onto the ProteinChips® WCX2 and peptides detected using SELDI-TOF-MS. Peak height or area under curve for the substrates, Ang I and Ang II, and the generated peptides, Ang 1-7 and Ang 1-9, were monitored. The ACE2 inhibitor, MLN 4760 (0.01- 100 $\mu\text{mol/L}$), failed to inhibit plasma ACE1 activity. However, in nmol/L concentrations MLN 4760 significantly inhibited rACE2 activity ($\text{IC}_{50} = 3$

nmol/L). Ang II was preferably cleaved by rACE2 ($K_m = 5 \mu\text{mol/L}$) while Ang I was not a good substrate for rACE2. Unlike ACE1, there was no detectable ACE2 activity in plasma. Assay specificity was validated in a model of ACE2 gene deletion. In kidney extract from ACE2 deficient mice, there was no generation of Ang (1-7) from Ang II. However, Ang (1-7) was produced when Ang I was used as a substrate. In conclusion, we developed a specific and sensitive assay for ACE2 activity which used the natural endogenous peptide substrate, Ang II. This approach allows for the rapid screening for ACE2 which has applications in drug testing, high throughput enzymatic assays and identification of novel substrates/inhibitors of the RAS.

Key Words: SELDI-TOF-Mass Spectrometry, angiotensin, angiotensin 1-7, renin angiotensin system, mice.

INTRODUCTION

The renin angiotensin system (RAS) is a key regulator of cardiovascular and renal function, both under physiological and pathological conditions¹. It consists of a cascade of enzymatic reactions and in the classical system, the processing scheme begins with the conversion of angiotensinogen (AGT) to angiotensin I (Ang I) via renin (EC 3.4.23.15)². This step is followed by the action of angiotensin converting enzyme (ACE1, EC 3.4.15.1), a peptidyl dipeptidase which belongs to the gluzincin family of metalloproteases³. ACE1 cleaves the C-terminal dipeptide (L-histidyl-L-Leucine) of Ang I, generating the physiologically active vasoconstrictor peptide, angiotensin II (Ang II). Ang II is the key mediator of the RAS and its biological actions are produced through the selective binding of this peptide to two different types of receptors, AT1 and AT2¹. In addition to the initially described circulating RAS, the components are also expressed locally in brain, kidney, pancreas, adipocytes and other organs⁴⁻⁶.

New findings suggest that the RAS is a far more complex and dynamic system than suggested by previous research. In 2000, a homologue of ACE1, known as angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), was cloned by two independent groups^{7, 8}. This newly discovered member of the RAS is an 805 amino acid protein that shares around 42%

sequence identity to the N-and C-domains of somatic ACE1⁷. Unlike ACE1, ACE2 functions predominantly as a carboxypeptidase with a substrate preference for hydrolysis between proline and a hydrophobic or basic C-terminal residue⁹. Recombinant expressed ACE2 was first reported to cleave a single amino acid from Ang I to generate Ang (1-9)^{8,9}, which is then converted by ACE1 to the potent vasodilator peptide, Ang (1-7). Subsequent to this initial characterization, it was found that ACE2 has a preference for Ang II as a substrate, which it rapidly hydrolyses to Ang (1-7)^{7,9}. Thus, *in vitro* biochemical data suggest that ACE2 negatively regulate Ang II production and function, not only because it decreases local production of Ang II, but also because the cardiovascular effects of its product, Ang (1-7), oppose those of Ang II^{10,11}. In addition, there is evidence that other non-ACE enzyme systems may be active in tissue, adding to the local production of Ang II and Ang (1-7)^{12,13}.

Initially, ACE2 appeared to be more limited in its tissue distribution than ACE1, with significant levels detected only in heart, kidney and testis^{7,8}. However, a recent study detected ACE2 expression in a variety of other tissues¹⁴. The exact *in vivo* role of ACE2 remains to be determined, but it is clearly multifunctional. Studies of gene deletion mice and of the effects of heart failure on ACE1 and ACE2 expression, suggest that ACE2 is involved in the control of cardiovascular function^{15,16,17,18}. Moreover, ACE2 has been identified as a functional receptor for the coronavirus which causes the severe acute respiratory syndrome (SARS)¹⁹. Recently Santos et al²⁰ identified the orphan G protein-coupled receptor *mas* as an Ang (1-7) receptor.

One issue, which is important for the investigation of the ACE2 system and its pathophysiological role, is the availability of selective, sensitive and rapid assays. This is critical in view of accumulating evidence of ACE2's role both in cardiovascular homeostasis and as a cellular receptor for the SARS virus¹⁹. A classical method for measurement of ACE2 tissue activity is based on the use of fluorogenic peptide substrates^{3,9,21,22}. Another method which is accurate, but time consuming, is the use of radiolabeled peptide precursors followed by HPLC separation of the peptide products²³.

Our recent studies have focused on the development of new proteolytic assay technologies. Using endogenous peptide substrates with SELDI-TOF mass spectrometric (MS) measurements, we were able to show that ACE1 (conversion of Ang I to Ang II) or renin (conversion of tetradecapeptide to Ang I) activity could be measured in small sample volumes (less than 1 μ L plasma)²⁴. Studies of physiological conditions revealed that there were increases in plasma ACE1 activity in diabetic mice and plasma renin activity in the Ang AT1a gene deletion model. The key issue behind the methodology is the ability to distinguish and quantify small molecular weight peptides^{25, 26}. This means that it can be applied to peptide sequencing as well quantification of enzymatic reactions. This is different from spectroscopic assays in which the index of activity is the change in color or fluorescence with no information regarding the identity of the specific peptides formed in the proteolytic reactions²⁷.

The objective of the present study was to develop a sensitive and specific assay for ACE2 activity. The method was based on our previous work which established MS as a useful tool for measuring proteolytic enzyme activity, specifically as related to the RAS²⁴. The approach uses the natural endogenous substrates for ACE2, Ang I and Ang II, which are proteolytically cleaved to yield Ang (1-9) and Ang (1-7), respectively. It is anticipated that this MS-enzyme assay will have applications in drug screening, antagonist development and clinical investigations.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant Human ACE2 was purchased from R& D System (Minneapolis, MN, USA). Ang I and Ang II were obtained from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA). Bestatin was obtained from ALPCO Diagnostics (Windham, NH, USA). SELDI-TOF-MS ProteinChip[®] and the calibration standard molecules were purchased from Ciphergen Biosystems, Inc (Fremont, CA, USA). ACE2 inhibitor MLN 4760 was a gift from Dr. Natalie Dales (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL,

USA). Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), α -hydroxy-4-cinnamic acid (CHACA), captopril, EDTA and 1,10 phenanthroline were purchased from Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Organic solvents were HPLC grade.

Animals and Plasma Samples - C57BL/6 male mice were purchased from a commercial source (Harlan Inc, Indianapolis, IN). Male mice with targeted disruption of the ACE2 gene (*Ace2*^{-/-}) and their littermate controls (*Ace2*^{+/-}) were generated in the laboratory of Dr. Thomas Coffman¹⁸. ACE2 deficient mice (*Ace2*^{-/-}) showed no gross abnormalities, were capable of efficient reproduction and showed normal cardiac function¹⁸. Animals were housed at 22°C under a 12-hr light/12-hr dark cycle with *ad libitum* access to water and standard mouse chow. For the collection of blood samples, mice were decapitated and trunk blood was collected in ice-chilled, heparinized tubes. Plasma was immediately separated and stored frozen at - 80°C. Tissues were removed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C. All experimental protocols were approved by the WSU Animal Care and Use Committee.

ACE1 and ACE 2 activity were measured in plasma and kidney extracts. The SELDI-TOF-MS method takes advantage of the ability to precisely quantify the peptide products of the ACE1 and ACE2 reactions, Ang II, Ang (1-9) and Ang (1-7). The methodology for tissue measurements is similar to that previously described²⁴. The tissues are homogenized on ice in 1:9 (w/v) of Tris HCl (50 mmol/L, pH 7.4) containing 2 mmol/L PMSF. The homogenate is centrifuged at 9,000 x g for 10 min to remove cellular debris. Total protein content is determined in the supernatant using the Bradford protein assay with BSA as a standard (BioRad Protein Assay Reagent, BioRad Labs, Hercules, CA). The tissue extract is adjusted with Tris HCl (50 mmol/L, pH 7.4) to a concentration of 1 μ g total protein/ μ L. The components of the reaction mixture are the following: 25 μ L MES buffer (50 mmol/L, pH 6.75); 2 mmol/L PMSF; 10 μ mol/L bestatin, source of ACE (kidney extract, 0.5-2.5 μ g protein in 0.5-2.5 μ L, r ACE2 or plasma) and Ang I or Ang II (10 μ mol/L). The incubations time was from 30 to 120 min at 37° C. The contribution of endogenous angiotensinogen and Ang peptides in the reaction was negligible since excess amounts of Ang I and Ang II were used.

SELDI-TOF-MS - Weak cation exchange (WCX2) ProteinChips[®] were used for the retention and analysis of substrate and peptide enzyme products. WXC2 ProteinChip[®] spots were first outlined with a hydrophobic mark (pap-pen; RPI Corp, Mt. Prospect, IL, USA) and air dried. The Chip surface was activated with 1 μ L 0.01 N HCl and washed with deionized water (5 μ L, 3X). After the incubation period, 1 μ L of the reaction mixture was spotted onto ProteinChip[®] WCX2 and analyzed as previously described²⁴.

Statistics - Values of peptide spectra relative intensity or AUC were expressed as means \pm SEM. Nonparametric Mann Whitney U test was used for comparison between groups. Differences were considered to be statistically significant at the $p < 0.05$.

RESULTS

Measurement of rACE2 Activity - An example of the SELDI-TOF-MS profile for peptides retained on ProteinChip[®] WCX2 during rACE2 proteolytic assays is shown in Figure 1. The chromatographs show the substrates and peptide products formed after 30 min incubation of Ang I or Ang II (10 μ mol/L) with rACE2 (2 and 10 ng). rACE2 (10 ng) converted Ang I (1296.5 m/z) to Ang (1-9) (1183.45 m/z), by cleavage of the C-terminal leucine (Figure 1A, 1B). The Ang (1-9) peak was almost undetectable when using the lower concentration of rACE2 (2 ng, Figure 1A). The conversion from Ang I to Ang (1-9) was minimal, indicating that Ang I was not a good substrate for rACE2. Incubation of Ang II with rACE2 (2 ng) resulted in production of peptides with m/z that matched Ang (1-7) (898.8) (Figure 1C and 1D). Ang II was a good substrate for rACE2 as seen by the formation of Ang (1-7) and by complete conversion of Ang II to Ang (1-7) when a higher concentration of rACE2 (10 ng) was used (Figure 1D).

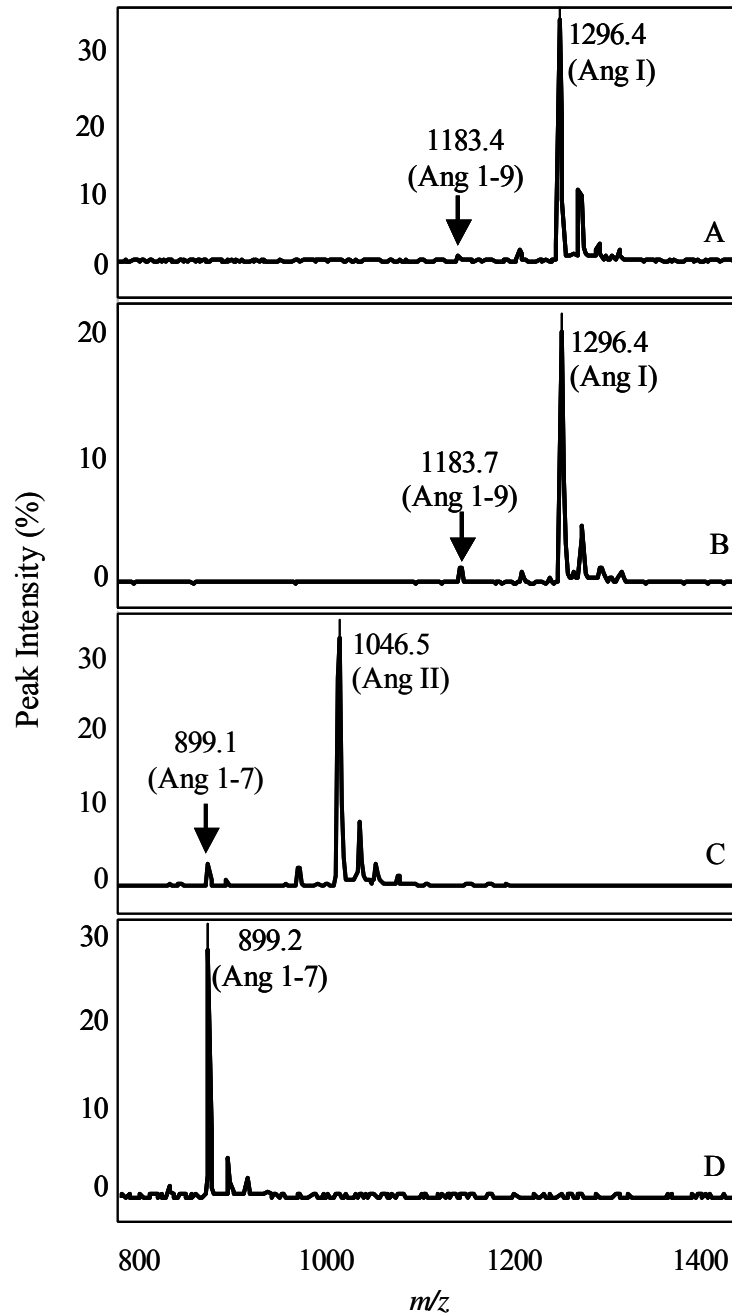


Figure 1: SELDI-TOF-MS analysis of recombinant ACE2 (rACE2) activity. rACE2 (2 and 10 ng) was incubated with Ang I (10 μ mol/L) or Ang II (10 μ mol/L) in 25 μ L MES buffer (pH, 6.75) for 30 min. Substrate and generated peptides were monitored and expressed as peptide peak % intensity. A: Ang I + rACE2 (2 ng); B: Ang I + rACE2 (10 ng); C: Ang II + rACE2 (2 ng), D: Ang II + rACE2 (10 ng).

Recombinant ACE2 activity was evaluated in the presence of the metallic chelators (EDTA and 1,10 phenanthroline) and the specific ACE2 inhibitor, MLN 4760. Like ACE1, ACE2 activity was blocked by the chelating agents (data not shown). Figure 2 shows the dose related inhibitory effect of MLN 4760 on rACE2 activity (2 ng). Ang II (10 μ mol/L) was incubated with rACE2 (2 ng) in the absence and presence of various concentrations of MLN 4760 (3 - 300 nmol/L) (Figure 2B-E). The low dose (3 nmol/L) significantly inhibited rACE2 activity (Figure 2C) and the highest dose (300nmol/L) produced > 95% inhibition of rACE2activity (Figure 2E). A test of 0.3 nmol/L MLN 4760 also showed inhibition of almost 20% (data not shown). The results show the specificity of the reaction, indicating that peptide cleavage was not produced by nonspecific degradation of Ang II, but rather via the zinc metalloproteases ACE2^{7,8}.

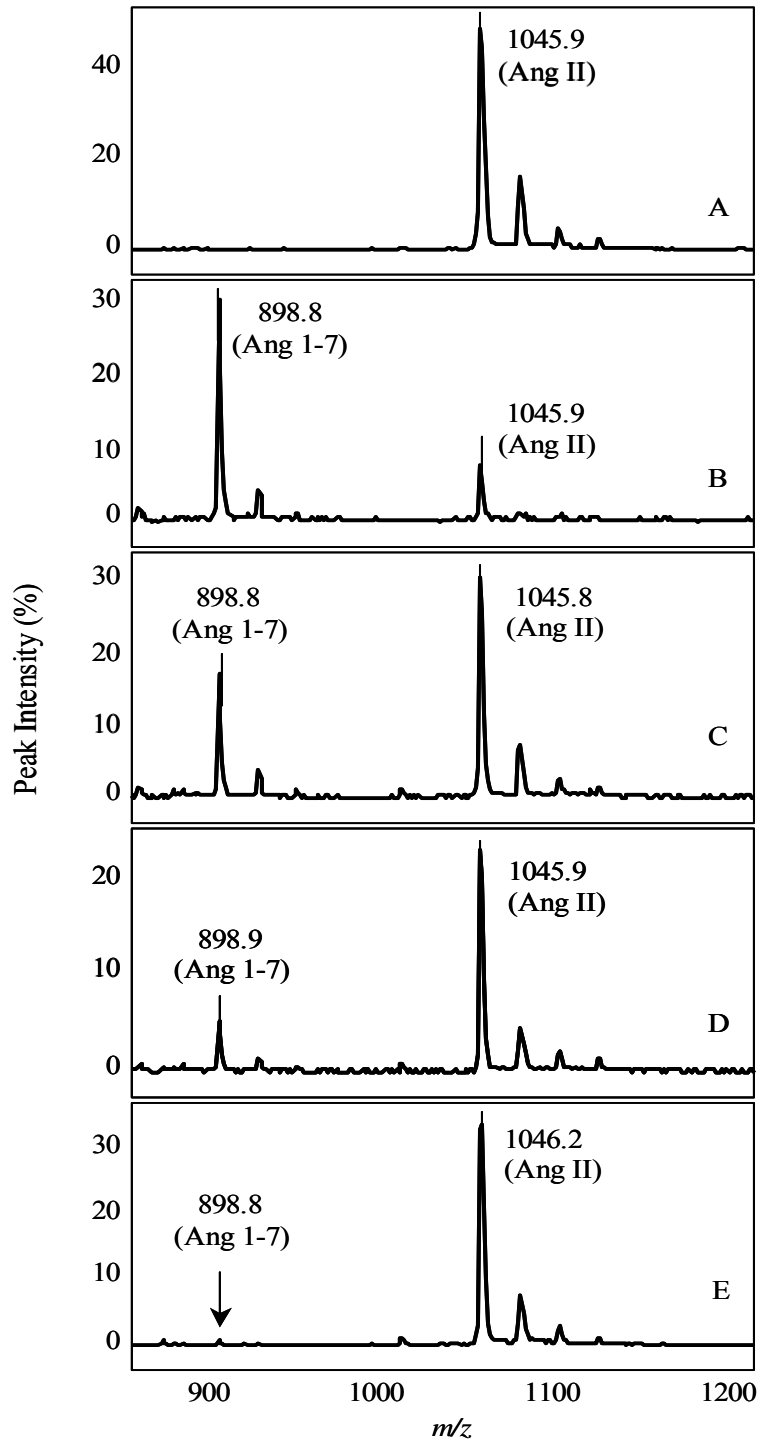


Figure 2: Inhibition of rACE2 activity with a selective ACE2 inhibitor, MLN 4760. rACE2 (2ng) was incubated with Ang II (10 μ mol/L) in 25 μ L MES buffer (pH, 6.75) for 30 min in the absence and presence of variable concentrations of MLN-4760. SELDI-TOF-MS analysis of substrate and generated Ang (1-7) was monitored. A: control Ang II; B: Ang II + rACE2; C: Ang II + rACE2 + MLN 4760 (3 nmol/L). D: Ang II + rACE2 + MLN 4760 (30 nmol/L). E: Ang II + rACE2 + MLN 4760 (300 nmol/L).

The reproducibility of the SELDI-TOF-MS assay for rACE2 activity was quantified using variable concentration of Ang II as substrate (0.5-50 $\mu\text{mol/L}$). The peptide was added to 25 μL of MES buffer containing rACE2 (2 $\text{ng}/\mu\text{L}$) and generated Ang (1-7) was monitored and expressed as AUC (data not shown). There was a good correlation between the concentrations of Ang II substrate and the quantity of generated Ang (1-7) ($R^2 = 0.95$). For assay evaluation, we determined the relationship between disappearance of substrate, Ang II, generation of product, Ang (1-7), and enzyme concentration ($R^2 = 0.97$ and 0.98 respectively) (Figure 3a). When the ratio of the peptide peaks (Ang 1-7/Ang II) was used as the experimental index, there was a linear relationship between Ang 1-7/Ang II ratio and rACE2 concentration (Figure 3b, $R^2 = 0.99$). The data verifies the utility and the reproducibility of the method and demonstrates that the peptide ratio provides a better index of activity. Similarly, when different amounts of kidney extracts were added to a standard amount of Ang II there was a linear relationship between kidney protein content and generated Ang (1-7) ($R^2 = 0.96$). The data demonstrates that SELDI-TOF-MS may be used as a biochemical for enzyme assay and for quantitative evaluation of peptide levels in the reaction mixture.

To further validate the MS enzyme assay, the kinetics of rACE2 activity was studied by constructing a Lineweaver-Burk plot (1/substrate versus 1/velocity) (data not shown). Calculated Michaelis constant (K_m) for rACE2 using Ang II as a substrate was found to be 5.1 $\mu\text{mol/L}$, which is in agreement with published data using another assay system²¹.

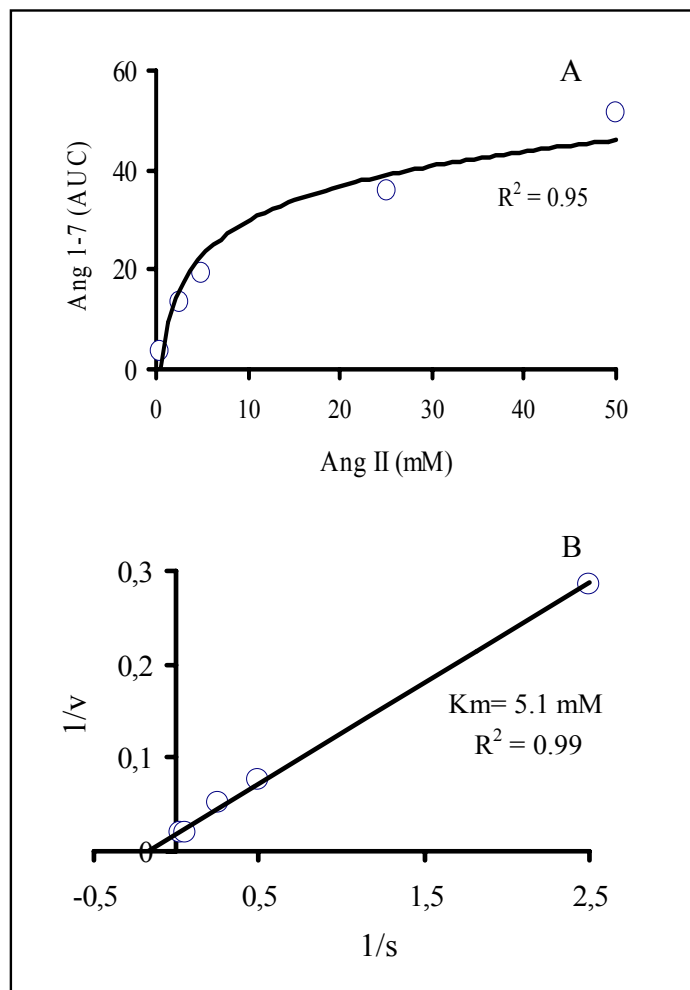


Figure 3: (A) Relationship between rACE2 concentration and formation of Ang (1-7) and disappearance of Ang II. Ang II (10 $\mu\text{mol/L}$) was mixed with variable concentrations of rACE2 (0.05-2 ng) and incubated for 2h. Substrate and generated peptides were monitored and expressed as peptide peak AUC. (B) Linear relationship between rACE2 concentrations and ratio of Ang 1-7/Ang II. Ang II (10 $\mu\text{mol/L}$) was mixed with variable concentrations of rACE2 (0.05-2 ng) and incubated for 2h. Substrate and generated peptides were monitored and expressed as peptide peak AUC.

Measurement of ACE2 Activity in plasma and kidney - Further characterization studies were conducted using the specific ACE2 antagonist, MLN 4760²⁸ with measurement of ACE1 and ACE2 activity in plasma and kidney extracts. Figure 4 shows the results of an experiment in which normal mouse plasma (source of ACE1) was incubated with Ang I (10 $\mu\text{mol/L}$) for 2 hr. Ang I was processed by ACE1 to yield Ang II (1046, m/z), a reaction which was blocked by the ACE1 inhibitor, captopril (data not shown). There was no evidence for the production of Ang (1-7) (898.8) and ACE1 activity was not affected by preincubation with MLN 4760 (0.01 and 100 $\mu\text{mol/L}$) (Figure 4C & 4D). The composite data suggests that ACE2 is not active in plasma. To exclude the possibility that endogenous ACE2 inhibitors might be present in plasma and influence the enzyme reaction, rACE2 activity (2 ng) was measured in the presence of mouse plasma (0.5-2.5 μL). Plasma had no effect on rACE2 activity (data not shown), suggesting that circulating ACE2 inhibitors are not present.

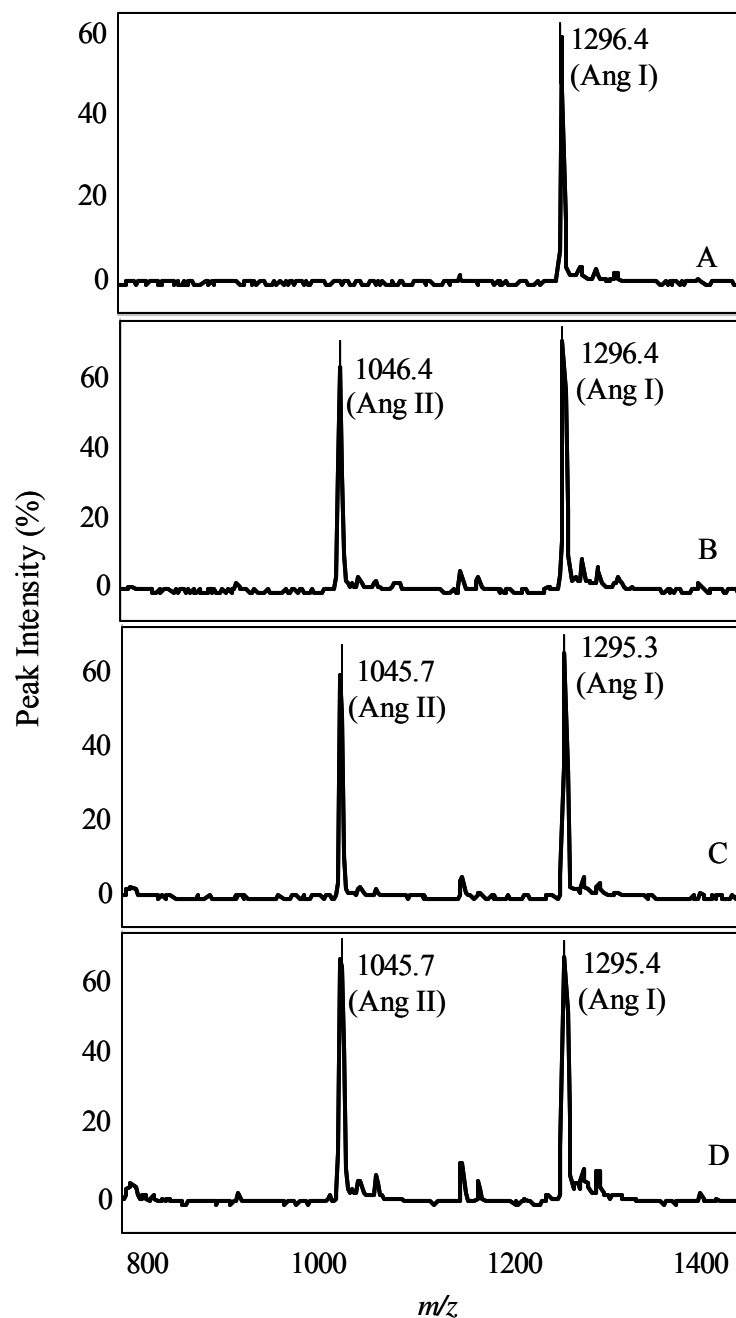


Figure 4: Evaluation of plasma ACE1 and ACE2 activity. Ang I (10 $\mu\text{mol/L}$) was added to a 25 μL MES buffer containing 0.5 μL mouse plasma and 2 mmol/L PMSF in the absence and presence of MLN 4760. Substrate and generated peptides were monitored and expressed as peak % intensity. The conditions are the following: A: control Ang I; B: Ang I + plasma; C: Ang I + plasma + MLN 4760 (0.01 $\mu\text{mol/L}$). D: Ang I + plasma + MLN 4760 (100 $\mu\text{mol/L}$).

ACE2 deficient (*Ace2*^{-/-}) and wildtype ACE2 (*Ace2*^{+/-}) mice were used for further characterization and validation of the ACE2 assay. Kidney extract was used as a source of ACE2. Figure 5 shows the results of a representative experiment in which kidney extract from wildtype ACE2 (*Ace2*^{+/-}) and ACE2 deficient (*Ace2*^{-/-}) mice were incubated with Ang II (10 μ mol/L). In the wildtype (*Ace2*^{+/-}), Ang II was metabolized to Ang 1-7 (899, *m/z*), providing direct evidence of renal ACE2 activity as expected (Figure 5B). In contrast, Ang 1-7 (899, *m/z*) was not formed in kidney extracts from ACE2 deficient (*Ace2*^{-/-}) mice (Figure 5C), providing physiological evidence for an absence of ACE2.

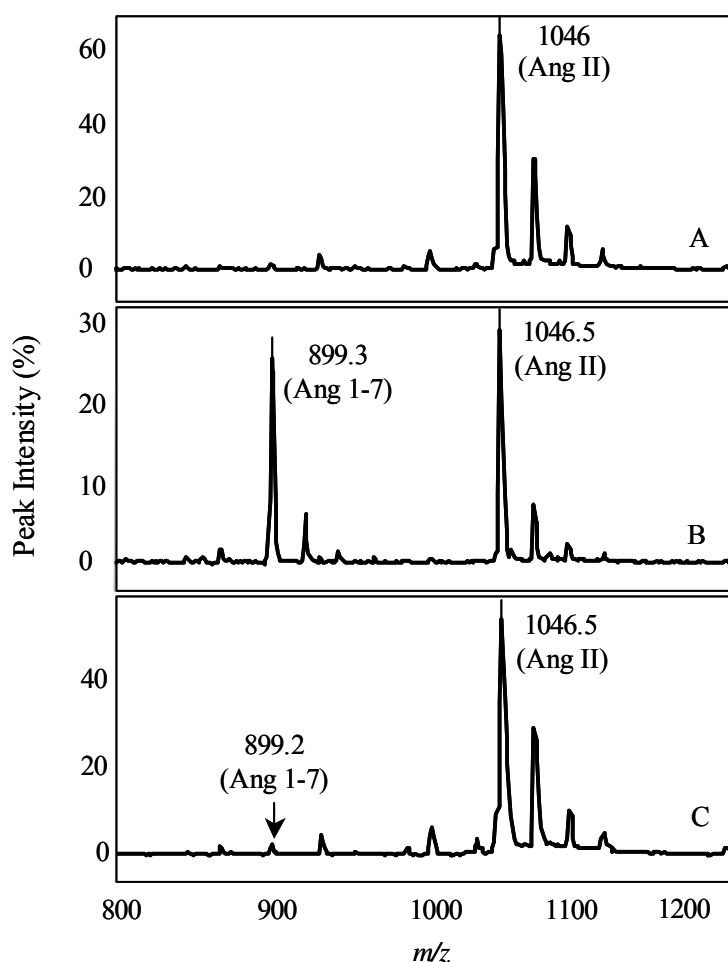


Figure 5: Kidney ACE2 activity in ACE2 deficient and wildtype ACE2 mice. Tissue extract (1 μ g protein) was incubated with Ang II (10 μ mol/L) for 2 hrs. Substrate and generated peptides Ang (1-7) were analyzed with SELDI-TOF-MS and expressed as peptide peak % intensity. A: control Ang II, B: Ang II + wildtype ACE2 , C: Ang II + ACE2 deficient.

Figure 6 compares Ang (1-7) generation in renal extracts from ACE2 deficient (*Ace2*^{-y}) and wildtype (*Ace2*^{+y}) mice using Ang II or Ang I as substrates. For quantitative evaluation, the ratio of peptide peaks (Ang 1-7/Ang II) and (Ang 1-7/Ang I) was used as the experimental index. As expected there was marked decrease in the ratio of Ang 1-7/Ang II in ACE2 deficient mice compared to the wildtype ($p < 0.001$, Figure 6). However, when Ang I was used as the substrate, there was no difference in the ratio of Ang 1-7/Ang I between the groups indicating other enzyme systems apart from ACE2 may be involved in generation of Ang (1-7) from Ang I.

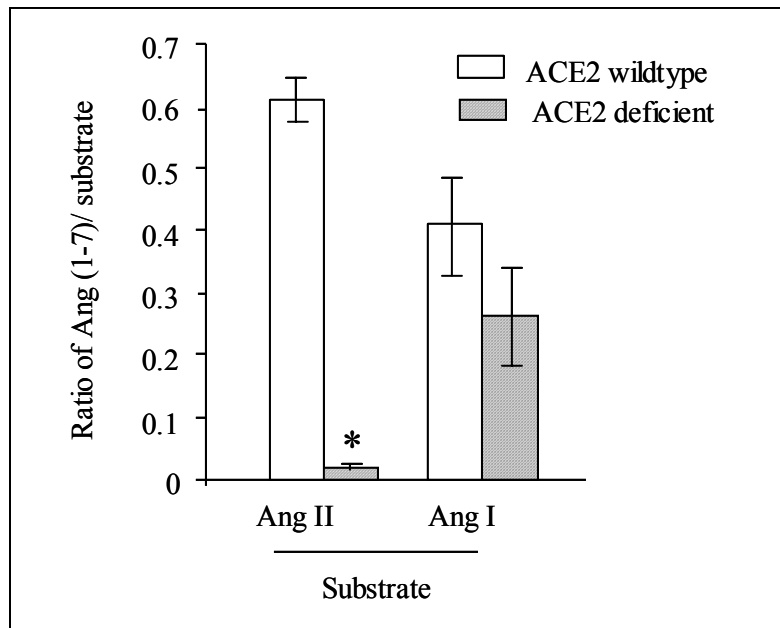


Figure 6: Kidney ACE2 activity in wildtype ACE2 and ACE2 deficient mice. Tissue extract was incubated with Ang I (10 $\mu\text{mol/L}$) or Ang II (10 $\mu\text{mol/L}$) for 2 hrs. Each reaction mixture was assayed in duplicates. Substrates and generated peptide Ang (1-7) AUC were analyzed with SELDI-TOF-MS and expressed as ratio of formed Ang (1-7) to each substrate. Values are means \pm SE. * $P < 0.01$, compared to wildtype ACE2 mice, $n=5$.

DISCUSSION

The RAS is a major target for cardiovascular drugs. Since this system is essentially a peptide enzymatic cascade, characterization of current and prospective drugs requires data on peptide targets. The traditional view that Ang II is the major product of the RAS has been questioned with the recent discovery of a novel carboxypeptidase, ACE2^{7, 8} and growing evidence for a physiological role for its peptide product, Ang (1-7)^{12, 23}. Like ACE1, the substrate affinity of ACE2 is not confined to the RAS. ACE2 efficiently cleaves apelin-13, dynorphin A (1-13) and des-Arg⁹ bradykinin^{3, 9}. However, the ability of ACE2 to inactivate the vasoconstrictor Ang II and generate the putative cardioprotective metabolite, Ang (1-7), implicates ACE2 as a potential regulator of the RAS^{3, 9, 23}. Further clarification of the role of ACE2 in disease states will be assisted by the development of sensitive and rapid methods for measurement of ACE2 activity. There is also need for miniaturized, reliable assays because of increasing use of mice as experimental models and the volume requirements of classical enzyme methods.

The introduction of two ionization techniques, electrospray ionization mass spectrometry²⁹ and matrix-assisted laser/desorption/ionization^{30, 31} in the late 1980s provided major advances in analytical techniques in biomedical research. MS is a powerful tool with the potential to replace fluorometric, radioactive and photometric monitoring of certain enzyme assays³². The method makes it possible to plot appearances and disappearance of products, reactants, and even intermediates over short reaction times^{24, 33}. It has the advantage of specificity, speed and reproducibility. We chose to develop a MS based assay system because of the ability to utilize endogenous peptides as substrates and the capacity for direct analysis of the enzymatic peptide products. New approaches for MS quantification have been developed³⁴ and include the use of relative intensity of peak height and ratio of products to substrate³⁵. We used both peak height intensity and area under the curve as parameters for quantification of substrate and enzyme products. One restriction of MALDI-TOF-MS for quantitative analysis is possible interference of the matrix with peptides in the mass range between 0 to 500 (m/z). However, this is not

applicable in the present study since the Ang peptides analyzed have mass greater than 700 m/z .

A recent modification of MS methodology is the ProteinChip technology (Ciphergen Biosystems, Inc. Fremont, CA) which facilitates protein/peptide profiling of complex biological mixtures^{25, 36}. It provides tool for determination of biomarkers of physiological/pathological states^{25, 36}. Recently we used this emerging technology for evaluation of ACE1 and renin activity in mice, using plasma sample sizes of less than 1 μ l^{24, 37, 38}. The method does not require fluorogenic substrates, radioactivity or laborious purifications steps. The objective of the present study was to determine if this technology could be extended to the measurement of ACE2 activity.

To initiate the project, we took advantage of the availability of recombinant human ACE2 in order to establish and optimize a MS-based assay for ACE2. A unique characteristic of this assay methodology is the ability to use the endogenous peptide substrates, Ang I and Ang II. Our results showed that ACE2 activity could be measured using a MS assay similar to that developed for ACE1²⁴. We demonstrated that ACE2 preferentially hydrolyses Ang II over Ang I and that the assay was specific, sensitive and showed linearity of reaction. It is difficult to directly compare this new MS-enzyme method with traditional assays which use fluorogenic substrates^{3, 9, 21, 22}. However, we measured the K_m for the ACE2 reaction and compared it with traditional methods. rACE2 was incubated with different concentrations of Ang II with measurement of peptide hydrolysis products (formation of Ang (1-7)) followed by construction of a Lineweaver-Burk plot (1/substrate vs 1/velocity). Results showed a linear reaction with a regression coefficient of 0.97 and a calculated K_m of 5 μ mol/L. This experimental K_m value for Ang II in the ACE2 reaction was similar to that reported²¹. In other studies which used natural peptides as substrates, peptide hydrolysis products were separated using reverse phase HPLC and measured with UV detection. The peaks corresponding to the peptide products were integrated to calculate product formation and compared with standard curves²¹. This type of method is time consuming and subject to problems because of the requirement of multiple steps. The MS-enzyme method described here is relatively simple, rapid (could be

completed in one hr) and does not require desalting or further purification steps. This more direct approach takes advantage of MALDI-TOF-MS which allows for real time detection of m/z . Another advantage is that the matrix is tolerant of buffers and salts, which makes MALDI-TOF-MS suited for direct analysis of complex samples such as enzymatic digests without further purification. In addition, ProteinChip[®] Arrays are preferable over other MALDI -TOF-MS methods because they allow for a simple washing step which removes unbound peptides, residual salts and detergents that are present in crude biological extracts or buffers. These substances can interfere with MS analysis and reduce assay sensitivity²⁵

Results show that the enzymatic reactions produce the predicted Ang peptides with inhibition by specific inhibitors. For example, initial studies of ACE1 revealed that incubation of Ang I with plasma resulted in the formation of Ang II with a linear relationship between substrate depletion and product formation²⁴. In the present study, ACE1 activity was measured in plasma using Ang I as a substrate with no evidence of production of Ang (1-7). There is a report of a secreted form of human ACE2 (shACE2) in culture media from transfected endothelial cells and cardiomyocytes³⁹ and in plasma of neonatal rats injected with lenti-vector encoding shACE2³⁹. We re-addressed the idea of the presence of circulating ACE2 using the new assay technology. When plasma from normal mice was incubated with Ang II, Ang (1-7) could not be detected. This suggests that there is ACE2 activity is not present in normal plasma, but does not rule out the possibility that ACE2 may be active in the circulation under pathological states.

To physiologically validate the method, we used a new genetic mouse model which lacks the ACE2 enzyme¹⁸. Renal ACE2 activity was measured in wildtype ACE2 (*Ace2*^{+/y}) and ACE2 deficient (*Ace2*^{-/y}) mice using Ang II as the substrate. There was a marked decrease in formation of Ang (1-7) in kidney extracts from ACE2 deficient mice. The results verify the assay specificity and confirm the absence of renal ACE2 activity in ACE2 deficient (*Ace2*^{-/y}) mice, consistent with the characterized model^{17 18}. Interesting results were obtained when Ang I was used as the enzyme substrate. If ACE2 is critical in the metabolism of Ang I, one would predict similar results with the Ang substrates. However, Ang (1-7) generation was not different in the knockout and wildtype strains. This is likely

explained by Ang I's reaction with other proteolytic enzymes such as the neutral endopeptidase, neprilysin (E.C. 3.4.24.11) which also generates Ang (1-7)¹³.

One of the issues of concern with the classical enzyme assays is their reliance on fluorogenic, artificial substrates. For examples, one ACE2 assay employs Mca-YVADAPK(Dnp)-OH which was originally developed to measure caspase-1 activity^{40, 41}. The current method of choice for ACE2 measurement uses the fluorogenic peptide substrates, Mca-YVADAPK(Dnp) and Mca-APK(Dnp)^{3, 9, 21, 22}. In this assay, the substrate peptide contains a fluorescent 7-methoxycoumarin group (Mca) which is quenched by energy transfer to a 2, 4-dinitrophenyl group (Dnp). It can be used to measure ACE2 activity as well as activity of other peptidases. It is based on cleavage of an amide bond between the fluorescent and quencher groups, resulting in an increase in fluorescence. However, there is no information as to whether this substrate is selective for ACE2 over ACE1. In fact, in one study, captopril (ACE1 inhibitor) was included in the ACE2 assay system³⁹ with no explanation as to its purpose³⁹. Furthermore, in a recent study using this fluorogenic substrate, there was a discrepancy between ACE2 activity and protein content (western blot and immunohistochemistry)⁴². The reason could be due to the use of polyclonal antibodies or the use of the fluorogenic substrate for measuring enzyme activity. Using the MS approach described in this paper, it is possible to determine if a given substrate can act as a substrate for more than one enzyme and determine the site(s) of proteolytic cleavage.

Use of artificial synthetic substrates can also generate conflicting data and an example is provided by the effect of NaCl on ACE1¹³ and ACE2^{3, 9} activity. When the synthetic substrate, Mca-APK (Dnp), is used there is either inhibition^{3, 9} or activation of ACE2 by NaCl^{3, 9}. However, when the natural substrate, Ang II, is used, NaCl inhibits ACE2 activity³. These studies highlight the problems with the use of artificial substrates to study enzyme activity and suggest that that observed differences in the activation of ACE1 and ACE2 cannot be directly attributed to differences in the enzymes, because other conditions, such as substrates, or ionic conditions, could affect the outcome of the study.

In conclusion, our results document the development of a novel MS-enzyme assay for monitoring tissue ACE2 activity. Results document the absence of a circulating form of ACE2, the specificity of the method and the alterations associated with specific gene deletion. SELDI-TOF-MS provides a viable alternative to existing analytical techniques with the advantage of the use of endogenous synthetic substrates and the ability to directly measure enzymatic peptide products. The method may be useful as a tool for monitoring disease states, a screening mechanism for drug development and a prototype for other MS-enzyme assays. The method provides a rapid, sensitive and reproducible alternative to existing analytical techniques for detection for RAS enzymatic activities.

PERSPECTIVE

The focus in the present study was on the development of a MS based enzyme assay for ACE2 using endogenous peptide substrates. Evaluation of enzyme activity by SELDI-TOF-MS is specific where substrates and products are unambiguously identified by their mass to charge ratio (m/z) and quantified as peptide peak intensity or AUC. The technology has been successfully used to monitor rACE2 and kidney ACE2 activity and calculated kinetic parameters were shown to parallel those obtained by conventional techniques. Mass spectrometric data give more confidence about the identity of the reaction products than other enzyme assays and therefore avoids false positive results. The short time, small sample size and minimal handling requirements along with potential for high throughput represent further significant advantage in the application of the method in drug development of potential ACE2 inhibitors. The method could also be applied to studies of the functional role of ACE2 and screening for circulating ACE2 under pathological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by R01 NIH-HL69319 (MM), the NHLBI Diversity Research Award (KME) and WSU Seed Grant (KME). The authors thank Dr. Natalie Dales for providing MLN-4760 and Dr. Fernanda Klein and Dr. Maria Claudia Irigoyen for support. TSC was supported by a Brazilian graduate fellowship from CAPES/PDEE.

REFERENCE LIST*

- (1) de GM, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-472.
- (2) Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977;57:313-370.
- (3) Guy JL, Jackson RM, Acharya KR, Sturrock ED, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): comparative modeling of the active site, specificity requirements, and chloride dependence. *Biochemistry* 2003;42:13185-13192.
- (4) Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;79:1-6.
- (5) Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:838-846.
- (6) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-2556.
- (7) Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000;275:33238-33243.
- (8) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87:E1-E9.
- (9) Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:14838-14843.
- (10) Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* 1997;30:535-541.
- (11) Ferrario CM, Martell N, Yunis C, Flack JM, Chappell MC, Brosnihan KB, Dean RH, Fernandez A, Novikoy SV, Pinillas C, Luque M. Characterization of

*Apresentada de acordo com as exigências do periódico *Hypertension*.

- angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. *Am J Hypertens* 1998;11:137-146.
- (12) Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in the Biochemical and Functional Roles of Angiotensin Converting Enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) in the Regulation of Cardiovascular Function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005.
 - (13) Welches WR, Brosnihan KB, Ferrario CM. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neprilysin. *Life Science* 1993;52:1461-1480.
 - (14) Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis GJ, van GH. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631-637.
 - (15) Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, Krege JH, Meneton P, Marre M, Smithies O, Alhenc-Gelas F. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13330-13334.
 - (16) Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension* 2004;43:970-976.
 - (17) Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveiras-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417:822-828.
 - (18) Gurley SB, Allred A, Le TH, Mao L, Donoghue M, Breitbart RE, Acton S, Rockman HA, Coffman TM. Altered Blood Pressure Response and Normal Cardiac Phenotype in ACE2-Deficient Mice. *Hypertension* 2004;44:19 Abstract
 - (19) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426:450-454.
 - (20) Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8258-8263.
 - (21) Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 2004;383:45-51.
 - (22) Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernandez Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, Ostrov DA. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. *Hypertension* 2004;44:903-906.
 - (23) Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Diz DI, Gallagher PE. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and

- angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* 2005;111:2605-2610.
- (24) Elased KM, Cool DR, Morris M. Novel mass spectrometric methods for evaluation of plasma angiotensin converting enzyme 1 and renin activity. *Hypertension* 2005;46:953-959.
 - (25) Caputo E, Moharram R, Martin BM. Methods for on-chip protein analysis. *Anal Biochem* 2003;321:116-124.
 - (26) Cool DR, Hardiman A. C-terminal sequencing of peptide hormones using carboxypeptidase Y and SELDI-TOF mass spectrometry. *Biotechniques* 2004;36:32-34.
 - (27) Schluter H, Jankowski J, Rykl J, Thiemann J, Belgardt S, Zidek W, Wittmann B, Pohl T. Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Anal Bioanal Chem* 2003;377:1102-1107.
 - (28) Dales NA, Gould AE, Brown JA, Calderwood EF, Guan B, Minor CA, Gavin JM, Hales P, Kaushik VK, Stewart M, Tummino PJ, Vickers CS, Ocain TD, Patane MA. Substrate-based design of the first class of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) inhibitors. *J Am Chem Soc* 2002;124:11852-11853.
 - (29) Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 1985;57:675-679.
 - (30) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-2301.
 - (31) Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;42:3860-3870.
 - (32) Kang MJ, Tholey A, Heinzle E. Application of automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the measurement of enzyme activities. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15:1327-1333.
 - (33) Hsieh FY, Tong X, Wachs T, Ganem B, Henion J. Kinetic monitoring of enzymatic reactions in real time by quantitative high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995;229:20-25.
 - (34) Venable JD, Yates JR, III. Impact of ion trap tandem mass spectra variability on the identification of peptides. *Anal Chem* 2004;76:2928-2937.
 - (35) Kang MJ, Tholey A, Heinzle E. Quantitation of low molecular mass substrates and products of enzyme catalyzed reactions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:1972-1978.
 - (36) Fung ET, Thulasiraman V, Weinberger SR, Dalmaso EA. Protein biochips for differential profiling. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:65-69.
 - (37) Elased KM, Morris M. A New Assay for Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Renin Using Endogenous Substrates and SELDI-TOF-Mass Spectrometry. *FASEB J*.2005; 19:113A. Abstract.
 - (38) Elased KM, Cunha TS, Gurley SB, Coffman TM, Morris M. A Novel Assay for Measurement of Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Activity. *Circulation*. 2005;112: 795 Abstract.

- (39) Huentelman MJ, Zubcevic J, Katovich MJ, Raizada MK. Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regul Pept* 2004;122:61-67.
- (40) Kawahara A, Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Fas-induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins. *Genes Cells* 1998;3:297-306.
- (41) Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-726.
- (42) Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* 2005;26:1270-1277.

CAPÍTULO 4

Elased KM, Cunha TS, Marcondes FK, Morris M. Predominant role of angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) in mouse brain. The Journal of Biological Chemistry – submetido em 22.03.2007.

Neste capítulo, apresentaremos os dados referentes à aplicação do SELDI-TOF-MS no estudo do papel da ECA1, ECA2 e NEP cerebrais sobre a metabolização das angiotensinas.

O comprovante de submissão eletrônica do artigo encontra-se na página 77.

Impresso do comprovante de submissão referente ao artigo intitulado:
“Predominant role of angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) in mouse brain”.



Corresponding author: Mariana Morris, Ph.D.
Wright State University – Dayton OH

In the table below are listed all your electronic submissions that are currently on file, along with their statuses. For submissions where a PDF file is currently available, you can click the title to view the paper. If you need to proofread a converted PDF, please use the link provided.

Note: Only electronic submissions are listed here, and older submissions may have been archived and removed from the list.

Date submitted	MS #	Title	Status
22 Mar 2007	M6:10866	Predominant role of angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) in mouse brain	Processed and cleared for review*

***Processed and cleared for review:** Once a submission is in the review process, its status will not be updated again here. **Please contact the Associate Editor responsible for your paper if you need to check on its status.**

NOTE: You must have Adobe Acrobat Reader installed to view PDF files. If you do not have it installed, you can download it for free from [Adobe](#)

Predominant Role of Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2) in Mouse Brain

Khalid M. Elased^{1,3}, Tatiana Sousa Cunha^{2,3}, Fernanda Klein Marcondes² and Mariana Morris¹

¹Wright State University, Boonshoft School of Medicine, 3640 Colonel Glenn Highway Dayton, OH, U.S.A. 45435; ² State University of Campinas, Faculty of Dentistry of Piracicaba, Piracicaba, SP, Brazil; ³ = contributed equally to paper

Running Title: Angiotensin metabolism in brain.

Address Correspondence to:

Mariana Morris,
Dept Pharmacology & Toxicology
Boonshoft School of Medicine
Wright State University
3640 Colonel Glenn Highway
Dayton, OH 45435
Tel: 937 775 2463

Email: mariana.morris@wright.edu

SUMMARY

Angiotensin (Ang) converting enzyme 2 (ACE2) is a newly discovered metalloprotease enzyme which metabolizes Ang II to the vasodilator peptide, Ang (1-7). Neprilysin (NEP) is another enzyme involved in generation of Ang (1-7) from Ang I. Experiments were performed to study the functionality of ACE2 in brain using novel mass spectrometric (MS) proteolytic assays. We compared ACE1 and ACE2 activity in brain, plasma and kidney from C57BL/6 and NEP gene deletion mice (NEP -/-) and their littermate controls (NEP +/-). Plasma or tissue extracts were incubated with either Ang I or Ang II (1296 or 1045

m/z, respectively) and generated peptides were monitored and detected using SELDI-TOF-MS. ACE2 activity, measured as the generation of Ang (1-7) from Ang II, was detected in kidney and brain, but not plasma. Brain ACE2 activity was highest in hypothalamus as compared to other brain regions. ACE2 activity was inhibited by the specific ACE2 inhibitor, DX600 (10 μ M, 99% inhibition), but not by the ACE1 inhibitor, captopril (10 μ M). Both MS and conventional colorimetric assays showed high ACE1 activity in plasma and kidney with low to undetectable levels in brain. In hypothalamic extracts from NEP^{-/-} mice, generation of Ang (1-7) from Ang I was significantly decreased, suggesting a role for NEP in Ang metabolism. With Ang II as the substrate, there was no difference between NEP^{-/-} and wild type controls, indicating that other enzymes, apart from NEP, contribute to generation of brain Ang (1-7). Results show: 1) evidence for a predominance of ACE2 over ACE1 activity in brain; 2) lack of detectable ACE2 activity in plasma; 3) evidence for a predominant role of NEP in metabolism of Ang I in hypothalamus and 4) utility of MS for studying ACE1/ACE2 and neprilysin enzyme activity using natural Ang peptide substrates.

Key Words: angiotensin (1-7), angiotensin II, ACE1, ACE2, neprilysin, renin angiotensin system, angiotensin metabolism

INTRODUCTION

The importance of the systemic renin-angiotensin system (RAS) and the pivotal role of angiotensin II (Ang II) in the pathogenesis of hypertension and other cardiovascular diseases is widely acknowledged (1;2). However, the traditional view that Ang II is the key product of the RAS has been questioned with discovery of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) (3;4), as well as growing evidence for a physiological role for Ang (1-7) (5-7).

ACE2 catalyses the conversion Ang II to Ang (1-7) (4;8;9). Ang (1-7) is a peptide with vasodilator and anti-proliferative properties which has gained attention because of cumulative evidence showing that it antagonizes many of the cardiovascular actions of Ang II (10). Apart from ACE2, Ang (1-7) can be generated directly via cleavage of the Pro⁷-

Pro⁸ bond in the C-terminal domain of Ang I (11), by at least three enzymes, which include neprilysin (EC 3.4.24.11), prolyl-endopeptidase (EC 3.4.21.26) and thimet endopeptidase (EC 3.4.24.15) (12-14). With less efficiency, ACE2 also converts Ang I to Ang (1-9) (3;9), a peptide whose physiological effects are not fully understood. Besides its physiological role as a peptidase, ACE2 has been demonstrated to be a functional receptor for the coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS) (15;16).

In addition to the systemic RAS, there is evidence for a local RAS system in a variety of tissues, such as pancreas, heart, liver, lungs, adipose tissue and brain (reviews) (17-19). Using molecular biological, biochemical, immunochemical and genetic approaches, results have shown that the peptide precursor and enzymes required for the formation and degradation of the biologically active forms of Ang, as well as Ang receptors, are present in brain (20-22). However, despite the multitude of studies on the brain RAS, there is little information on regulation of enzymatic activity. The focus has instead been on localization of enzymes, peptides and receptors and their mRNAs (20;23-25). There is evidence for ACE1 activity in areas lacking a blood brain barrier, for example, the subfornical organ and pineal gland (26;27). Even so, levels are extremely low with activity expressed as pmole/mg protein.

Similar to ACE1, ACE2 is present in a wide variety of cells and tissues with high concentrations in cardio-renal tissues but limited expression in the central nervous system (CNS) (28;29). Gallagher et al. (5) reported that Ang II down regulates ACE2 mRNA in astrocytic cultures, resulting in lower levels of Ang (1-7). However, activity of Ang (1-7) generating enzymes was not measured in this study and there is evidence for a dissociation between gene expression and enzyme activity for components of the RAS (28).

There is much information to show that the brain RAS is critical in regulation of blood pressure, water balance and endocrine secretion (30;31). Nevertheless, there are questions as to exact means by which the central RAS functions, particularly as to the relationship between ACE1 and ACE2 in the regulation of brain Ang peptide metabolism. To close this knowledge gap, we developed a program to examine the regulation of ACE1 and ACE2 activity in brain. We took advantage of newly developed mass spectrometric

(MS) methods for measuring Ang proteolytic processing (32;33). The methods are sensitive and specific and offer advantages over traditional assays since they provide data on peptide precursors and precise proteolytic products (32;33). The goal was to study Ang peptide metabolism in the central nervous system (CNS) in order to determine the functional importance of ACE2.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents-Ang I (1296.7, *m/z*) and Ang II (1046.3, *m/z*) were obtained from Bachem Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA, USA). Bestatin was obtained from ALPCO Diagnostics (Windham, NH, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL, USA). Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), α -hydroxy-4-cinnamic acid (CHACA), captopril and EDTA were purchased from Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). ACE2 inhibitor DX600 was purchased from Phoenix Pharmaceuticals, Inc (Belmont, CA, USA). SELDI-TOF-MS ProteinChip[®] and the calibration standards were purchased from Ciphergen Biosystems, Inc (Fremont, CA, USA). Organic solvents were HPLC grade.

Animals - C57BL/6 male mice were purchased from Harlan, Inc. (Indianapolis, IN). Tissues from NEP gene deletion mice (NEP $-/-$) and their littermate controls (NEP $+/+$) were obtained from Dr. Bao Lu (Harvard Medical School, Boston, MA) (34). Animals were housed at 22°C under a 12-hr light/12-hr dark cycle with *ad libitum* access to water and standard mouse chow. All experimental protocols were approved by the WSU Animal Care and Use Committee.

Tissue and plasma samples - Mice were decapitated and trunk blood was collected in ice-chilled heparinized tubes. Plasma was immediately separated and stored frozen at -80°C. Brain and kidney were quickly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Kidney, hypothalamus, cortex, brainstem, pituitary and hippocampus were carefully dissected and homogenized on ice in 1:9 (w/v) of Tris HCl (50 mM, pH 7.4) containing 2 mM PMSF. The homogenate was centrifuged at 9,000 x g for 10 min to remove cellular

debris. Total protein content was determined in the supernatant using the Bradford protein assay with BSA as a standard (BioRad Protein Assay Reagent, BioRad Labs, Hercules, CA).

SELDI-TOF-MS ACE1 and ACE2 Assays – ACE1 and ACE2 activities were measured in plasma and tissue extracts, as previously described (32;33). Tissue extracts (1-2 μg protein) or plasma (0.5 μL) were added to 50 μL MES buffer (50 mM, pH 6.5), containing PMSF (2 mM) and bestatin (20 μM). Samples were spiked with 5 μM of Ang I or Ang II and incubated at 37°C. After incubation, the reaction mixture (1 μL , 40-80 ng protein) was spotted onto weak cation exchange (WCX2) ProteinChip[®], and enzymatic reactions were terminated by addition of 1 μL of freshly prepared saturated matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile (v/v), containing 0.1% TFA). Generated peptides, Ang II and Ang (1-7), were directly read in a ProteinChip[®] reader system, PBS II (Ciphergen Biosystems). MS analysis was performed with proprietary software (version 3.1, Ciphergen Biosystems), which integrates area under the peak. Ionized peptides were detected and their molecular masses determined according to time of flight (TOF).

Colorimetric ACE1 Assay – ACE1 activity was also measured with a colorimetric assay (ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA), using the synthetic substrate, N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine, in the presence and absence of the ACE1 inhibitor, captopril (10 μM). Briefly, tissue extracts (320 μg protein) or plasma (40 μL) were incubated with substrate and released hippuric acid was colorimetrically measured at 382 nm. Results were expressed as ACE1 units, defined as the amount of enzyme required to release 1 μM of hippuric acid/min/l of tissue extract or plasma. Samples were measured in duplicate.

Statistics - Values of peptide spectra relative intensity or AUC were expressed as means \pm SEM. Student's t-test was used for comparison between groups. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

ACE2 activity - The first goal was to determine whether ACE2 activity is present in brain from normal mice. An example of a typical SELDI-TOF-MS peptide chromatographic profile for an ACE2 assay in plasma (1A), renal (1B) and hypothalamic (1C) tissue is shown in Figure 1. The two MS peaks observed in Figures 1B and 1C are the assay substrate Ang II (5 μ M, 1045, *m/z*) and the peptide product, Ang (1-7) (899, *m/z*), providing evidence for ACE2 like activity in kidney and brain with no detectable activity in plasma. Incubation of Ang II with heat inactivated brain tissue failed to generate Ang (1-7) (data not shown).

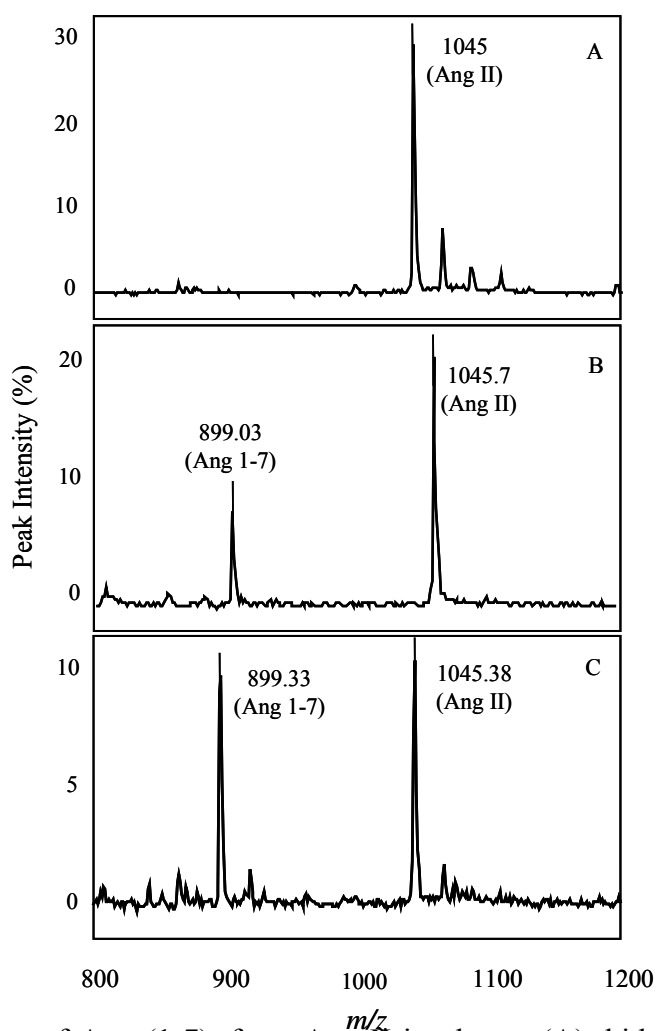


Figure 1: Generation of Ang (1-7), from Ang II in plasma (A), kidney (B) and brain (C) from C57BL/6 mice. Plasma (0.5 μ L), kidney or hypothalamic extract (1 μ g total protein) was incubated with 25 μ L MES buffer, containing Ang II (5 μ mol/L), PMSF (2 mM), bestatin (20 μ M) and ZPP (10 μ M), for 2 hours at 37°C. Substrate and generated peptides

were monitored in 1 μ L reaction mixture using SELDI-TOF-MS and expressed as peak % intensity. The conditions are the following: A: Ang II + plasma; B: Ang II + Kidney; C: Ang II + Brain.

Based on this finding, we screened for ACE2 activity in specific brain areas (Table 1). ACE2 activity levels were highest in hypothalamus (1.35 ± 0.22) followed by cortex (0.69 ± 0.05), hippocampus (0.53 ± 0.18), pituitary (0.27 ± 0.16) and brainstem (0.06 ± 0.02).

Table 1: Measurement of ACE2 activity in hypothalamus, cortex, hippocampus, pituitary and brainstem from C57BL/6 mice, using SELDI-TOF-MS. Ang II ($5 \mu\text{mol/L}$) was incubated with tissue extract ($1 \mu\text{g}$ total protein) for 2 hours. Buffer and protease cocktail mixture is described in figure 1. Ang II and generated Ang1-7 were monitored in 1 μ L reaction mixture using SELDI-TOF-MS. ACE2 activity was expressed as ratio between Ang (1-7)/Ang II. Values are mean \pm SE. (n=5).

Brain region	Ratio Ang (1-7) / Ang II
Hypothalamus	1.35 ± 0.22
Cortex	0.69 ± 0.05
Hippocampus	0.53 ± 0.18
Pituitary	0.27 ± 0.16
Brainstem	0.06 ± 0.02

The linearity of the SELDI-TOF-MS ACE2 assay is shown in Figure 2 in which varying protein concentrations of hypothalamic extract (20 to 80 ng) were used. The substrate (Ang II) and product (Ang 1-7) were measured and activity expressed as the ratio between Ang (1-7)/Ang II. There was a linear relationship between hypothalamic protein and ACE2 activity ($R^2 = 0.92$).

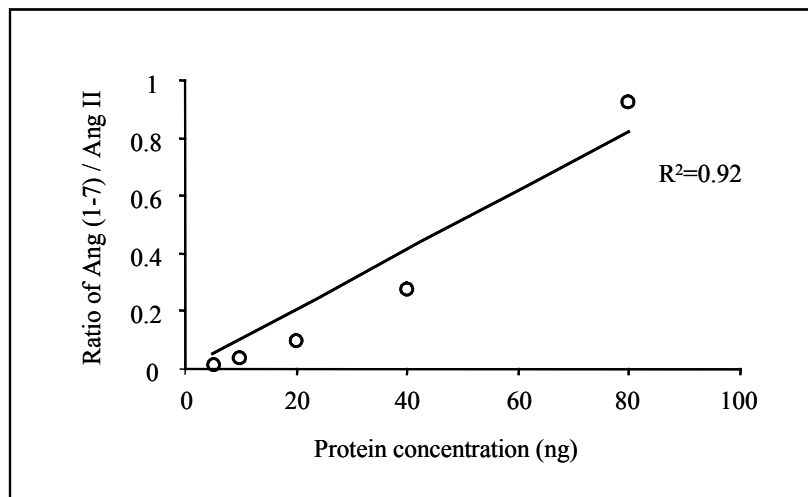


Figure 2: Relationship between protein concentration and Ang (1-7) formation. Ang II (5 $\mu\text{mol/L}$) in 25 μL MES buffer was mixed with variable concentrations of hypothalamic extract (0.25-2.0 μg total protein) from C57BL/6 mice and incubated for 2 hours at 37°C. Ang II and generated Ang1-7 were monitored in 1 μL reaction mixture using SELDI-TOF-MS. ACE2 activity was expressed as ratio between Ang (1-7)/Ang II.

To evaluate specificity of the brain ACE2 assay, we determined the effect of the specific ACE2 inhibitor, DX600 (35) and the metallic chelator, EDTA. Figure 3 shows the dose related inhibitory effect of DX600 on hypothalamic ACE2 activity. Ang II (5 μM) in 25 μL MES buffer was incubated with hypothalamic extract (40ng/ μL total protein) in the absence and presence of DX600 (1 and 10 μM) (Figure 3B-3D). The low dose (1 μM) inhibited hypothalamic ACE2 activity by 92% (Figure 3C) and the higher dose (10 μM) produced more than 99% inhibition (Figure 3D). EDTA (10 mM) completely blocked the reaction, while captopril had no effect on ACE2 activity (data not shown). The generation of Ang (1-7) was not inhibited Z-PP, selective inhibitor of prolyl-endopeptidase. Results document the specificity of the reaction, indicating that the peptide cleavage was not produced by nonspecific degradation of Ang II, but rather via the zinc metalloprotease, ACE2 (3;4).

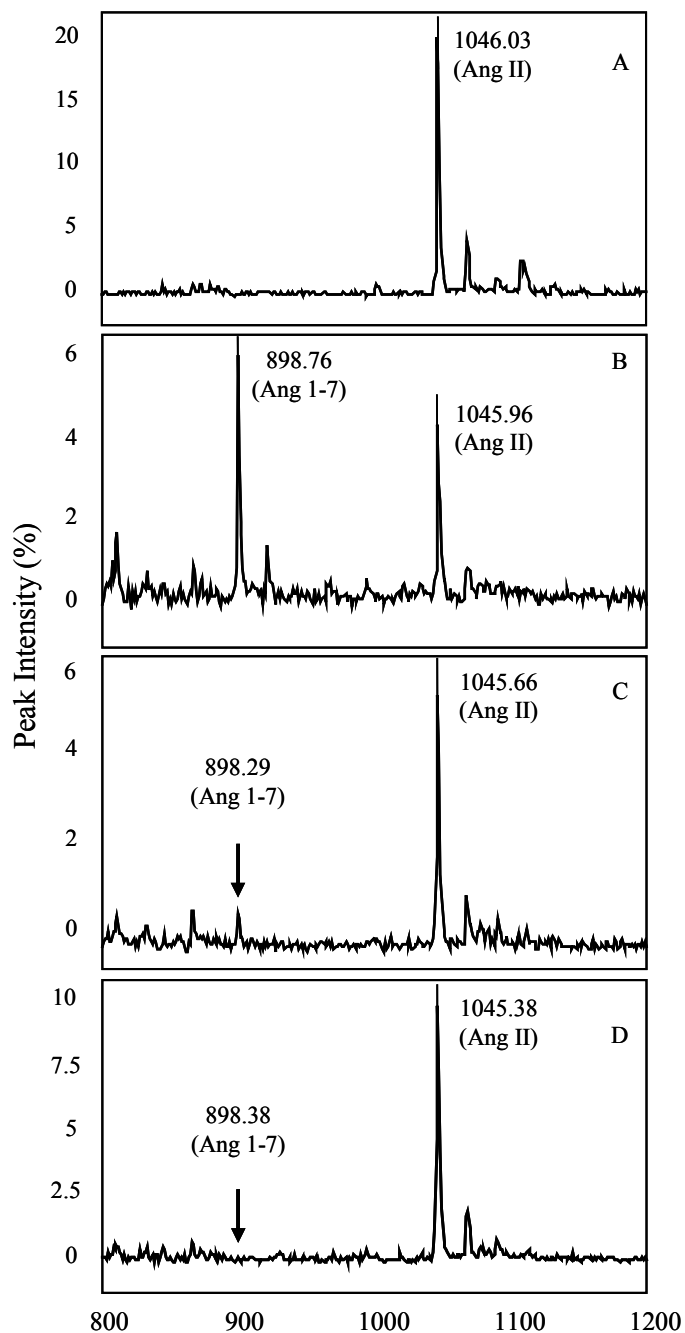


Figure 3: Inhibition of hypothalamic ACE2 activity with a selective ACE2 inhibitor, DX600. Ang II (5 μ M) was incubated with hypothalamic extract (1 μ g total protein) from C57BL/6 mice for 2 hours in the absence and presence of variable concentrations of DX600. Substrate and generated Ang (1-7) were monitored in 1 μ L reaction mixture using SELDI-TOF-MS and expressed as peak % intensity. The conditions are the following: A: control Ang II; B: Ang II + Hypothalamus; C: Ang II + Hypothalamus + DX600 (1 μ M); D: Ang II + Hypothalamus + DX600 (10 μ M).

Ang I as a peptide substrate in plasma and brain - Plasma and hypothalamic extract from C57BL/6 mice were incubated with Ang I (5 μ M). Figure 4 represents a typical chromatograph for sequential processing of Ang peptides. Figure 4A shows the MS peak for the Ang I substrate in the absence of added plasma or hypothalamic extract. As expected in the presence of plasma, Ang I (1294.64, m/z) was processed by ACE1 to yield Ang II (1044.42, m/z) (Figure 4B). In addition there was no evidence for production of Ang 1-7 (Figure 4B). A different peptide profile was observed when Ang I (1294.8, m/z) was incubated with hypothalamic extract (Figure 4C). Ang II (1044.7, m/z) was almost undetectable, suggesting that ACE1 activity is low in brain. Moreover, the chromatograph showed that in hypothalamus Ang (1-7) is the primary Ang peptide product generated when Ang I is the substrate, indicating ACE2 activity (Figure 4C). The absence of detectable Ang (1-9) (1183, m/z) suggests that Ang I is not a good substrate for ACE2, as previously demonstrated with recombinant human ACE2 (33).

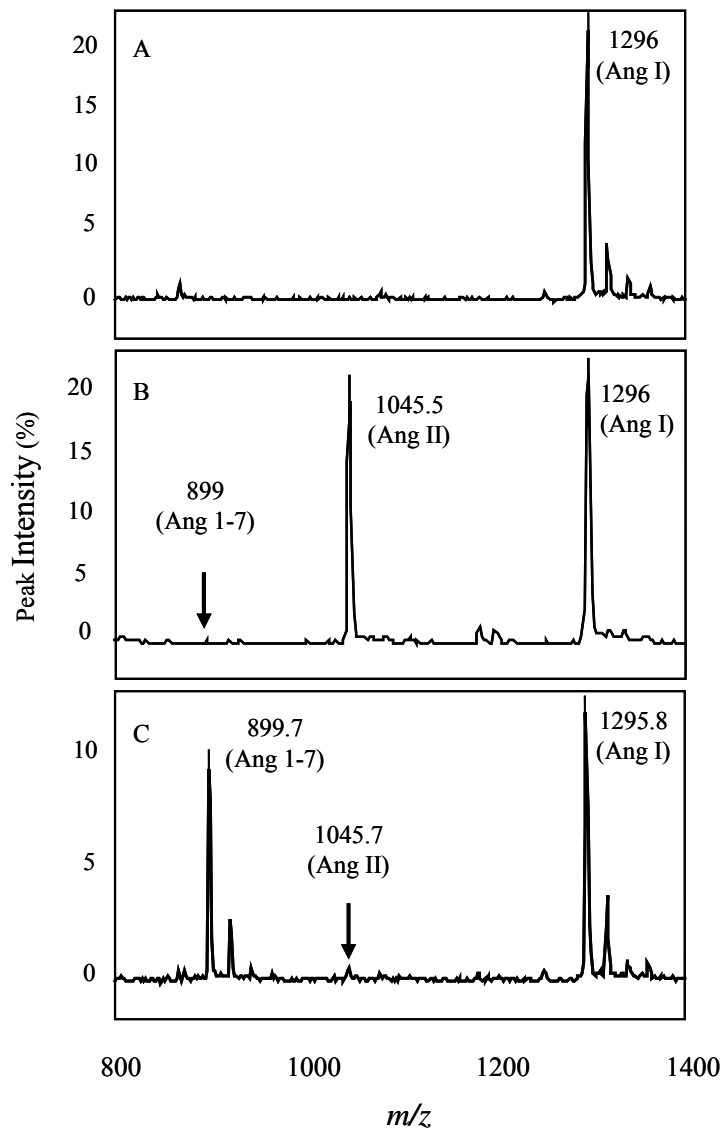


Figure 4: Enzymatic processing of Ang I and Ang II. Plasma (0.5 μ L) and hypothalamus extract (1 μ g total protein) from C57BL/6 mice were incubated with Ang I (5 μ M) for 2 hours. SELDI-TOF-MS analysis of substrate and generated Ang (1-7) was monitored in 1 μ L reaction mixture and expressed as peak % intensity. The conditions are the following: A: control Ang I; B: Ang I + Plasma; C: Ang I + Hypothalamus.

ACE2 activity in neprilysin deficient mice - In order to determine whether other Ang (1-7) generating enzymes affect ACE2 activity, NEP (-/-) mice were tested. Since conversion of Ang I to Ang (1-7) was not inhibited by DX600, the idea emerged that NEP might take part in Ang metabolism. Indeed, data suggests that NEP is one of the enzymes involved in generation of Ang (1-7) (12;36). We took advantage of the availability of NEP deficient mice (NEP -/-) to analyze the contribution of this enzyme in the generation of Ang (1-7) in brain. Figure 5 compares Ang (1-7) generation in hypothalamic extracts from NEP -/- and wild type NEP +/+ mice using Ang II or Ang I as the substrate. For quantitative evaluation, the ratio of peptide peaks (Ang 1-7/Ang II) and (Ang 1-7/Ang I) was used as the experimental index. When Ang II was used as the substrate, there was no difference in the ratio of Ang 1-7/Ang II between the groups. However, as expected there was marked decrease in the ratio of Ang 1-7/Ang II in NEP -/- mice compared to NEP +/+ ($p < 0.05$, Figure 5). Taken together, these results indicate that neprilysin plays a role in generation of Ang (1-7) in mouse brain, depending on the available substrate.

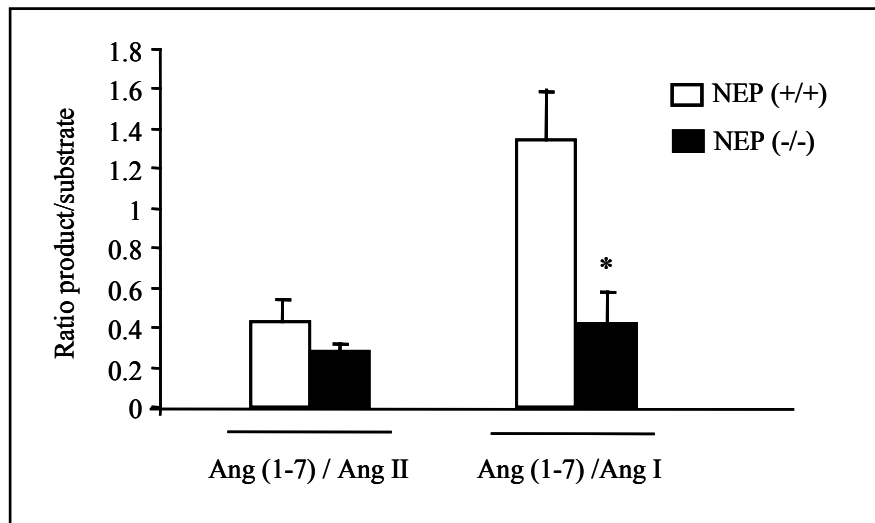


Figure 5: Role of neprilysin in the generation of Ang (1-7) from Ang I and Ang II, in hypothalamus extract from NEP^{-/-} and wild type NEP^{+/+} mice. Tissue extract was incubated with Ang I (5 μ M) or Ang II (5 μ M) for 2 hours at 37°C. Each reaction mixture was assayed in duplicates. Substrates and generated peptide Ang (1-7) peak were analyzed in 1 μ L reaction mixture using SELDI-TOF-MS and expressed as ratio of formed Ang (1-7) to each substrate. Values are mean \pm SE. * $P < 0.05$ vs wild type NEP^{+/+} mice (n=5).

Brain ACE1 activity measured using SELDI-TOF-MS and colorimetric assays - As mentioned previously, using the SELDI-TOF-MS assay, there was little evidence for the formation of Ang II from Ang I in hypothalamic extracts. This suggests that ACE1 activity in mouse brain is low to undetectable. To confirm these results, we compared ACE1 activity in plasma, kidney and hypothalamus using SELDI-TOF-MS (32;33) and the classic colorimetric ACE1 assay (37). Plasma (0.5 μ L) and kidney or hypothalamic extracts (1 μ g protein) were incubated with Ang I (5 μ M). Ang I and generated Ang II and the ratio were quantified using SELDI-TOF-MS. As shown in Figure 6A, hypothalamic ACE1 activity was almost undetectable as compared to kidney and plasma ($p < 0.001$). Captopril (10 μ M) inhibited the generation of Ang II in all samples (Figure 6A, $p < 0.05$), indicating that this peptide was generated by the action of ACE1. The experiment was repeated using the conventional colorimetric assay. Plasma (20 μ l), kidney or hypothalamic extract (160 μ g protein) were incubated with the synthetic substrate, N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine. The released hippuric acid was colorimetrically quantified and results expressed as ACE units. Figure 6B shows that ACE1 activity in hypothalamus was below the detection limit of the assay and was not significantly altered by captopril (10 μ M). As expected, ACE1 activity was detected in kidney extracts and plasma and was significantly inhibited by captopril (10 μ M) ($p < 0.001$, Figure 6B). The protein concentrations required for the colorimetric assay were much greater (more than a 150 fold) than that needed for the MS assay, further verifying the utility of the new method.

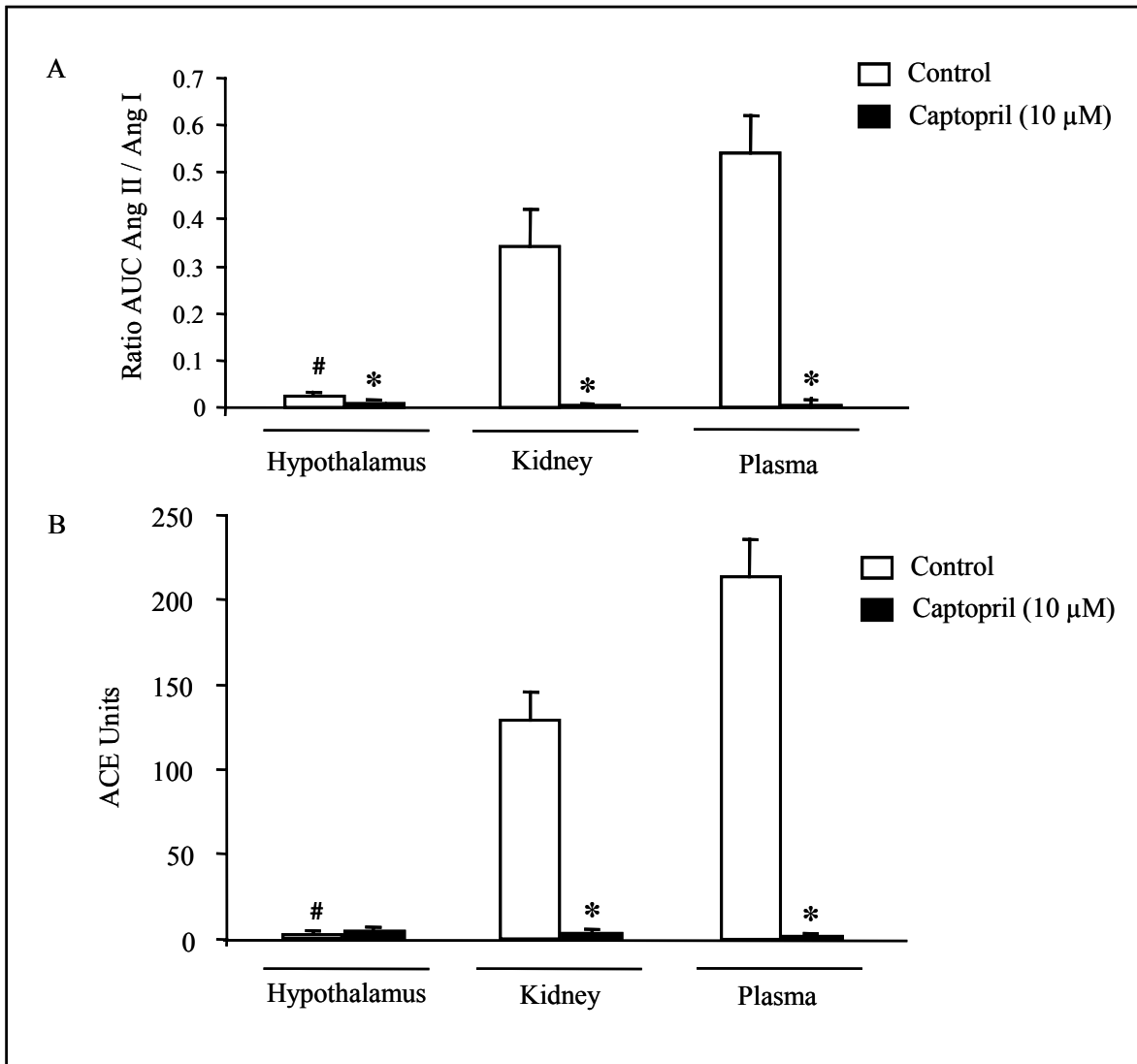


Figure 6: Comparison of brain ACE1 activity using SELDI-TOF-MS and colorimetric assay. (A) SELDI-TOF-MS: Plasma (0.5μL), kidney or hypothalamic extract (1 μg total protein) from C57BL/6 mice were incubated with Ang I (5 μM) for 2 hours, in the absence and presence of captopril (10 μM). Substrate and generated Ang II AUC were monitored and expressed as ratio of Ang II / Ang I. Values are mean ± SE. #P<0.001 vs control kidney and control plasma; *P<0.001 vs control (n=5). (B) Colorimetric assay: Plasma (20 μL), kidney or hypothalamic extract (160 μg total protein) from C57BL/6 mice were incubated in the presence of the synthetic substrate N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine. The released hippuric acid was colorimetrically quantified, and results expressed as ACE units. Values are mean ± SE. #P<0.001 vs control kidney and control plasma; *P<0.001 vs control (n=5).

DISCUSSION

The RAS is an attractive target for medications designed for management of cardiovascular dysfunction. Since this system is essentially a complex of bioactive peptides with a regulatory enzymatic cascade, characterization of current and prospective drugs requires data on peptide processing and a sensitive assay of the regulatory enzymes. There is much clinical interest in measurement of renin and ACE activity as biomarkers for disease states, such as, hypertension, diabetes, heart failure and renal dysfunction. The traditional view that Ang II is the key product of the RAS has been challenged with the recent discovery of a new carboxypeptidase, ACE2, and growing evidence for a physiological role of its peptide product, Ang (1-7) (38). Like ACE1, the substrate affinity of ACE2 is not confined to the RAS, for example it also efficiently degrades des-Arg⁹ bradykinin (8;9). However, it is the ability of ACE2 to inactivate the vasoconstrictor, Ang II, and generate the putative cardioprotective metabolite, Ang (1-7), that implicates ACE2 as an important participant in cardiovascular homeostasis (8;9;38).

Recently we used SELDI-TOF-MS to develop sensitive and specific assays for ACE1, ACE2 and renin activities in tissue and plasma (33;39). The proteolytic Ang peptide products are identified by *m/z* and quantified by peak intensity and AUC. Results show that the enzymatic reactions produce the predicted Ang peptides with inhibition by specific inhibitors. For example, Ang I incubation with plasma resulted in the formation of Ang II with a linear relationship between substrate depletion and product formation. There was also a correlation between incubation time and product formation. In the present study we exploited the sensitivity and selectivity of SELDI-TOF-MS to screen for localized ACE1 and ACE2 and other possible enzymes such as NEP which generate Ang (1-7) from Ang I and Ang II in brain. The assay system allows for relative comparison of multiple proteolytic enzymes contributing to Ang peptide processing in brain. Plasma and kidney were used as known sources for ACE1 and ACE2, respectively, and provided data to compare with brain. The goal was to address the ability of brain tissue to metabolize Ang I and Ang II and to directly evaluate the contributions of ACE1/ACE2 activity. Proteolytic

enzyme activities were measured directly rather than using other indices of the RAS such as receptor binding or mRNA levels.

The current, widely used method for measurement of ACE2 activity employs synthetic, fluorogenic peptide substrates (9;40-42). The substrate peptide contains a fluorescent 7-methoxycoumarin group which is quenched by energy transfer to a 2, 4-dinitrophenyl group. For example the fluorogenic peptide substrate, Mca-Y-V-A-D-A-P-K (Dnp)-OH is used to measure activity of ACE2 or any other peptidase that is capable of cleaving an amide bond between the fluorescent group and the quencher group. Examples of other enzymes that would be active in this assay are ACE1 (43), caspase -1 and interleukin converting enzyme (44). More recent studies have employed a different fluorogenic substrate, Mca-A-P-K (Dnp)-OH, which is more specific for ACE2 (8;9;45). It is also possible to use radioactive Ang peptides (¹²⁵I-Ang I and ¹²⁵I-Ang II) for the study of Ang metabolism and as a screen for ACE2 activity in kidney (46;47) and heart (38). While this approach is reliable and accurate, it is time consuming and requires the use of radioactivity and chromatographic separation of substrate and peptide products. The advantage of the new MS-based method is the ability to utilize endogenous peptide substrates for ACE1 and ACE2 without the need of synthetic, artificial fluorogenic or radioactive substrates.

There is a considerable data to support the presence and a physiological role for brain Ang (1-7) (36), which binds to a non-Ang I/Ang II type receptor originally identified as the Mas oncogene(48). However, the role of brain ACE2 in the generation of this peptide is not well understood. The original study described ACE2 in heart, kidney and testis, but failed to demonstrate its presence in brain (3). Subsequent studies using QRT-PCR (29) and immunohistochemistry (49) revealed that ACE2 is localized in brain and astrocytes (5). However, in this emerging field there are few studies which address the activity of ACE2 in brain. Thus, our first goal was to determine whether ACE2 is active in mouse brain and to evaluate whether it is genetically regulated.

Results demonstrate significant levels of ACE2 activity in brain as seen by marked conversion of Ang II to Ang (1-7) in brain extracts. Other supportive data show that

reaction was inhibited by DX 600, but not by captopril. Present data also show differential activity for ACE2 in brain regions with highest activity in hypothalamus. This is consistent with an early study (50) which showed robust immunochemical staining for Ang (1-7) in the hypothalamus. Furthermore, the substrate of preference was Ang II with little interaction with Ang I. It is interesting to note that there was no evidence for ACE1 activity in brain even though it was easily detected in kidney and plasma. This was seen using either the MS proteolytic or the conventional colorimetric assay. Indeed, most other investigations have relied on the use of immunochemical methods (51) or receptor binding assays (51-53) to support the idea of an active brain ACE1 system. A recent study reports that brain ACE1 activity is low, in agreement with our findings. ACE1 activity was measured in serum and brain of perindopril-treated mice (54). The study showed more than 90 % inhibition of serum ACE1 with only a slight inhibition of brain ACE1 even though perindopril is brain permeable (54). Low brain ACE1 activity noticed under normal conditions does not rule out that activity could be enhanced during pathophysiological situations. Our present enzyme activity data agrees with early autoradiographic binding studies which revealed low levels of ACE1 throughout the mouse hypothalamus (55)

An important conclusion of our study is that brain ACE2 is predominant over ACE1 under normal physiological situations. This is an unexpected finding since Ang II and its receptors are present and active in the brain, review (56). Injection of Ang II peripherally or centrally activates brain systems, with effects blocked by Ang AT1 blockers (57). However, this does not provide information on the endogenous state. It would be interesting to determine whether the ratio between brain ACE1/ ACE2 activity is altered in animals or humans with cardiovascular dysfunction. Indeed, a recent study using *db/db* and streptozotocin diabetic mice showed an alteration in ACE1 and ACE2 activity compared to non-diabetic controls (43). Studies using adenovirus mediated inference small hairpin RNA for AT1a (Ad-AT1a-shRNA) injected directly into the brainstem also documented interactions between Ang AT1a and ACE2 (58).

The endopeptidase neprilysin (NEP) cleaves the vasodilator atrial natriuretic factor and a number of RAS peptides and contributes to the formation of Ang (1-7) (12;59). In

an effort to understand the mechanisms that implicate brain NEP and RAS in the generation of Ang 1-7 in brain tissue, experiments were performed using NEP deficient mice. Our data showed that Ang (1-7) forming activity from Ang I was significantly reduced in the hypothalamus obtained from NEP (-/-) mice. However, Ang (1-7) forming activity from Ang II was not altered in these mice. This supports the idea that brain ACE2 has a distinct role in inactivating Ang II. Our data showed that conversion of Ang I to Ang (1-7) was not inhibited by DX600, which suggested that NEP might be involved in Ang metabolism. Indeed, data suggests that NEP is one of the enzymes involved in generation of Ang (1-7) (12;36). This data also indirectly indicates a lack of secondary role of ACE1 in the brain. If there was an abundant supply of functional ACE1, there would be sequential production of Ang II and Ang (1-7).

Measurement of circulating forms of ACE2 has proved problematic. In normal plasma, we found no evidence of ACE2 activity. A recent clinical trial showed that plasma ACE2 was only detectable in <10 % of individuals, a total study population of 500 (45). While there is evidence showing Ang 1-7 in plasma and urine which is physiologically regulated, the source of the peptide is not certain (47;60). In rats, ACE2 was measured in plasma and found to be increased after coronary artery ligation (61). It was surprising that the increase in plasma ACE2 activity was not associated with an increase in plasma Ang (1-7), but rather with an increase in Ang (1-9) (61). This would suggest that ACE2 preferentially cleaves Ang I rather than Ang II. This observation does not agree with our data or previous studies which demonstrate that Ang II is efficiently cleaved by ACE2, almost 400 fold more active with Ang II as substrate as compared to Ang I (9). We also found no evidence for ACE2-dependent formation of Ang (1-9) from Ang I (data not shown). Therefore, an important criterion for *in vivo* ACE2 activity would be detection of increased Ang (1-7). Evidence that this reaction was mediated by ACE2 was shown by the inhibition with MLN 4760 and metal chelators. The generation of Ang (1-7) in the brain was not inhibited by Z-PP, selective inhibitor of prolyl-endopeptidase, which is capable of generating Ang (1-7). It is interesting to note that there was no evidence for the formation

of other Ang peptides, Ang 1-7 and Ang 1-9, which indicates a lack of ACE2 in plasma as would be predicted.

In conclusion, using a SELDI-TOF MS assay approach with endogenous Ang peptide substrates, we documented a predominant role of ACE2 in processing of Ang II in brain as well as 1 evidence that ACE2 is a critical element of the RAS. This suggests an interesting scenario in which Ang (1-7), rather than Ang II, may be the dominant brain peptide. Furthermore, a balance between ACE1 and ACE2 may be important in cardiovascular health and new treatment strategies may be envisioned which specifically target this system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of NIH R01HL69319 (MM) and WSU seed grant (KME). TSC was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (CAPES/PDEE). We acknowledge the help of Terry Oroszi and Mary Key.

REFERENCE LIST*

1. Hall, J. E. (2003) *Mol. Biotechnol.* 24, 27-39
2. Lavoie, J. L. and Sigmund, C. D. (2003) *Endocrinology* 144, 2179-2183
3. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., and Acton, S. (2000) *Circ. Res.* 87, E1-E9
4. Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A. J. (2000) *J Biol. Chem.* 275, 33238-33243
5. Gallagher, P. E., Chappell, M. C., Ferrario, C. M., and Tallant, E. A. (2006) *Am. J. Physiol Cell Physiol* 290, C420-C426
6. Sakima, A., Averill, D. B., Gallagher, P. E., Kasper, S. O., Tommasi, E. N., Ferrario, C. M., and Diz, D. I. (2005) *Hypertension* 46, 333-340
7. Tallant, E. A., Ferrario, C. M., and Gallagher, P. E. (2005) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 289, H1560-H1566
8. Guy, J. L., Jackson, R. M., Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Hooper, N. M., and Turner, A. J. (2003) *Biochemistry* 42, 13185-13192
9. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., and Tummino, P. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 14838-14843

*Apresentada de acordo com as exigências do periódico *The Journal of Biological Chemistry*.

10. Ferrario, C. M., Trask, A. J., and Jessup, J. A. (2005) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*
11. Ferrario, C. M. and Chappell, M. C. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* 61, 2720-2727
12. Welches, W. R., Santos, R. A., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., Greene, L. J., and Ferrario, C. M. (1991) *J. Hypertens.* 9, 631-638
13. Welches, W. R., Brosnihan, K. B., and Ferrario, C. M. (1993) *Life Science* 52, 1461-1480
14. Yamamoto, K., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., and Ferrario, C. M. (1992) *Hypertension* 19, 692-696
15. Huentelman, M. J., Zubcevic, J., Hernandez Prada, J. A., Xiao, X., Dimitrov, D. S., Raizada, M. K., and Ostrov, D. A. (2004) *Hypertension* 44, 903-906
16. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., and Farzan, M. (2003) *Nature* 426, 450-454
17. Stock, P., Liefeldt, L., Paul, M., and Ganten, D. (1995) *Cardiology* 86 Suppl 1, 2-8
18. Ye, V. Z. and Duggan, K. A. (2000) *Clin. Sci. (Lond)* 99, 201-206
19. Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C. C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., and Penninger, J. M. (2005) *Nature* 436, 112-116
20. Lippoldt, A., Paul, M., Fuxe, K., and Ganten, D. (1995) *Clinical & Experimental Hypertension* 17, 251-266
21. Morimoto, S. and Sigmund, C. D. (2002) *Neuropeptides* 36, 194-200
22. Aldred, G. P., Chai, S. Y., Song, K., Zhuo, J., MacGregor, D. P., and Mendelsohn, F. A. (1993) *Regul. Pept.* 44, 119-130
23. Strittmatter, S. M., Lo, M. M., Javitch, J. A., and Snyder, S. H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 1599-1603
24. Baltatu, O., Lippoldt, A., Hansson, A., Ganten, D., and Bader, M. (1998) *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 237-242
25. Whiting, P., Nava, S., Mozley, L., Eastham, H., and Poat, J. (1991) *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11, 93-96
26. Jouquey, S., Mathieu, M. N., Hamon, G., and Chevillard, C. (1995) *Neuropharmacology* 34, 1689-1692
27. Saavedra, J. M. (1992) *Endocrine Review* 13, 329-380
28. Gembardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H. P., Siems, W. E., and Walther, T. (2005) *Peptides* 26, 1270-1277
29. Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., and Clark, K. L. (2002) *FEBS Lett.* 532, 107-110
30. Lazartigues, E., Dunlay, S. M., Loihl, A. K., Sinnayah, P., Lang, J. A., Espelund, J. J., Sigmund, C. D., and Davissou, R. L. (2002) *Circ. Res.* 90, 617-624
31. Wright, J. W. and Harding, J. W. (1992) *Brain Research Reviews* 17, 227-262
32. Elased, K. M., Cool, D. R., and Morris, M. (2005) *Hypertension* 46, 953-959
33. Elased, K. M., Cunha, T. S., Gurley, S. B., Coffman, T. M., and Morris, M. (2006) *Hypertension* 47, 1010-1017

34. Lu, B., Gerard, N. P., Kolakowski, L. F., Jr., Bozza, M., Zurakowski, D., Finco, O., Carroll, M. C., and Gerard, C. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2271-2275
35. Huang, L., Sexton, D. J., Skogerson, K., Devlin, M., Smith, R., Sanyal, I., Parry, T., Kent, R., Enright, J., Wu, Q. L., Conley, G., DeOliveira, D., Morganelli, L., Ducar, M., Wescott, C. R., and Ladner, R. C. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 15532-15540
36. Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., Diz, D. I., and Ferrario, C. M. (1989) *J Biol. Chem.* 264, 16518-16523
37. Hurst, P. L. and Lovell-Smith, C. J. (1984) *Clin. Chem.* 30, 817
38. Ferrario, C. M., Jessup, J., Chappell, M. C., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Tallant, E. A., Diz, D. I., and Gallagher, P. E. (2005) *Circulation* 111, 2605-2610
39. Elased, K. M., Cool, D. R., and Morris, M. (2005) *Hypertension* 46, 953-959
40. Yan, Z. H., Ren, K. J., Wang, Y., Chen, S., Brock, T. A., and Rege, A. A. (2003) *Anal. Biochem.* 312, 141-147
41. Huentelman, M. J., Zubcevic, J., Katovich, M. J., and Raizada, M. K. (2004) *Regul. Pept.* 122, 61-67
42. Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2004) *Biochem. J.* 383, 45-51
43. Wysocki, J., Ye, M., Soler, M. J., Gurley, S. B., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., Coffman, T. M., Chen, S., and Batlle, D. (2006) *Diabetes* 55, 2132-2139
44. Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W., and Nagata, S. (1996) *Nature* 380, 723-726
45. Rice, G. I., Jones, A. L., Grant, P. J., Carter, A. M., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2006) *Hypertension*
46. Shaltout, H. A., Westwood, B., Averill, D. B., Ferrario, C. M., Figueroa, J., Diz, D. I., Rose, J. C., and Chappell, M. C. (2006) *Am. J. Physiol Renal Physiol*
47. Ferrario, C. M., Jessup, J., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Ann, T. E., Smith, R. D., and Chappell, M. C. (2005) *Kidney Int.* 68, 2189-2196
48. Santos, R. A., Simoes e Silva AC, Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de, B., I, Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., and Walther, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8258-8263
49. Doobay, M. F., Talman, L. S., Obr, T. D., Tian, X., Davisson, R. L., and Lazartigues, E. (2006) *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*
50. Krob, H. A., Vinsant, S. L., Ferrario, C. M., and Friedman, D. P. (1998) *Brain Res.* 798, 36-45
51. Jhren, O., Imboden, H., Hauser, W., Maye, I., Sanvitto, G. L., and Saavedra, J. M. (1997) *Brain Res.* 757, 218-227
52. Chai, S. Y., McKinley, M. J., and Mendelsohn, F. A. (1987) *Clin. Exp. Hypertens. A* 9, 449-460
53. Rogerson, F. M., Schlawe, I., Paxinos, G., Chai, S. Y., McKinley, M. J., and Mendelsohn, F. A. (1995) *J Chem. Neuroanat.* 8, 227-243
54. Eckman, E. A., Adams, S. K., Troendle, F. J., Stodola, B. A., Kahn, M. A., Fauq, A. H., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., and Eckman, C. B. (2006) *J. Biol. Chem.*
55. Jhren, O. and Saavedra, J. M. (1996) *Am. J Physiol* 271, E104-E112

56. McKinley, M. J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mathai, M. L., May, C. N., McAllen, R. M., Oldfield, B. J., Mendelsohn, F. A., and Chai, S. Y. (2003) *Int. J Biochem. Cell Biol.* 35, 901-918
57. Davisson, R. L., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., and Sigmund, C. D. (2000) *J. Clin. Invest* 106, 103-106
58. Lin, Z., Zhang, W., Key, M., Lin, S., Chen, A. F., Chen, Y., and Morris M (2006) Angiotensin AT1a shRNA Demonstrates Interactions between Brainstem Angiotensin AT1a Receptors and Angiotensin Converting Enzyme 2.
59. Turner, A. J., Isaac, R. E., and Coates, D. (2001) *Bioessays* 23, 261-269
60. Brosnihan, K. B., Neves, L. A., Anton, L., Joyner, J., Valdes, G., and Merrill, D. C. (2004) *Braz. J Med. Biol. Res.* 37, 1255-1262
61. Ocaranza, M. P., Godoy, I., Jalil, J. E., Varas, M., Collantes, P., Pinto, M., Roman, M., Ramirez, C., Copaja, M., az-Araya, G., Castro, P., and Lavandero, S. (2006) *Hypertension*.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O diabetes mellitus, bem como suas complicações, tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública dos países Ocidentais. Estima-se que existam aproximadamente 200 milhões de pacientes diabéticos no mundo, e acredita-se que nos próximos anos a prevalência da doença vai aumentar não somente no Ocidente, devido à epidemia de sobrepeso e obesidade, mas também em países emergentes, por causa das mudanças com relação aos hábitos alimentares. Sendo assim, a previsão é de que nos próximos anos, o diabetes se torne a causa mais importante de morbidade e mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares (Nitenberg, 2007).

Apesar do incrível progresso das pesquisas básicas e aplicadas na área da saúde, nossa capacidade para tratar as doenças cardiovasculares seguem limitadas. Em outras palavras, podemos sim tratar muitos sintomas, mas devido à limitação na compreensão da etiologia primária responsável pela manifestação e desenvolvimento do processo patológico, as causas desencadeantes seguem parcialmente obscuras. Até muito recentemente, os enfoques que eram utilizados para estudar as enfermidades eram baseados em ferramentas farmacológicas e bioquímicas *in vitro*. Hoje em dia, tem sido cada vez maior o número de estudos *in vivo* dedicados à compreensão dos mecanismos relacionados ao aparecimento de complicações cardiovasculares decorrentes do diabetes e hipertensão. Entretanto, uma série de perguntas ainda permanece sem respostas. Buscando alcançar um maior entendimento a respeito das complicações decorrentes do diabetes mellitus e alterações cardiovasculares, apresentamos nos Capítulos 1 e 2 os resultados de estudos *in vivo* utilizando diferentes modelos animais.

No Capítulo 1 desta tese, foi mostrado pela primeira vez que o alto consumo de frutose, causa disfunção renal significativa em camundongos, evidenciada por aumento da excreção protéica urinária e alterações renais histológicas discretas. Além disto, mostramos que o grau de disfunção renal está positivamente correlacionado tanto com a variabilidade da pressão arterial, como com o componente *low frequency* (LF) da mesma, importantes preditores de lesões em órgãos-alvo, em pacientes hipertensos (Parati *et al.*, 1987; Mancia

et al., 1994) e em ratos SHR (Su & Miao, 2001; Wang *et al.*, 2005). Os dados obtidos em nosso estudo complementam aqueles obtidos por Farah *et al.* (2006), onde foi mostrado que a dieta rica em frutose causa hipertensão arterial noturna, associada à ativação simpática, hiperatividade do SRA e intolerância à glicose, sem entretanto causar hiperglicemia e hiperinsulinemia. Estes achados ressaltam a importância dos dois estudos na caracterização do modelo, que parece mimetizar a fase precoce do estado diabético em humanos. Além disto, evidenciam que as disfunções cardiovasculares e renais, induzidas pela dieta, estão presentes mesmo quando não existem alterações metabólicas acentuadas (Farah *et al.*, 2006). Apesar de não ser possível concluir se a hipertensão arterial neste modelo foi o determinante da lesão renal, ou se foi secundária à doença renal intrínseca, sabe-se que a hipertensão desempenha um prognóstico negativo sobre o desenvolvimento da disfunção renal, e vice-versa, em vários modelos experimentais (Yoshida K *et al.*, 1994; Yoshida K *et al.*, 2001; Yoshida K *et al.*, 2002).

É vasta a literatura que mostra que o exercício aeróbio, realizado regularmente, promove importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas, resultando em redução significativa da pressão arterial (Brum *et al.*, 2000; Rondon & Brum, 2003). Por outro lado, poucos estudos avaliaram os efeitos do treinamento físico na associação entre hipertensão arterial e diabetes mellitus. Lehmann *et al.* (1997) demonstraram que pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e pressão arterial limítrofe, submetidos a um programa de exercícios aeróbios por 3 meses, apresentaram aumento do VO₂ máximo, redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, com melhora do perfil lipídico, independentemente da melhora glicêmica. Sendo assim, no Capítulo 2, utilizamos o modelo SHR-STZ para estudar os efeitos do treinamento físico sobre as alterações metabólicas e cardíacas presentes na associação hipertensão-diabetes.

Nossos dados mostraram que o treinamento físico moderado não só induziu melhora dos parâmetros metabólicos gerais e hemodinâmicos dos animais, como também atenuou a progressão das alterações morfológicas e funcionais do músculo cardíaco, aumentando a concentração tecidual de substrato energético. Mostramos também que o treinamento físico aumentou significativamente o índice de sobrevivência dos animais, fator provavelmente

relacionado à melhora do perfil metabólico e da função cardiovascular, evidenciado pela redução dos níveis pressóricos, melhora da sensibilidade do barorreflexo e das funções sistólica e diastólica. Não descartamos entretanto, que as adaptações benéficas também sejam decorrentes da melhora do perfil oxidativo e de mudanças relacionadas à expressão e atividade de componentes do SRA (dados não mostrados). Embora a eficácia do treinamento físico sobre a associação entre diabetes e hipertensão tenha sido evidenciada neste estudo, sabe-se que nem todos os pacientes são responsivos ao mesmo (Rondon & Brum, 2003). Sendo assim, a adoção do treinamento físico como tratamento único e não-farmacológico de pacientes diabéticos e/ou hipertensos sempre dependerá da responsividade, disponibilidade e aderência do paciente à terapia adotada, bem como do grau de disfunção apresentado.

Os resultados apresentados nos dois primeiros capítulos desta tese mostram a importância da utilização de modelos experimentais para a compreensão das complicações decorrentes do diabetes e da hipertensão. Modelos como estes, além de possibilitarem maior controle sobre as variáveis que interferem na manifestação destas doenças, reproduzem sintomas e complicações em um período de tempo relativamente curto, comparado à evolução em humanos. Além disso, nos permitem a realização de análises que, por questões éticas, obviamente não poderiam ser utilizadas em estudos envolvendo humanos, já que é inadmissível manter um paciente sem tratamento quando opções terapêuticas estão disponíveis.

Mas o desafio é ainda maior, e sabe-se que para compreender os mecanismos envolvidos na manifestação de algumas doenças, é necessária a utilização de outros recursos técnicos disponíveis. Um deles é a utilização de ferramentas que permitam a avaliação, de maneira rápida, simples e precisa, de componentes envolvidos no processo fisiopatológico. Sendo assim, no Capítulo 3 apresentamos os resultados referentes à padronização de uma metodologia alternativa para a detecção e quantificação da atividade enzimática da ECA2, importante enzima envolvida no controle cardiovascular. Para tanto, lançamos mão da tecnologia denominada *surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS)*, e utilizando ensaios proteolíticos

miniaturizados, determinamos a atividade da enzima. Esta técnica é particularmente útil para a quantificação de peptídeos de baixo peso molecular, apesar de ainda não estar sendo aplicada em grande escala para a mensuração de atividade enzimática. Neste estudo (Capítulo 3), foram utilizados substratos endógenos (angiotensina I e angiotensina II) que quando clivados pela enzima ECA2, liberam angiotensina (1-9) e angiotensina (1-7), respectivamente. Os substratos e produtos foram identificados pelas razões massa/carga (m/z), quantificados como intensidade do pico ou área sob a curva, e a atividade enzimática expressa pela razão produto/substrato. Utilizando esta metodologia, foi possível monitorar com sucesso a atividade da ECA2 recombinante e da ECA2 renal, mostrando que a técnica apresenta também alta reprodutibilidade. Por outro lado, a atividade da ECA2 não foi detectada no plasma. Além disto, apresentamos neste estudo os resultados de dois importantes recursos para validação do método: 1) Mostramos que valor de K_m (*Michaelis constant*), obtido pelo estudo da cinética da ECA2 recombinante utilizando o *SELDI-TOF-MS*, foi semelhante àqueles obtidos utilizando outras técnicas e, 2) Mostramos também que a atividade proteolítica da ECA2 foi inibida por agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e também por inibidores específicos, como o MLN-4760, enfatizando a especificidade da reação.

Sabe-se que após a padronização e validação de novos ensaios como o apresentado no Capítulo 3, é essencial que seja mostrada a aplicabilidade do mesmo em diferentes condições experimentais. Sendo assim, utilizamos o novo método para ajudar-nos na compreensão do papel da ECA1, ECA2 e da endopeptidase 24.11 (NEP) cerebrais no metabolismo das angiotensinas (Capítulo 4), em camundongos controle. Optamos pelo estudo do SRA cerebral, que desempenha papel crítico na regulação da pressão arterial, controle hídrico e de secreção endócrina (Wright & Harding *et al.*, 1992; Lazartigues *et al.*, 2002), e cuja atividade, em situações patológicas como no diabetes e hipertensão, o funcionamento deste sistema pode estar alterado (Pereira *et al.*, 2001; Wichi *et al.*, 2005; Gaudio *et al.*, 2005; Jandeleit-Dahm & Cooper, 2006; Cooper *et al.*, 2006).

No presente estudo (Capítulo 4) mostramos que, semelhante ao que já havia sido observado por Ferrario *et al.* (1992) em tecido cerebral de cães e ratos, a angiotensina (1-7)

é o principal peptídeo formando em extratos hipotalâmicos de camundongos controle. A novidade foi que, não só a NEP, mas também a ECA2 contribui para a síntese de angiotensina (1-7), clivando eficientemente, angiotensina I e angiotensina II, respectivamente. Mais surpreendente, os resultados do presente estudo mostraram que em situações fisiológicas, a ECA2 exerce papel predominante sobre a ECA1, metabolizando de maneira rápida e eficaz o peptídeo vasoconstritor, angiotensina II, que se forma. Este foi um achado inesperado, uma vez que diversos estudos mostram que tanto a angiotensina II quanto os receptores para o peptídeo estão presentes no cérebro, e parecem ser gerados localmente (Lippoldt *et al.*, 1995; Morimoto & Sigmund, 2002). Os resultados *in vitro* obtidos no presente estudo apresentam limitações com relação a sua aplicabilidade *in vivo*. Entretanto, sugerem que o balanço existente entre ECA1, ECA2 e NEP para a formação das angiotensinas no hipotálamo, importante centro regulador da pressão arterial, pode ser um fator essencial na manutenção das funções fisiológicas do sistema cardiovascular, apontando a angiotensina (1-7) como o principal peptídeo vasoativo neste tecido.

O próximo passo será a utilização do novo método na monitorização do SRA, em estados patológicos, já que existe grande interesse clínico na mensuração da atividade dos componentes do SRA como marcadores de doenças, como a hipertensão, o diabetes, insuficiência cardíaca e disfunção renal. O pequeno volume de amostra necessário para o ensaio, a rapidez no processamento das amostras e a precisão na identificação dos peptídeos de interesse permitirão o acompanhamento da dinâmica do SRA durante o curso temporal de evolução destas afecções, evitando resultados falso-positivos. Além disto, com a utilização desta nova tecnologia, será possível avaliar e comparar o efeito de diferentes abordagens, farmacológicas ou não, sobre o SRA, bem como testar inibidores e antagonistas potenciais para a enzima ECA2, auxiliando-nos na compreensão do funcionamento deste complexo sistema. E assim como os ensaios para a avaliação da atividade da renina e da ECA1 serviram de protótipo para a padronização desta metodologia, esperamos que a metodologia apresentada contribua para o desenvolvimento de outros ensaios enzimáticos utilizando a espectrofotometria de massa.

Entretanto, é importante ressaltar que existem duas importantes restrições com relação à utilização do método. A primeira diz respeito à possível interferência entre a matriz e os peptídeos de interesse, na escala entre 0 e 500 (m/z), o que não se aplica ao presente estudo, pois os peptídeos analisados possuem massa maior do que 500 (m/z). A segunda está relacionada ao alto custo para aquisição do equipamento e material necessários para a realização das análises. No momento, este fator limita significativamente a utilização do ensaio no Brasil, tendo em vista que poucos são os centros que possuem o equipamento.

Com base nos estudos apresentados, concluímos que a utilização de modelos animais é essencial para a compreensão da fisiopatologia, medidas terapêuticas e desenvolvimento de novas tecnologias para a prevenção e tratamento do diabetes e hipertensão arterial. Sabemos que alguns grupos ainda são resistentes ao uso de animais em estudos científicos, alegando, dentre diversos outros pontos, que as alterações e respostas observadas em modelos experimentais não se aplicam diretamente ao homem. Entretanto, diante da grande homologia roedor-homem e da possibilidade de isolamento de variáveis, dados como os apresentados nesta tese, direta e indiretamente, adicionarão novos conhecimentos na busca por medidas eficazes para a prevenção e tratamento destas doenças. Porém devido à complexidade de alguns temas, nem sempre é assim tão evidente a justificativa para a utilização de modelos animais, nem tampouco a aplicabilidade dos resultados obtidos na experimentação animal. Como estes são fatores que podem limitar o desenvolvimento técnico-científico do país, já que as decisões em Política de Desenvolvimento Científico e Tecnológico nem sempre, ou na maioria das vezes, são tomadas por pessoas com conhecimento técnico, é muito importante que, desde o momento do delineamento experimental, estejam claras para o pesquisador quais são as perguntas que se pretende responder. Desta forma, por mais complexo que seja o trabalho desenvolvido, o estudante não terá dificuldade em mostrar como seus achados poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos relacionados ao bem-estar humano e animal, justificando assim a importância científica da sua pesquisa.

CONCLUSÃO

1. O alto consumo de frutose causa disfunção renal significativa em camundongos, que se mostrou positivamente correlacionada com as alterações cardiovasculares induzidas pela dieta;
2. A associação entre diabetes e hipertensão promove efeitos deletérios sobre a função cardiovascular e o treinamento físico moderado atenua a progressão destas alterações, aumentando significativamente o índice de sobrevivência de animais hipertensos diabéticos;
3. Por meio da utilização da espectrofotometria de massa foi possível padronizar um ensaio alternativo, rápido, sensível e preciso para determinação da atividade proteolítica da ECA2 tecidual em camundongos;
4. Em condições fisiológicas, as enzimas ECA2 e NEP parecem exercer papel predominante sobre a ECA1 na metabolização das angiotensinas no hipotálamo de camundongos controle, contribuindo de maneira significativa para a formação de angiotensina (1-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA*. 1999; 282(16): 1530-8.

Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*. 2005; 2(1): 5.

Blair SN, Kohl HW 3rd, Paffenbarger RS Jr, Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*. 1989; 262(17): 2395-401.

Blair SN, Wei M. Sedentary habits, health, and function in older women and men. *Am J Health Promot*. 2000; 15(1): 1-8.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(4): 537-43.

Brum PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2000; 36(6): 1018-22.

CDC - Centers for Disease Control. Diabetes surveillance report, 1999. [Acesso em 10 de outubro de 2006]. Disponível em www.cdc.gov/diabetes/statistics/sur199.index.htm

CDC - National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Physical Activity and Health: A report of the surgeon general, 1999. [Acesso em 10 de outubro de 2006]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nccdphp/sgr/sum.htm>

Colditz GA. Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc*. 1999; 31 Suppl 11: 663-7.

Cooper ME, Tikellis C, Thomas MC. Preventing diabetes in patients with hypertension: one more reason to block the renin-angiotensin system. *J Hypertens Suppl*. 2006; 24(1): 57-63.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002; 417(6891): 822-8.

Dai S, McNeill JH. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33(2): 101-7.

De Angelis K, Pureza DY, Flores LJ, Rodrigues B, Melo KF, Schaan BD *et al*. Physiological effects of exercise training in patients with type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50(6): 1005-13.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

- De Angelis KL, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LR, Gadonski G, Lacchini S *et al.* Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(6): 635-41.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3): 415-72.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5): E1-9.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(5): 911-22.
- Factor SM, Bhan R, Minase T, Wolinsky H, Sonnenblick EH. Hypertensive-diabetic cardiomyopathy in the rat: an experimental model of human disease. *Am J Pathol.* 1981; 102(2): 219-28.
- Factor SM, Minase T, Cho S, Fein F, Capasso JM, Sonnenblick EH. Coronary microvascular abnormalities in the hypertensive-diabetic rat. A primary cause of cardiomyopathy? *Am J Pathol.* 1984; 116(1): 9-20.
- Farah V, Elased KM, Chen Y, Key MP, Cunha TS, Irigoyen MC *et al.* Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci.* 2006; 130(1-2): 41-50.
- Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC *et al.* Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension.* 1990; 15 Suppl 2: I13-9.
- Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation.* 2005; 111(20): 2605-10.
- Fiske WD 3rd, Blouin RA, Mitchell B, McNamara PJ. Renal function in the obese Zucker rat. *Int J Obes.* 1986; 10(3): 175-83.
- Frohlich ED. Detection, evaluation, and treatment of hypertension: JNC-5 (Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure). *Heart Dis Stroke.* 1993; 2(6):459-60.
- Fuller JH. Epidemiology of hypertension associated with diabetes mellitus. *Hypertension.* 1985; 7(6 Pt 2): I13-7.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores sociais / Dados sobre exercício físico. [Acesso em 20 de novembro de 2006]. Disponível em: <http://www.sempreenforma.com.br/vidasaudavel/infogeral/dados-ibgeexerc- fisic.html>
- Gaesser GA. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep.* 2007; 7(1): 14-9.
- Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976; 25(7): 595-603.

- Gaudio G, Guasti L, Schizzarotto A, Simoni C, Crespi C, Cimpanelli M *et al.* Changes in plasma lipids during renin-angiotensin system blockade by combination therapy (enalapril plus valsartan) in patients with diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45(4): 362-6.
- Gordon NF, Scott CB, Levine BD. Comparison of single versus multiple lifestyle interventions: are the antihypertensive effects of exercise training and diet-induced weight loss additive? *Am J Cardiol.* 1997; 79(6): 763-7.
- Grossman E, Shemesh J, Shamiss A, Thaler M, Carroll J, Rosenthal T. Left ventricular mass in diabetes-hypertension. *Arch Intern Med.* 1992; 152(5): 1001-4.
- Group DCCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Eng J Med.* 1993; 329: 977-986.
- Guy JL, Jackson RM, Acharya KR, Sturrock ED, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): comparative modeling of the active site, specificity requirements, and chloride dependence. *Biochemistry.* 2003; 42(45): 13185-92.
- Hagberg JM, Montain SJ, Martin WH 3rd, Ehsani AA. Effect of exercise training in 60- to 69-year-old persons with essential hypertension. *Am J Cardiol.* 1989; 64(5): 348-53.
- Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci.* 2006 – *in press*
- Hayashi A, Kobayashi A, Takahashi R, Suzuki F, Nakagawa T, Kimoto K. Effects of voluntary running exercise on blood pressure and renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2000; 46(4): 165-70.
- Hsieh PS. Attenuation of insulin-mediated pressor effect and nitric oxide release in rats with fructose-induced insulin resistance. *Am J Hypertens.* 2004; 17(8): 707-711.
- Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF *et al.* Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(23): 13330-4.
- Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernandez Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS *et al.* Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. *Hypertension.* 2004; 44(6): 903-6.
- Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005; 436(7047): 112-6.
- Irigoyen MC, Lacchini S, De Angelis K, Michelini LC. Fisiopatologia da Hipertensão: O que avançamos. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2003; 13(1): 20-45.
- Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006; 35(3): 469-90.

Joslin EP, Root HF, White P, Marble A. The treatment of diabetes mellitus. Philadelphia: Lea Febiger, 1935.

Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Okamura A, Nagai M, Moriguchi K *et al.* The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens.* 2002; 15(1 Pt 1): 66-71.

Katovich MJ, Reaves PY, Francis SC, Pachori AS, Wang HW, Raizada MK. Gene therapy attenuates the elevated blood pressure and glucose intolerance in an insulin-resistant model of hypertension. *J Hypertens.* 2001; 19(9): 1553-8.

Kinugawa T, Ogino K, Miyakoda H, Saitoh M, Hisatome I, Fujimoto Y *et al.* Responses of catecholamines, renin-angiotensin system, and atrial natriuretic peptide to exercise in untrained men and women. *Gen Pharmacol.* 1997; 28(2): 225-8.

Kushi LH, Fee RM, Folsom AR, Mink PJ, Anderson KE, Sellers TA. Physical activity and mortality in postmenopausal women. *JAMA.* 1997; 277(16): 1287-92.

Lazartigues E, Dunlay SM, Loihl AK, Sinnayah P, Lang JA, Espelund JJ *et al.* Brain-selective overexpression of angiotensin (AT1) receptors causes enhanced cardiovascular sensitivity in transgenic mice. *Circ Res.* 2002; 90(5): 617-24.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996; 379(6566): 632-5.

Lehmann R, Kaplan V, Bingisser R, Bloch KE, Spinaz GA. Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in IDDM. *Diabetes Care.* 1997; 20(10): 1603-11.

Libonati JR, Gaughan JP. Low-intensity exercise training improves survival in Dahl salt hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38(5): 856-8.

Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens.* 1995; 17(1-2): 251-66.

MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(20): 9034-7.

Maeda S, Iemitsu M, Jesmin S, Miyauchi T. Acute exercise causes an enhancement of tissue renin-angiotensin system in the kidney in rats. *Acta Physiol Scand.* 2005; 185(1): 79-86.

Mancia G, Frattola A, Parati G, Santucci C, Ulian L. Blood pressure variability and organ damage. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 24 Suppl A: 6-11.

Mello MT, Fernandes AC, Tufik S. Epidemiological survey of the practice of physical exercise in the general population of São Paulo city - Brazil. *Am Coll Spor Med.* 1998; 30 Supl: 11.

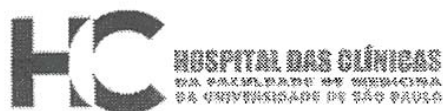
Morimoto S, Sigmund CD. Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. *Neuropeptides.* 2002; 36(2-3): 194-200.

- Nagata R, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S *et al.* Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis. *J Biol Chem.* 2004; 279(28): 29031-42.
- Neuhouser ML, Miller DL, Kristal AR, Barnett MJ, Cheskin LJ. Diet and exercise habits of patients with diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease or hypertension. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21(5): 394-401.
- Nitenberg A. Macrovascular disease in type 2 diabetes: We do need animal models for in vivo studies. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(3): 450-2.
- Noonan WT, Banks RO. Renal function and glucose transport in male and female mice with diet-induced type II diabetes mellitus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 225(3): 221-30.
- O'Sullivan SE, Bell C. The effects of exercise and training on human cardiovascular reflex control. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81(1-3): 16-24.
- Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension. *J Hypertens.* 1987; 5(1):93-8.
- Pereira AC, Mota GA, Bensenor I, Lotufo PA, Krieger JE. Effect of race, genetic population structure, and genetic models in two-locus association studies: clustering of functional renin-angiotensin system gene variants in hypertension association studies. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(11): 1421-8.
- Ribeiro J, Guerra S, Pinto A, Oliveira J, Duarte J, Mota J. Overweight and obesity in children and adolescents: relationship with blood pressure, and physical activity. *Ann Hum Biol.* 2003; 30(2): 203-13.
- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004; 383(Pt 1): 45-51.
- Rodgers RL. Depressor effect of diabetes in the spontaneously hypertensive rat: associated changes in heart performance. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986; 64(9): 1177-84.
- Rodrigues B, McNeill JH. Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *Am J Physiol.* 1986; 251(3 Pt 2): H571-80.
- Rollo J. Cases of diabetes mellitus: With the results of the trials of certain acids and other substances in the cure of the lues venereal. 2. ed. London: Dilly 1798.
- Rondon MUPR, Brum PC. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. *Ver Bras Hipertens.* 2003; 10(2): 134-139.
- Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. *BMJ.* 1996; 313(7060): 779-84.
- Shephard RJ. Whistler 2001: a Health Canada/CDC conference on "Communicating physical activity and health messages: science into practice". *Am J Prev Med.* 2002; 23(3): 221-5.

- Sherman SE, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB. Comparison of past versus recent physical activity in the prevention of premature death and coronary artery disease. *Am Heart J.* 1999; 138(5 Pt 1): 900-7.
- Stefanick ML, Mackey S, Sheehan M, Ellsworth N, Haskell WL, Wood PD. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. *N Engl J Med.* 1998; 339(1): 12-20.
- Stewart KJ. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA.* 2002; 288(13): 1622-31.
- Stewart KJ. Role of exercise training on cardiovascular disease in persons who have type 2 diabetes and hypertension. *Cardiol Clin.* 2004; 22(4): 569-86.
- Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology.* 1995; Suppl 1: 2-8.
- Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001; 28(9): 709-15.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50(6): 537-46.
- The fifth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC V) *Arch Intern Med.* 1993; 153(2): 154-83.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275(43): 33238-43.
- Venco A, Grandi A, Barzizza F, Finardi G. Echocardiographic features of hypertensive-diabetic heart muscle disease. *Cardiology.* 1987; 74(1): 28-34.
- Veras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrao CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1997; 273(6 Pt 2): H2627-31.
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002; 277(17): 14838-43.
- Wallberg-Henriksson H, Rincon J, Zierath JR. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med.* 1998; 25(1): 25-35.
- Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, Su DF. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32(7): 545-52.
- Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Ann Intern Med.* 2000; 132(8): 605-11.

- Wei M, Kampert JB, Barlow CE, Nichaman MZ, Gibbons LW, Paffenbarger RS Jr *et al.* Relationship between low cardiorespiratory fitness and mortality in normal-weight, overweight, and obese men. *JAMA*. 1999; 282(16): 1547-53.
- Wichi RB, Souza SB, Casarini DE, Morris M, Barreto-Chaves ML, Irigoyen MC. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(5): R1129-33.
- Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Brain Res Rev*. 1992; 17(3):227-62.
- Ye VZ, Duggan KA. Vasoactive intestinal peptide down-regulates the intrahepatic renin-angiotensin system in the anaesthetized rat. *Clin Sci (Lond)*. 2000; 99(3): 201-6.
- Yoshida K, Kohzuki M, Xu HL, Wu XM, Kamimoto M, Sato T. Effects of troglitazone and temocapril in spontaneously hypertensive rats with chronic renal failure. *J Hypertens*. 2001; 19(3): 503-10.
- Yoshida K, Xu HL, Kawamura T, Ji L, Kohzuki M. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism in rats with chronic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 40(4): 533-42.
- Yoshida K, Yasujima M, Kohzuki M, Kanazawa M, Abe K: Effect of chronic treatment with calcium channel blockers or angiotensin converting enzyme inhibitors on renal function in streptozotocin-treated hypertensive diabetic rats. *Hypertens Res*. 1994; 17: 35–41.
- Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered*. 1961; 52: 275-278, 1961.

ANEXO



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.11.03, **APROVOU** documentos abaixo mencionados referentes ao Protocolo de Pesquisa nº 1034/02, intitulado: "Efeitos do treinamento físico nas alterações hemodinâmicas do diabetes experimental: papel do débito cardíaco, fluxo sanguíneo regional e reflexos cardiovasculares" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**.

- Inclusão da aluna de pós-graduação Tatiana de Sousa da Cunha.
- Inclusão da Dra. Fernanda Consolim-Colombo como orientadora.
- Extensão do estudo com o título: **Efeito do treinamento físico sobre as alterações cardíacas induzidas pelo diabetes experimental em ratos espontaneamente hipertensos: papel do estresse oxidativo.**

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Ângela D'Avila Harthmann**

CAPPesq, 27 de Novembro de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa