

Artigo de  
Atualização

## A Emergência de um Novo Modulador Cardiovascular - A 2ª enzima de conversão da Angiotensina 2 (ECA2)

# 4

### The Emergence of a New Cardiovascular Modulator 2<sup>nd</sup> Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2)

*Emilio Antonio Francischetti, Aloísio Francischetti, Virginia Genelhu de Abreu*

*Universidade do Estado do Rio de Janeiro*

**Palavras-chave:** ECA2, Renina, Hipertensão arterial

**Key words:** ACE2, Renin, Arterial hypertension

#### Resumo

O sistema renina-angiotensina (SR-A) exerce um papel central no controle das várias alças de regulação cardiovascular. Muito dos seus efeitos são modulados pela enzima conversora de angiotensina (ECA) que remove dois aminoácidos da angiotensina I para formar a angiotensina II (Ang II). A Ang II é o vasoconstrictor mais potente entre os que participam da fisiopatogenia da hipertensão arterial. Outros produtos do SR-A também contribuem para os mecanismos reguladores da perfusão tecidual. É o caso da angiotensina-(1-7), gerada diretamente da Ang I por endopeptidases, e que é um potente vasodilatador, opondo-se às ações tróficas da Ang II. A partir de 2000, uma outra enzima do SR-A foi caracterizada; sua seqüência genômica apresentou várias semelhanças estruturais com o gene da ECA humana. Por isso, foi denominada ECA2. É expressa principalmente pelas células endoteliais, coração e rim. A ECA2 tem atividades biológicas distintas da ECA, convertendo a Ang I em Ang-(1-9), que é subsequentemente hidrolisada pela ECA em Ang-(1-7). A ECA2 hidrolisa a Ang II, produzindo, também, a partir daí, a Ang-(1-7). A ECA2, além de ser uma enzima chave na geração de um potente vasodilatador [Ang-(1-7)], é essencial para uma adequada função miocárdica. A perspectiva de se contar com uma droga que especificamente induza à formação de ECA2, atenuando, ao mesmo tempo, a atividade da Ang II poderá abrir novos horizontes terapêuticos para a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

#### Abstract

The renin-angiotensin system (RA-S) has a central role in the control mechanisms of cardiovascular regulation. Most of its effects are modulated by the angiotensin-converting enzyme (ACE), which promotes removal of two aminoacids from angiotensin I to form angiotensin II (Ang II). The Ang II molecule is the most potent vasoconstrictor among those that participate in the pathogenesis of arterial hypertension. Other products of the RA-S also participate in the control of tissue perfusion. Angiotensin-(1-7), produced by the endopeptidase clivage of Ang I, is a potent vasodilator which has opposite effects compared with those of Ang II. In 2000, another enzyme of the RA-S was identified; its genomic sequence revealed several structural similarities with the human ACE gene. For this reason, it was named ACE2. It is expressed mainly in the endothelial cells, heart, and kidney. The biological activity of ACE2 is completely distinct from ACE as it converts Ang I in Ang-(1-9), which is subsequently hydrolyzed by ACE into Ang-(1-7). ACE2 hydrolyzes Ang II thus generating Ang-(1-7). Besides being a key-enzyme in the generation of a potent vasodilator peptide [Ang-(1-7)], ACE2 is crucial for an adequate myocardial performance. In the near future, the existence of a drug which specifically induces ACE2 formation, while at the same time reducing Ang II activity, will open up new horizons in prevention therapies for arterial hypertension and cardiovascular disease.

## Introdução

O sistema renina-angiotensina (SR-A) exerce um papel central no controle de várias alças de regulação cardiovascular. Muitos dos seus efeitos são modulados pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil-carboxipeptidase que remove dois aminoácidos da angiotensina I (Ang I) para formar a angiotensina II (Ang II). A Ang II é o vasoconstritor mais potente entre os que participam da fisiopatogenia da hipertensão arterial, exercendo seus efeitos através da ocupação de receptores específicos. A ECA é expressa na membrana plasmática de células do pulmão, em células endoteliais do sistema cardiovascular e do sistema reprodutor. Além de remover os dois peptídios terminais da molécula da Ang I, degrada a bradicinina em bradicinina-(1-7).

Até a alguns anos, eram essas as vias bioquímicas conhecidas do SR-A – a Ang I atuando como molécula precursora, tendo características de pró-hormônio e servindo de substrato para a ação de enzimas hidrolíticas, cujo produto final mostrava elevada atividade biológica. A partir da década de 60, a intervenção sobre o SR-A com inibidores da ECA e, mais recentemente, antagonistas de receptores de Ang II, foi um marco importante não só para o subsequente conhecimento do próprio sistema e sua participação em distintos mecanismos fisiopatológicos de doença, como pelas implicações terapêuticas que se traduziram em mudanças significativas na história natural da hipertensão arterial, da insuficiência cardíaca, da disfunção endotelial e da doença renal, incluindo a nefropatia diabética.

Na última década, os conhecimentos sobre o SR-A foram consideravelmente expandidos. Atualmente se reconhece que outros produtos do sistema, também biologicamente ativos, contribuem para os mecanismos reguladores da perfusão tecidual e mais, eles se relacionam com diversos peptídeos e autacóides não só em condições normais, como em distintos estágios de doença. É o caso da angiotensina-(1-7), gerada diretamente da Ang I por endopeptidases (prolil-endopeptidase, endopeptidase neutra, metaloprotease e prolil-carboxipeptidase), que é um potente vasodilatador, opondo-se às ações tróficas da Ang II<sup>1</sup>. Essas endopeptidases estão distribuídas em sítios os mais diversos: endotélio vascular, tubos contornados proximais e distais, cérebro e musculatura lisa dos vasos.

A complexidade do SR-A é muito maior do que inicialmente se supunha. A Ang II, por exemplo,

pode ser sequencialmente clivada em Ang III [Ang-(2-8)], Ang IV [Ang-(3-8)] e Ang-(1-7)<sup>2,3</sup>. Esta última pode ser subsequente hidrolisada em fragmentos menores: a Ang-(2-7) e a Ang-(3-7)<sup>4</sup>. Além disso, a própria ECA não só processa a Ang I em Ang II, mas promove também a hidrólise da Ang-(1-7) em Ang-(1-5). Recentemente, demonstrou-se que a prolil-carboxipeptidase, além de participar da síntese da Ang-(1-7), ativa a calicreína, contribuindo para as interações sinérgicas da Ang-(1-7) e bradicinina sobre o tônus vascular<sup>5</sup>. Uma outra enzima – a quimase cardíaca, que se expressa predominantemente no coração e é secretada pelos mastócitos, converte a Ang I em Ang II, estabelecendo uma via de síntese alternativa para o peptídeo pressor<sup>6</sup> (Figura 1).

Todo esse sistema de biotransformação acabou se definindo como um sistema de mediadores múltiplos, gerando vários produtos biologicamente ativos que além de atuarem sistemicamente, à semelhança de hormônios, conduzem funções moduladoras sobre compartimentos teciduais e células adjacentes – ações parácrinas – ou dentro das próprias células – ações autócrinas<sup>7</sup>. Como exemplo, os miócitos cardíacos expressam receptores de angiotensina, hipertrofiando-se graças às ações locais da mesma. O octapeptídeo, por sua vez, promove, no que concerne ao coração, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. Tais efeitos locais podem ser inibidos pela intervenção farmacológica sobre o SR-A que, dependendo da patologia em questão e de seu estágio, previne a fibrose miocárdica e orienta de modo mais apropriado a remodelação cardíaca pós-infarto<sup>8</sup>.

## ECA2 – descoberta e participação na biotransformação do SR-A

Em 2000, Tipnis et al.<sup>9</sup> descreveram pela primeira vez uma protease clonada de uma livraria de cDNA de células obtidas de um paciente com linfoma. Devido à seqüência genômica ter várias semelhanças estruturais com o gene da ECA humana, denominaram-na ACEH (do inglês, *angiotensin converting enzyme homolog*). Neste mesmo ano, Donoghue et al.<sup>10</sup> clonaram, de uma livraria de cDNA preparada com tecido ventricular de um paciente com insuficiência cardíaca, uma outra proteína idêntica à ACEH que rotularam de ACE2 (do inglês, *angiotensin converting enzyme*), ou ECA2 em português. A ECA2 é uma metaloprotease de 805 aminoácidos que apresenta homologia considerável com a ECA. Atua, porém, como uma carboxipeptidase e não como uma dipeptidil-carboxipeptidase à semelhança da ECA, e se

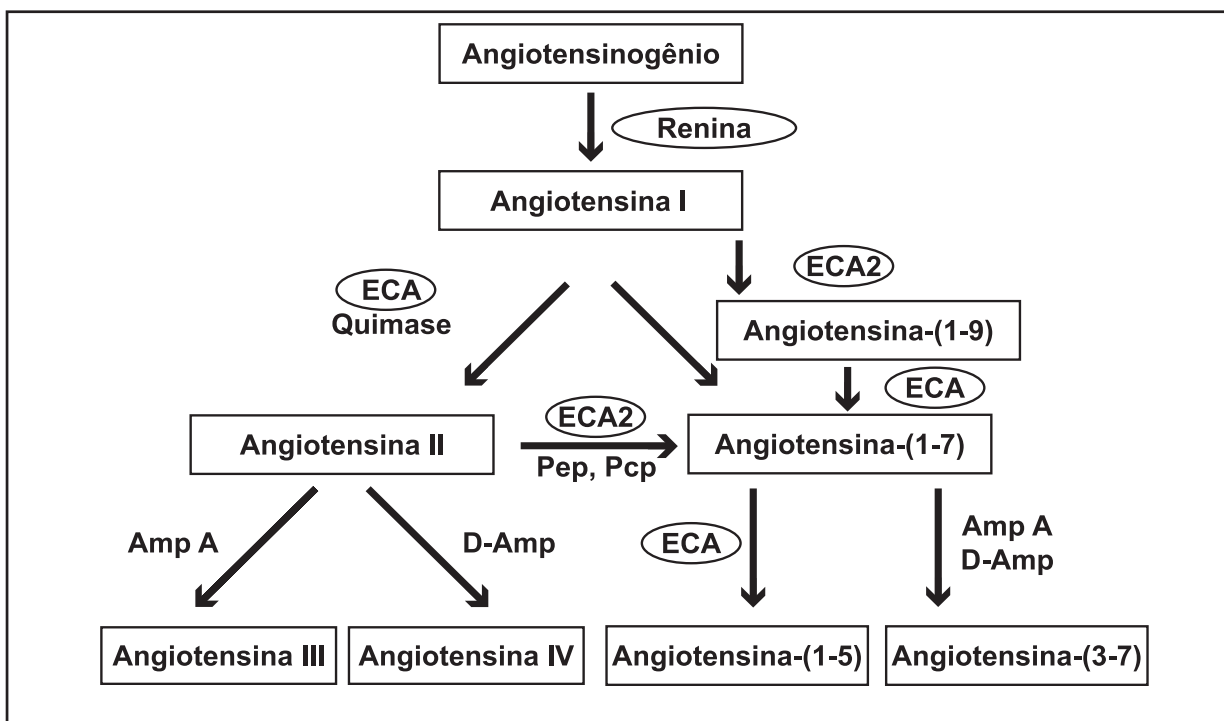


Figura 1

Vias de transformação do Angiotensinogênio.

A ECA2 atua no processo de formação da Ang-(1-9) e da Ang-(1-7) a partir da Ang II.

(Amp= aminopeptidases; D-amp= dipeptidil-aminopeptidase; PEP= prolil-endopeptidase; PCP= prolil-carboxipeptidase)

expressa principalmente em células endoteliais do coração e rim.

Como já mencionado, a ECA2 exibe atividades bioquímicas muito distintas da ECA, convertendo a Ang I em Ang 1-9<sup>10</sup>. A Ang-(1-9), cujas ações não foram ainda bem definidas, é hidrolisada pela ECA em Ang-(1-7). Outra ação da ECA2 é a hidrólise da Ang II, com remoção de um aminoácido, produzindo, a partir daí, a Ang-(1-7)<sup>11</sup>. A ação catalítica da ECA2 tem eficiência aproximadamente 500 vezes maior quando o substrato é a Ang II, em comparação à sua ação sobre a Ang I. A ECA2 é, além disso, 10 a 600 vezes mais eficiente que a prolil endopeptidase e a prolil-carboxipeptidase, respectivamente, para gerar Ang-(1-7) a partir da Ang II<sup>12</sup>.

Este novo capítulo da história do SR-A claramente configura um segundo braço do sistema do qual emergem a ECA2 e a Ang-(1-7). A ECA2, por gerar um vasodilatador – a Ang-(1-7), e por hidrolisar a Ang II – contrabalançaria os efeitos vasopressores da ECA mediados pela Ang II.

A Ang-(1-7) é um potente vasodilatador não só em preparações isoladas, como em vários modelos experimentais e ainda quando testada em seres humanos<sup>7</sup>. Contribui também para a neoangiogênese de processos cicatriciais, de processos inflamatórios crônicos e do crescimento de tumores<sup>13,14</sup>. É, além disso, um importante co-regulador da pressão arterial. Experimentos utilizando ratos espontaneamente hipertensos e normotensos têm evidenciado que a administração de anticorpos anti-Ang-(1-7) reverte os efeitos hipotensores de inibidores da ECA ou dos antagonistas de receptores da Ang II. Por outro lado, a Ang-(1-7) potencializa os efeitos da bradicinina<sup>15</sup>. A ação vasodilatadora da Ang-(1-7) parece ser independente da acetilcolina, é inibida pela indometacina e bloqueada pela [D-Ala7] Ang-(1-7), um inibidor da NO Síntase<sup>7</sup>. Em indivíduos hipertensos não-tratados, a Ang-(1-7) está significativamente diminuída na urina, elevando-se notavelmente durante a administração crônica de um inibidor da ECA<sup>16</sup>.

Postula-se, atualmente, que o comportamento dual do SR-A configurando um sistema dentro de um sistema – permitiria que estímulos e inibições atuassem em um mesmo órgão efector<sup>17</sup>. Seria um modelo cibernético, com inúmeras alças de retroalimentação que se ajustariam para manter em equilíbrio relativamente estável os dois braços do sistema. Eventuais desequilíbrios resultariam em hipertensão ou hipotensão.

## As ações da ECA2 vão além de sua participação no controle da pressão arterial

### ECA2 vs remodelação cardíaca

Observações experimentais têm sustentado a hipótese de que a ECA2 estaria envolvida no controle sistêmico da pressão arterial e em parâmetros relacionados à função contrátil do coração. Crackwover et al.<sup>11</sup>, utilizando quatro abordagens experimentais diferentes, comprovaram o papel de regulador crítico que a ECA2 tem sobre ambas as funções. Primeiramente constataram que modelos de ratos Sabra hipertensos sódio-sensíveis (SBH/y) tinham níveis de RNAm da ECA2 diminuídos em comparação aos animais Sabra normotensos e sódio resistentes (SBN/y). Nos SBH/y a pressão sistólica elevou-se 10mmHg a 20mmHg a mais que nos SBN/y, o que seria consistente com a hipótese de que a ECA2 teria um papel central nos mecanismos que modulam a pressão arterial desses animais. Confirmando a hipótese, observaram que após sobrecarga de sódio, a pressão arterial dos SBH/y se elevava ainda mais, o que coincidia com níveis reduzidos de ECA2. Em contrapartida, os SBN/y não só permaneciam normotensos na vigência da sobrecarga salina, como seus níveis de ECA2 mantinham-se estáveis, fazendo supor que a resistência dos SBN/y à hipertensão ocorreria por conta dos efeitos protetores da ECA2.

Em segundo lugar, demonstraram que a expressão da ECA2 permanecia constantemente reduzida em outros modelos experimentais de hipertensão, como nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e nos ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidentes vasculo-encefálicos (SHR/SP).

Em terceiro lugar, mostraram que o gene da ECA2 estava mapeado no cromossoma X humano onde previamente um *locus* de traço quantitativo (QTL, do inglês *quantitative trait locus*) havia sido caracterizado em vários modelos de hipertensão em ratos sem, até então, um gene candidato conhecido. Esta foi uma das descobertas mais relevantes da história recente do SR-A, se for considerada que a maior parte das doenças cardiovasculares corresponde a traços quantitativos multifatoriais controlados por fatores genéticos e ambientais. Assim, a posição no mapa genômico e a menor expressão da ECA2 nos SBH/y, SHR e SHR/SP indicam que a enzima de conversão recém-caracterizada pode ser um forte gene candidato para um QTL hipertensivo no cromossoma X.

Trabalhando agora com modelos genéticos de camundongos nocauteados para o gene da ECA2,

comprovaram à saciedade, que a ECA2 é essencial para uma adequada função miocárdica, já que nocauteada nestes animais, embora não altere a pressão arterial, provoca severa disfunção contrátil e dilatação ventricular, sem fibrose intersticial cardíaca e hipertrofia miocárdica, em muito semelhante a constelações de achados morfofuncionais do miocárdio hibernante ou atordoado. Vale mencionar que essas alterações se acompanharam de elevação nos níveis de Ang II, justificadas pela ausência da ECA2 no processo de clivagem da molécula do octapeptídeo pressor. Como contraprova adicional procederam à ablação da ECA2 e da ECA. As anormalidades cardíacas foram inteiramente abolidas, sugerindo fortemente que estariam associadas a um excesso de ECA e à ausência de formação da Ang-(1-7), e que a ECA e ECA2 regular-se-iam reciprocamente através de alças de regulação negativas.

### ECA2 vs nefropatia diabética – evidências experimentais

São inúmeros os ensaios clínicos e trabalhos experimentais comprovando o envolvimento do SR-A nas alterações hemodinâmicas e não-hemodinâmicas presentes na nefropatia diabética<sup>18,19</sup>. Por outro lado, fármacos que atuam sobre o SR-A, como os inibidores da ECA e antagonistas de receptor da Ang II, conferem nefroproteção em modelos animais e em pacientes portadores de nefropatia diabética<sup>20,21</sup>.

A ECA2 está presente no rim, localizando-se, à semelhança da ECA, nos túbulos contornados proximais e distais. Expressa-se discretamente nos glomérulos e no mesângio glomerular.

Em 2003, Tikellis et al.<sup>22</sup> demonstraram em ratos Sprague-Dawley, nos quais se induziu diabetes com estreptozotocina, que a expressão da ECA2 estava reduzida nos túbulos proximais desses roedores e que a administração de um inibidor da ECA revertia esse quadro. Postularam que a deficiência local de ECA2 promoveria um aumento da Ang II que acabaria por induzir fibrose intersticial e progressão da doença renal. Nesta linha de raciocínio, os autores não excluíram a provável participação da Ang-(1-7), tendo em vista que a expressão de ECA2 nos túbulos renais de ratos espontaneamente hipertensos acompanhava *pari passu* a expressão de Ang-(1-7) no mesmo sítio anatômico<sup>23</sup>. Esses resultados, ainda que restritos à área experimental, levantam a possibilidade de que a ausência ou redução do peptídeo vasodilatador Ang-(1-7) associada à menor expressão da ECA2, teriam um papel chave na progressão da doença renal de diabéticos, pela contraposição que exercem sobre os efeitos hemodinâmicos, tróficos e antinatriuréticos da Ang II.

## Que intervenções seriam possíveis na prática clínica sobre a ECA2? Perspectivas e novos horizontes terapêuticos

Pelos dados de que se dispõe pode-se antecipar que a molécula da ECA2 é uma das mais promissoras perspectivas para a indústria farmacêutica. Tanto que a *Millenium Pharmaceuticals Inc*<sup>24</sup> e a divisão de pesquisa da *Dyax Corporation*<sup>25</sup>, dos EUA, desenvolveram nos últimos dois anos moléculas inibidoras da ECA2, com vistas a tornar possível aos pesquisadores um instrumento farmacológico valioso para induzir hipertensão ou mesmo identificar indivíduos mais sensíveis a estímulos pressores, como resposta à sobrecarga salina, ou a caracterização de estados hiper-reninêmicos. Mais ainda, um inibidor da ECA2 poderia ser um importante avanço no controle de algumas situações clínicas que se acompanham de hipertensão arterial sintomática.

A possibilidade, porém, de se contar com uma droga que induza especificamente a ECA2 e que, ao mesmo tempo, atenuar a atividade da Ang II, representará uma esperança de excepcional valor clínico, que abrirá novos horizontes terapêuticos para a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

### Referências bibliográficas

- Ferrario CM, Brosnikan KB, Dig DI, et al. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*. 1991;18(suppl III):126-33.
- Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1716-722.
- Wright JW, Harding JW. Regulatory role of brain angiotensin in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev*. 1992;17:227-62.
- Braszko JJ, Wlasienko J, Koziolkiewicz W, et al. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive properties. *Brain Res*. 1991;554:49-54.
- Paula RD, Lima CV, Britto RR, et al. Potentiation of the hypotensive effects of bradykinin by angiotensin-(1-7) related peptides. *Peptides*. 1999;20:493-500.
- Francischetti EA. Vias alternativas da angiotensina I no tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 1995;64(3):191-94.
- Ferrario CM. Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5:129-34.
- Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. *JAMA*. 1995;273:1450-456.
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275:33238-3243.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). *Circ Res*. 2000;87:E1-E9.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002;417:822-28.
- Vickers C, Hales P, Kaushik V, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002;277:14838-4843.
- Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000;91:45-62.
- Machado RD, Ferreira MA, Belo AV, et al. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regul Pept*. 2002;107:105-113.
- Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, et al. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension*. 1998;31:699-705.
- Luque M, Martin P, Martell N, et al. Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Hypertens*. 1996;14:799-805.
- Yagil Y, Yagil C. Hypohypotension. ACE2 modulates blood pressure in mammalian organism. *Hypertension*. 2003;41:871-73.
- Anderson S, Jung FF, Ingeltinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol*. 1993;265:F477-F486.
- Matos JPS, Abreu VG, Francischetti EA. Como diagnosticar e tratar a nefropatia diabética. *Rev Bras Med*. 2002;59(7):507-20.
- Anderson S, Rennke HG, Garcia DL, Brenner BM. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rat. *Kidney Int*. 1989;36:S26-S36.
- Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med*. 2001;345:870-78.
- Tikelis C, Johnston CI, Forbes JM, et al. Characterization of renal angiotensin converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension*. 2003;4:392-97.
- Jung FF, Grupta M, Gallagher PE, et al. Omapatrilat increase renal ACE2 and antiangiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. [Abstract]. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:146A.
- Dales NA, Gould AE, Brown JA, et al. Substrate-based design of the first class of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) inhibitors. *J Am Chem Soc*. 2002;124:11852-1853.
- Huang L, Lexton DJ, Skogerson K, et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*. 2003;18:15532-5540.