

Kátia Regina Maruyama Gomes

Padrão de expressão gênica e localização tecidual
no rato de um novo membro do *Cluster* gênico
da enzima conversora da angiotensina I: variante-4

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Kátia Regina Maruyama

Padrão de expressão gênica e localização tecidual no rato de um novo membro do
Cluster gênico da enzima conversora de angiotensina I : variante-4 / Kátia Regina
Maruyama Gomes. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Sistema renina-angiotensina 2.Expressão gênica 3.Peptídil
dipeptidase A 4.Reação em cadeia da polimerase 5. .Hibridização *in situ* 6.Ratos
wistar

USP/FM/SBD-343/07

Dedico esta tese,

*Aos meus pais Yoshiji e Tsune
Que sempre priorizaram a educação.*

*À minha irmã Isabel Cristina
Pela amizade e o apoio incondicional.*

*À meu marido Everton
Que com amor me deu forças para almejar conquistas.*

*À meu Deus
Pela vida e por todas as vitórias alcançadas.*

Ao **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e pelo seu grande exemplo de dedicação e amor à pesquisa científica.

À amiga **Renata Carmona**, pela credibilidade, pelo carinho e por todo o auxílio fundamental ao desenvolvimento desta tese.

À **Profa. Dra. Sílvia Lacchini**, pela amizade, pela revisão e por todos os ensinamentos experimentais essenciais para a realização desta tese.

À **Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias**, pela amizade e pela orientação técnica em hibridização *in situ* essencial à finalização desta tese.

Ao **Dr. Paulo S. Oliveira**, pelo auxílio em bioinformática o que possibilitou o início deste trabalho.

Ao **Dr. Bryan Strauss**, pelo auxílio na técnica de Northern blotting.

À **Daniela**, pela amizade e pelo auxílio técnico em Real Time PCR.

À **Fernanda e Érika**, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados no início deste trabalho.

Aos amigos **Gustavo, Ayumi e Marcilene**, pelos bons momentos compartilhados.

Ao **Leandro Cardoso**, pela amizade e paciência para a aquisição dos animais.

À **Maúde, Silvana e Isabel Cristina**, pela amizade e por todo desprendimento em sempre ajudar nos assuntos burocráticos.

Ao **Márcio Chaves**, pela amizade e pelo suporte na histologia.

Ao **Dr. Luciano Borges**, pela amizade e sugestões.

Ao **Allysson**, pela amizade e pelos divertidos momentos no laboratório.

Aos amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho: **Jô, Beatriz, Márcio, Mariliza, Giovanna, Thaiz, João, Débora, Juliana, Luciene, Helena, Arruda, Janilton e Dona Antônia**.

À entidade de fomento **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido que possibilitou a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

Sumário

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	11
3. MÉTODOS	13
3.1 Animais	14
3.2 Protocolo Experimental para o Painel de Expressão	14
3.2.1 Painel de Expressão: Pool para Trinta Tecidos	15
3.2.2 Painel de Expressão: Individual de Nove Tecidos	15
3.3 Extração de RNA	16
3.4 Síntese do cDNA	17
3.5 Desenho dos oligonucleotídeos para o RT-PCR e qRT-PCR	17
3.6 Oligonucleotídeos dos Genes Endógenos (Normalizadores)	20
3.7 Transcrição Reversa (RT-PCR)	21
3.8 Avaliação Eletroforética dos Produtos de Amplificação	21
3.9 Real Time Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)	22
3.9.1 Curvas de Eficiência	24
3.9.2 Curvas de Amplificação	25
3.9.3 Curvas de Dissociação	26
3.10 Protocolo Experimental para Hibridização <i>in Situ</i>	27
3.10.1 Construção das Sondas para Hibridização <i>in situ</i> e Northern blotting.....	29
3.10.2 Pré- hibridização	32
3.10.3 Transcrição da Sonda e Marcação com o Radioisótopo ³⁵ S	33
3.10.4 Transcrição da Sonda e Marcação com a Digoxigenina	34
3.10.5 Hibridização <i>in Situ</i>	35
3.10.6 Lavagem pós-hibridização	36

3.10.7	Procedimentos de Revelação	38
3.10.8	Análise de Imagem	39
3.11	Northern Blotting	40
3.11.1	Preparação das amostras de RNAm	40
3.11.2	Preparação do gel de agarose 1,5%	41
3.11.3	Eletroforese	41
3.11.4	Ponte de transferência	42
3.11.5	Hibridização da membrana com sondas radioativas	43
4.	RESULTADOS	45
4.1	Análise da Expressão RT-PCR das 4 Variantes	46
4.2	Análise da Expressão QRT-PCR das 4 Variantes	51
4.3	Análise de Hibridização <i>in situ</i>	55
4.4	Northern Blotting	73
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÃO	81
7.	ANEXOS	83
8.	REFERÊNCIAS	93

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema do <i>cluster</i> da ECA. Representação dos quatro transcritos correspondentes às isoformas da ECA	9
Figura 2.	Desenho esquemático da estrutura gênica das quatro Variantes do <i>cluster</i> gênico da ECA	19
Figura 3.	Desenho esquemático da estrutura gênica das quatro Variantes do <i>cluster</i> gênico da ECA	30
Figura 4.	Representação esquemática da ponte de transferência para northern blot	43
Figura 5.	Análise RT-PCR do mRNA da Var-1 nos 30 tecidos de rato	47
Figura 6.	Análise RT-PCR do mRNA da Var-2 nos 30 tecidos de rato	48
Figura 7.	Análise RT-PCR do mRNA da Var-3 nos 30 tecidos de rato	49
Figura 8.	Análise RT-PCR do mRNA da Var-4 nos 30 tecidos de rato	50
Figura 9.	Valor relativo de expressão de mRNA das Variantes 1, 2, 3, e 4 em 30 tecidos de rato (n=5 pool) por QRT-PCR	52
Figura 10.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de nove tecidos de rato (n = 10) por QRT-PCR	54
Figura 11.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 1, 2 e 3 marcada com ³⁵ S-UTP	56
Figura 12.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 1, 2 e 3 marcada com ³⁵ S-UTP	57
Figura 13.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ³⁵ S-UTP anti-sense	58
Figura 14.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ³⁵ S-UTP anti-sense	59

Figura 15.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ³⁵ S-UTP anti-sense	60
Figura 16.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ³⁵ S-UTP	61
Figura 17.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ³⁵ S-UTP	62
Figura 18.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ³⁵ S-UTP	63
Figura 19.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	64
Figura 20.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	65
Figura 21.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	66
Figura 22.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	67
Figura 23.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	68
Figura 24.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	69
Figura 25.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	70
Figura 26.	Análise de hibridização <i>in situ</i> , cortes seriados em testículo	71
Figura 27.	Análise de hibridização <i>in situ</i> em coração	72
Figura 28.	Análise de Northern blotting	73
Figura 29.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	85

Figura 30.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	86
Figura 31.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	87
Figura 32.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	88
Figura 33.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	89
Figura 34.	Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR	90

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Seqüência de Oligonucleotídeos	18
Tabela 2.	Seqüência de Oligonucleotídeos dos Genes Endógenos	20
Tabela 3.	Seqüência de Oligonucleotídeos para Hibridização <i>in situ</i> e Northern blotting.....	30

Lista de Abreviaturas

A	adenina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
C	citosina
cDNA	DNA complementar
Ct	números de ciclo
dATP	desoxi-adenosina trifosfatada
dCTP	desoxi-citidina trifosfatada
DEPC	dietil-pirocarbonato
dGTP	desoxi-guanosina trifosfatada
DIG	digoxigenina
Dig-UTP	digoxigenina-trifosfato de uracila
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxi-timidina trifosfatada
ECA	enzima conversora de angiotensina I
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EST	etiqueta de expressão (do inglês, expressed sequence tag)
G	guanina
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GB	<i>genius buffer</i>
HCFM/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
mmHg	milímetro de mercúrio
NaCl	cloreto de sódio
NBT	azul de nitrotetrazólio
°C	grau Celsius
pb	pares de base

PBS	salina tampão fosfato
PCR	reação de polimerização em cadeia (do inglês, Polimerase Chain Reaction)
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
qRT-PCR	Real Time PCR
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_{sin}	inibidor de RNase
RT-PCR	transcrição reversa PCR
SRA	sistema renina-angiotensina
SSC	tampão citrato de sódio
T	timina
TAE	Tris-acetato EDTA
TEA-HCl	trietanolamina-ácido clorídrico
T_m	temperatura de dissociação
U	unidade
Var	Variante

Gomes KRM. **Padrão de expressão gênica e localização tecidual no rato de um novo membro do *cluster* gênico da enzima conversora da angiotensina I: variante-4** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 101p.

O sistema renina-angiotensina (SRA) é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia cardiovascular. A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é um elemento crítico na cascata de ativação das diversas substâncias ativas do SRA. Evidências obtidas em nosso laboratório por análise de genômica comparativa e confirmadas através de clonagem de segmentos de cDNA sugerem que esta família de proteínas está incompleta. Nossos dados apontam para existência de duas novas isoformas da ECA, que aqui denominaremos Variante-3 (Var-3) e Variante-4 (Var-4), localizadas no mesmo *locus* da ECA. Neste trabalho, analisamos simultaneamente o padrão de expressão das 4 Variantes da ECA e ECA2 em 30 tecidos do rato utilizando a técnica de qRT-PCR. A Variante 4, cuja ação ainda é desconhecida e está sendo investigada em nosso laboratório, apresenta predominantemente expressão no testículo e em quantidade relativamente baixa no ventrículo esquerdo. Utilizando a técnica de hibridização *in situ* no testículo, verificamos que a marcação positiva da Var-4 pode ou não ser co-localizada com a Var-2 dependendo do estágio celular em que se encontra no túbulo seminífero. Verificou-se que as espermátides redondas são as células que expressam a Var-4 nos túbulos seminíferos. Em conjunto, estes dados mostram que as Variantes 1, 2, 3 e 4 da ECA apresentam expressão tecido-específica. O padrão de expressão da Var-4, principal objeto deste trabalho, é consistente com a idéia de que esta variante gênica pode estar envolvida com o controle da espermatogênese e em processos cardíacos, até então não caracterizados.

Descritores: Sistema renina-angiotensina, expressão gênica, peptidil dipeptidase A, reação em cadeia da polimerase, hibridização *in situ* e ratos wistar.

Gomes KRM. **Gene and tissue expression pattern of a novel member of the angiotensin converting enzyme-I gene cluster in the rat: variant-4.** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 101p.

The renin-angiotensin system (RAS) is essential to maintain the cardiovascular homeostasis. The angiotensin-converting enzyme (ACE) is a critical point in the biochemical activation of several active substances, notably angiotensin II. Evidence obtained in our laboratory using comparative genomic analysis and confirmed by cDNA cloning suggests that this protein family is incomplete and point to the existence of two new isoforms of ACE that from now on are denominated Variant-3 (Var-3) and Variant-4 (Var-4), located within the same ACE locus. In the present work we simultaneously analyzed the expression pattern of the 4 ACE gene variants in 30 different tissues of rats. The variant 4, whose mechanism of action remains unknown and it is being presently investigated in our laboratory is mainly expressed in testis and in relatively low quantity in left ventricle. Using *in situ* hybridization technique in testis, we verified that positive labeling of Var-4 is distinct from Var-2, suggesting that they may play distinct functions during the spermatogenesis process. Taking together, we provide direct evidence that the ACE gene locus contain, 4 variants instead of 2 and they show a specific cell tissue pattern of expression. Mostly important, the Var-4 is primarily expressed in testis and the data suggest that it may be involved with spermatogenesis control, and in cardiac processes presently unknown.

Descriptors: Renin-angiotensin system, gene expression, pepdil dipeptidase A, polimerase chain reaction (PCR), in situ hibridization and wistar rats.

Introdução

1. Introdução

Os seres vivos são dotados de vários sistemas biológicos para a manutenção da homeostase cardiovascular. Tais sistemas são compostos de um conjunto de peptídeos, enzimas e pró-hormônios, que atuam em muitos casos de maneira redundante, e que permitem ao indivíduo responder a variações no meio interno ou responder a estímulos externos.

Entre os vários sistemas enzimáticos de controle responsáveis pela regulação cardiovascular, um dos mais importantes é o sistema renina-angiotensina (SRA). Este sistema consiste numa cascata de reações, onde os pontos limitantes são o substrato primário (o angiotensinogênio) e duas enzimas (renina e enzima conversora de angiotensina I), que, em última análise, representam a principal via de produção de angiotensina II (principal efector do sistema)¹.

Componentes do Sistema Renina-Angiotensina

Estudos mais recentes, utilizando ferramentas de biologia molecular, permitiram identificar os componentes do SRA em diferentes tecidos.

A **renina** é uma enzima proteolítica secretada e armazenada pelas células justaglomerulares do rim. A renina é sintetizada na forma de pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina, que pode ser liberada diretamente na circulação ou ser convertida em renina ativa e armazenada em grânulos secretores ².

A maior parte da renina circulante é proveniente do rim, embora possa haver outras fontes de renina, como o útero, placenta, cérebro, supra-renais, artérias e veias, entre outros locais ^{3, 4, 5}.

Quando é liberada na circulação, a renina cliva o **angiotensinogênio** em um único sítio, formando a **angiotensina I**, constituída de 10 aminoácidos (decapeptídeo), que não tem ações biológicas conhecidas. O angiotensinogênio do plasma humano é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, constituída de 25 aminoácidos de peso molecular variável, dependendo do grau de sua glicosilação ⁶.

A angiotensina I, por sua vez, é clivada pela **enzima conversora de angiotensina I**, localizada nas células endoteliais, produzindo a **angiotensina II**, considerada o principal efector do sistema ⁷. Apesar da angiotensina II ser o peptídeo ativo mais importante do sistema renina-angiotensina, outras angiotensinas produzidas têm ações específicas, tais como as angiotensinas III e IV e a angiotensina-(1-7) ⁸.

Entre muitas das ações conhecidas, a angiotensina II estimula a reabsorção de sódio ⁹, tem ação vasoconstritora direta sobre os vasos de resistência, facilita a liberação de noradrenalina e reduz sua recaptção, potencia a liberação de catecolaminas pela adrenal, e aumenta o tônus simpático ¹⁰.

A angiotensina II exerce suas amplas ações, ligando-se a receptores específicos identificados primeiramente por Lin e Goodfried ¹¹, em 1970, localizados na membrana plasmática de vários tecidos. Inicialmente foram identificados os subtipos AT₁ e AT₂ ¹². Sasamura *et al* ¹³ clonaram e caracterizaram duas isoformas do AT₁ em camundongo : AT_{1A} e AT_{1B}. Além disso, sabe-se que as ações dos receptores AT₂ funcionalmente se opõem às ações dos receptores AT₁ ¹⁴. A capacidade dos receptores AT₁ de manterem a pressão sanguínea e de regular a homeostase eletrolítica e hídrica é bem estabelecido e confirmado por modelos transgênicos. Os receptores AT₂ são anti-proliferativos e pró-apoptóticos, sendo que seus mecanismos de sinalização são variados e não são ainda bem compreendidos, mas podem envolver ativação da proteína G, estimulação de fosfatases e modulação dos canais de K⁺ e Ca⁺ ¹⁵.

Sistema Renina-Angiotensina (SRA) Tecidual

A via de biossíntese dos componentes do SRA endócrino é bem conhecida como constituída de angiotensinogênio hepático, que é hidrolizado pela enzima renina nos rins. Resultando em angiotensina I, que é posteriormente convertida a angiotensina II pela ECA no pulmão.

No entanto, vários tecidos incluindo cérebro, hipófise, vasos sanguíneos, coração, rins, glândulas adrenais e placenta, expressam RNAm para angiotensinogênio, renina, ECA e para os receptores da angiotensina II ^{7, 10, 16, 17, 18}. Leung *et al* ¹⁹, em 1999 demonstraram a expressão de mRNA do

angiotensinogênio pelo epitélio epididimal em rato. Esses dados sugerem a existência de um SRA tecidual, no qual todos ou alguns de seus componentes são formados localmente e que este sistema é independente do SRA hepático/renal. Porém, o significado fisiológico e patológico destes sistemas ainda não foi completamente elucidado (pois experimentalmente é difícil dosar as quantidades dos diferentes componentes em cada tecido ou conjunto de células e de separar o que é proveniente da produção local daquilo que se origina à distância).

A Enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A enzima conversora de angiotensina I foi isolada pela primeira vez em 1956²⁰. Além de clivar a angiotensina I, essa enzima cliva também uma série de outros peptídeos, como a bradicinina²¹.

Estudos recentes demonstraram a expressão gênica da ECA em diferentes tecidos, tendo sido possível identificar duas formas distintas de ECA: a ECA somática (ECAs), produzida no endotélio vascular e em outros epitélios, e a ECA testicular (ECA_t), expressa quase exclusivamente nos testículos e que tem um papel crucial na formação dos espermatozoides, e com traços de expressão no jejuno, pâncreas e baço^{22, 23, 24}.

Mais recentemente, dois grupos publicaram trabalhos paralelos e independentes, revelando um novo gene homólogo humano da ECA, que foi

chamado de ECA2²⁵ ou ECAH²⁶ localizada no cromossomo Xp22. Trata-se de uma carboxipeptidase, associada à membrana e que é expressa predominantemente pelo endotélio e que não sofre a ação dos inibidores da ECA. É altamente expressa nos testículos, tecidos renais e cardiovasculares, e tecidos do sistema gastrointestinal²⁴. A ECA2 catalisa a clivagem de Ang I para Ang1-9 e pode ter um papel importante no Sistema Renina-Angiotensina no coração e rim^{25,27}.

Vias Alternativas na Produção de Angiotensina II

A formação de angiotensina II, através de outras peptidases que não a enzima conversora de angiotensina I, é denominada na literatura como via alternativa de geração de angiotensina II.

A primeira descrição bioquímica de uma dessas vias foi realizada por Boucher *et al*²⁸ em 1974, onde demonstraram que a tonina, extraída da glândula salivar de rato, era capaz de clivar a angiotensina I, formando a angiotensina II *in vitro*. Posteriormente descobriu-se que várias proteases têm a capacidade de gerar angiotensina II, a partir da angiotensina I ou do próprio angiotensinogênio, tais como a tripsina e calicreína^{29,30}, a catepsina G³¹, e uma quimiotripsina³².

Mais recentemente, uma serina-proteinase tem recebido muita atenção pela sua grande importância como via alternativa de geração de

angiotensina II em vários locais, principalmente no coração e nos vasos sanguíneos, denominada de quimase, e que foi identificada nos mastócitos da pele humana por Schechter *et al*³³. Em conjunto, a maior parte destas evidências foi obtida em estudos *in vitro* e por isso o papel destas vias alternativas *in vivo* permanece pouco conhecido.

Um Novo Membro do *Cluster* Gênico da ECA (Enzima Conversora da Angiotensina I): Variante-4

Em nosso laboratório, utilizando ferramentas de genômica comparativa, obtivemos evidência da existência de uma região altamente conservada entre espécies (homem, rato, camundongo, cachorro, vaca) imediatamente a jusante do que hoje chamamos gene da ECA. Essas seqüências estão localizados na banda citogenética 17q23.3 em humano, 10q32.1 em rato e 11qE1 em camundongo, entre os genes da ECA e ERG. Estudos preliminares utilizando clonagem por PCR utilizando cDNAs de rato e camundongo evidenciaram que estas seqüências estão associadas a formação de 2 novas isoformas da ECA e, por isso, passaremos a denominar a ECA somática de Variante-1 (Var-1), a ECA testicular de Variante-2 (Var-2) e as novas isoformas de Variante-3 (Var-3) e de Variante-4 (Var-4), como ilustrado na figura 1.

Estudos em nosso laboratório (resultados não publicados) evidenciaram que a Var-3 (estudada em *Rattus norvegicus*) possui 27 éxons

distribuídos em 31.1Kb e produz um mRNA de 4.279bp. A Var-3 é homóloga à Var-2 e à Var-4, respectivamente na porção N-terminal e C-terminal, e apresenta dois sítios catalíticos de metaloprotease, sendo o da porção N-terminal idêntico ao da Var-2 e o C-terminal à da Var-4.

Por sua vez, a Variante-4 possui uma taxa de 64,1% de identidade com a Var-2 na sequência de nucleotídeos e 55% na composição de aminoácidos. A molécula da Var-4 possui uma porção transmembrana e um sítio ativo que a caracterizaria como uma metaloprotease, com alta similaridade com o sítio da ECA, exceto pela substituição do ácido glutâmico pela glutamina no domínio catalítico (HEMGH). A molécula protéica da Var-4 é composta por 737 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular estimada de aproximadamente 85,5KDa.

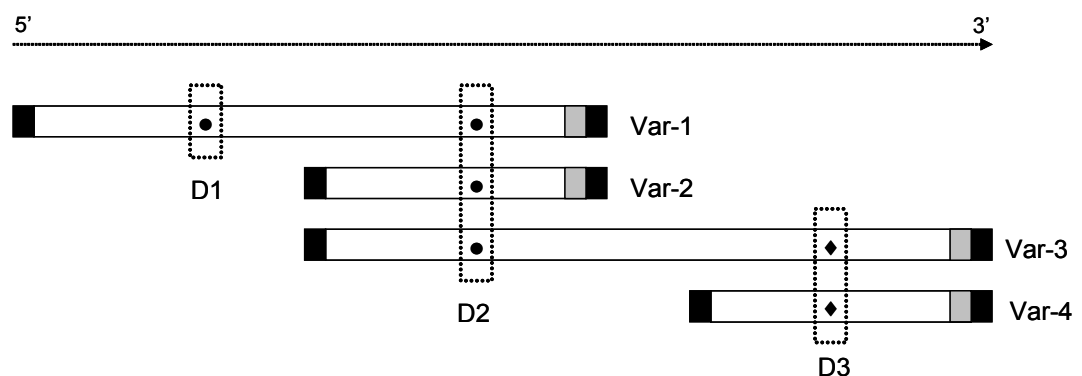


Figura 1. Esquema do *cluster* da ECA. Representação dos quatro transcritos correspondentes às isoformas da ECA: ECA somática (Var-1); ECA testicular (Var-2); Variante-3 (Var-3) e Variante-4 (Var-4). As regiões em negro nas extremidades representam as seqüências não traduzidas (5' e 3'UTRs). As regiões cinzas indicam a porção transmembrânica de cada isoforma. Os domínios catalíticos estão representados como D1, D2 e D3, sendo que símbolos iguais representam domínios iguais. As dimensões não estão em escala.

Mais recentemente, dados sobre a existência de transcritos provenientes desta seqüência foram evidenciados em bancos públicos como dados de expressão em humanos disponíveis nas bases de dados do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), na forma de etiquetas produzidas por análise em série de expressão gênica (SAGE) e por etiquetas de seqüências expressas (ESTs). Por exemplo, em tumor de próstata, identifica-se o expresso pela etiqueta SAGE: TCTAATTGCT (Biblioteca PR317), enquanto que em homogeneizados de pulmão fetal, testículo e linfócito B na AI915342 estão disponíveis da Biblioteca Soares_NFL_T_GBC_S1.

Além disso, existência do gene ortólogo (Variante-4) em rato é mostrada pela EST CK476758 (biblioteca de pulmão) e ESTs CK470709 e CK471101 (biblioteca de testículo).

Em humanos, Rella *et al*³⁴ em 2007 não encontraram evidências de que a Var-4 (denominada de ACE3 naquele trabalho) seja expressa, e que a presença de deleções e inserções na seqüência indicariam que esse gene seria um pseudogene. Porém, em nosso laboratório verificamos, através da técnica de RT-PCR, a expressão da Var-4 em testículo humano em diferentes faixas etárias (dados ainda não publicados).

Portanto, as evidências que dispomos no laboratório sugerem que esta família de proteínas está incompleta, e o intuito deste estudo é o

mapeamento da expressão tecidual destes novos componentes do SRA – Variante-3 e Variante-4 – cuja função é desconhecida e está sendo detalhadamente investigada em nosso laboratório.

Objetivos

2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi identificar os tecidos do rato onde existe expressão da Var-4, especialmente no contexto das isoformas da ECA já conhecidas – somática (Var-1) e testicular (Var-2).

Objetivos Específicos:

1. Construção de sondas que permitam a amplificação específica das sequências de cDNA da ECA Var-1, Var-2, Var-3 e da Var-4.
2. Desenvolver sondas para hibridização *in situ* que facilitem identificar os tipos celulares que expressam a Var-4.

Métodos

3. Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 15 ratos Wistar machos e 10 fêmeas, com peso variando entre 300-350g provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da USP. Estes animais foram mantidos no biotério do Instituto do Coração (InCor - HCFMUSP) em condições padrão de iluminação, temperatura e acesso a água e comida por um período mínimo de 7 dias antes dos experimentos. Destes animais, 10 machos e 10 fêmeas foram utilizados para o painel de expressão, 3 machos para o estudo de hibridização *in situ* e 2 machos para o estudo de expressão gênica pela técnica de northern blotting. Os métodos utilizados para os estudos se deram conforme aprovado pela comissão de ética da Instituição.

3.2 Protocolo Experimental para o Painel de Expressão

Os animais foram anestesiados com pentobarbital 100 mg/kg intraperitonal e em seguida sacrificados. Os tecidos coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C até serem processados.

Foram coletados de ratos machos 29 tecidos de cada animal sendo: átrio direito, átrio esquerdo, aorta, baço, bulbo olfatório, cerebelo, cérebro – telencéfalo, esôfago, estômago - antro, estômago - corpo, estômago - fundo,

fígado, glândula salivar submandibular, glândula supra-renal, gordura marrom, gordura peri-epididimal, intestino delgado - duodeno, intestino delgado - íleo, intestino grosso - cólon, medula espinal, músculo gastrocnêmio, pâncreas, pulmão, rim - córtex, rim medula, testículo, tronco encefálico, ventrículo direito, ventrículo esquerdo. O 30º tecido foi o ovário coletado das fêmeas.

3.2.1 Painel de Expressão: Pool (n=5) para Trinta Tecidos

Para este painel foi feito um pool (n=5) do RNA extraído para cada tecido estudado. Utilizou-se 2 µg de RNA de cada animal para o pool de cada tecido. Posteriormente, deste pool de RNA foram utilizados 2 µg para a síntese do cDNA. Esse cDNA foi utilizado para análise inicial em RT-PCR e posterior em qRT-PCR para os genes das variantes 1, 2, 3, 4 e ECA2.

3.2.2 Painel de Expressão: Individual (n=10) de Nove Tecidos

Para esse painel, foram utilizados os RNAs extraídos de 9 tecidos: córtex renal, duodeno, medula renal, músculo esquelético, ovário, pulmão, testículo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. A escolha desses tecidos foi baseada nos resultados do painel de expressão por pool das variantes. Foram utilizados os tecidos coletados para pool com n=5 e feita uma nova coleta de tecidos com mais 5 animais totalizando um n final de 10 animais. Foram utilizados 5µg de RNA para a síntese do cDNA. Esse cDNA foi

utilizado para análise em qRT-PCR dos genes das variantes 1, 2, 3, 4 e ECA2.

3.3 Extração de RNA

As amostras de cada tecido pesando 100 mg foram homogeneizadas no Ultra-turrax T25 em 1 mL de TRIzol[®] Reagent e a extração foi realizada conforme as instruções do fabricante. O TRIzol[®] Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato corresponde a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski & Sacchi ³⁵. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75 % para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC).

Posteriormente, foi realizada a leitura espectrofotométrica das soluções nos comprimentos de onda 260 e 280 nm para a determinação da concentração de RNA total em cada amostra extraída e de uma estimativa do seu grau de pureza a partir da relação A_{260}/A_{280} . A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA) e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos.

3.4 Síntese do cDNA

Foram utilizados 2 µg de RNA (painel em pool) ou 5 µg de RNA (painel individual) para síntese do DNA complementar (cDNA), acrescidos de água tratada com DEPC q.s.p. 10 µL para cada amostra. A amostra foi aquecida à 65 °C por 5 minutos e em seguida colocada em gelo. Foi adicionado ao RNA 10 µL da seguinte mistura: 1x tampão da enzima, 20 U de RNAsin, 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 0,5 µg/µL de oligo (dT) e 200 U de SuperScript™ III Reverse Transcriptase. Incubou-se a solução à 50 °C por 2 horas e 95 °C por 5 minutos. O cDNA obtido foi estocado em freezer -20 °C.

3.5 Desenho dos oligonucleotídeos para o RT-PCR e qRT-PCR

O desenho dos oligonucleotídeos foi feito pelo programa PRIMER 3, desenvolvido pelo Whitehead Institute e Howard Hughes Medical Institute, EUA. Os parâmetros considerados foram: tamanho dos oligonucleotídeos (18 – 23 nucleotídeos), conteúdo de G/C em torno de 50 %, temperatura de anelamento (60 °C), e tamanho do *amplicon* (83 - 211 bp). Foi utilizado o programa de comparação de seqüências BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, para determinar a combinação de oligonucleotídeos mais específica. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Invitrogen Technologies (Brasil) (Tabela 1 e Figura 2).

Os oligonucleotídeos sintetizados foram inicialmente testados na temperatura de anelamento desejada (60 °C) pelo método da PCR convencional. A especificidade do produto de amplificação foi verificada em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídeo (0,5 µg/µL).

Tabela 1. Seqüência de Oligonucleotídeos

Gene	Tipo	Seqüência
ECA somática (Var-1)	Sense	5'- GCCAAGTTTCACATCCCAA - 3'
	Anti-sense	5'- GCAGCACCTGTTGGAGCTT - 3'
Tamanho do amplicon 172 pb		
ECA testicular (Var-2)	Sense	5'- AGGCGAGGCCTGTCTGTTT -3'
	Anti-sense	5'- AGGTATGGTTGGACACTTCCTTG -3'
Tamanho do amplicon 209 pb		
Var-3	Sense	5'- GTCCAGTCGCGTCAACTTC -3'
	Anti-sense	5'- TTGTACTTTGGCACCCGG -3'
Tamanho do amplicon 211 pb		
Var-4	Sense	5'- GGGAGAGCCAAGCTTAGATGAGT -3'
	Anti-sense	5'- CAACTCGGGCTGTTTGCT -3'
Tamanho do amplicon 83 pb		
ECA2	Sense	5'- CGCTGTCACCAGACAAGAA -3'
	Anti-sense	5'- GCCATTATTTTCGTCCAATCC -3'
Tamanho do amplicon 139 pb		

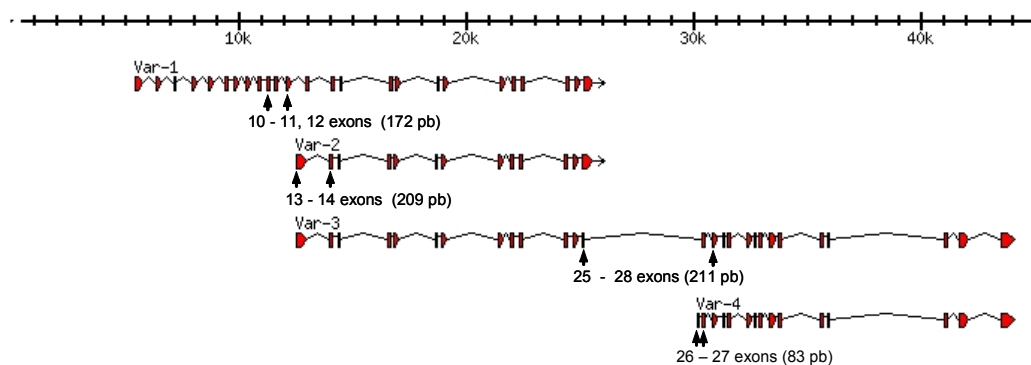


Figura 2. Desenho esquemático da estrutura gênica das quatro variantes do *cluster* gênico da ECA. Setas indicam localização dos exons onde foram construídos os oligonucleotídeo para RT-PCR e qRT-PCR.

3.6 Oligonucleotídeos dos Genes Endógenos (Normalizadores)

Os genes endógenos testados foram: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -actina e ciclofilina (Tabela 2). Como não houve diferença no padrão de expressão entre os normalizadores (Anexo B), escolhemos a ciclofilina como normalizador para apresentar os resultados.

Tabela 2. Seqüência de Oligonucleotídeos dos Genes Endógenos

Gene	Tipo	Seqüência
GAPDH	Sense	5'- ATGGTGAAGGTCGGTGTG -3'
	Anti-sense	5'- GAACTTGCCGTGGGTAGA -3'
Tamanho do amplicon 163 bp		
β-actina	Sense	5'- CGT TGACATCCGTAAAGACC -3'
	Anti-sense	5'- GCCACCAATCCACACAGA -3'
Tamanho do amplicon 173 bp		
Ciclofilina	Sense	5'- AATGCTGGACCAAACACAAA -3'
	Anti-sense	5'- CCTTCTTTCACCTTCCCAA -3'
Tamanho do amplicon 101 bp		

3.7 Transcrição Reversa (RT-PCR)

A amplificação dos segmentos de cDNA foi realizada utilizando 12,5 μ M de cada primer correspondente a cada variante. Adicionou-se 125 ng de cDNA, 4,5 μ L de tampão da PCR com dNTP a 0,4 mM cada (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,25 μ L de DMSO, 0,125 μ L de Easy Taq DNA polimerase (5 U/ μ L), e completou-se o volume final para 25 μ L com água deionizada estéril.

A reação em cadeia pela polimerase foi realizada em um termociclador modelo PTC-225, obedecendo-se à seqüência de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos compostos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, hibridização a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, e finalmente um ciclo de extensão a 72 °C por 10 minutos.

3.8 Avaliação Eletroforética dos Produtos de Amplificação

A partir da obtenção dos produtos da reação da PCR, foram adicionados 2 μ L glicerol 87 % com tampão de amostra 1x, e alíquotas de 15 μ L de cada amostra foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 3 ou 4 %, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. O gel foi submerso em cuba horizontal com tampão TAE 1x, e a eletroforese realizada a 115 Watts por aproximadamente 1 hora.

As bandas foram visualizadas por meio da incidência de radiação ultravioleta em uma câmara escura equipada com um transluminador e uma câmera digital de aquisição de imagem (Eagle Eye, Stratagene) acoplada a um microcomputador.

Tampão de amostra 6x: 95 % de formamida; 20 μ M de NaOH e 0,05 % dos corantes azul de bromofenol e xilenocianol.

TAE 1x: 40 mM Tris-acetato; 2 mM EDTA.

Gel de agarose 3 e 4 %: 3 g de agarose; 4 g de agarose, completar para 100 mL com TAE 1x.

3.9 Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

A análise quantitativa da expressão foi realizada por qRT-PCR, usando o sistema de detecção ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foi realizada inicialmente uma padronização do método que inclui: escolha do normalizador adequado; teste de eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos; determinação da quantidade de cDNA molde; ajustes na concentração final dos oligonucleotídeos e avaliação das condições de termociclagem.

A cinética de amplificação desse sistema é dividida nas seguintes fases:

1) Fase Geométrica: apresenta alta precisão na duplicação do número de moléculas da reação a cada novo ciclo. Todos os reagentes estão presentes em quantidades suficientes para que todas as moléculas repliquem com máxima eficiência. Os dados foram coletados nessa fase.

2) Fase Linear: nesta fase a produção de novas cadeias de DNA passa de uma progressão geométrica para uma progressão linear, devido à redução de reagentes.

3) Fase de Platô: a eficiência de amplificação diminui drasticamente para níveis insignificantes, com baixa ou nenhuma produção de novas cadeias de DNA.

O método de quantificação usado foi o SYBR® Green PCR Máster Mix, que é um agente fluorescente que se intercala em fitas duplas de DNA, e emite grande quantidade de fluorescência. Desta forma, a detecção do aumento de produtos de PCR gerados ao longo de cada ciclo, é feito proporcionalmente ao aumento da fluorescência emitida pelo SYBR® Green PCR Master Mix. No método, o equipamento detecta, a cada ciclo, uma elevação de sinal fluorescente e constrói uma curva de amplificação em tempo real (intensidade de fluorescência x curva).

Para o painel individual (n=10) foram utilizados três normalizadores: ciclofilina, β -actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Contudo, não foi observada diferença no padrão de expressão entre os três normalizadores utilizados (Anexo B).

O controle endógeno normaliza a amplificação do gene alvo, obtendo um valor real de expressão do alvo em relação ao total de RNA utilizado na

reação. As reações foram feitas em triplicatas, a fim de garantir a consistência dos dados coletados.

3.9.1 Curvas de Eficiência

Foram feitas curvas de amplificação com quantidades conhecidas de cDNA, para determinar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos e o nível de expressão tecidual de cada variante. Foram realizadas diluições seriadas de 50 ng/ μ L, 25 ng/ μ L, 12,5 ng/ μ L e 6,25 ng/ μ L, a partir do cDNA estoque (100 ng/ μ L). Foi verificada a relação entre a quantidade inicial de amostra e o número de ciclos obtidos em uma determinada fluorescência (Ct). O esperado é que, a cada ciclo, dobre a quantidade de produto formado.

Determinando-se um nível de fluorescência e o número de ciclos necessários para amplificar quantidades diferentes de cDNA inicial, é possível fazer a correlação desses dois fatores. O valor de R^2 gera o fator de correlação entre os pontos de diluição e o Ct obtido, e a inclinação da reta (slope) determina a eficiência de amplificação da reação. Uma reação onde ocorre a duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo (100 % de eficiência), terá uma inclinação de -3,32 e coeficiente de correlação igual a -1, quando todos os pontos da curva estiverem coincidentes ao Ct esperado. Por meio dessas análises, foi possível determinar a melhor quantidade de amostra para cada par de oligonucleotídeos desenhado.

Em alguns casos não foi possível a detecção de expressão gênica pela técnica utilizada. Isto ocorreu por não termos nestes casos uma eficiência de amplificação aceitável e está indicada por um asterisco (*) nos resultados onde tenha ocorrido.

3.9.2 Curvas de Amplificação

A quantificação relativa da expressão das variantes em tecidos de ratos foi iniciada após ter sido determinada a melhor concentração inicial de cDNA para cada par de oligonucleotídeo. Todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 amostras. Foi utilizado para reação: 1 μ L de cDNA (concentração previamente definida pela curva de diluição); 0,32 μ L de cada oligonucleotídeo (200 nM) sense e anti-sense específico para cada variante; 10 μ L do 2x SYBR Green PCR Master Mix e 8,36 μ L de água DEPC, no volume total de 20 μ L.

O programa de amplificação utilizado foi: 95 °C por 10 minutos para ativação da AmpliTaq DNA Polymerase; 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (anelamento do primer e extensão). Ao final de cada ciclo foi feita a coleta do sinal de fluorescência. O software quantifica a intensidade da fluorescência dada pelo SYBR e normaliza pelos dados de fluorescência obtidos pelo ROX (referência passiva). Este procedimento corrige as diferenças causadas por flutuações não

relacionadas à termociclagem, como volume de reação ou evaporação. Foi utilizado um controle negativo de amplificação, que consistiu de uma reação sem o cDNA, a partir de uma mesma mistura de reagentes das amostras experimentais e na mesma placa óptica, possibilitando a exclusão de contaminação.

3.9.3 Curvas de Dissociação

A curva de dissociação foi realizada após a reação de qRT-PCR, para determinar a especificidade dos produtos de PCR formados. Reações que apresentaram curvas de dissociação com picos de T_m menores que o produto de PCR específico (formação de dímeros de primer) ou com mais de um pico (formação de produtos não-específicos) foram descartados e novos oligos desenhados.

Os gráficos da curva de dissociação foram obtidos pelo programa Dissociation Curve 2.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA).

3.10 Protocolo Experimental para Hibridização *in Situ*

O procedimento de hibridização *in situ* é um método extremamente sensível e considera os princípios de pareamento de bases da dupla-fita que forma a estrutura do DNA. Uma sonda de fita simples marcada liga-se especificamente a uma fita de RNA mensageiro simples complementar e, dessa forma, ocorre o processo de hibridização. O cuidado primordial com o material a ser hibridizado é que esteja livre da enzima ribonuclease (RNase).

O procedimento de hibridização *in situ* foi realizado conforme proposto pela Profa. Dra. Carol Fuzeti Elias, do Laboratório de Neuroanatomia Química, do Departamento de Anatomia do ICB/USP.

Os animais (3 ratos machos wistar) foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico 100 mg/kg e sacrificados. Em seguida, foi feita a perfusão, primeiramente com soro fisiológico e cloreto de potássio 42 mmol (10 minutos), e posteriormente com paraformaldeído 4 % (10 minutos) para fixação completa dos tecidos. A perfusão foi feita sob pressão constante de 80mmHg através de agulha inserida no ventrículo esquerdo, e concomitante dissecação do átrio direito. Os tecidos (coração, pulmão, rim e testículo) foram retirados, dissecados e armazenados em paraformaldeído 4 % por 24 horas na geladeira. Os tecidos foram colocados em cassetes plásticos histológicos e processados em álcool 95 % (2x), álcool 100 % (4x), citrisolv (3x) e paraplast (3x) em processador Leica TP1020 com ciclo total de 12 horas (realizando a desidratação, diafanização e parafinização do material). Foi realizada a inclusão dos tecidos em paraplast (com o próprio

cassete plástico para identificação), utilizando inclusive Leica EG1160. Os tecidos foram cortados em micrótomo Microm HM 200 em cortes seriados de 8µm e dispostos em lâminas livres de RNases (Fisherbrand® Superfrost®/Plus). Estas lâminas foram mantidas a 4 °C para tratamento pré-hibridização.

As hibridizações foram feitas em 3 etapas:

1) Hibridização com radioisótopo nos tecidos: testículo, coração, pulmão e rim utilizando as sondas M1, M2 e M3. Porém, para o gene de interesse deste estudo (Var-4), a expressão foi positiva apenas em testículo. Por isso, nas etapas posteriores foi feita apenas a hibridização em testículo.

2) Hibridização com dupla marcação (digoxigenina e radioisótopo), usando as sondas M2 e M3, respectivamente.

3) Hibridização com dupla marcação (digoxigenina e radioisótopo) e com radioisótopo para as sondas M2 e M3, e coloração pelo método PAS.

As lâminas foram preparadas em séries e hibridizadas na primeira etapa com o radioisótopo, obedecendo a seguinte seqüência: lâmina 1 – sense M1; lâmina 2 – anti-sense M1; lâmina 3 – sense M2 ; lâmina 4 – anti-sense M2; lâmina 5 – sense M3 e lâmina 6 – anti-sense M3. Na segunda etapa, foi feita a dupla marcação com radioisótopo (M3) e digoxigenina (M2) em testículo, e foi feita outra série de lâminas: lâmina 1 – sense e lâmina 2 – anti-sense. Na terceira etapa, para a confirmação do tipo celular, outra série de lâminas foi preparada: lâmina 1 – sense M2; lâmina 2 – anti-sense M2; lâmina - 3 – anti-sense M3; lâmina 4 – sense M3; lâmina 5 – PAS método de coloração (ácido periódico de Schiff) e lâmina 6 – dupla marcação

(digoxigenina - M2 e radioisótopo - M3). Durante a fase de espermiogênese, as espermátides jovens possuem núcleos arredondados com capuz acrossômico PAS-positivo, ou seja, através do método do PAS é possível detectar as glicoproteínas no acrossomo em desenvolvimento de espermátides adjacentes do lúmen do túbulo seminífero.

A montagem em série das lâminas neste experimento foi viável, porque em roedores, os estágios ou associações celulares estão alinhados em uma ordem consecutiva (Anexo D).

3.10.1 Construção das Sondas para Hibridização *in situ* e Northern blotting

Os esquemas abaixo (Tabela 3 e Figura 3) mostram as seqüências e a localização dos exons respectivamente onde foram construídos os oligonucleotídeos das variantes para as sondas de hibridização *in situ* e Northern blotting. As sondas foram classificadas em módulos: módulo 1 (M1), localiza Var-1; módulo 2 (M2), localiza Var-1, 2, e 3 e módulo 3 (M3), localiza Var-3 e 4. Devido às regiões de identidade entre as variantes, a análise de hibridização *in situ* foi baseada na correlação dos três módulos.

Tabela 3. Seqüência de Oligonucleotídeos para Hibridização *in situ* e Northern blotting

Sonda (Genes)	Tipo	Seqüência
Módulo 1	Sense	5'- ACAGCTATAACTCGAGTG -3'
(Var-1)	Anti-sense	5'- ATGTCGTAAATGTTCTCC - 3'
Tamanho do amplicon 736 pb		
Módulo 2	Sense	5'- AAGGATGGGCTACTCCAGGA -3'
(Var-1, Var-2 e Var-3)	Anti-sense	5'- AGGTATGGTTGGACACTTCCTTG -3'
Tamanho do amplicon 489 pb		
Módulo 3	Sense	5'- AGGATCCCTGTTCTCTTGGCAATGG -3'
(Var-3 e Var4)	Anti-sense	5'- GTTCCAGGTCTTCCT CCAG -3'
Tamanho do amplicon 720 pb		

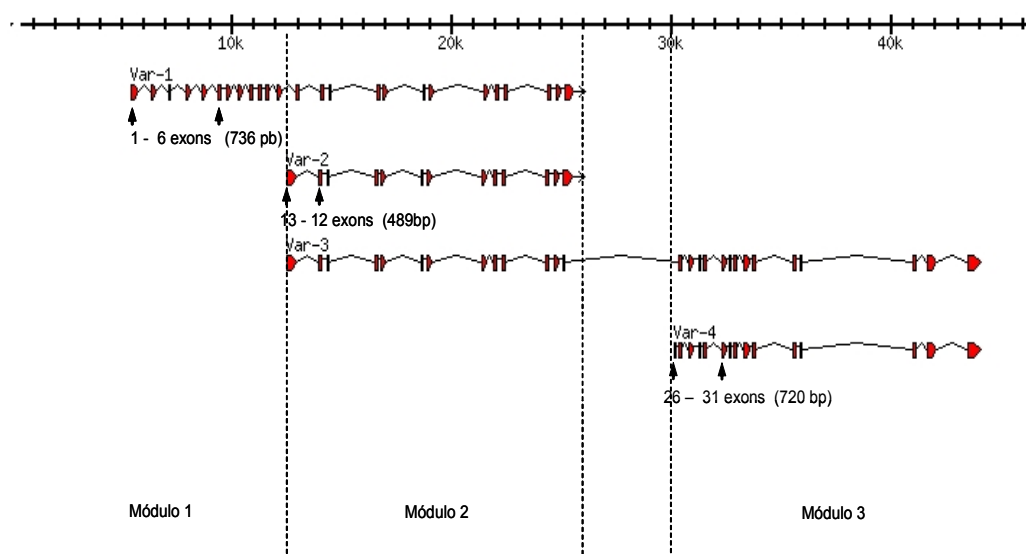


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura gênica das quatro variantes do *cluster* gênico da ECA. Setas indicam localização dos exons onde foram construídos os oligonucleotídeos das variantes para as sondas de hibridização *in situ* e Northern blotting, e os módulos.

Para a construção das sondas, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos dos módulos acima citados e feita a amplificação da seqüência escolhida pela PCR. O DNA amplificado foi purificado do gel de agarose com kit da QIAGEN. Aproximadamente 750 ng de DNA foi ligado ao vetor comercial pCR[®]4-TOPO[®], TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing, Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante (Anexo A). Em seguida, foi feita a transformação por choque térmico em bactéria competente (*Escherichia coli* do tipo DH5- α). Posteriormente essas bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB + 50 μ g/mL de ampicilina e deixadas na estufa 37 °C por 14-16 horas. Das colônias que cresceram, foram escolhidas algumas para serem inoculadas em meio líquido LB + 50 μ g/mL de ampicilina e preparadas *mini Prep* com o kit da QIAGEN para extração do DNA plasmidial. Para a confirmação dos clones positivos e o sentido destes (sense ou anti-sense) foi feita a PCR utilizando oligonucleotídeos M₁₃. Os clones confirmados pela PCR foram enviados para sequenciamento. Após a escolha do melhor clone foi feita *maxi prep* com o kit da QIAGEN seguindo o protocolo do fabricante.

O vetor foi linearizado com as enzimas Spe I ou Not I para termos a sonda sense e anti-sense, baseado na direção que tenha entrado o inserto no vetor após análise de sequenciamento. É importante que as enzimas produzam extremos 5' protuberantes ou abruptos, para que a síntese da ribossonda seja altamente específica. A digestão foi verificada em gel de agarose, lado a lado com plasmídeo intacto. A digestão foi extraída uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e uma vez com clorofórmio: álcool

isoamílico, a partir desta etapa, tudo RNase-free. Foi adicionado 0,1 vez o volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e 2 vezes o volume de etanol absoluto, e posteriormente centrifugado durante 15 minutos. A amostra foi lavado com etanol 70 % e ressuspendida em água livre de RNases. A quantidade de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.10.2 Pré- hibridização

Foi feita a remoção da parafina dos cortes com banhos em xilol, subsequente hidratação dos tecidos em banhos de álcool etílico 100 %, 95 %, 80 %, 70 %, 50 % e 30 %, e posterior lavagem em 1xPBS por 5 minutos.

As lâminas foram colocadas em uma solução de formaldeído 4 % em PBS durante 5 minutos e em seguida foram lavadas 2x por 10 minutos em PBS. Foram incubadas por 5 minutos na temperatura de 37 °C em tampão de digestão (proteínase K, 20 µg/mL) para quebrar ligações peptídicas e aumentar a permeabilidade do tecido, com o objetivo de permitir uma melhor exposição dos ácidos nucleicos à sonda.

As lâminas foram mergulhadas em água tratada com DEPC e depois incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente em solução de trietanolamina hidrocloreto 0,1 M pH 8,0 e anidrido acético 0,1 M para neutralizar a possível ocorrência de íons livres e aumentar a penetração da sonda. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 2xSSC (tampão citrato de sódio 0,3 M / cloreto de sódio) e então desidratadas em álcool etílico 70 %, 80 %, 95 %, 100 % e 95 % por 1 minuto cada banho. As lâminas foram

deixadas secando em bancada por 30 minutos e posteriormente utilizadas para a hibridização.

3.10.3 Transcrição da Sonda e Marcação com o Radioisótopo ³⁵S

Foi preparada uma solução com 1x tampão de transcrição (5x TB), 10 mM ditiltritol (DTT), 1 u/μL RNAsin, 500 μM nucleotídeo (ΔNTP), 0,05 μg/μL cDNA do gene de interesse, 50 μCi ³⁵S-UTP e 0,75 u/μL RNA polimerase (T7 ou T3, dependendo da orientação do inserto no vetor). Esta solução foi incubada na temperatura de 37 °C por 60 minutos. Para remover o plasmídeo linearizado, foi adicionado 1 μL RNAsin e 1 μL RQ1 DNase à solução e incubada à 37 °C por 10 minutos.

A fim de remover-se os DNTs não incorporados foram utilizadas microcolunas de resina S-400HR (Amersham). Quantificou-se a incorporação do radioisótopo ³⁵S-UTP com 1 μL da ribossonda em 4 mL do líquido de cintilação, analisado em duplicata. A leitura foi realizada em um aparelho de cintilação (Tri-Carb 2100 TR Liquid Scintillation Analyzer – Packard BioScience Company) e considerou-se como satisfatória a contagem acima de 1 milhão de contagens por minuto (dpm). O cálculo da quantidade necessária para mistura de hibridização foi feito pelo programa *Ribocalcs*.

Prontas para serem utilizadas na hibridização, as ribossondas (M1, M2 e M3) marcadas com radioisótopo foram utilizadas à concentração de 10^6 dpm/mL.

3.10.4 Transcrição da Sonda e Marcação com a Digoxigenina (DIG-UTP)

Foi preparada uma solução com 1x tampão de transcrição (5x TB), 10 mM ditiltritol (DTT), 1 u/μL RNAsin, 500 μM nucleotídeo (Δ NTP), 0,05 μg/μL cDNA do gene de interesse, 2 mM DIG-UTP e 0,75 u/μL RNA polimerase (T7 ou T3, dependendo da orientação do inserto no vetor). Esta solução foi incubada na temperatura de 37 °C por 60 minutos. Para remover o plasmídeo linearizado foi adicionado 1 μL RNAsin e 1 μL RQ1 DNase à solução e incubada à 37 °C por 15 minutos.

Para parar a reação da DNase, adicionou-se 0,4 μL de 0,5 M de EDTA pH 8,0. Em seguida, foi feita a precipitação com cloreto de lítio por 18 horas. Após este período foi feita a centrifugação, sendo o precipitado foi ressuspenso em 100 μL de água DEPC e 0,5 μL RNAsin por 30 minutos à 37 °C e feita a quantificação.

Pronta para ser empregada na hibridização, a ribossonda (M2) marcada com digoxigenina foi utilizada na quantidade de 15 μL.

3.10.5 Hibridização *in Situ*

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de sondas específicas. As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar. Para permitir a visualização da reação entre as moléculas de DNA ou RNA em estudo e as sondas, estas podem ser associadas a moléculas que permitam um meio de visualização, como moléculas radioativa, fluorescente ou biotinizada (esta última de forma semelhante à técnica de imunohistoquímica). Neste estudo, as sondas sense e anti-sense foram marcadas com nucleotídeo radioativo (^{35}S -UTP) e conjugado com Digoxigenina (DIG-UTP)

A hibridização com ribossonda radioativa (^{35}S -UTP) e DIG-UTP foi utilizada para detectar mRNA dos genes das variantes em diferentes tipos de células dentro do tecido estudado.

Foi preparada uma mistura da ribossonda marcada com ^{35}S -UTP (10^6 dpm/mL) e/ou DIG-UTP com o tampão de hibridização (2x ribo HB) [10 mM de tampão tris-HCl (gibco-BRL), pH 8, 0,01 % de DNA esperma de salmão, 0,01 % de RNA transportador (RNAt) de levedura, 0,05 % de RNA total de levedura (Sigma), 10 mM de ditioneitol (DTT), 10 % de sulfato de dextrana, 0,3 M NaCl, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 8, e 1x solução de Denhardt (Sigma)]. A mistura foi aquecida à 90 °C por 5 minutos

e em seguida colocada em gelo por 5 minutos. Acrescentou-se 750 μL de formamida, 15 μL de lauril sulfato de sódio 10 % (SDS), 15 μL de tiosulfato de sódio 10 % e 30 μL de DTT 5 M.

As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida de acrílico previamente preparada com papel filtro umedecido em 4x SSC/50 % formamida. As secções foram cobertas com a sonda diluída na solução descrita anteriormente. Para evitar evaporação desta solução, as lâminas foram cobertas com lamínulas livres de RNase e permaneceram incubando por aproximadamente 16-18 horas (*overnight*) na temperatura de 57 °C.

3.10.6 Lavagem pós-hibridização

No dia seguinte, após a hibridização, as lamínulas foram removidas e o excesso de sonda retirado em 2x SSC. As lâminas foram incubadas em uma solução de RNase A (preparada em tampão contendo 5 M NaCl, 1 M de tris-HCl, pH 8, 0,5 M EDTA, pH 8) e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase por 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em tampão de RNase por 30 minutos, lavados em 2xSSC e posteriormente com banhos de estringência crescente durante 1 hora cada banho: 2xSSC + 0,01 M de DTT à 50 °C; 0,2xSSC + 0,01 M de DTT à 55 °C e 0,2xSSC + 0,01 M de DTT à 60 °C, na ordem apresentada. Finalmente, as lâminas foram lavadas 2x de 10 minutos em 2xSSC em temperatura ambiente e desidratadas em álcool

70° %+ (1mL 20x SSC q.s.p. 1L) por 10 minutos. Deixou-se secar as lâminas em temperatura ambiente.

As soluções de 2xSSC e RNase A que entraram em contato com as lâminas pós-hibridizadas foram descartadas em recipiente apropriado para líquido radioativo, assim como todo o material sólido utilizado (ponteiras, micro tubos, papel de filtro, lamínulas, etc.). Após o decaimento necessário, o material foi descartado em lixo comum.

Quando se utilizou a dupla marcação, com sondas ³⁵S-UTP e DIG-UTP, o procedimento foi igual ao descrito anteriormente até antes da desidratação em álcool. Depois, procedeu-se o bloqueio, utilizando 2xSSC, soro de ovelha 2 % e 10 % triton X-100, por 2 horas. As lâminas foram então lavadas em tampão GB1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) por 5 minutos.

Foi feita posteriormente a marcação com alfa-DIG-fosfatase alcalina na concentração de 1:5000, soro de ovelha 1 % e 0,3 % triton X-100, por 16 horas.

Em seguida, foram feitas as lavagens com tampão GB1 e GB3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl e 50 mM MgCl₂-6H₂O) por 10 minutos cada. As lâminas foram mantidas em solução cromógena NBT 0,34 mg/mL e

BCIP 0,18 mg/mL protegidas da luz e observadas de hora em hora até a marcação ser visível. A reação foi bloqueada com tampão TE. As lâminas foram lavadas em água e secas a temperatura ambiente e procedeu-se a revelação para a sonda radioativa.

3.10.7 Procedimentos de Revelação

O procedimento de revelação foi realizado em duas fases, sendo uma por exposição inicial em filme de raio-X e outra por emulsão autoradiográfica e fixação.

Na primeira fase, as lâminas foram acomodadas em cassetes no qual foi colocado sobre elas um filme autoradiográfico (Kodak, autoradiográfico – Biomax MR). Este ficou em contato com as lâminas durante 72 horas em temperatura ambiente, e após os filmes foram revelados com revelador e fixador Kodak. Este procedimento permitiu a verificação do sucesso da marcação radioativa e o cálculo do tempo de exposição das lâminas na emulsão autoradiográfica.

Na segunda fase, as lâminas marcadas somente com o radioisótopo foram embebidas em emulsão radiográfica (NBT-II, Kodak) de forma a obter-se uma fina película sobre elas e mantidas por 3 horas à 37 °C. As lâminas com dupla marcação (digoxigenina e radioisótopo), foram primeiramente imersas em uma solução de Parlodion 3 % e isoamil acetato (1,5 g de

Parlodion e 50 mL isoamil acetato) e deixadas por 4 horas em capela de exaustão para secarem, sendo depois mergulhadas em emulsão radiográfica (NBT-II, Kodak) e mantidas por 3 horas à 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram armazenadas em caixas de lâminas com cápsulas de sílica e envolvidas em papel alumínio e mantidas à 4 °C por 30 dias. Após este período, as lâminas foram reveladas em câmara escura, com revelador e fixador (Kodak) na temperatura de 16 °C e contra-coradas, utilizando o método de hematoxilina-eosina quando marcadas somente com radioisótopo (quando foi feita a dupla marcação, não foi utilizado nenhum método de coloração).

Após a revelação, as lâminas marcadas somente com o radioisótopo foram cobertas com DPX (como meio de montagem) e lamínulas, e as lâminas com dupla marcação foram cobertas com tampão glicerol.

3.10.8 Análise de Imagem

A análise de imagem foi realizada através de programa Image-Pro-Plus versão 4.5 029 para Windows 98/NT (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) instalado em um computador Dell Dimension 4400 acoplado a uma câmara Spot RT[®] color (Diagnostic Instruments Sterling Heights, MI, EUA), montada em um microscópio de luz Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram obtidas através da câmara e projetadas em um monitor.

3.11 Northern Blotting

Para analisamos o tamanho do transcrito do gene da variante-4 em relação aos genes conhecidos das Variantes 1 e 2, foi utilizada a técnica de northern blotting. Este método consiste em correr as amostras de RNA total ou RNAm por um gel desnaturante através de um gradiente elétrico. O RNA posteriormente é transferido para uma membrana de nylon e feita a detecção do RNAm com uma sonda marcada com radioisótopo.

3.11.1 Preparação das amostras de RNAm

Foram coletados testículos e pulmões de ratos wistar n=2, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C até serem processados para extração do RNAm. A extração do RNAm foi feita utilizando-se o kit comercial FastTrack® 2.0, Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra aplicou-se 40µL no total no gel da seguinte mix: RNAm (10 µg), 50 % formamida, 18 % formaldeído, 1x MOPS. As amostras foram aquecidas no banho seco a 65 °C por 15 minutos e colocadas imediatamente no gelo por 5 minutos. Este processo permite que o RNA se mantenha em fita simples e a composição do tampão que foi adicionado ao RNA propicia que este permaneça desnaturado durante o experimento. Em seguida, acrescentou-se 4 µL de brometo de etídio 1 mg/ml e 2 µL de tampão de marcação 6x. Foi preparado para ser aplicado

em cada gel um marcador de peso molecular para RNA (RNA markers, Promega).

3.11.2 Preparação do gel de agarose 1,5 %

O gel de agarose para northern blotting é um gel desnaturante, que permite manter o RNA em fita simples. Cada gel foi preparado com 1,25 g de agarose dissolvida em 105 mL de água mili-Q autoclavada e aquecida em microondas por 2,5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 12,5 mL de 10xMOPS e 7,5 mL de formaldeído pH 7,0, homogeneizado bem e despejado na cuba de eletroforese, tomando cuidado para que não fiquem bolhas. Deixou-se em seguida a cuba fechada e esperou-se esfriar e polimerizar o gel para as amostras serem aplicadas.

3.11.3 Eletroforese

Para cada cuba, foram preparados 700 mL de tampão de corrida (1xMOPS), colocado na cuba antes de aplicar as amostras de RNAm no gel. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, aplicou-se 40 µL da mix descrita anteriormente no gel, em cada sulco. A cuba foi ligada a uma fonte e mantida por 3 horas a 80 V. Depois o gel foi exposto rapidamente à luz ultravioleta para visualizar o marcador de peso molecular e fotografado. Este procedimento permite visualizar a adequada migração do ácido nucléico pelo gel e verificar a sua integridade.

3.11.4 Ponte de transferência

Após a eletroforese, o gel foi tratado com 0,05 N de NaCl por 20 minutos, e em seguida lavado em H₂O Mill-Q e tratado com 20xSSC por 20 minutos. Foi cortado papel filtro e membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia biotech) do mesmo tamanho do gel. A ponte de transferência foi montada da seguinte forma (Figura 4):

1. Em uma cuba de vidro, foi posto um suporte e sobre este uma placa de vidro.
2. O papel filtro foi cortado e colocado sobre a placa de vidro, mas indo até o fundo da cuba. Em seguida coloca-se na cuba 500 mL de solução 10xSSC, molhando bem o papel filtro.
3. Colocou-se o gel sobre o papel filtro, com o cuidado de não deixar nenhuma bolha de ar, para não interferir na transferência do RNA.
4. A membrana de nylon foi posta sobre o gel, e sobre esta o papel de filtro.
5. Com filme plástico foi vedada a ponte, ficando livre apenas o gel.
6. Utilizou-se um bloco de papel toalha sobre a ponte, e sobre esta uma placa de vidro com um peso.
7. A ponte ficou montada até o dia seguinte, para a transferência do RNA do gel para a membrana de nylon através da força iônica causada pelo SSC.
8. No dia seguinte retirou-se a membrana de nylon e colocou-se num forno de luz ultravioleta (1600 joules/cm² por um minuto).
9. A membrana foi lavada em 5xSSC e guardada em freezer -20 °C envolvida em filme plástico até o uso.

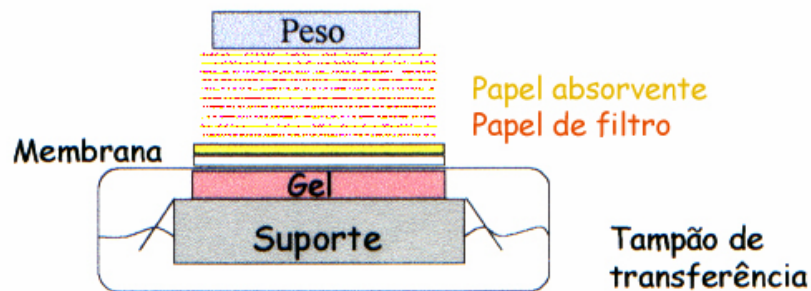


Figura 4. Representação esquemática da ponte de transferência para northern blot.

3.11.5 Hibridização da membrana com sondas radioativas

Neste estudo foram utilizados DNAs complementares, denominadas sondas, dos genes da Var-1, Var-2 e Var-4. A transcrição das sondas foi feita utilizando-se o kit comercial Ready-to-go™ DNA labelling beads (-dCTP), Amersham Pharmacia Biotech, com o nucleotídeo marcado com o radioisótopo ^{32}P -CTP. Após a reação de marcação, a sonda foi purificada em coluna G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) e levada à leitura em contador alfa, para determinação da emissão radioativa. Para cada sonda calculou-se o uso de $1,0 \times 10^6$ cpm/mL de solução de hibridização.

A membrana foi colocada em tubo de hibridização e inicialmente pré-hibridizada, em forno de hibridização a 42°C por 4 horas. A solução de pré-hibridização é composta por: 5xDenhardt's, 6xSSC, 50 % formamida, 0,5 % SDS e 10 mg/mL de DNA de esperma de salmão (desnaturado a 100°C e

imediatamente colocado em gelo, antes do uso). A hibridização foi feita nas mesmas condições da pré-hibridização, porém sem o Denhardt's, por aproximadamente 18 horas. Após esse período, as membranas foram lavadas em 2xSSC e 0,1 % de SDS, por 10 minutos à temperatura ambiente, em 2xSSC e 0,1 % de SDS, por 20 minutos à temperatura de 65 °C e em 0,1xSSC e 0,1 % de SDS, por 20 minutos à temperatura de 65°C, mantendo-se todas as lavagem em agitação.

Posteriormente as membranas foram envoltas duas vezes em filme plástico, e colocadas em cassetes (Molecular Dynamics), permanecendo expostas em filme especial por um período de 24 horas, a temperatura ambiente. Após este tempo, os filmes foram expostos ao sistema de leitura por fluorescência (Storm – Phosphor – Imager), para a visualização das bandas geradas através da hibridização da sonda radioativa com o RNA na membrana.

Resultados

4. Resultados

4.1 Análise da Expressão RT-PCR das 4 Variantes

A partir da técnica de RT-PCR nos 30 tecidos de ratos, foi obtido o painel geral de expressão das Variantes 1, 2, 3 e 4. A Var-1 apresentou expressão em todos os tecidos, com exceção do fígado (Figura 5). A Var-2 apresentou expressão no intestino delgado - duodeno, intestino delgado - íleo, pulmão, testículo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo (Figura 6). A Var-3 apresentou expressão no intestino delgado - duodeno, pulmão e testículo (Figura 7). Já a Var-4 apresentou expressão no testículo (Figura 8).

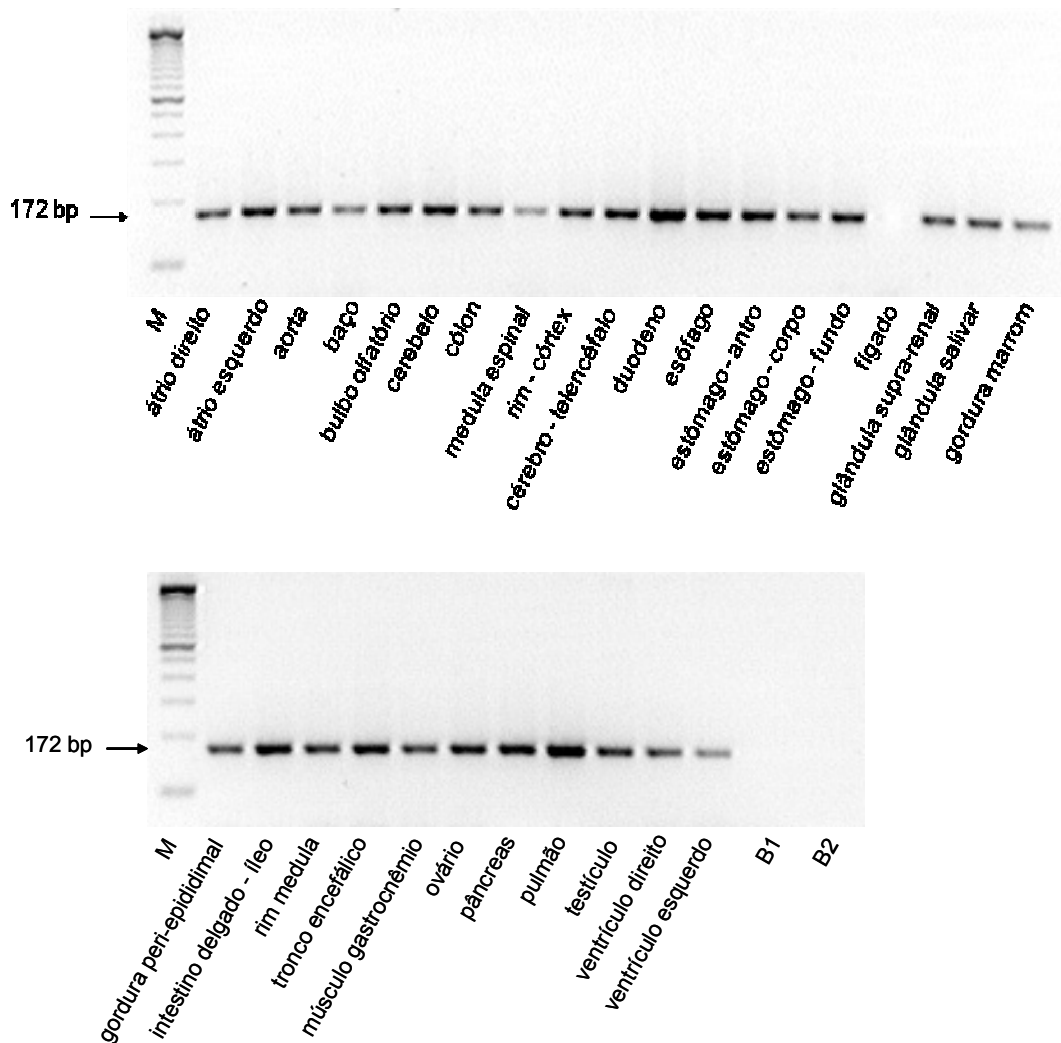


Figura 5. Análise RT-PCR do mRNA da Var-1 nos 30 tecidos de rato. (B1) Branco 1 (mix da reação sem o cDNA pipetada antes de por nas amostras, controle negativo 1), (B2) Branco 2 (mix após ter sido pipetada nas amostras, controle negativo 2), (M) Marcador de peso molecular 100 bp. As setas indicam o tamanho esperado do produto amplificado para a Var-1 (172 bp).

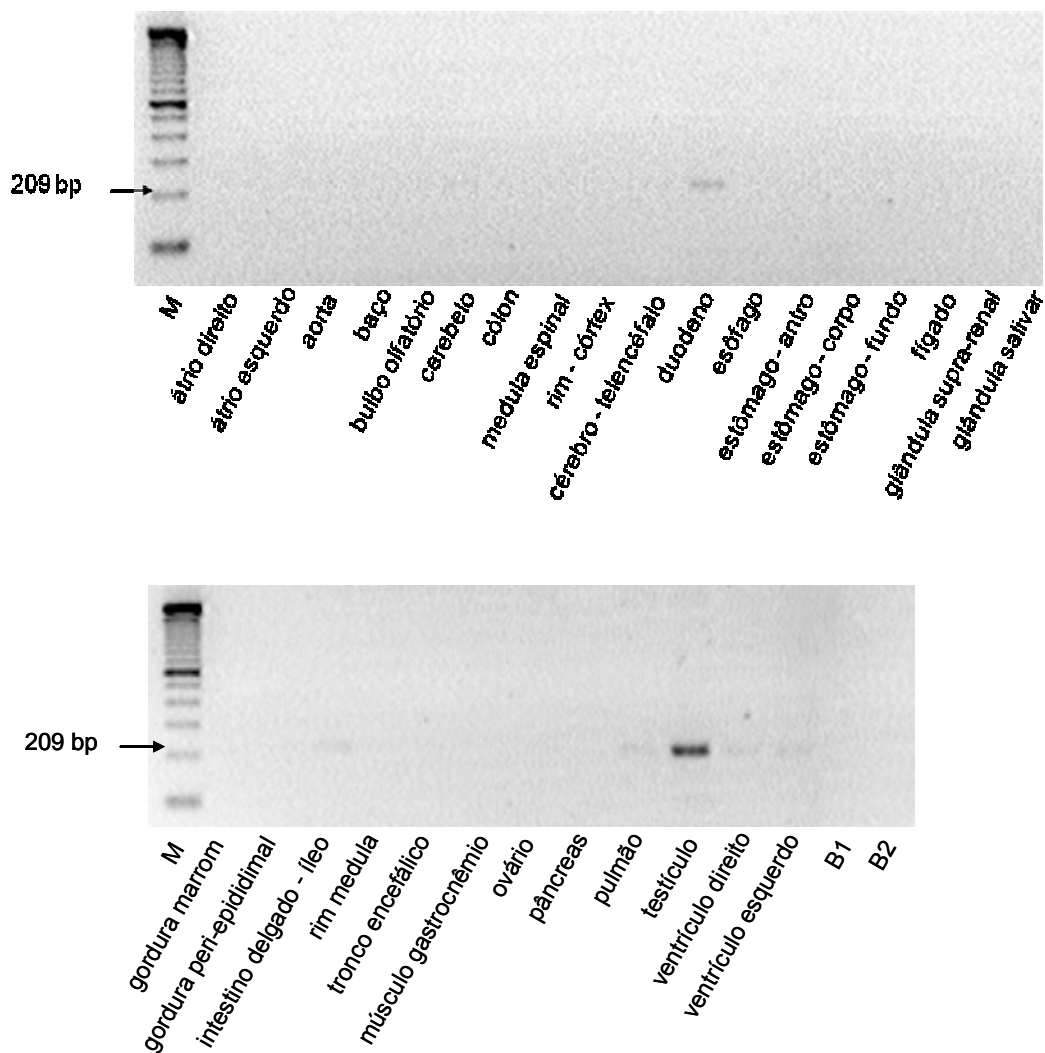


Figura 6. Análise RT-PCR do mRNA da Var-2 nos 30 tecidos de rato. (B1) Branco 1 (mix da reação sem o cDNA pipetada antes de por a mix nas amostras, controle negativo 1), B2 - Branco 2 (mix após ter sido pipetada nas amostras, controle negativo 2), (M) Marcador de peso molecular 100 bp. As setas indicam o tamanho esperado do produto amplificado para a Var-2 (209 bp).

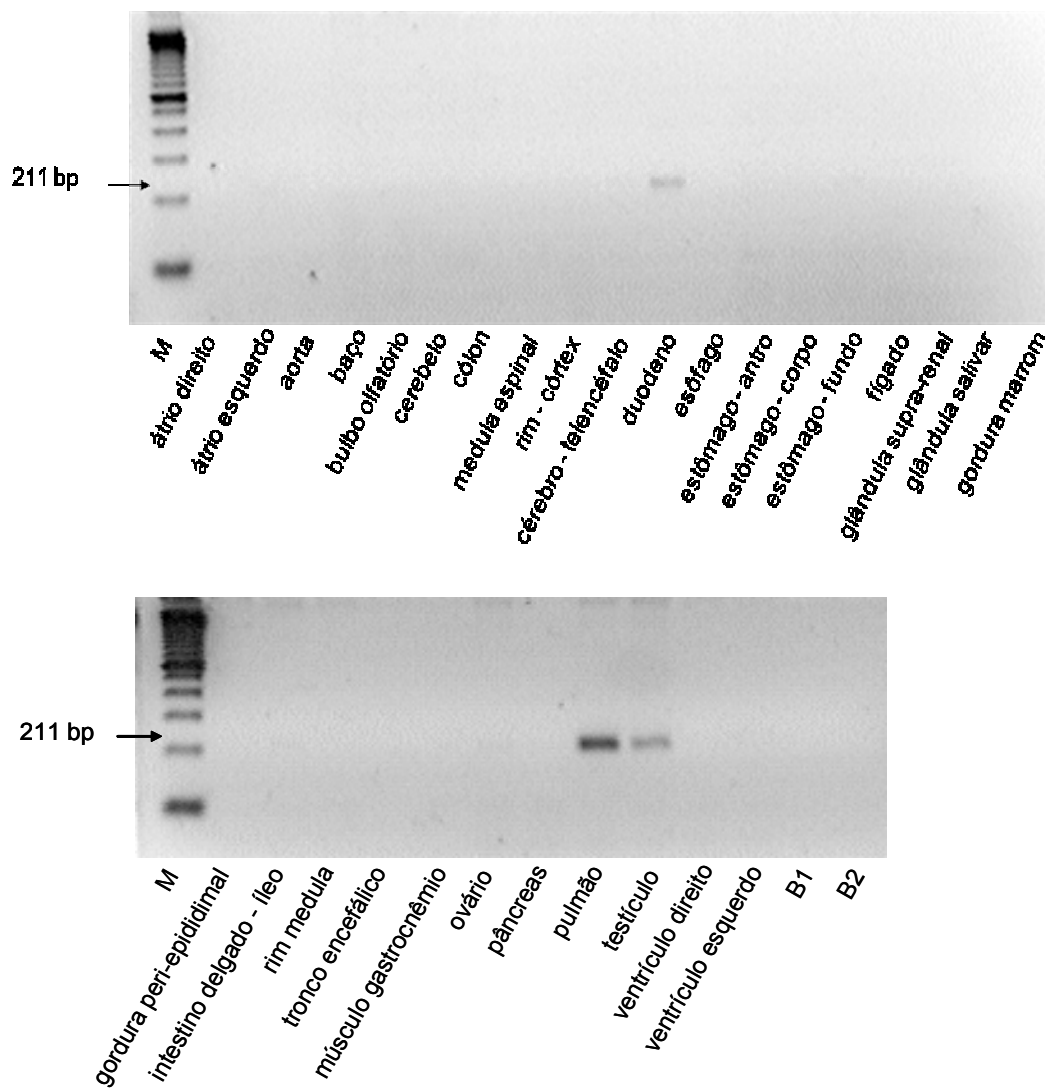


Figura 7. Análise RT-PCR do mRNA da Var-3 nos 30 tecidos de rato. (B1) Branco 1 (mix da reação sem o cDNA pipetada antes de por a mix nas amostras, controle negativo 1), (B2) Branco 2 (mix após ter sido pipetada nas amostras, controle negativo 2), (M) Marcador de peso molecular 100 bp. As setas indicam o tamanho esperado do produto amplificado para a Var-3 (211 bp).

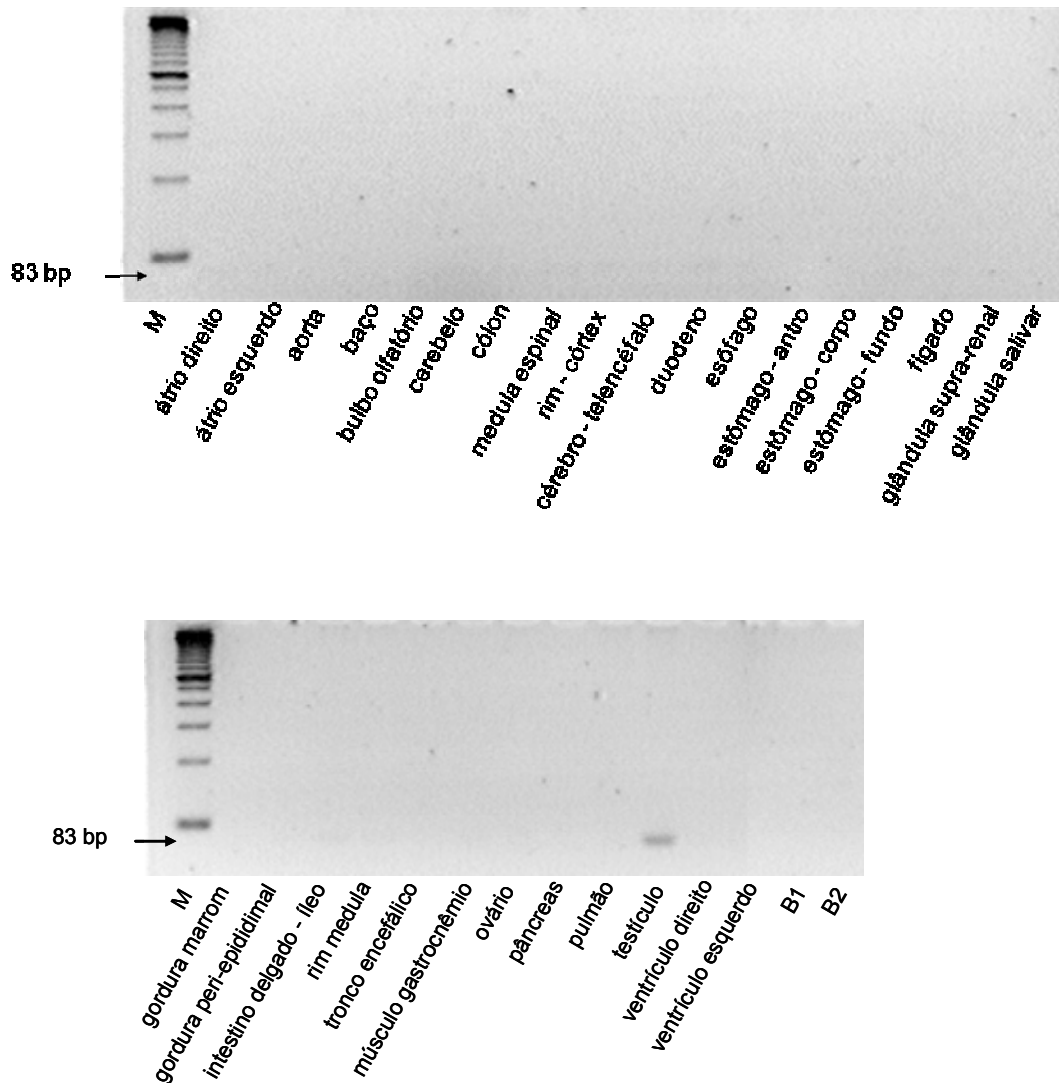


Figura 8. Análise RT-PCR do mRNA da Var-4 nos 30 tecidos de rato. (B1) Branco 1 (mix da reação sem o cDNA pipetada antes de por a mix nas amostras, controle negativo 1), (B2) Branco 2 (mix após ter sido pipetada nas amostras, controle negativo 2), (M) Marcador de peso molecular 100 bp. As setas indicam o tamanho esperado do produto amplificado para a Var-4 (83 bp).

4.2 Análise da Expressão qRT-PCR das 4 Variantes e ECA2

A figura 9 apresenta o padrão de expressão do mRNA por qRT-PCR das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 em 30 tecidos de rato, que foram avaliadas com o objetivo de termos um painel geral dos tecidos que apresentam expressão para as quatro Variantes e ECA2. Os dados de qRT-PCR corroboram com os dados anteriormente apresentados de RT-PCR que utiliza um método de detecção fluorescente, com incremento substancial na sensibilidade. A variante de interesse do nosso estudo, Var-4, apresentou alto nível de expressão em testículo e níveis mais baixos de expressão em ventrículo esquerdo (Figura 9D). Já a Var-3 apresentou expressão mais elevada em pulmão, testículo e intestino delgado - duodeno (Figura 9C), assim como a Var-2 em testículo e pulmão (Figura 9B). Por outro lado, a Var-1 apresentou expressão em todos os tecidos, com exceção do fígado, sendo que o pulmão tem o nível mais elevado de expressão entre os tecidos analisados (Figura 9A); estes foram confirmados em estudos anteriores. A ECA2 teve expressão mais elevada em intestino delgado- íleo (Figura 9E).

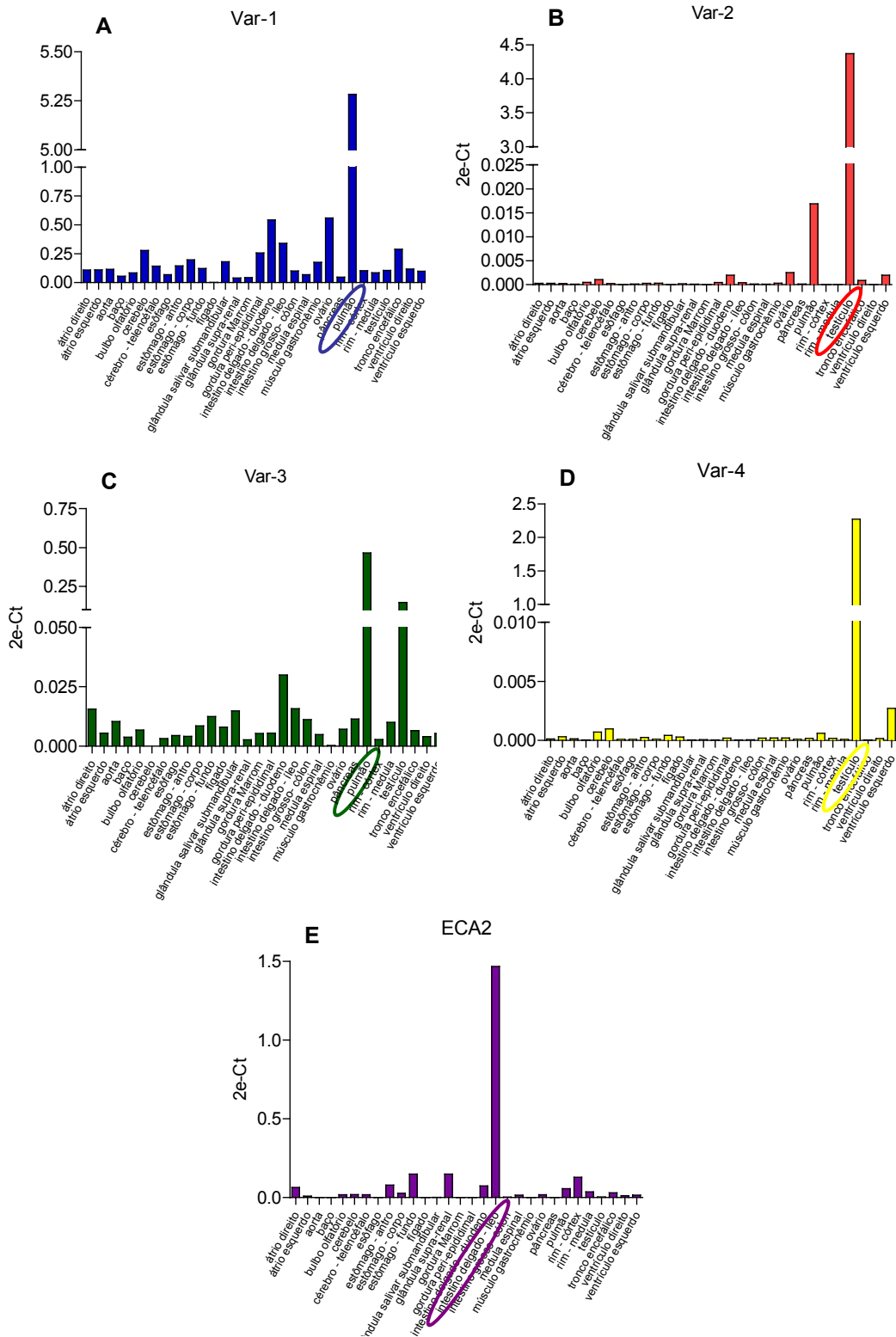


Figura 9. Valor relativo de expressão de mRNA das Variantes 1, 2, 3, e 4 em 30 tecidos de rato (n=5 pool) por qRT-PCR. (A) Variante-1, (B) Variante-2, (C) Variante-3, (D) Variante-4 e (E) ECA2. Os valores estão expressos em 2e-Ct.

Os resultados apresentados na figura 10 mostram os valores relativos de expressão gênica das Variantes 2, 3 e 4 e ECA2 em relação à Var-1 analisados em nove tecidos (n=10). Em testículo, a expressão foi elevada para a Var-2 e para o gene de interesse Var-4 (Figura 10A). Em ventrículo esquerdo observamos nível de expressão maior para a Var-1 seguindo de ECA2 e níveis menores para a Var-2 e Var-4 (Figura 10B). Em ventrículo direito também foi observado valor relativo de expressão maior para a Var-1 e baixa expressão para a ECA2 e traços de expressão para a Var-2 e Var-4. Em pulmão há alto nível de expressão para a Var-1 (Figura 10D). Já no rim tanto a região do córtex como a medula têm padrão semelhante de expressão para Var-1 e ECA2 (Figuras 10E e 10F). No ovário verificamos expressão para a ECA2 e Var-1 (Figura 10G). No intestino delgado – duodeno e músculo gastrocnêmio o padrão de expressão foi semelhante (Figuras 10F e 10G).

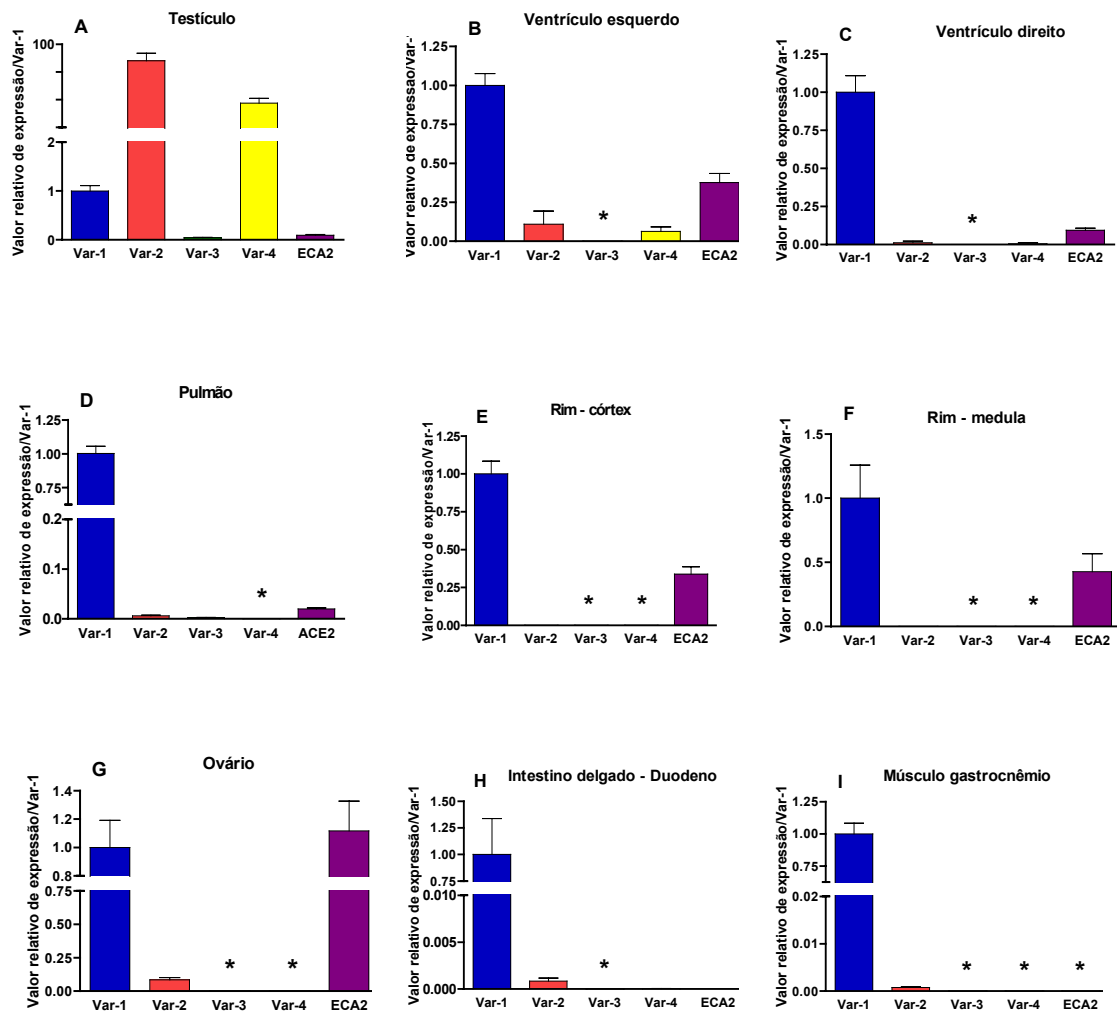


Figura 10. Valor relativo de expressão de RNAm das Variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / Variante-1, de nove tecidos de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) testículo, (B) ventrículo esquerdo, (C) ventrículo direito, (D) pulmão, (E) rim - córtex, (F) rim - medula, (G) ovário, (H) intestino delgado - duodeno e (I) músculo gastrocnêmio. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

4.3 Análise de Hibridização *in situ*

Os resultados de hibridização *in situ* da primeira etapa, mostram que a marcação foi positiva em endotélio nos cortes de testículo utilizando sonda Módulo-1 (M1), que corresponde ao gene da Var-1 e Módulo-2 (M2), correspondendo aos genes das Variantes 1, 2 e 3 (Figuras 11A, 12A, 11C e 12C). E em túbulos seminíferos com as sondas M2 e módulo-3 (M3) correspondendo aos genes Var-3 e Var-4 (Figuras 13-15).

Na segunda etapa, observamos a dupla marcação positiva (sondas M2 e M3) nos túbulos seminíferos, corroborando com os resultados anteriores quando hibridizados com sondas individualmente (Figuras 16-18).

É interessante notar que o padrão de expressão das Variantes 2 e 4 em alguns túbulos se co-localizam e em outros não. Nesse contexto, para identificarmos que tipo celular expressa a Var-4, a terceira etapa da hibridização foi fundamental, pois nos permitiu a comparação do padrão de expressão das duas variantes com o tipo celular, uma vez que os cortes são seriados e temos a coloração de PAS que propicia a identificação das espermatídes.

Verificamos que a Var-2 é expressa por espermatídes redondas, espermatídes alongadas e espermatozóides, enquanto que a Var-4 é expressa apenas por espermatídes redondas (Figuras 19-26).

No coração verificamos marcação somente para a Var-1 em vaso, enquanto para a Var-4 não foi detectada marcação em hibridização *in situ* (Figura 27).

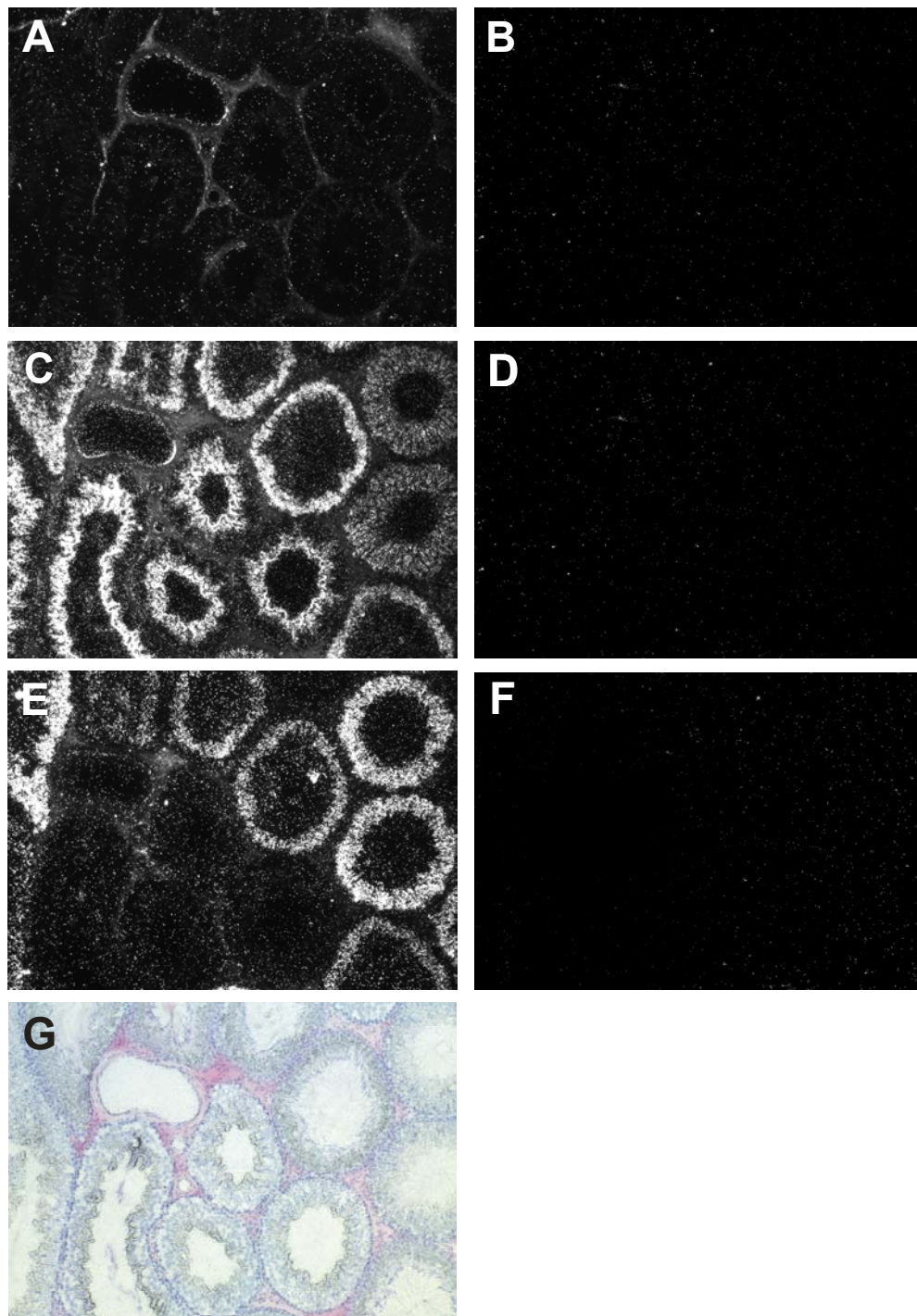


Figura 11. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 1, 2 e 3 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A, C e E) respectivamente, sonda sense (B, D e F), coloração HE (G). Aumento de 100x.

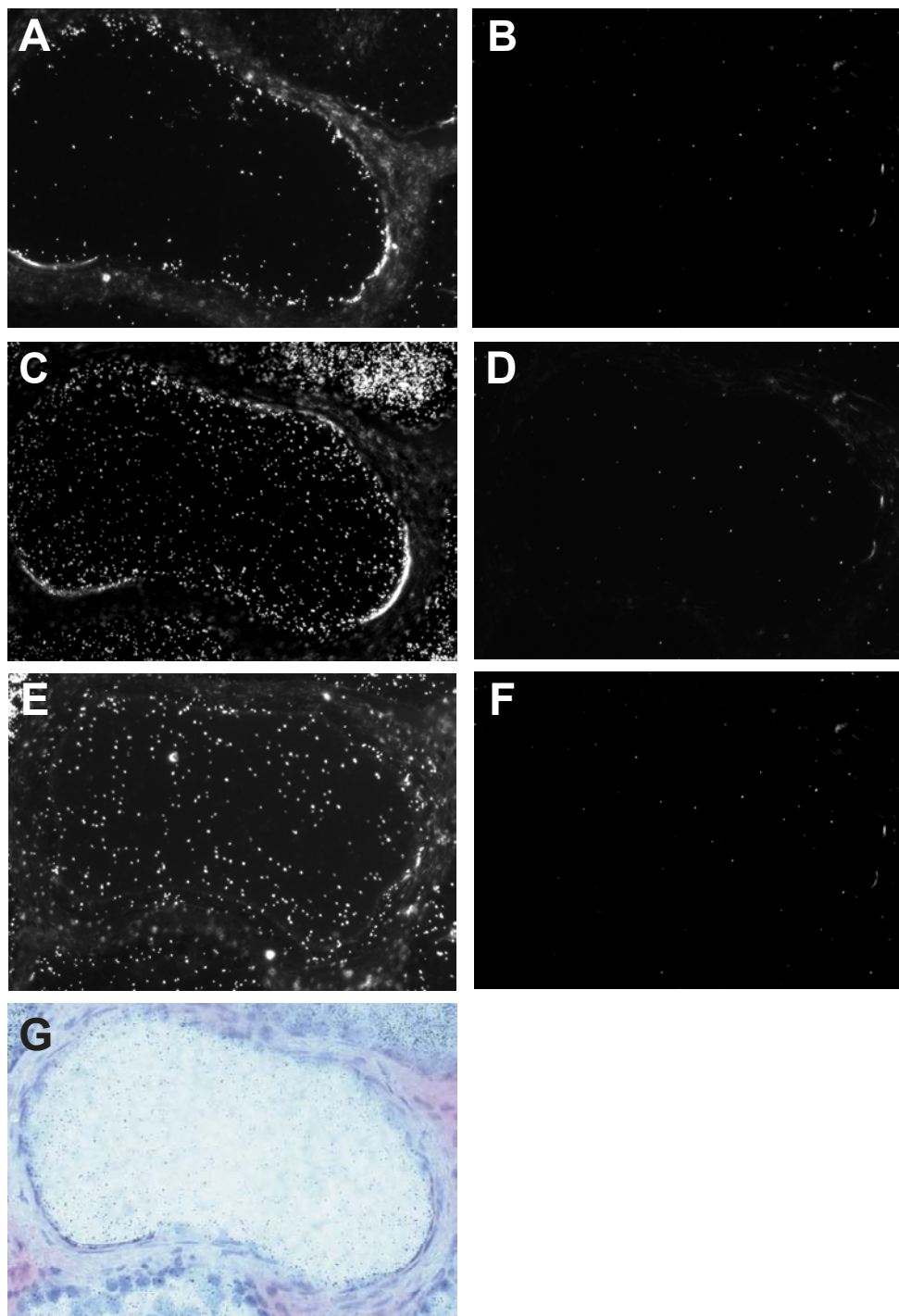


Figura 12. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 1, 2 e 3 marcada com ³⁵S-UTP anti-sense(A, C e E) respectivamente, sonda sense (B, D e F), coloração HE (G). Aumento de 400x.

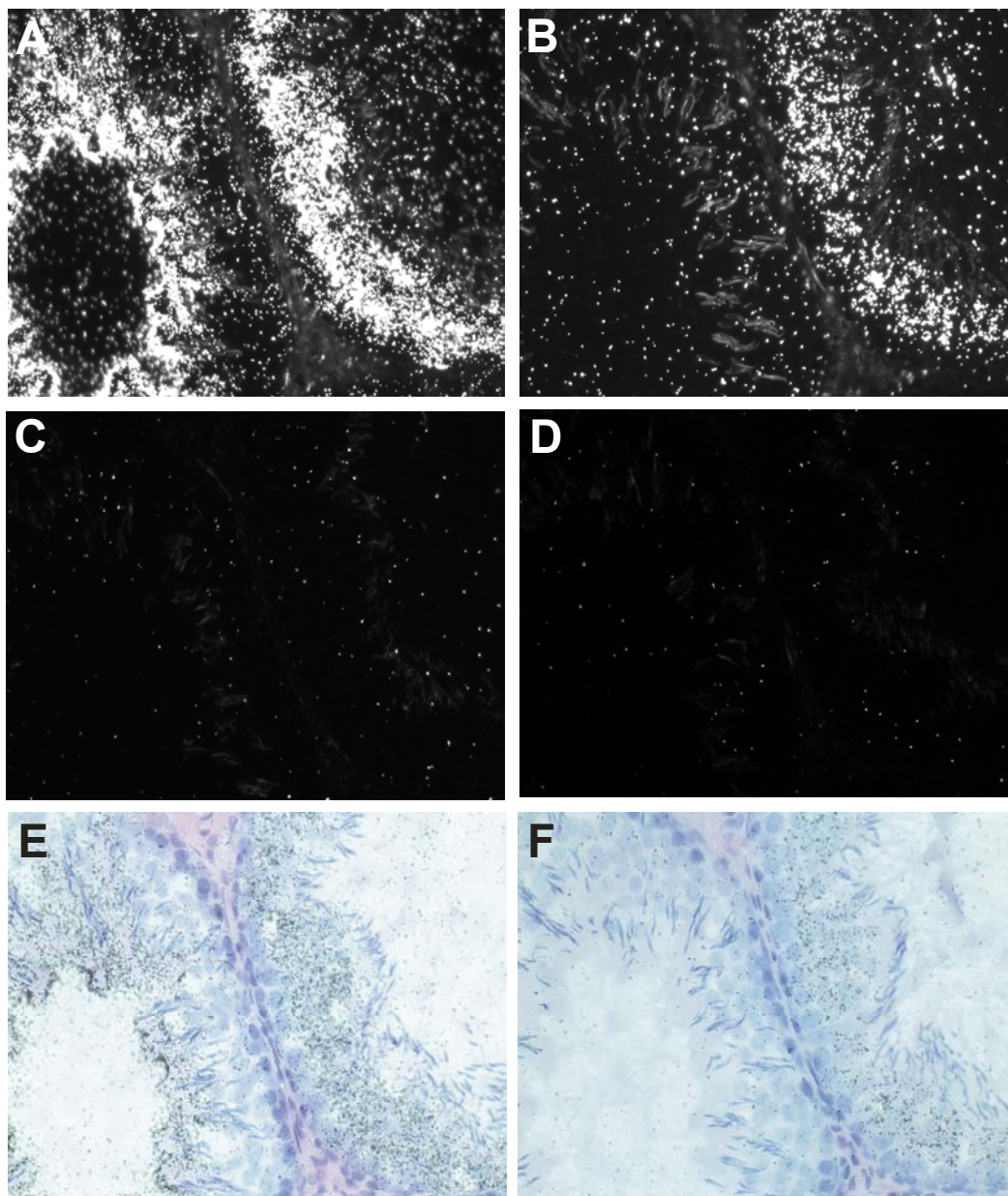


Figura 13. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A) e módulo 3, (B), sonda sense (C e D), coloração HE (E e F). Aumento de 400x .

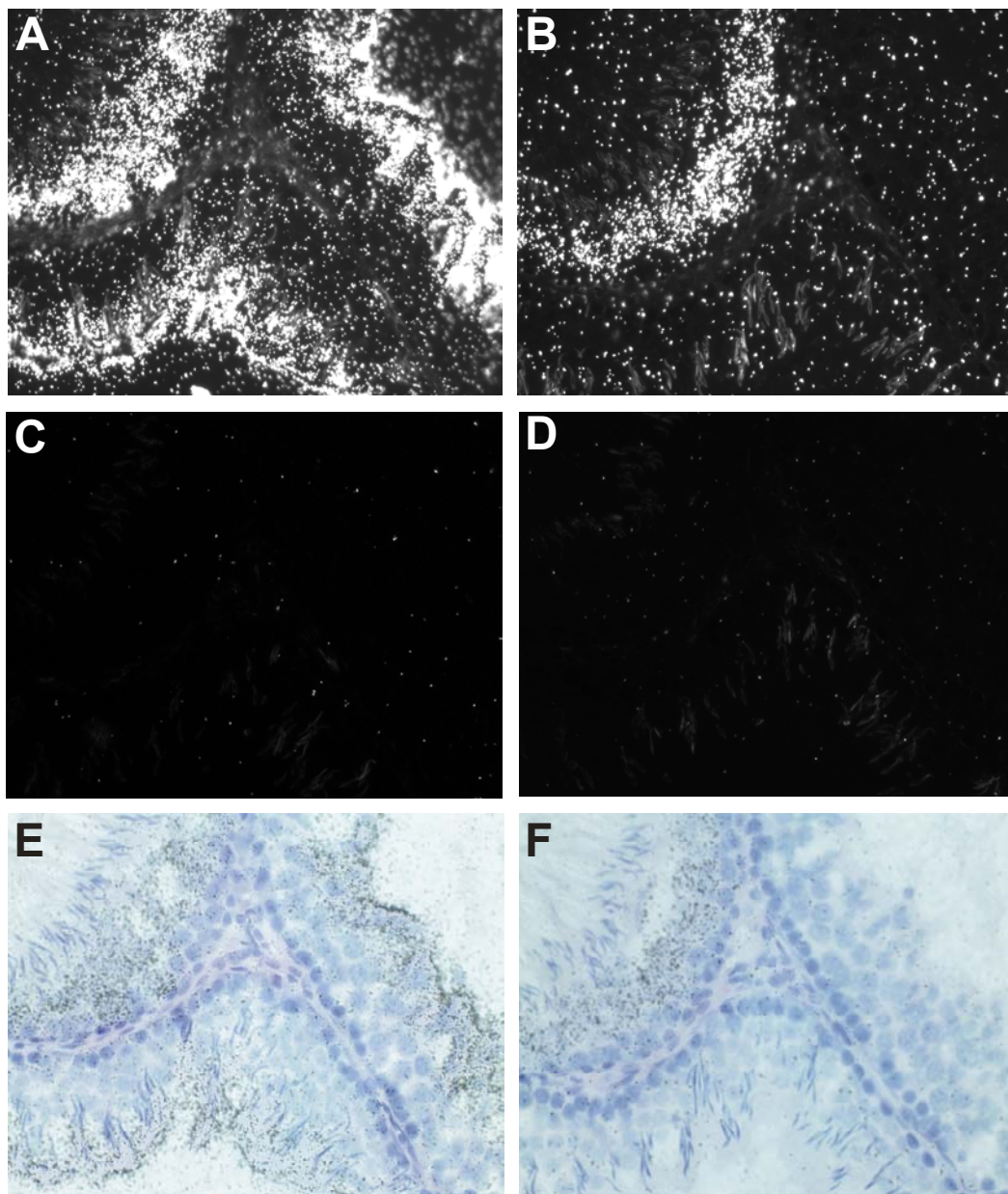


Figura 14. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A) e módulo 3, (B), sonda sense (C e D), coloração HE (E e F). Aumento de 400x .

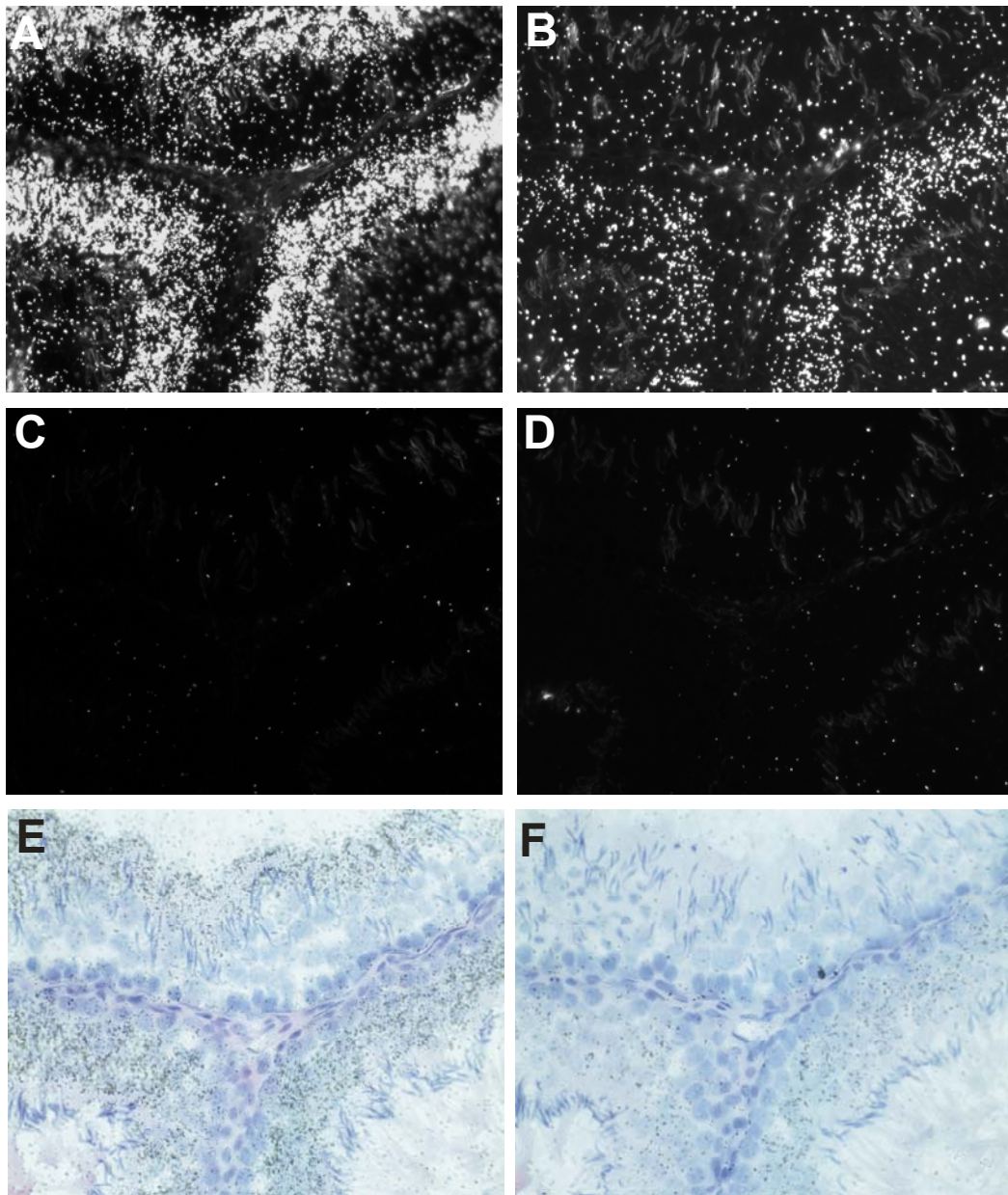


Figura 15. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A) e módulo 3, (B), sonda sense (C e D), coloração HE (E e F). Aumento de 400x .

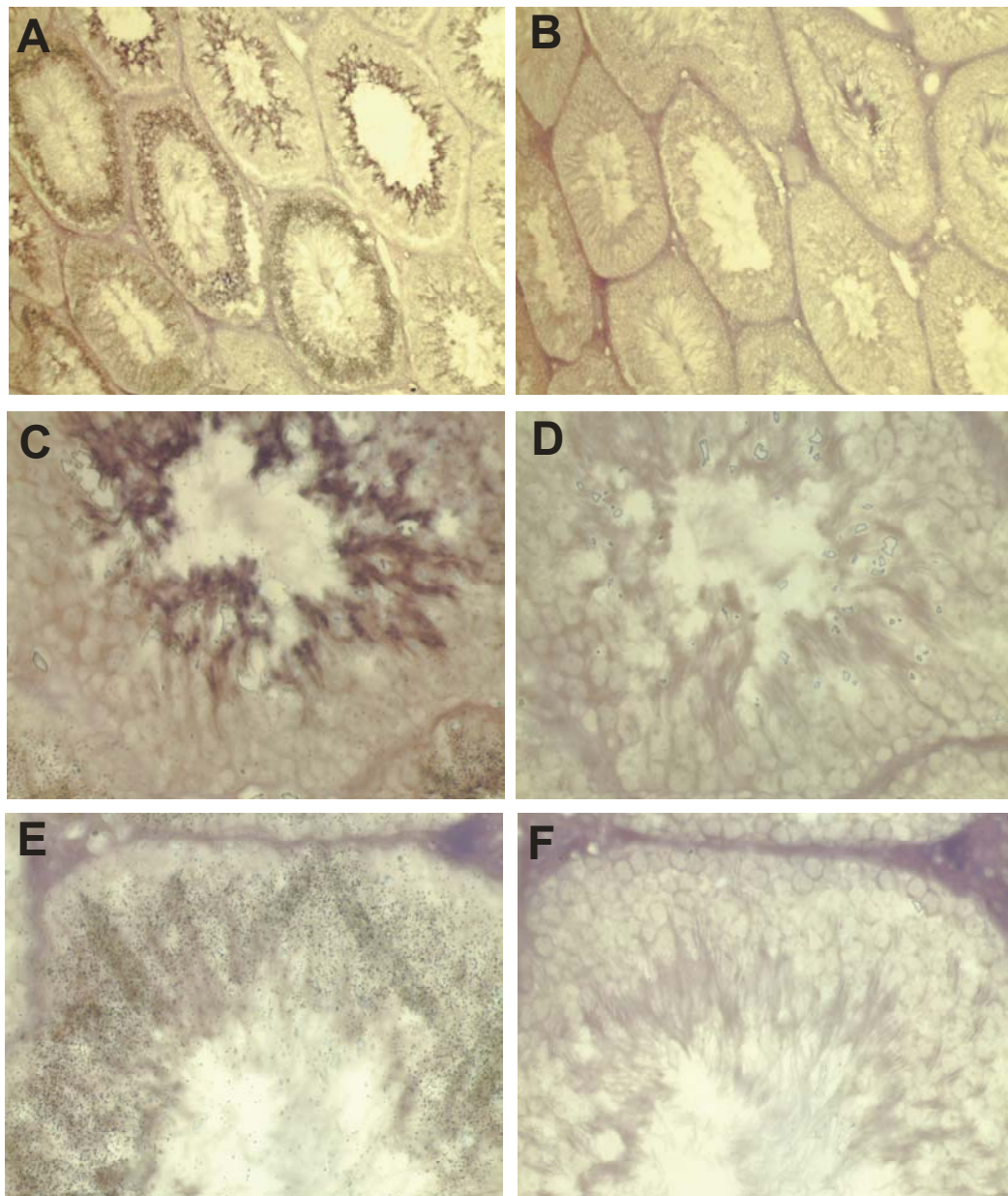


Figura 16. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A, C e E), sonda sense (B, D e F). Aumento de 100x (A e B) e aumento de 400x (C, D, E e F).

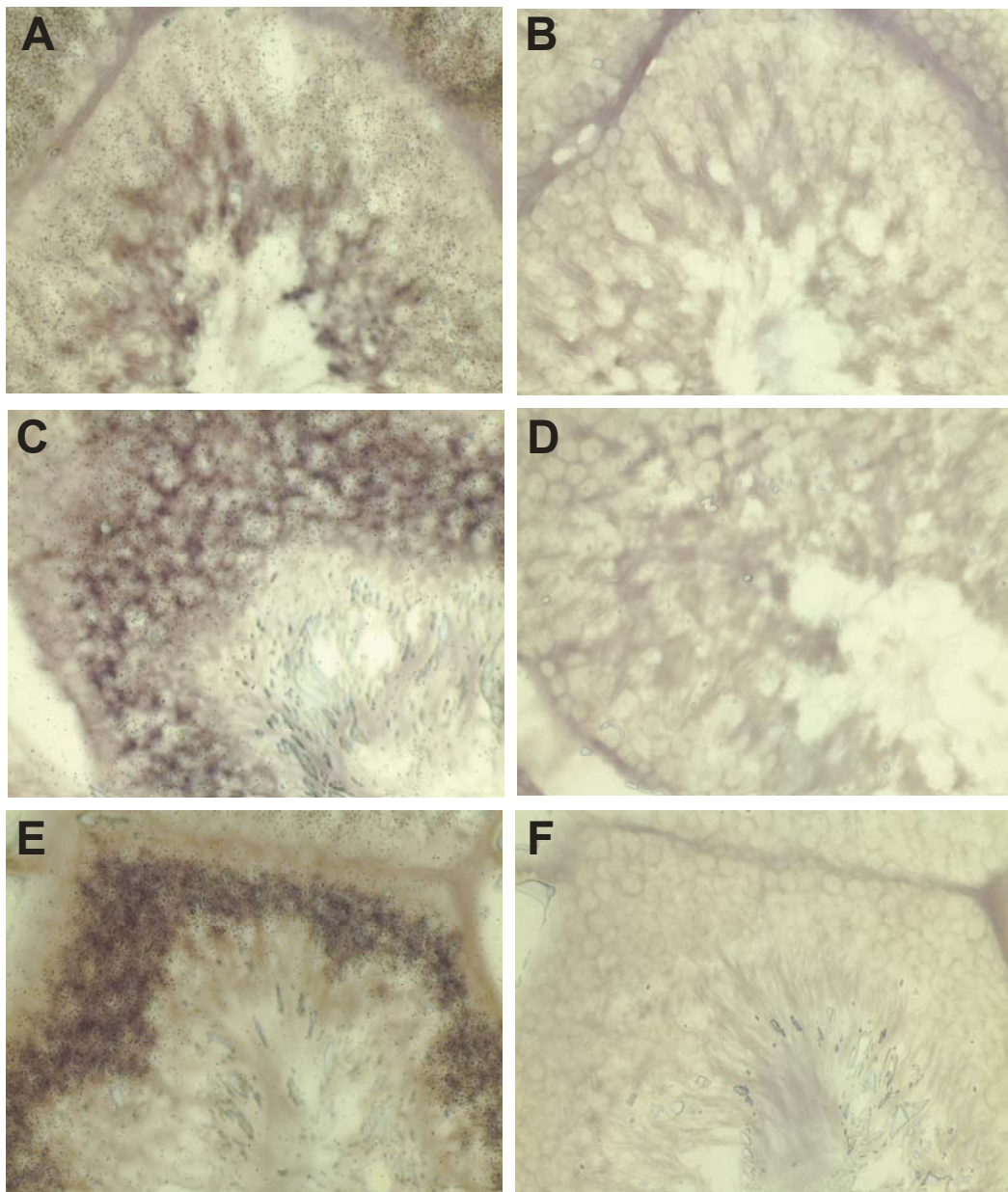


Figura 17. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ³⁵S-UTP anti-sense (A, C e E), sonda sense (B, D e F). Aumento de 400x.

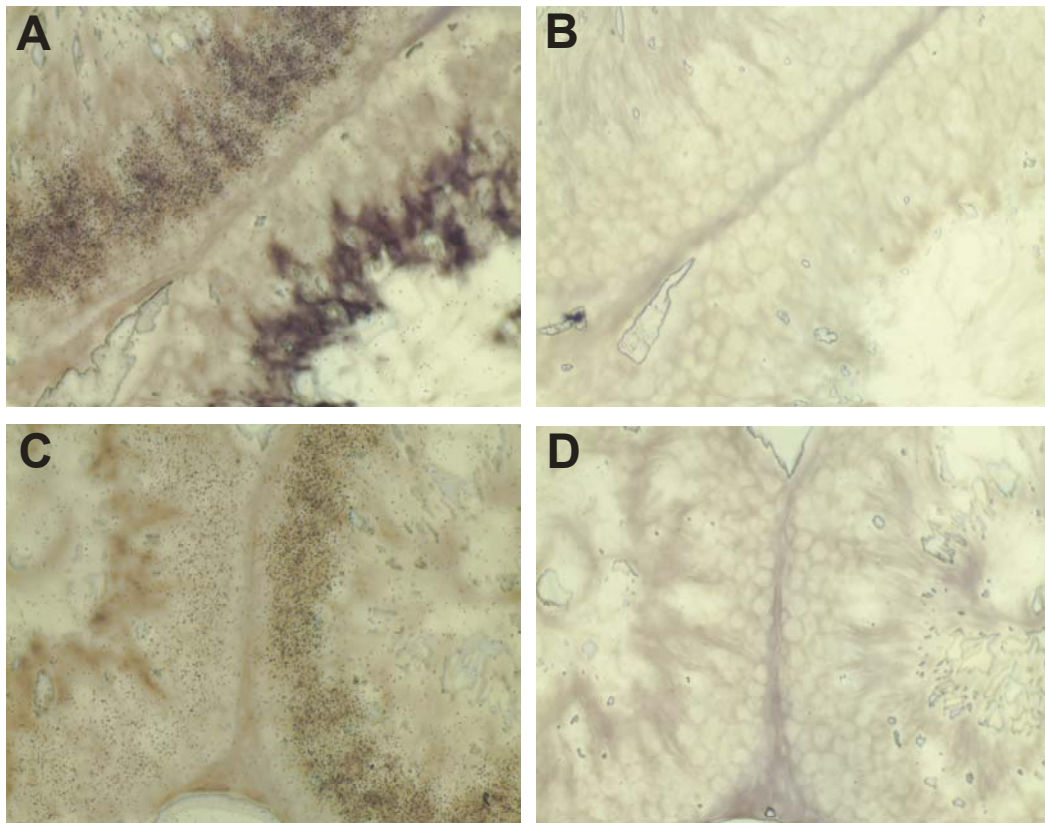


Figura 18. Análise de hibridização *in situ* em testículo, sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A e C), sonda sense (B e D). Aumento de 400x.

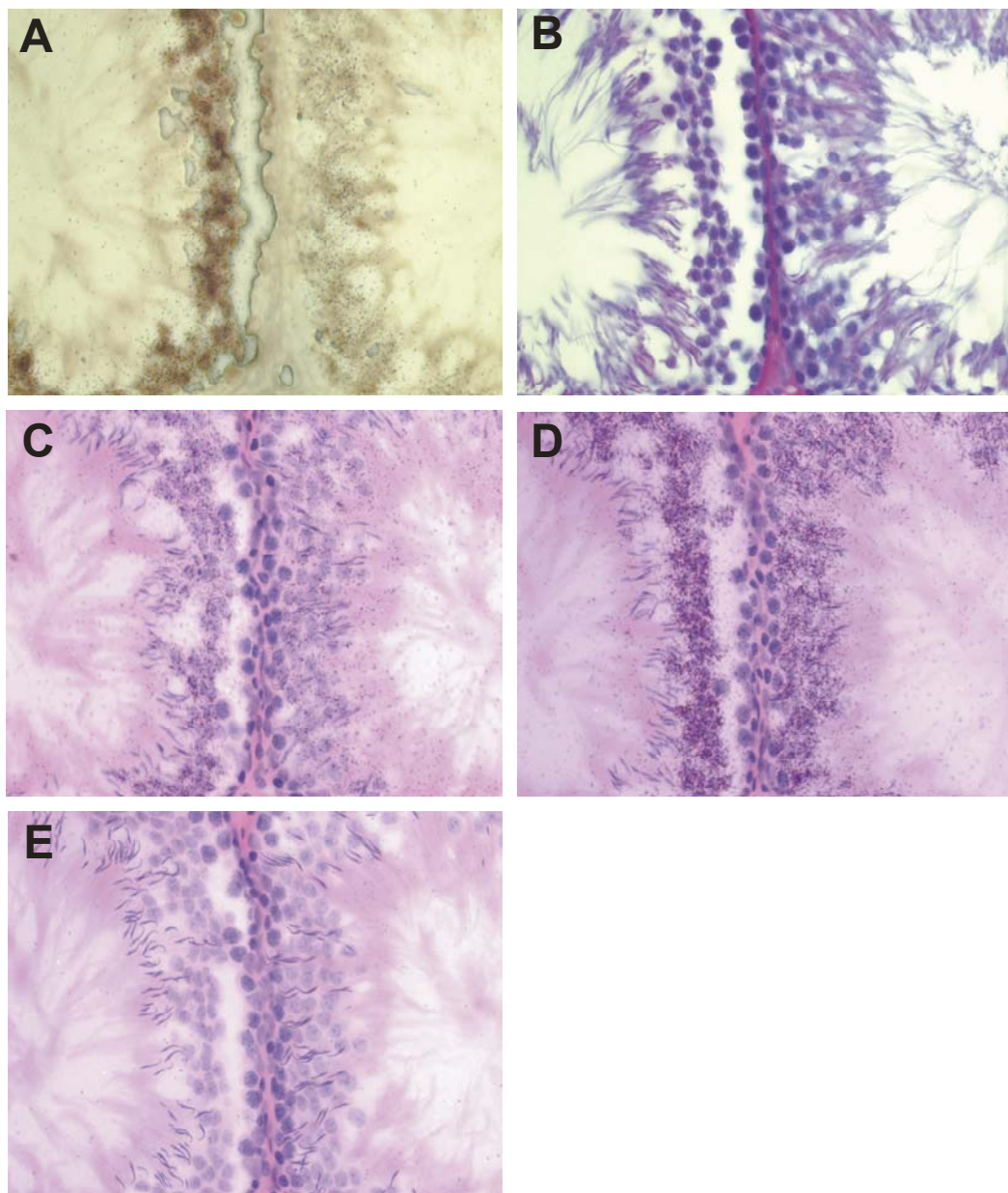


Figura 19. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ³⁵S-UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ³⁵S-UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ³⁵S-UTP, (E) sonda sense (controle negativo). Aumento de 400x.

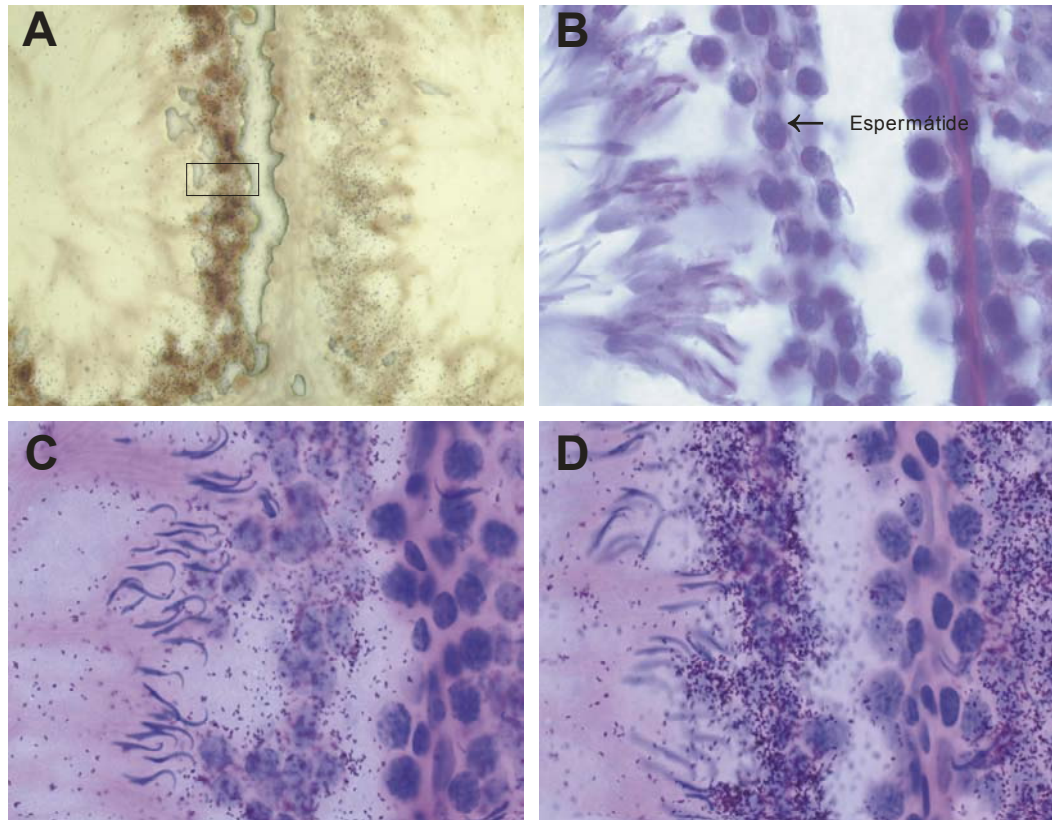


Figura 20. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP . Aumento de 400x (A) e aumento de 1000x (B, C e D).

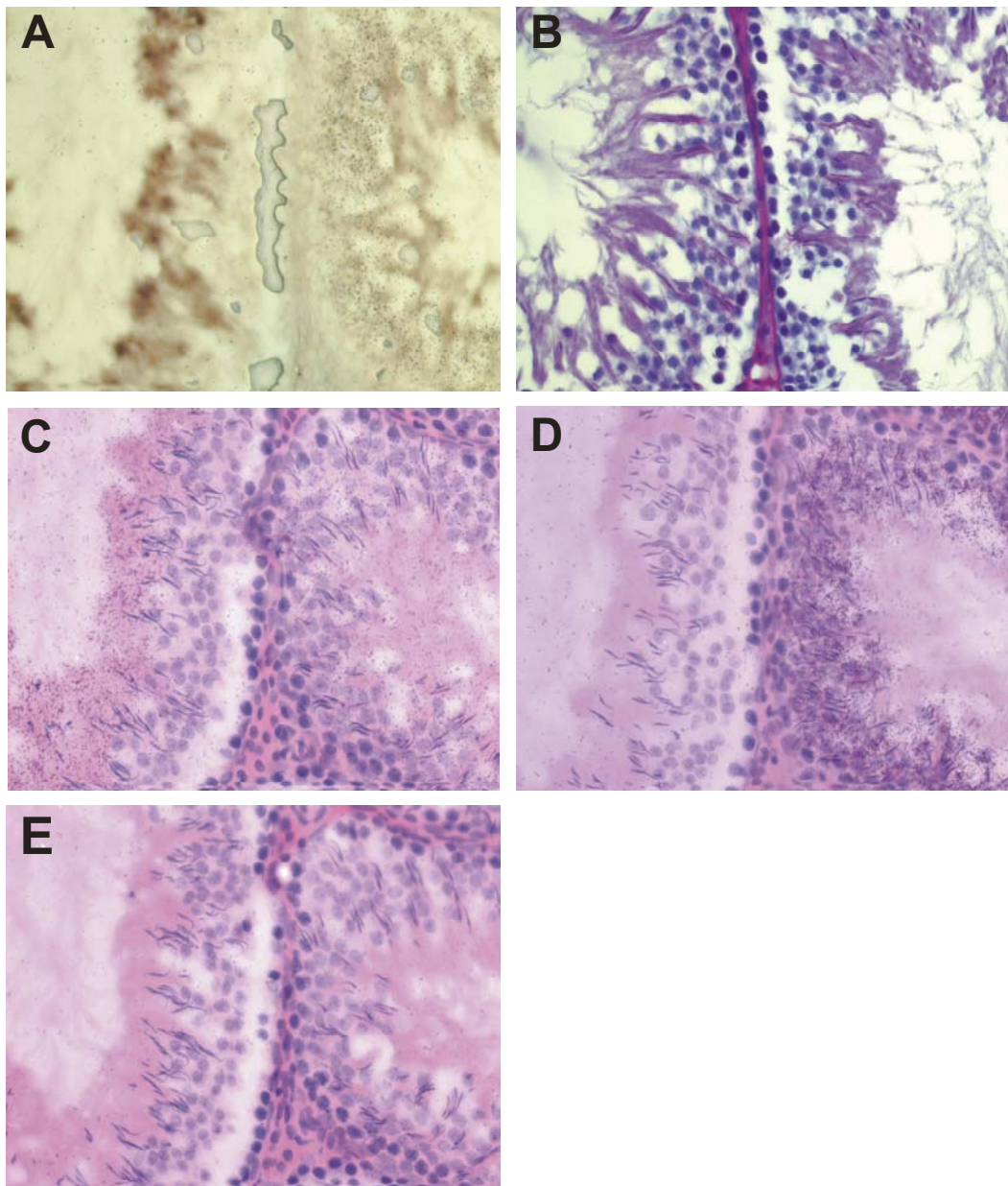


Figura 21. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo . (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ³⁵S-UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ³⁵S-UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ³⁵S-UTP, (E) sonda sense (controle negativo). Aumento de 400x.

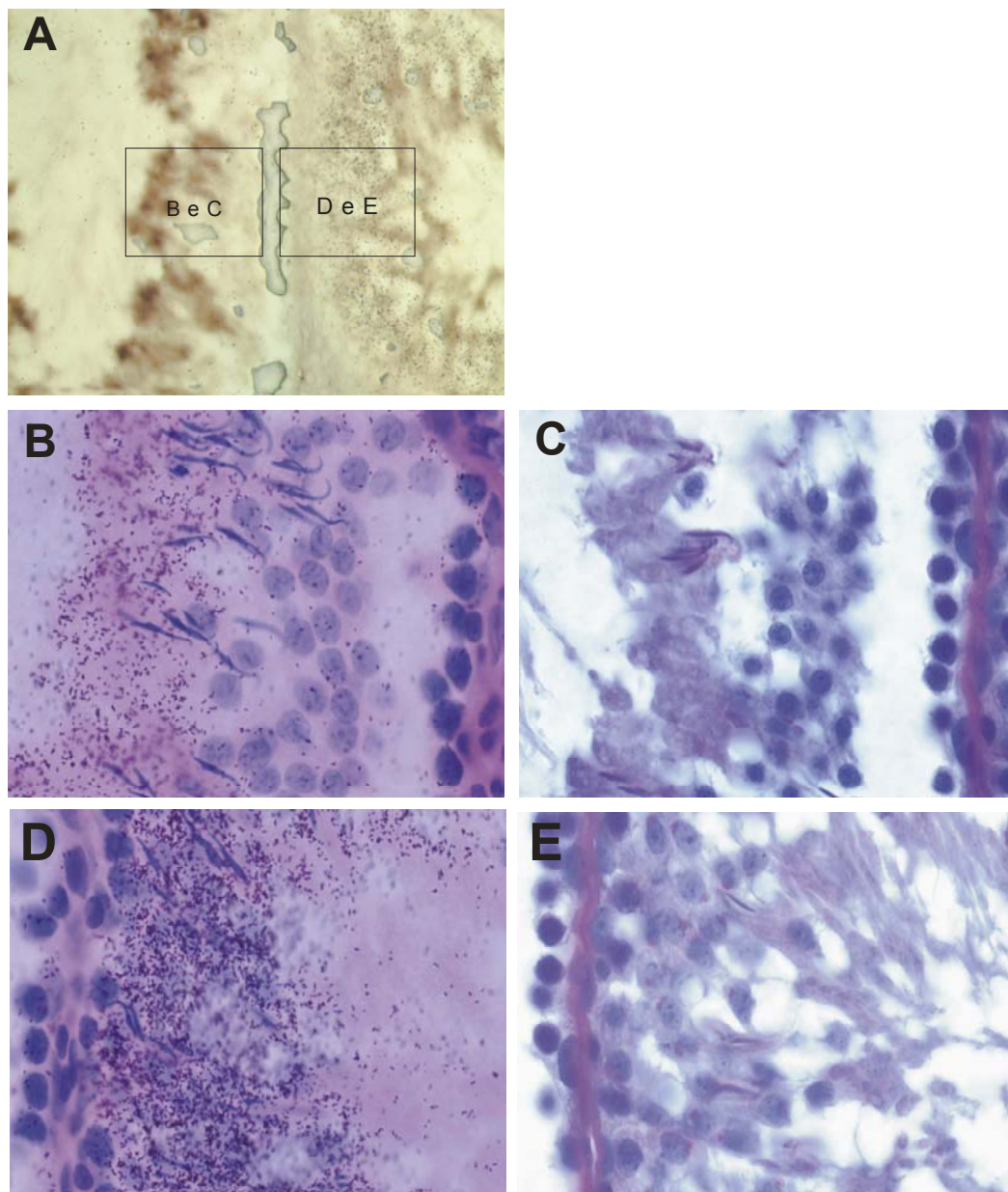


Figura 22. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (C e E) coloração de PAS, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP. Aumento de 400x (A) e aumento de 1000x (B, C, D e E).

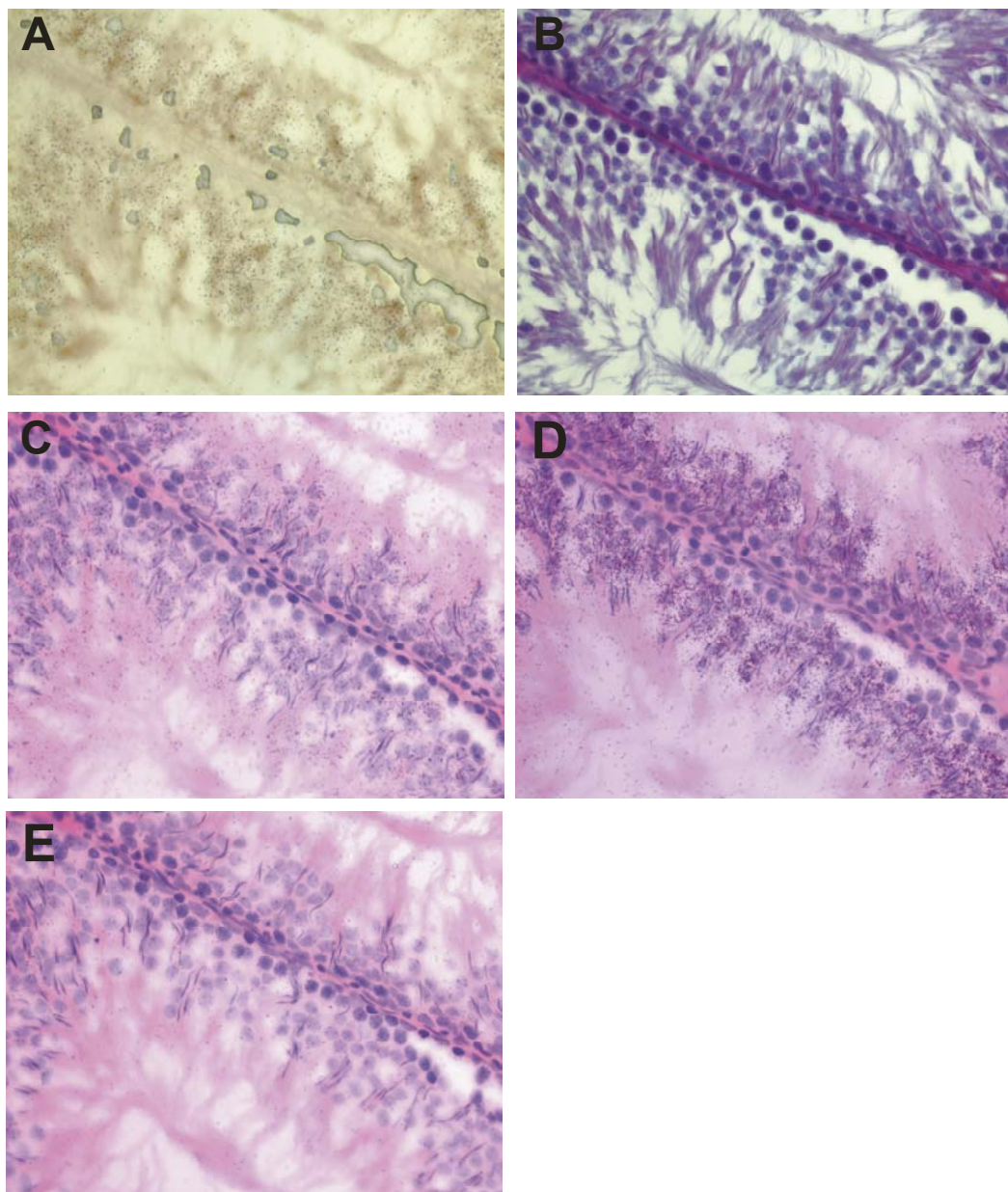


Figura 23. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (E) sonda sense (controle negativo). Aumento de 400x.

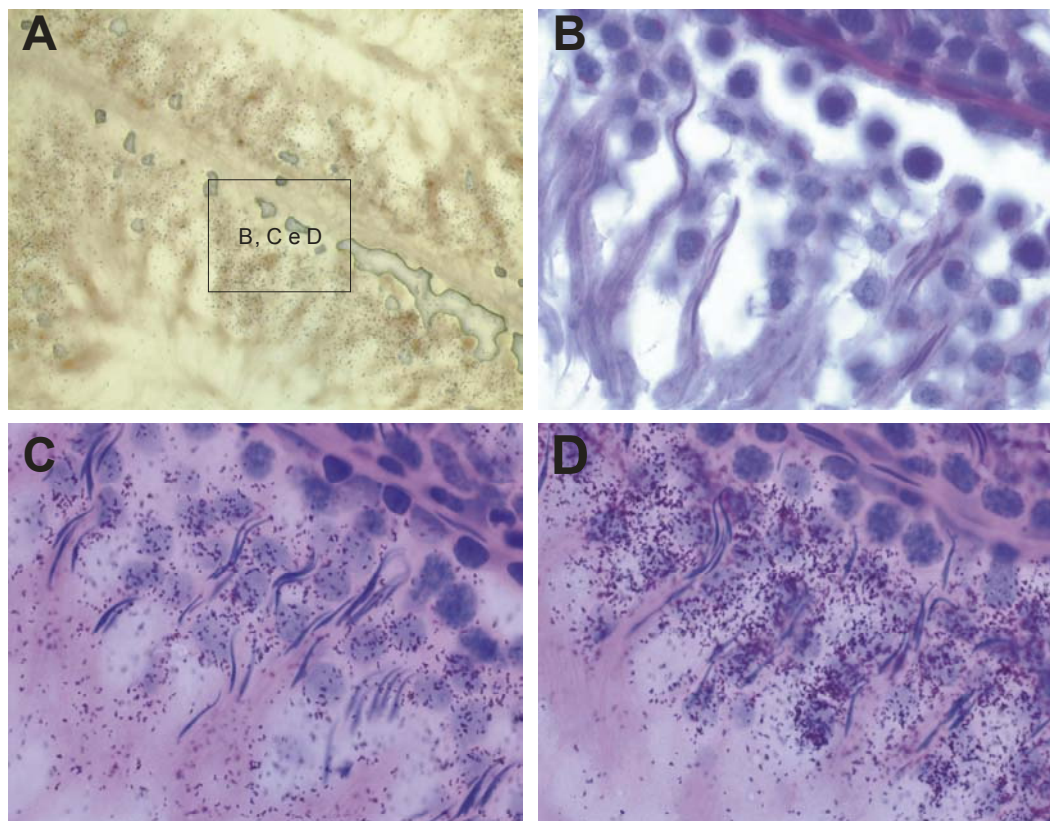


Figura 24. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP. Aumento de 400x (A) e aumento de 1000x (B, C e D).

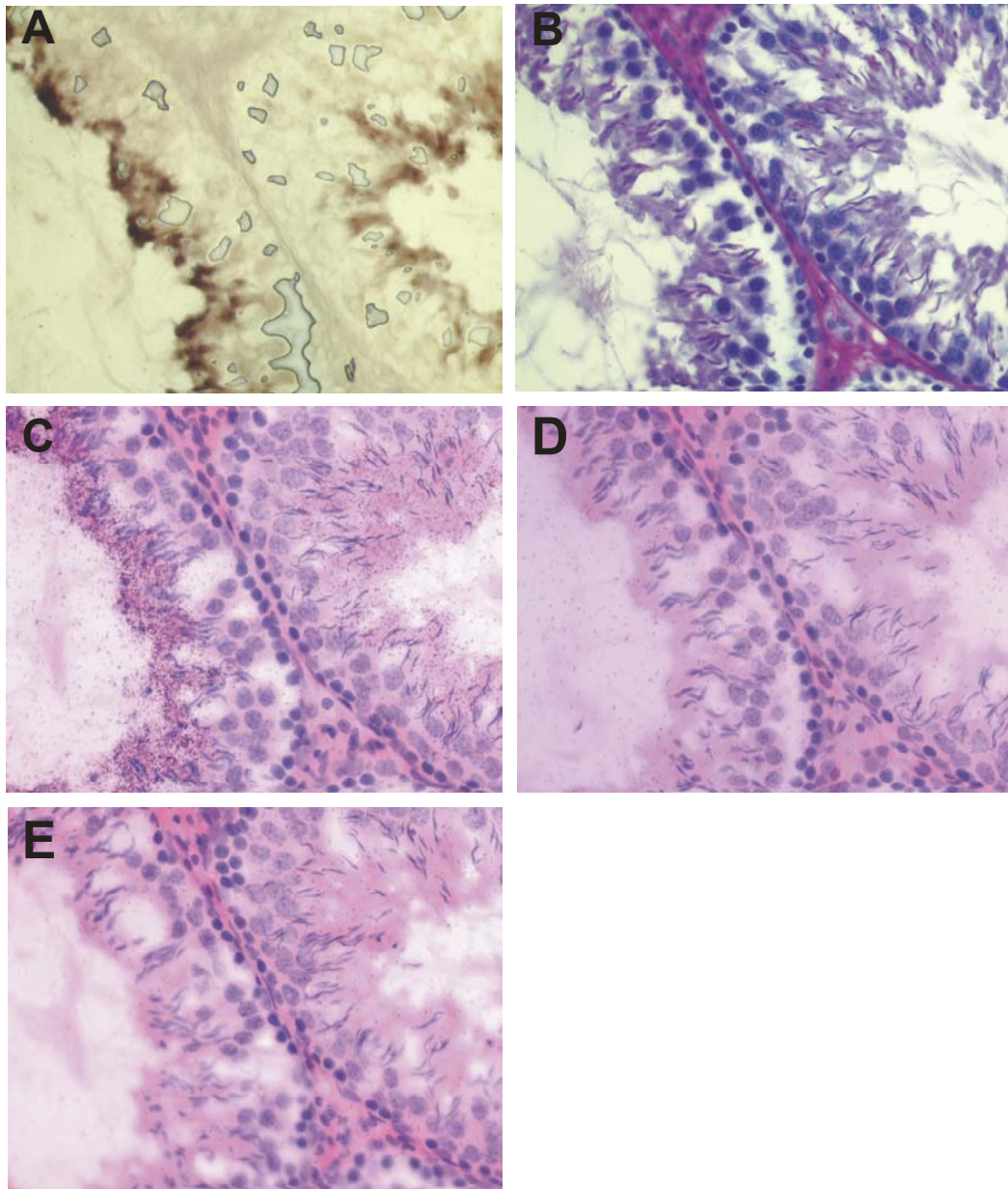


Figura 25. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) coloração de PAS, (C) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (D) sonda do módulo 3 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (E) sonda sense (controle negativo). Aumento de 400x.

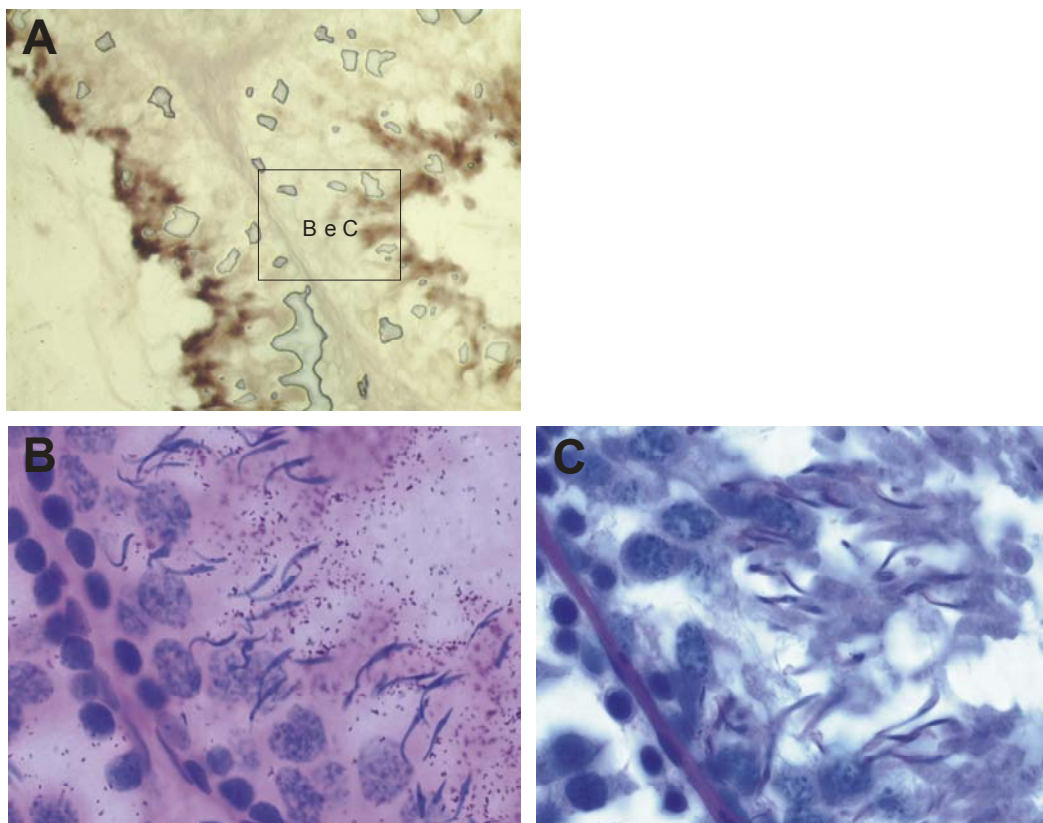


Figura 26. Análise de hibridização *in situ*, cortes seriados em testículo. (A) dupla marcação sonda do módulo 2 marcada com Dig-UTP (marrom) e sonda módulo 3 marcada com ^{35}S -UTP (pontos pretos) anti-sense, (B) sonda do módulo 2 anti-sense marcada com ^{35}S -UTP, (C) coloração de PAS. Aumento de 400x (A) e aumento de 1000x (B, C e D).

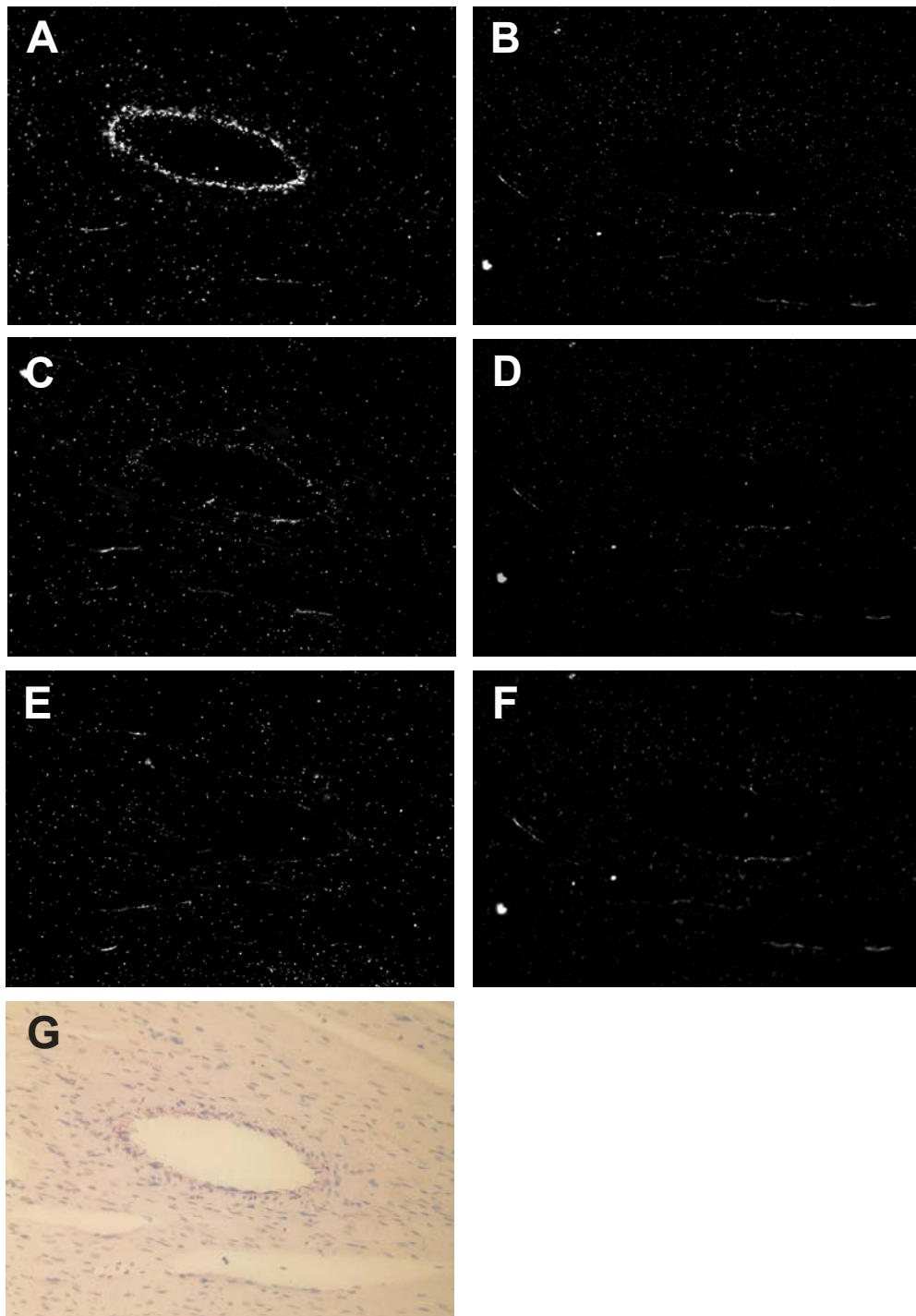


Figura 27. Análise de hibridização *in situ* em coração, sonda do módulo 1, 2 e 3 marcada com ^{35}S -UTP anti-sense (A, C e E) respectivamente, sonda sense (B, D e F), coloração HE (G). Aumento de 200x.

4.4 Northern Blotting

A análise de Northern blotting em testículo e pulmão de rato mostra tamanhos diferentes de transcritos para os genes das Variantes 1, 2 e 4 (Figura 26).

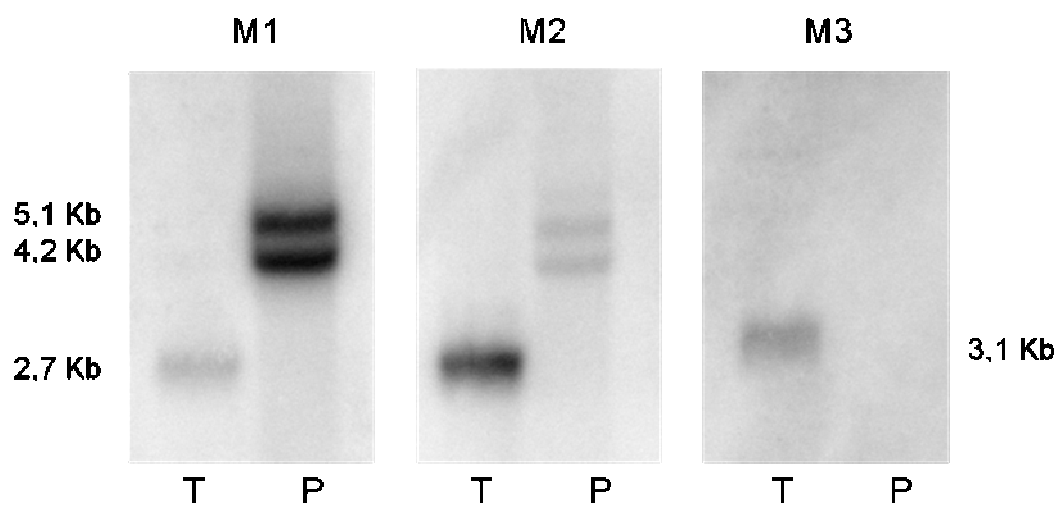


Figura 28. Análise de Northern blotting, RNAm (10 µg) de testículo (T) e pulmão (P) de rato. M1- sonda Var-1 e Var-2, M2 – sonda Var-2 e Var-1 e M3 – sonda Var-3 e Var-4. Tamanho dos transcritos 5,1 e 4,2 Kb Var-1 no pulmão, 2,7 Kb Var-2 no testículo e 3,1 Kb Var-4 no testículo.

Discussão

5. Discussão

Vários estudos têm sido realizados para caracterização do perfil de expressão das isoformas da enzima conversora de angiotensina: ECA somática (Var-1) e ECA testicular (Var-2), além da ECA2. Um conjunto amplo de evidências aponta a enzima conversora de angiotensina I, a ECA, como um passo determinante tanto na fisiologia como na patogênese de várias doenças cardiovasculares e no controle da fertilidade masculina^{36, 37, 38}.

A Var-1 é predominantemente produzida no pulmão e menos expressa em outros tecidos, enquanto que a maior atividade da Var-2 foi detectada primariamente nas espermátides e espermatozóides epididimais^{39, 40}.

Tendo usado a técnica de qRT-PCR para demonstrar que o padrão de expressão da Var-1, Var-2 e ECA2 são coerentes com estudos prévios, nossos resultados de expressão gênica para esses genes foram similares aos encontrados na literatura²⁴. Para os genes de interesse desse estudo, Var-3 e Var-4, observamos expressão da Var-3 predominantemente em pulmão e testículo, porém com níveis relativamente baixos, e para Var-4 alto nível de expressão em testículo e níveis mais baixos em ventrículo esquerdo (Figura 10). Isto sugere que esse gene esteja envolvido no processo da espermatogênese em rato, como mostra a análise de hibridização *in situ*,

pela marcação positiva em células que participam no processo da espermatogênese.

Neste caso, as células com expressão para Var-4 foram as espermátides redondas, mostradas nas análises seriadas de hibridização, comparadas com a lâmina de coloração pelo método de PAS. Através desse método é possível detectar as glicoproteínas no acrossomo em desenvolvimento de espermátides no túbulo seminífero. Não foi observada marcação nas outras células espermatogênicas: espermatogônia, espermatócito primário, espermatócito secundário e espermatozóide. Da mesma forma, não foi observada nas células somáticas, como a célula de Sertoli (sustenta, protege e nutre as células espermatogênicas em desenvolvimento e que se estende da lâmina basal até o lúmen do túbulo seminífero) e a célula de Leydig (produtora de andrógenos, localizada no espaço entre os túbulos seminíferos).

Durante a espermatogênese, as células germinativas passam por uma série de fases do desenvolvimento, envolvendo proliferação de células precursoras, divisão meiótica e diferenciação de espermátide até tornar-se espermatozoides ⁴¹. Essas fases são caracterizadas por mudanças no padrão de expressão de genes, e abrangem a ativação de genes específicos para o tipo celular envolvido ^{42, 43}.

Portanto, isto reforça a participação da Var-4 no processo de espermiogênese, que é um processo de diferenciação complexo das espermatídes formando os espermatozóides (a última fase da espermatogênese).

Para a Var-2, também observamos marcação em espermatídes redondas, nas espermatídes alongadas e em espermatozóides. Porém, dependendo do estágio da associação celular observamos diferentes padrões de expressão entre as variantes 2 e 4.

A espermatogênese não é sincronizada em toda a extensão de um túbulo seminífero, mas ocorre como se fosse por ondas ao longo de cada túbulo. Isso explica o porquê de serem vistos ao longo desses túbulos regiões com fases diferentes da espermatogênese e conseqüentemente um padrão de expressão diferenciada entre um túbulo e outro, para os genes da Var-2 e Var-4, de acordo com a estágio em que se encontra o processo.

Quando analisamos os resultados de hibridização *in situ* com dupla marcação (Var-2 e Var-4), podemos concluir que dependendo do estágio em que se encontra a espermatogênese em determinado túbulo seminífero, temos padrões distintos de expressão para esses genes ou a co-localização deles.

No presente estudo, a Var-2 apresenta localização de 2 padrões distintos de expressão nos túbulos seminíferos (no compartimento adluminal e lúmen do túbulo seminífero) como observamos nas figuras 13A, 14A, 15A, 16C e 16E. Por outro lado, a expressão da Var-4 apresenta uma única localização topográfica no túbulo seminífero, no compartimento adluminal na região mediana (Figuras 13B, 14B, 15B, 16B e 17A). Observamos que ocorre a co-localização da expressão das variantes 2 e 4 em alguns túbulos (Figuras 17C, 17E e 18C), porém, em outros a co-localização não é observada (Figuras 17A, 18A, 19E e 16C). Tal observação pode sugerir que esses genes atuem separadamente ou de forma conjunta no processo de espermiogênese dependendo da fase do processo.

Desde a detecção da alta atividade enzimática da ECA no plasma seminal ⁴⁴, testículo e epidídimo ⁴⁵, a importância da ECA vem sendo estudada na reprodução.

Estudos de expressão com a Var-2 têm sido realizados com resultados controversos. Langford *et al* ⁴⁶ e Pauls *et al* ⁴⁷ mostraram em seus estudos com a Var-2, a expressão do RNAm em células germinativas precoces no estágio paquíteno em camundongo e humano, respectivamente. No entanto, em Sibony *et al* ⁴⁸, não observaram um sinal de hibridização para Var-2 em células diplóides em murino, mas em células haplóides até a primeira etapa da diferenciação das espermatídes e antes do processo de alongação dos espermatozóides.

Como mostrado anteriormente, em nossos estudos com rato adulto, para a Var-2 não foi observada hibridização nas células espermatogênicas diplóides, porém, foi observado hibridização em células haplóides, em todas as etapas da diferenciação das espermátides, desde espermátides redondas até as alongadas e espermatozóides.

Hagaman *et al*³⁷, em 1998 mostraram em seus estudos que a Var-1 não é essencial para a fertilidade do macho, no entanto a Var-2 é primordial. Porém, tanto a Var-1 e Var-2 são importantes para se obter a fertilização *in vivo* e que o esperma de camundongos sem ambas as isoenzimas apresentam defeitos no transporte dentro da tuba uterina e na ligação com a zona pelúcida.

Para sabermos se a Var-4 é crucial para a fertilização entre outras funções provavelmente desconhecidas até o momento, em nosso laboratório, vem sendo desenvolvido animal geneticamente modificado que não expresse a Var-4, e que permita responder a essas indagações.

A expressão no tecido cardíaco é interessante e, por isso, torna-se fundamental demonstrar se ela está co-expressa com a Var-1, só que em menor quantidade, ou se é particular de um determinado tipo celular. Porém, os resultados de hibridização *in situ* para a Var-4 não apresentaram marcação, provavelmente devido a baixos níveis de expressão como foi detectado em análise de Real Time em ventrículo esquerdo. No entanto, em

nosso laboratório, foi desenvolvido o animal transgênico para o promotor da Var-4, que apresenta níveis mais alto de expressão da Var-4 no coração e que possibilitará estudos futuros funcionais e utilizando a técnica de hibridização *in situ* para a localização do tipo celular no tecido cardíaco. Estes dados serão fundamentais para anteciparmos a(s) possível(eis) participação(ões) da Var-4 no coração em situações fisiológicas e ou patológicas.

Conclusão

6. Conclusão

Podemos concluir que:

As Variantes 1, 2, 3 e 4 da ECA apresentam expressão tecido-específica.

A expressão da Var-3 ocorre em níveis baixos em pulmão e testículo, e apresenta apenas traços de expressão nos demais.

A Var-4 tem expressão alta no testículo em espermátide redonda, e mais baixa em ventrículo esquerdo.

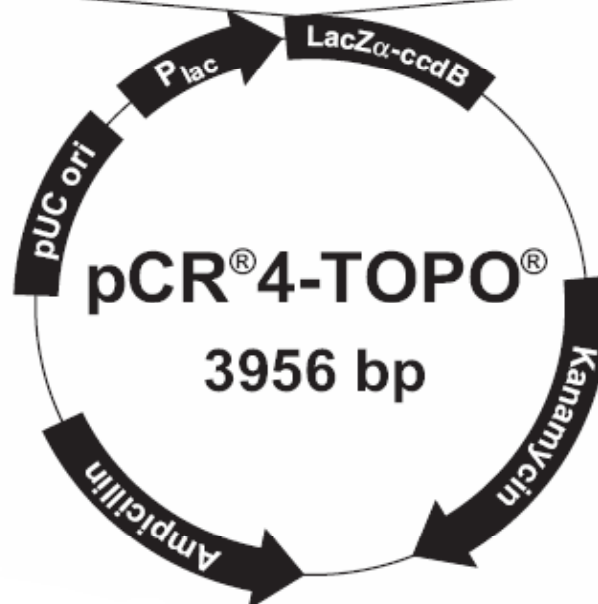
Em conjunto, estes dados sugerem que as 2 novas variantes da ECA, Var-3 e Var-4, apresentam expressão tecido-específica. O padrão de expressão da Var-4, principal objeto deste trabalho, é consistente com a idéia de que esta variante gênica pode estar envolvida com o controle da espermatogênese e em processos cardíacos, até então não caracterizados.

Anexos

Anexo A. Mapa do pCR[®]4-TOPO[®]

LacZ α initiation codon

	M13 Reverse priming site				T3 priming site
201	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTCA	GAATTAACCC
	GTGTGTCCTT	TGTCGATACT	GGTACTAATG	CGGTTGAGT	CTTAATTGGG
					AGTGATTTC
261	Spe I	Pst I	Pme I	EcoR I	EcoR I
	GACTAGTCCT	GCAGGTTTAA	ACGAATTCGC	CCTT	PCR
	CTGATCAGGA	CGTCCAAATT	TGCTTAAGCG	GGA	Product
					AAGGGC
					GAATTCGCGG
					TTCCCG
					CTTAAGCGCC
311	T7 priming site	M13 Forward (-20) priming site			
	CCGCTAAATT	CAATTCGCC	TATAGTGAGT	CGTATTACAA	TCACTGGCC
	GGCGATTTAA	GTTAAGCGGG	ATATCACTCA	GCATAATGTT	AAGTGACCGG
					GTCGTTTAC
					CAGCAAAATG



Anexo B. Gráficos dos normalizadores

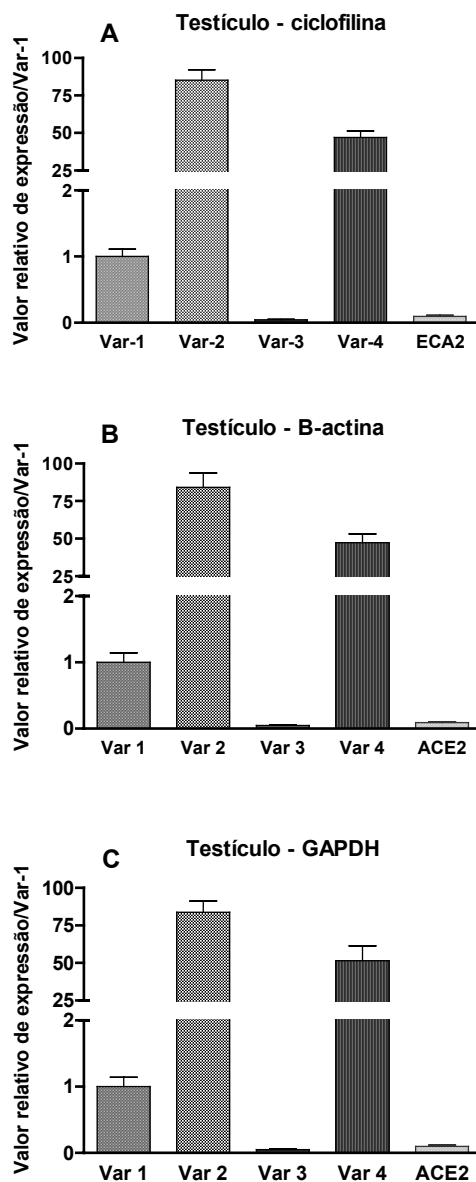


Figura 29. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de testículo de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

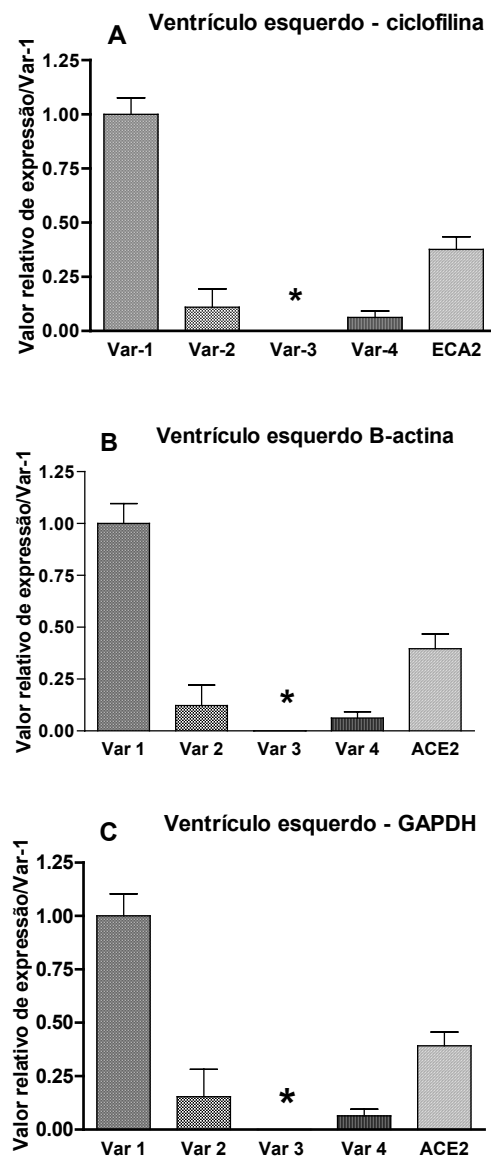


Figura 30. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de ventriculo esquerdo de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

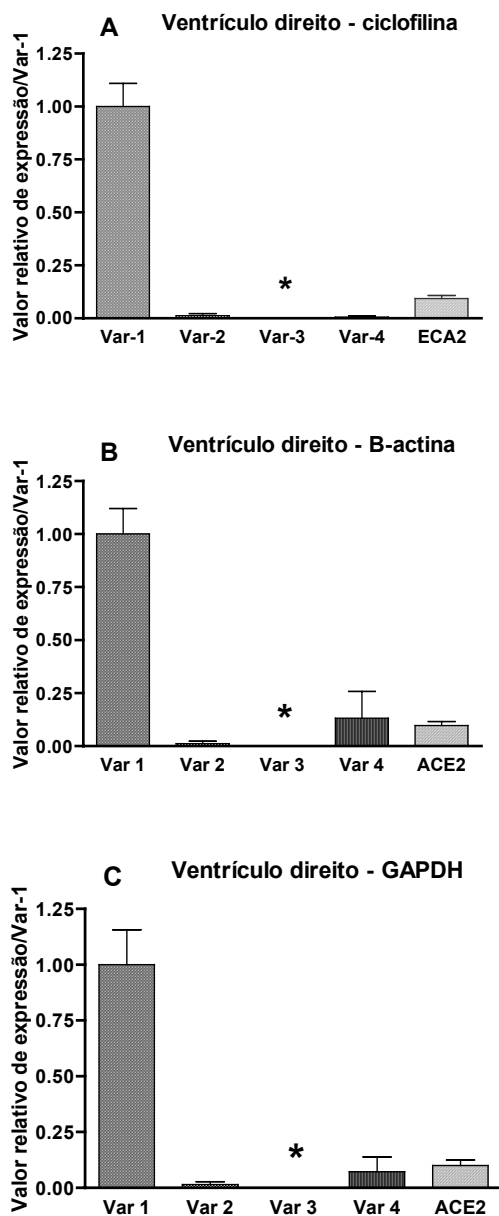


Figura 31. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de ventrículo direito de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

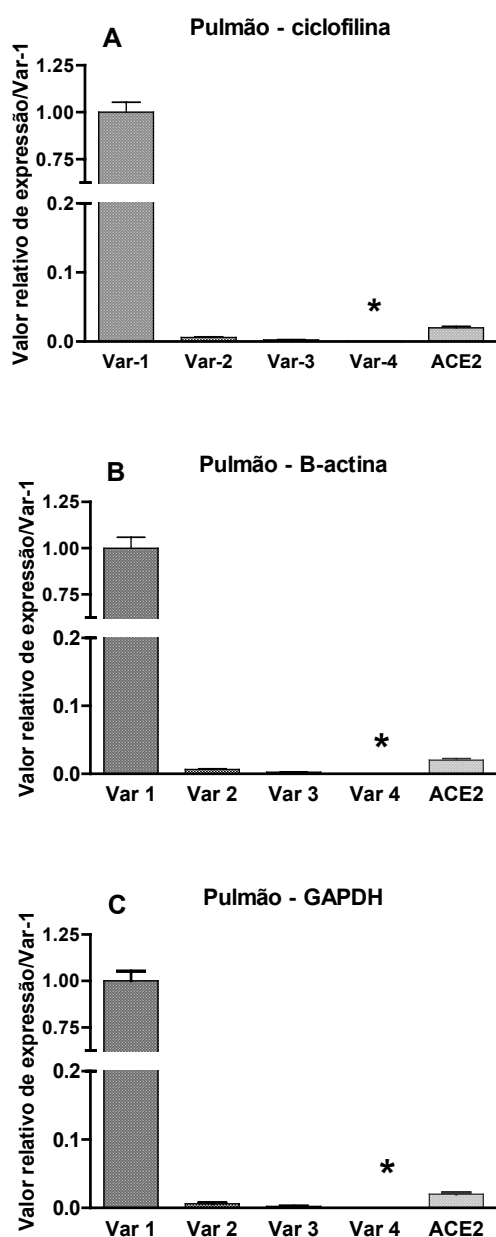


Figura 32. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de pulmão de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

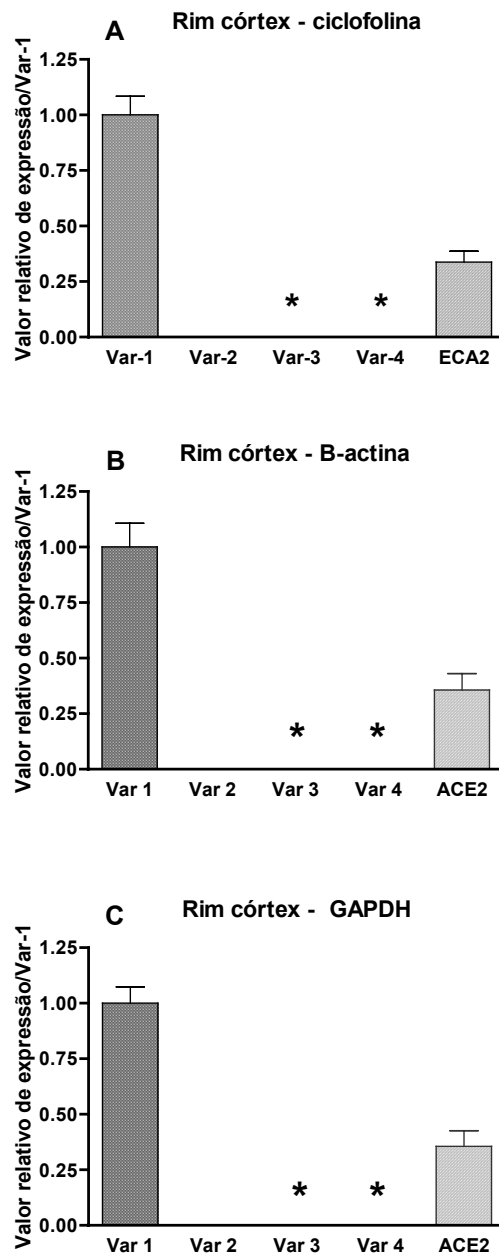


Figura 33. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de rim-córtex de rato (n = 10) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

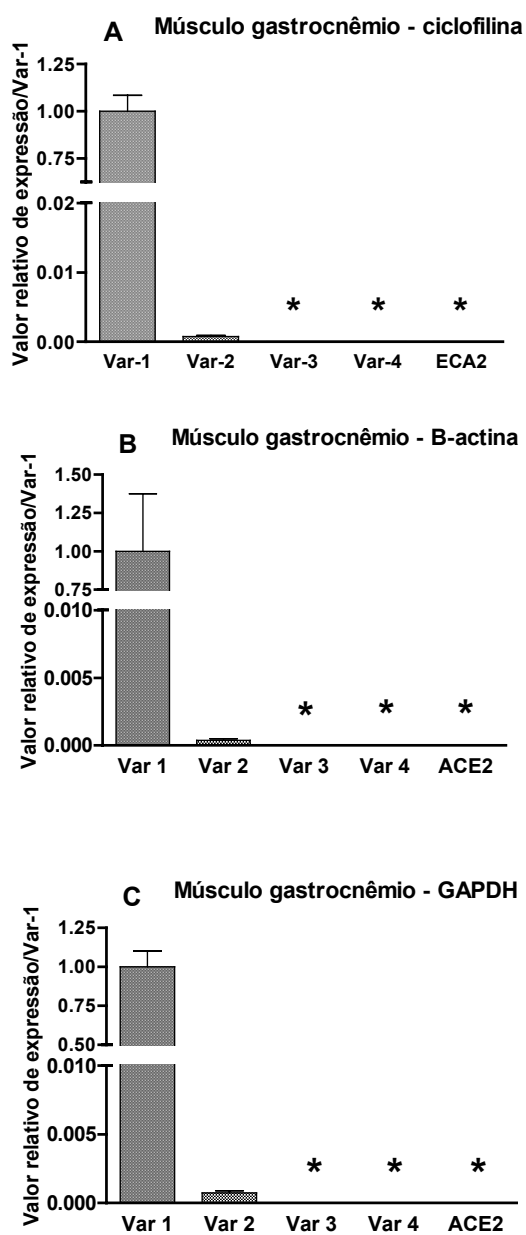
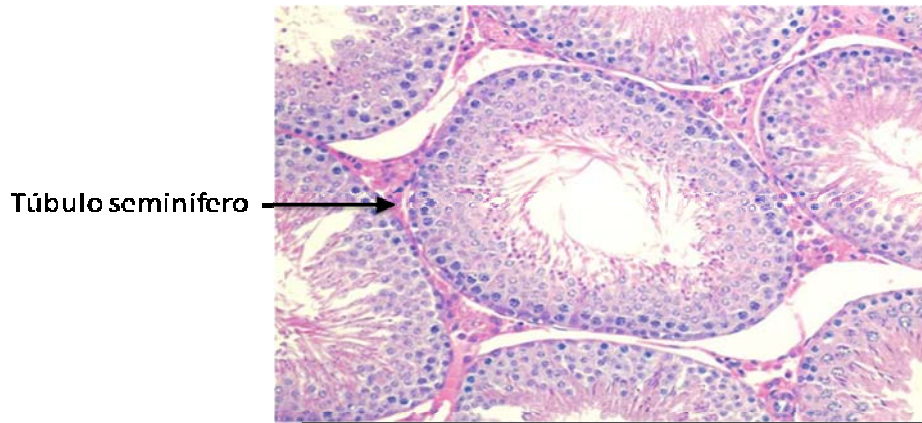


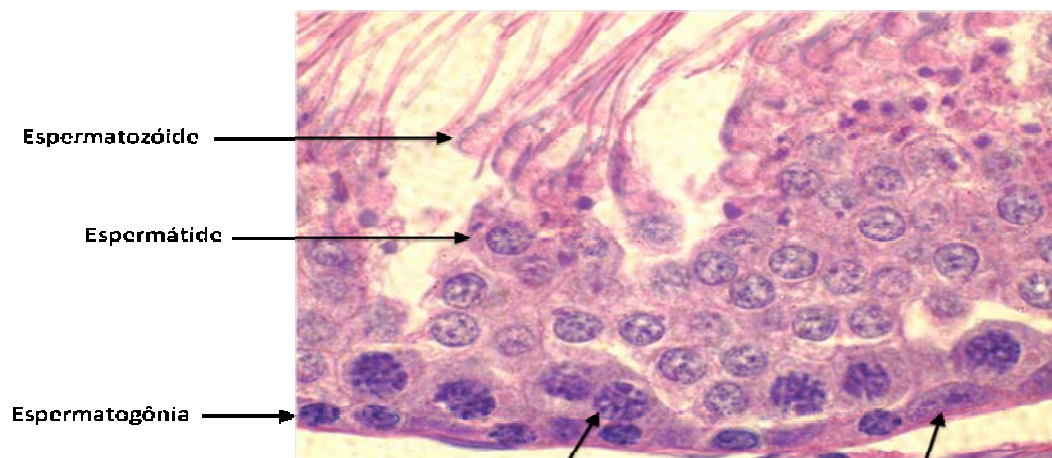
Figura 34. Valor relativo de expressão de RNAm das variantes 1, 2, 3 e 4 e ECA2 / variante-1, de músculo gastrocnêmio de rato ($n = 10$) por QRT-PCR: (A) normalizado pela ciclofilina, (B) normalizado pela β -actina, (C) normalizado pelo GAPDH. (*) indica que não foi possível à detecção de expressão pela técnica utilizada.

Anexo C. Túbulo seminífero de rato, coloração hematoxilina - eosina.



Túbulo seminífero

Aumento 200x



Espermatozóide

Espermátide

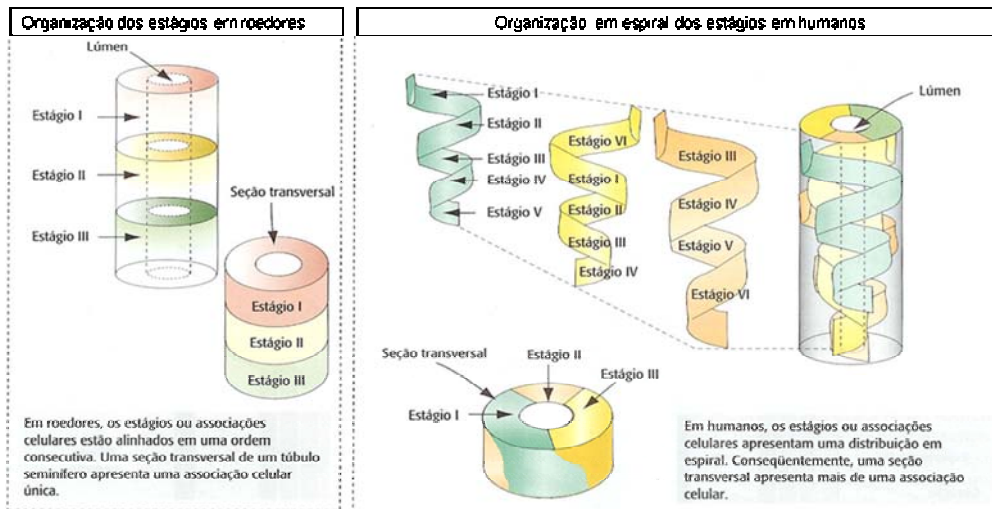
Espermatogônia

Espermatócito primário

Célula de Sertoli

Aumento 1000x

Anexo D. Organização das associações celulares em túbulos seminíferos de roedores e de humanos



Adaptado de Fierzzenbaum AL. *Histologia e Biologia celular – Uma Introdução à Patologia*. Rio de Janeiro, 2004.

Referências

8. Referências

1. ZAMAN MA, OPARIL S, CALHOUN DA. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nature Reviews*. 2002. Aug;1:621-636.
2. DAVIS JO, FREEMAN RH. Mechanisms regulating rennin release. *Physiol Review*, 1976;56:1-56
3. MENDELSON FA. Localization and properties of angiotensin receptors. *J Hypertens*. 1985 Aug;3(4):307-16.
4. CAMPBELL DJ. Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987a;10 Suppl 7:S1-8.
5. DZAU VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. : *Circulation*. 1988 Jun;77(6 Pt 2):14-13.
6. TEWKSBURY DA. Angiotensinogen. *Fed Proc*. 1983 Jul;42(10):2724-8.
7. CAMPBELL DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*. 1987b Jan;79(1):1-6.
8. SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000 Jul 28;91(1-3):45-62.

9. MORGAN L, PIPKIN FB, KALSHEKER N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Nov;28(11):1211-22.
10. DZAU VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1987 Jan 23;59(2):59A-65A.
11. LIN SY, GOODFRIEND TL. Angiotensin receptors. *Am J Physiol.* 1970 May;218(5):1319-28.
12. CAREY RM, WANG ZQ, SIRAGY HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2):155-63.
13. SASAMURA H, HEIN L, KRIEGER JE, PRATT RE, KOBILKA BK, DZAU VJ. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 May 29;185(1):253-9.
14. NAVAR LG, HARRISON-BERNARD LM, NISHIYAMA A, KOBORI H. Regulation of intrarenal angiotensina II in hypertension. *Hypertension* 2000;239:316-22.

15. THOMAS WG, MENDELSON FAO. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *The Intern J of Biochemistry & Cell Biology*. 2003. 35:774-779.
16. LEUNG PS, CHAN WP, WONG TP, SERNIA C. Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *J Endocrinol*. 1999a Jan;160(1):13-9.
17. PHILLIPS MI, SPEAKMAN EA, KIMURA B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept*. 1993 Jan 22;43(1-2):1-20.
18. POISNER, A. M. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol*. 1998.19:232-252.
19. LEUNG PS, WONG TP, SERNIA C. Angiotensinogen expression by rat epididymis: evidence for an intrinsic, angiotensin-generating system. *Mol Cell Endocrinol*. 1999b Sep 10;155(1-2):115-22.
20. SKEGGS LT, KAHN JR, SHUMWAY NP. Preparation and function of the hypertension converting enzyme. *J Exp Med*. 1956, 103:295-299.

21. ERDOS EG, SKIDGEL RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 1987 Apr;56(4):345-8.
22. RAMARAJ P, KESSLER SP, COLMENARES C, SEN GC. Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *J Clin Invest.* 1998 Jul 15;102(2):371-8.
23. TURNER AJ, HOOPER NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Apr;23(4):177-83.
24. HARMER D, GILBERT M, BORMAN R, CLARK KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 2002 Dec 4;532(1-2):107-10.
25. 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 Sep 1;87(5):E1-9.

26. 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 Oct 27;275(43):33238-43.
27. RIORDAN JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol*. 2003;4(8):225. Epub 2003 Jul 25.
28. BOUCHER R, ASSELIN J, GENEST J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 1974; 34(suppl I): I-203-12.
29. ARAKAWA K, IKEDA M, FUKUYAMA J, SAKAI T. A pressor formation by trypsin from renin-denatured human plasma protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976 Mar;42(3):599-602.
30. ARAKAWA K, MARUTA H. Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed 'kinin-tensin enzyme system'. *Nature*. 1980 Dec 25;288(5792):705-6.
31. TONNESEN MG, KLEMPNER MS, AUSTEN KF, WINTROUB BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. 1982 Jan;69(1):25-30.

32. WINTROUB BU, SCHECHTER NB, LAZARUS GS, KAEMPFER CE, SCHWARTZ LB. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol.* 1984 Nov;83(5):336-9.
33. SCHECHTER NM, CHOI JK, SLAVIN DA, DERESIENSKI DT, SAYAMA S, DONG G, LAVKER RM, PROUD D, LAZARUS GS. Identification of a chymotrypsin-like proteinase in human mast cells. *J Immunol.* 1986 Aug 1;137(3):962-70.
34. RELLA M, ELLIOT JL, REVETT TJ, LANFEAR J, PHELAN A, JACKSON RM, TURNER AJ, HOOPER NM. Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) gene: a novel mammalian homologue of ACE. *BMC Genomics* 2007, 8:194.
35. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
36. KREGE JH, JOHN SW, LANGENBACH LL, HODGIN JB, HAGAMAN X, BACHMAN ES, JENNETTE JC, O' BRIEN DA, SMITHIES O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995; 375:146-8.

37. HAGAMAN JR, MOYER JC, BACHMAN ES, SIBONY M, MAGYAR X, WELCH JE, SMITHIES O, KREGGE JH, O' BRIEN DA. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2552-7.
38. KANG N, WALTHER T, TIAN XL, BOHLENDER J, FUKAMIZU A, GANTEN D, BADER M. Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and angiotensinogen synthesis. *J Mol Med* 2002;80:359-366.
39. STRITTMATTER SM, SNYDER SH. Angiotensin-converting enzyme in the male rat reproductive system: autoradiographic visualization of [³H] Captopril. *Endocrinology* 1984; 11:2332-2341.
40. VANHA-PERTTULA T, MATHER JP, BARDIN CW, MOSS SB, BELLVE AR. Localization of the angiotensin--converting enzyme activity in testis and epididymis. *Biol Reprod* 1985;33:870-877.
41. RUSSELL LD, ETTLIN RA, HIKIN APS, CLEGG EC. Staging for the rat. In: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 63-118 (Cache River Press 1990).
42. HECHT NB, BOWER PA, WATERS SH, YELICK PC, DISTEL RJ. Evidence for haploid expression of mouse testicular genes. *Exp Cell Res* 1986; 164:183-190.

43. WILLISON K, ASHWORTH A. Mammalian spermatogenic gene expression. *Trends Genet* 1987; 3:351-355.
44. DEPIERRE, D. BARGETZI J.-P AND ROTH, M. Dipeptidyl carboxypeptidase from human seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1978. 523:469-476
45. CUSHMAN DW, CHEUNG HS. Concentrations of the angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1971 250-261.
46. LANGFORD KG, ZHOU Y, RUSSELL LD, WILCOX JN, BERNSTEIN KE. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 1993. 48, 1210-1218
47. PAULS K, METZGER R, STEGER K, KLONISCH S, DANILOV S, FRANKE FE. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia.* 2003. 35,32-43.
48. SIBONY M, SEGRETAIN D, GASC JM. Angiotensin-Converting enzyme in murine testis: Step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 1994. 50, 1015-1026.