

Enzimas conversoras de angiotensina en orina de hipertensos renovasculares tratados y no tratados con diurético: purificación parcial y caracterización

R. H. Costa*, D. E. Casarini**, J. E. Portela**, F. L. Plavnik**, O. Marson** y K. B. Alves*

* Departamento de Bioquímica. ** Disciplina de Nefrología. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, SP, Brasil

Introducción

La excreción de la enzima convertora de angiotensina (ECA) se encuentra alterada en diversas enfermedades renales¹⁻³. La ECA está presente en mecanismos relacionados con la presión arterial (retención de sodio e inactivación hormonal⁴) y al mismo tiempo altos niveles de estas enzimas son encontrados en la orina de los pacientes hipertensos moderados esenciales⁵. En relación a los hipertensos renovasculares, las enzimas conversoras se encuentran en grandes cantidades en la orina de estos individuos^{6,7}.

Este trabajo describe la purificación parcial y algunas propiedades de las enzimas conversoras de angiotensina obtenidas en la orina de pacientes hipertensos renovasculares tratados o no con diurético y su comparación con un grupo de control.

Material y métodos

Fueron estudiados tres grupos de pacientes: A) pacientes con presión arterial normal ($112,0/70,0 \pm 7,10/7,50$), cinco hombres, cinco mujeres, con edades de 25 a 40 años; B) pacientes hipertensos no tratados, con media de presión arterial de $153,7/98,2 \pm 3,15/2,86$, un hombre, nueve mujeres, con edades de 30 a 50 años; C) pacientes hipertensos renovasculares con presión arterial controlada con clortalidona (50 mg/diarios) en uso durante dos meses, 10 mujeres, con edades de 30 a 50 años y valores medios de presión arterial de $142,0/97,0 \pm 12,7/5,3$. La función renal de todos los pacientes era normal, determinada a través del clearance de creatinina. Todos los pacientes mostraban análisis sanguíneos, radiografías del tórax y electrocardiogramas normales. La actividad plasmática de renina y las arteriografías re-

nales fueron normales para los grupos de pacientes con presión normal. Por otro lado, los hipertensos renovasculares tenían lesiones comprobadas por la arteriografía renal y presentaban alteraciones de la actividad plasmática de renina.

Actividad convertora de la angiotensina

I. La actividad convertora de la angiotensina fue determinada por el método de Santos y cols.⁸. La orina (300 μ l) fue incubada con 240 μ l de solución de ensayo que contenía 5 mM Hip-L-His-Leu (HLL) en 0,4 M de tampón borato de sodio, 0,9 M NaCl, pH 8,3 durante tres horas a 37° C. La reacción fue detenida por adición de 1,2 ml de 0,28 NaOH y a seguir adjuntando 100 μ l de ophthalaldeído (20 mg/ml en metanol). Después de 10 minutos fueron añadidos 200 μ l de 3N HCL. El producto His-Leu fue cuantificado fluorométricamente (excitación 365 nm y 495 emisión). Fueron preparados controles por reversión del orden de adición de enzima y NaOH. La actividad de la ACE fue expresada en μ mol de His-Leu liberadas por min/mg de proteína.

II. La conversión de angiotensina I (AI) para angiotensina II (AII) fue determinada por ensayo biológico utilizando úteros aislados de ratas⁹. Los úteros fueron obtenidos de ratas previamente inyectadas con dietil-estilbestrol (100 μ g/100 g) el día anterior al experimento. La AI (10 μ g) fue incubada dos horas con muestras de enzimas (200 μ l) en 0,05 M Tris-HCL, pH 8,0, y NaCl 0,05 M con volumen final de 1,0 ml a 37° C. La reacción fue detenida por aumento de temperatura en baño hirviente durante 10 minutos.

Actividad de cininasas

Fue utilizado como monitor de la actividad de cininasas el íleo aislado de conejillos de Indias. La bradicinina (5 nmol/ml) fue incubada con enzima en tampón 0,05 M Tris-HCL, pH 8,0 a 37° C. Alícuotas (1 mmol) fueron removidas a 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos de incubación y diluidas en tampón Tyrode hasta obtener 1 ml. La reacción

Correspondencia: Kaethy Bisan Alves.
Rua da Consolação, 3064.
Apto. 212-A.
CEP 01416 São Paulo, SP, Brasil.

fue detenida manteniendo la mezcla incubada en baño hirviendo durante 10 minutos. La actividad residual de bradicinina fue determinada por ensayo biológico utilizando el íleo del conejillo de Indias aislado, bañado a 37° C en 10 ml de tampón Tyrode. Bajo estas condiciones, definimos una unidad de actividad de cininasa como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de bradicinina por minuto.

Determinación proteica

La absorbancia a 280 nm en cubeta de 1,0 cm fue utilizada para medida de la concentración de proteína en fracciones cromatográficas.

Cromatografía de cambio iónica

Cada muestra de orina (180 mg de proteína) fue cromatografiada después de dializada contra un tampón 0,02 M de fosfato de sodio, pH 7,0, en una columna de DEAE-celulosa Cellex D (2,1 × 6,2 cm), equilibrada con tampón fosfato de sodio 0,02 M, pH 7,0, y eluida con gradiente lineal de 200 ml de tampón fosfato de sodio 0,02 M y 200 ml tampón fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,0. La actividad conversora de la angiotensina fue medida sobre HHL como sustrato.

Gel-filtración

Columnas de Bio-gel A 0,5 m (2 × 95 cm), Sephadex G-150 (2,4 × 96 cm) y Sephadex G-50 (2 × 87 cm) fueron equilibradas y desarrolladas con 50 mM de tampón Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 8,0. Las fracciones activas, obtenidas después de la gel-filtración, fueron reunidas, liofilizadas y dializadas contra tampón 50 mM Tris-HCL, pH 8,0. A continuación fueron sometidas a cromatografía líquida de fase rápida (FPLC) en columna de Sepharose 12 (12 × 60 cm), equilibrada y desarrollada con 50 mM de tampón Tris-HCL, pH 8,0, conteniendo 0,1 M NaCl.

Peso molecular

El peso molecular de las enzimas fue determinado por el método Andrews¹⁰ en una columna de Bio-gel A_{0,5 m}, precalibrada con albúmina de huevo (Mr 43 kDa), albúmina sérica bovina (Mr, 67 kDa), catalasa (Mr, 232 kDa) y ferritina (Mr, 440 kDa) o en columna de Sephadex G-150 precalibrada con inhibidor de tripsina de soya, SBTI (Mr, 21,5 kDa), albúmina de huevo (Mr, 43 kDa) y albúmina (Mr, 67 kDa) o en una columna de Sephadex G-50 precalibrada con ribonucleasa (Mr, 13,7 kDa), SBTI (Mr, 21,5 kDa) y quimiopripsinógeno (Mr, 25 kDa).

Estudio de inhibición

Los estudios de inhibición de la actividad conversora de angiotensina fueron realizados usando HHL como sus-

trato. Utilizamos cuatro diferentes concentraciones de inhibidores (50, 100, 200 y 300 mM) con NaCl, EDTA y captopril. Los inhibidores fueron preincubados durante 30 minutos con la enzima antes de la adición del sustrato.

Resultados

Los *pools* de las orinas del grupo de control y del grupo de pacientes hipertensos renovasculares tratados con diurético fueron eluidos en cromatografía de cambio iónica en dos picos con actividad enzimática sobre HHL. En ambos casos, el primer pico (A0 y B0) corresponde al material no retenido en la columna en cuanto que el segundo pico (A1 y C1) fue eluido en 0,7 mS. El *pool* de la orina de los pacientes hipertensos renovasculares no tratados con diurético fue eluido en tres picos proteicos con actividad sobre HHL: el primero (B0), no retenido en la columna; el segundo (B1), eluido en 0,7 mS, y el tercero (B2), en 1,25 mS. La figura 1 muestra la cromatografía de cambio iónica de los dos grupos de pacientes hipertensos y del grupo de control. Las fracciones activas de cada uno de los diferentes picos proteicos, resultantes de las cromatografías de cambio iónica, fueron reunidas en los respectivos *pools*: A'0, A'1, B'0, B'1, B'2, C'0 y C'1, y fueron dializados contra tampón 50 mM Tris-HCL, pH 8,0, liofilizados e introducidos en columna de gel filtración previamente calibrada: A'1, B'1 y C'1 en columna de Bio gel A_{0,5 m}, A'0, B'0 y C'0 en columna de Sephadex G-150 y B'2 en columna de Sephadex G-50. En todas las gel filtraciones fue obtenido apenas un pico proteico con actividad sobre HHL. La tabla I muestra la purificación de las enzimas a partir de cromatografía de cambio iónica, y la tabla II, los pesos moleculares así determinados. A'1, B'1, C'1 y B'2 convierten AI en AII e hidrolizan bradicinina, en cuanto que A'0, B'0 y C'0 sólo hidrolizan bradicinina. La acción de los inhibidores sobre la actividad de las diferentes enzimas se encuentran en la tabla III.

Discusión

El cromatograma obtenido a través de la cromatografía de cambio iónica de la orina del grupo de control es semejante a la obtenida con la orina de pacientes tratados con clortalidona, o sea, fueron eluidos dos picos proteicos con actividad sobre HHL, el primero no retenido en la columna y el segundo en 0,70 mS. La orina de los pacientes no tratados presentó, además de los dos picos eluidos respectivamente en la misma conductividad, un tercero, eluido en 1,25 mS. Las enzimas no retenidas de los tres grupos tienen pesos moleculares alrededor de 66 kDa, hidrolizan HHL, bradicinina, pero no convierten AI en AII. Las enzimas eluidas en 0,70 mS tienen pesos moleculares alrededor de 85 kDa, hidrolizan bradicinina, HHL y convierten AI en AII. La tercera enzima que aparece en la orina de los pacientes renovasculares no trata-

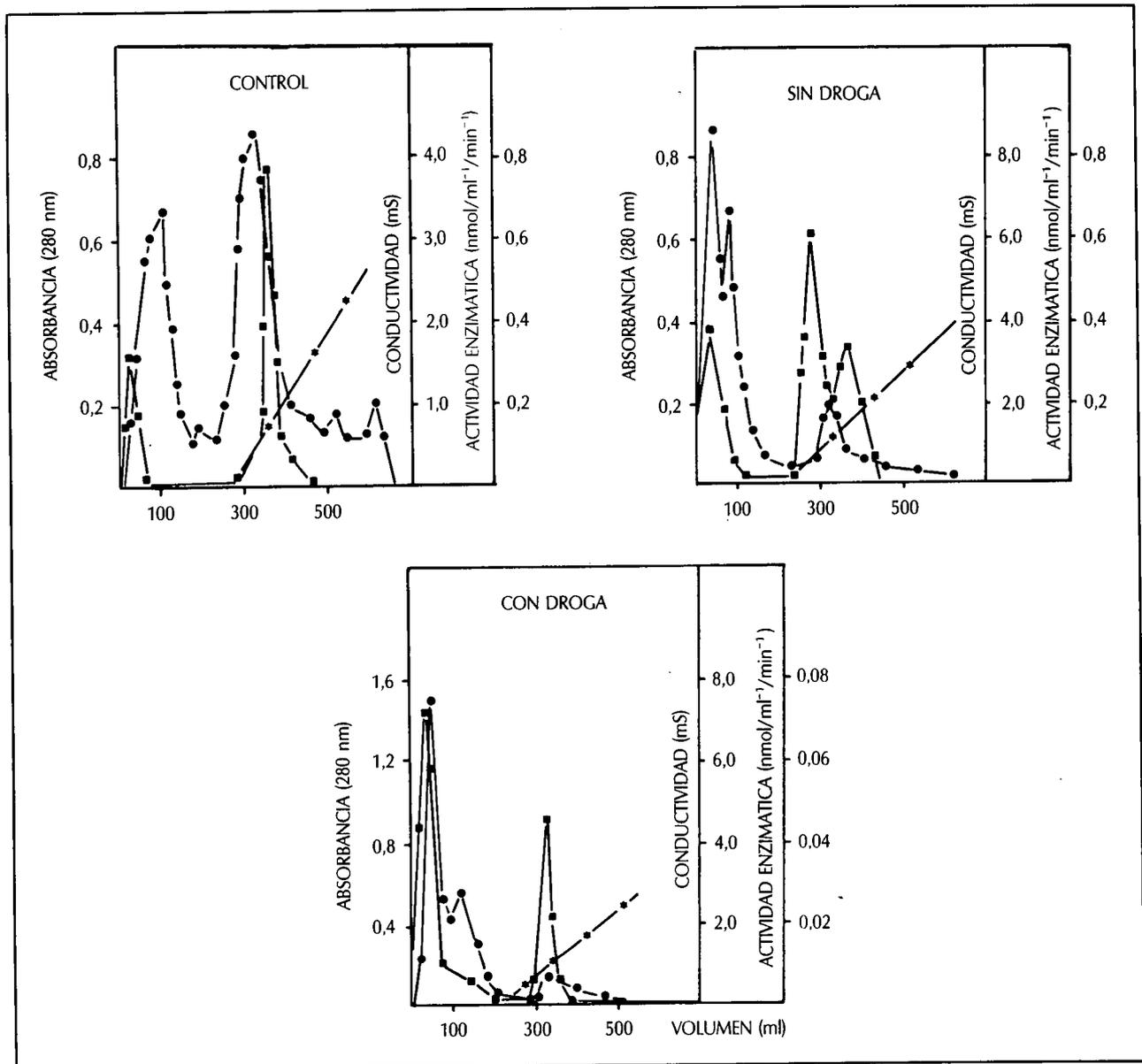


Fig. 1.—Cromatografía de cambio iónica. La cromatografía fue desarrollada de acuerdo con la descripción en los métodos. (●—●), A₂₈₀/ml; (▲—▲), actividad enzimática; (★—★), conductividad.

Tabla I. Purificación (P) de las enzimas después de la cromatografía de cambio iónica

Etapas	Control		Hipertensos renovasculares											
			Sin droga						Con droga					
	A0	A1	B0	B1	B2	C0	C1							
	AE	P	AE	P	AE	P	AE	P	AE	P	AE	P	AE	P
Cromatografía de cambio iónica	0,3	1	0,4	1	0,01	1	0,84	1	0,08	1	0,01	1	0,12	1
Gel-filtración	13	433	5,4	14	4,2	420	21	25	1,20	15	5,0	500	1,50	13

AE: Actividad específica (nmol/min⁻¹/mg⁻¹).

Tabla II. Pesos moleculares (kDa) de las distintas enzimas determinados a través de gel-filtración

Grupo	Conductividad de elución en la cromatografía de cambio iónica		
	0,20 mS	0,70 mS	1,25 mS
Control	66	88	—
RVHP sin droga	66	90	60
RVHP con droga	60	80	—

RVP: Pacientes hipertensos renovasculares.

dos difiere de las eluidas en 0,7 mS solamente en el peso molecular. Todas las enzimas fueron inhibidas por EDTA, ions cloreto y por captopril.

Perfil cromático idéntico fue observado en la orina de pacientes hipertensos esenciales tratados y no tratados con diurético¹³, esto es, el pico proteico con actividad sobre HHL eluido en 1,25 mS, en la orina de los pacientes no tratados, desaparece después del tratamiento con diurético.

Estudios posteriores deberán ser hechos para determinar si el aumento de la actividad de la enzima convertora en la orina de pacientes hipertensos es debido o no a la presencia de esta tercera forma de enzima, así como determinar si esta forma es una nueva enzima o es un fragmento de la enzima eluida en 0,7 mS, que sería la ECA encontrada normalmente en la orina.

Bibliografía

1. Baggio B, Piccoli A, Favaro S, Antonello A, Bertaglia E y Borsatti A: Urinary angiotensin-I-converting enzyme activity as a marker of tubulo-interstitial involvement in kidney diseases. En: *Biotechnology in Renal Replacement Therapy*. Bonomini V, Scolari MP, Stefoni S et al. (eds.) Basel, Karger, 70:208-212, 1989.
2. Maruhn D, Paar D y Bock KD: Lysosomal and brush border enzymes in urine of patients with renal artery stenosis and with essential hypertension. *Clin Biochem*, 12:228-230, 1979.
3. Kato I, Takada K, Nishimura K y cols.: Increased urinary excretion of angiotensin converting enzyme in patients with renal diseases. *J Clin Chem Clin Biochem*, 20:473-476, 1982.
4. Baggio B, Favaro S, Cantaro S, Bertazzo L, Funzio A y Borsatti A: Increased urine angiotensin converting enzyme in patients with upper urinary tract infection. *Clinica Acta*, 211-218, 1981.
5. Bailie MD y Barbour JA: Effect of inhibition of peptidase activity on distribution of intrarenal blood flow. *Am J Physiol*, 228 (3):850-853, 1975.
6. Larag JH: Renovascular Hypertension: a paradigm for all hypertension. *Journal of Hypertension*, 4 (suppl. 4):S79-S88, 1986.
7. Stephen C, Textot MD, Andrew C, Novick MD, Tarazi MD, Victor Klimas MD, Donald G, Viot MD y Marc Pohl MD: Critical Perfusion Pressure for Renal Function in Patients with Bilateral Atherosclerotic Renal Vascular Disease. *Annals of Internal Medicine*, 102:308-314, 1985.
8. Santos RAS, Krieger EM y Greene LJ: An improved fluorimetric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*, 7 (2):244-252, 1985.
9. Borges DR, Limaos EA y Prado JL: Catabolism of vasoactive polypeptides by the perfused rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol*, 295:33-40, 1976.
10. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
11. Andrews P: Estimation of molecular weight of protein by gel filtration. *Biochem J*, 91:222-223, 1964.
12. Ryan J, Oza NB, Martin LC y Pena GA: Components of kallikrein-kinin system in urine. En: *Kinin II. Biochemistry, Pathophysiology and Clinical Aspects*. Fuji S, Myria H and Suzuki T, editors. New York: Plenum Press, 10:313-323, 1978.
13. Alves KB, Casarini DE, Costa RH, Plavnik FL, Portela JE y Marson O: Angiotensin converting enzyme from urine of treated and untreated essential mild hypertensive patients (EHP) with diuretic: partial purification and characterization. *Agents & Actions*, 1992, In press.

Tabla III. Concentración (μ M) del inhibidor que provoca 50 % de inhibición de las actividades de enzimas ordinarias del grupo de control y de los grupos de pacientes tratados y no tratados sobre HHL. Los ensayos de inhibición fueron hechos como se ha descrito en el texto

Inhibidor	Pacientes renovasculares						
	Controles		Sin droga			Con droga	
	A0	A1	B0	B1	B2	C0	C1
EDTA	35	25	25	25	100	20	30
Cl ⁻	300	30	30	30	100	400	25
Captopril	20	75	30	30	50	75	30