

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
SANDRO SOARES DE ALMEIDA**

**Caracterização Bioquímica e Funcional do Polimorfismo da  
Enzima Conversora de Angiotensina em Indivíduos Normotensos**

**Mogi das Cruzes, SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
SANDRO SOARES DE ALMEIDA**

**Caracterização Bioquímica e Funcional do Polimorfismo da  
Enzima Conversora de Angiotensina em Indivíduos Normotensos**

**Dissertação apresentada ao programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Mogi das Cruzes como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia. Área  
de Concentração: Biológica.**

**Prof. Orientador: Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo**

**Mogi das Cruzes, SP**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Almeida, Sandro Soares de

Caracterização bioquímica e funcional da enzima conversora de angiotensina em indivíduos normotensos / Sandro Soares de Almeida. – 2009.

58 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araujo

1. Sistema renina angiotensina 2. ECA 3. Polimorfismo 4. Sistema cardiovascular I. Araujo, Ronaldo de Carvalho

CDD 660.634

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

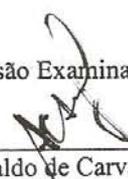
Às quatorze horas do dia nove de junho de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Caracterização Bioquímica e Funcional do Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina em Indivíduos Normotensos" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Sandro Soares de Almeida**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Ronaldo de Carvalho Araújo e Regina Lúcia Batista Costa de Oliveira da Universidade de Mogi das Cruzes e Carmen Silvia Grubert Campbell da Universidade Católica de Brasília, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovado por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

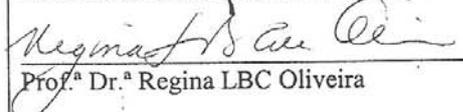
Mogi das Cruzes, 09 de junho de 2008.

Comissão Examinadora

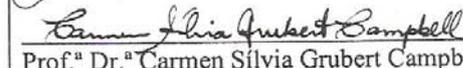
Julgamento

  
Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
Prof.ª Dr.ª Regina LBC Oliveira

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
Prof.ª Dr.ª Carmen Silvia Grubert Campbell

aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Aos meus Pais, **Edna Domingues de Almeida e Osmir Soares de Almeida**,  
que me ensinaram os verdadeiros valores do ser humano e constituem o alicerce  
da minha vida.

Meus irmãos, **Juliano e Fernando** pelo incentivo e carinho.

Minha namorada **Paula David**, por seu amor e seu apoio nos momentos de  
dificuldade.

Agradecimento:

Ao Professor Doutor *Ronaldo de Carvalho Araujo*, orientador deste trabalho, pela amizade, compreensão, muito obrigado por seus ensinamentos, incentivo e apoio durante todo o percurso desta difícil caminhada. Muito obrigado por acreditar!

## **Agradecimentos**

A Deus, por me fortalecer em todos os momentos desta conquista.

A todos os professores da banca examinadora por disponibilizarem o seu tempo para avaliar e julgar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero, agradeço pela amizade, pela ajuda quando necessário e pela grande contribuição à minha formação acadêmica com seu extraordinário conhecimento.

A Prof. Dra. Adriana Karaoglanivic Carmona, que gentilmente cedeu os substratos e seu laboratório para dosagens.

A meu grande amigo Milton Rocha, por seus valiosos ensinamentos não só na pesquisa, mas de vida, também sua ajuda e principalmente seu bom humor.

Aos colegas de laboratório, Carlos Castilho, Frank Bacurau, Anderson, Fernanda e Thiago.

Ao João Daivison, meu grande amigo, obrigado por sua amizade e imensa ajuda me ensinando realizar todas as técnicas no laboratório.

Ao Erivaldo, por me acolher em sua casa no período que fiquei em Brasília, por sua amizade e atenção.

Aos amigos de Mogi, Amauri, Ikeda, Paulo e Douglas do biotério, Vanessa e minha grande amiga Ingrid muito obrigado pela amizade de vocês durante esse tempo que estive em Mogi.

A todos os colegas de laboratório de Animais Transgênicos e Proteínas recombinantes da UMC, Débora, Rodrigo “Toiço”, Viviane, Daniela Sgai, Felipe, Amandinha, Elice, e também aqueles com que convivi pouco tempo.

Ao Professor Dr. Hebert Gustavo Simões e Professora Dra. Carmen Silva Grumert Campbell por me receberem tão bem em Brasília durante o tempo que estive por lá, e pelo incentivo profissional. A todos os colegas de laboratório (LAFIT) que conheci em Brasília, Carlos, Paulo Russo, Rafael Sotero, Rafilks, Puga, Emerson, Leonardo, Lucas, Renato e meu grande amigo Sergio que me acompanhou todo tempo por lá, as meninas, Gisela, Laila, Veruska, Marina a Daisy e Fabiana muito obrigado.

A todos os meus voluntários, pois sem vocês este trabalho não poderia ser realizado. O meu muito obrigado a todos!

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento em Pesquisa – (CAPES) pelo apoio financeiro.

## Resumo

O sistema renina angiotensina (SRA) é reconhecido como um dos principais efetores das funções renais e do controle do sistema cardiovascular, regulando a pressão arterial e homeostase do organismo. A influência desse sistema sobre as funções cardiovasculares e renais é extremamente ampla e complexa, envolvendo múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular. Muitos polimorfismos dos componentes do SRA estão sendo descritos, entretanto os impactos dessa variação gênica na expressão dos fenótipos ainda são pouco conhecidos. O objetivo desse estudo foi caracterizar bioquimicamente e funcionalmente o polimorfismo da enzima conversora de angiotensina (ECA), caracterizado como inserção ou deleção de 287 pares de bases no intron 16 do gene da ECA, localizado no cromossomo 17, investigando também a atividade dessa enzima com substratos específicos para cada um dos seus domínios catalíticos e a influência do polimorfismo em outros sistemas. Também foi objetivo desse trabalho verificar força, o índice de massa corporal em indivíduos saudáveis relacionando com o polimorfismo da ECA. Participaram do estudo 62 voluntários ( $24 \pm 1,5$  anos) que foram genotipados para o polimorfismo da ECA (II n=16, ID, n=28 e DD, n=18). A atividade da ECA foi avaliada através da utilização de substratos de supressão intramolecular de fluorescência específicos para cada domínio. Nenhum dos resultados hemodinâmicos mostrou diferença significativa entre os indivíduos estudados quando relacionados aos genótipos. A atividade da ECA, com a utilização do substrato para os domínios C-N, apresentou diferença significativa ( $p < 0,001$ ) no grupo de homozigotos II, quando comparado aos grupos ID e DD. Foi observada diferença significativa ( $p < 0,001$ ) do grupo II comparado aos grupos ID e DD com a utilização do substrato específico para o domínio-N da ECA. O resultado do substrato específico para o domínio-C, mostraram uma diferença significativa dos grupos II em relação aos grupos DD e ID. Com esses resultados, buscamos verificar a influência das variações dos níveis de ECA em outros sistemas. A atividade plasmática da caliceína foi maior ( $p < 0,05$ ) em indivíduos portadores do genótipo DD, quando comparado ao grupo de homozigotos II. As concentrações séricas de outro substrato da ECA, o Ac-SDKP, não mostraram diferenças significativas quando comparadas aos genótipos do polimorfismo da ECA. Conclui-se, dessa forma, que o grupo heterozigoto ID e homozigoto DD não apresentam diferença significativa entre si, não corroborando com os dados da literatura. Demonstramos assim, que a presença de um único alelo D é suficiente para aumentar o nível de expressão da ECA. Os níveis de caliceína são maiores no grupo DD, sugerindo uma compensação pela maior atividade de ECA nesses indivíduos. O polimorfismo da ECA não influenciou nos níveis de Ac-SDKP, demonstrando que provavelmente esse peptídeo também é compensado em indivíduos DD.

**Palavras-chave:** Sistema Renina Angiotensina, ECA, polimorfismo, sistema cardiovascular.

## Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) is recognized as one of the main effectors of renal function and cardiovascular control, regulating arterial blood pressure and homeostasis. Its influence on cardiovascular and renal functions is extremely complex involving multiple mediators, receptors and mechanisms of intracellular signaling. In the last few years several polymorphisms of RAS have being described; however, the importance of this genetic variation on phenotypic expression is poorly understood. The aim of this study was establish a biochemical and functional characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE) polymorphism. To this, we observe the activity of both enzyme domains with specific substrates and investigate the influence of the polymorphism on other systems. Also were objectives of the present study evaluate the strength and body mass index (BMI) in young and health subjects and verify with them are associated with ACE polymorphism. Sixty-two volunteers ( $24 \pm 1.5$  years-old) were characterized in relation to ACE polymorphism (II n=16; ID n=28 and DD n=18). ACE activity was evaluated by the intramolecular suppression fluorescent substrates specific for each ACE domain. None of hemodynamic parameters evaluated (blood pressure and heart rate) were different among the phenotypes. ACE activity, evaluated by the substrate specific for both domains was different ( $P < 0.001$ ) in individuals from homozygote group in comparison to ID and DD groups. This pattern of difference was also observed when the activity of ACE was determined by substrate specific to the N domain ( $p < 0.001$ ). The result obtained with the substrate specific for the C domain, demonstrated a significant difference between II and DD ( $p < 0.001$ ) and between II and DD ( $p < 0.01$ ). Based on these results we verify the influence of ACE variations on others systems. Kallikrein plasmatic levels were higher in DD individuals in comparison to II ( $p < 0.05$ ). The plasmatic levels of another ACE substrate, Ac-SDKP, did not demonstrated significant differences among the genotypes of ACE polymorphism. Thus, we concluded that ID individuals and homozygous DD subjects are not different in relation to ACE levels, in disagreement with data previously published. Also, we demonstrated that the presence of a single D allele is able to increase the degree of ACE expression. The kallikrein plasmatic levels were higher in individuals from DD phenotype, suggesting the existence of a compensatory mechanism in these individuals. ACE polymorphism did not influence the plasmatic levels of Ac-SDKP, demonstrating that the levels of this substrate were also compensated in DD individuals.

**Key-words:** Renin angiotensin system, ACE, polymorphism, cardiovascular system.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo I/D da ECA.....	40
<b>Tabela 2.</b>	Distribuição de médias dos parâmetros: idade, peso, estatura, índice de massa corpórea (IMC) em indivíduos normotensos.....	41
<b>Tabela 3.</b>	Médias de pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica medida em repouso, durante o exercício, final do exercício e frequência cardíaca (FC) no repouso e no final do exercício.....	41

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Esquema representando a interação da ECA nos sistemas Calicreína-Cininas e Renina Angiotensina.....	16
<b>Figura 2 -</b>	Representação do Sistema Calicreína-Cininas.....	17
<b>Figura 3 -</b>	Representação do Sistema Renina Angiotensina.....	21
<b>Figura 4 -</b>	Ilustração dos 26 exons (quadrados) e 25 introns (linhas) do gene ECA. Intron 16 é o local onde ocorre a deleção de 287pb.....	24
<b>Figura 5 -</b>	Protocolo experimental; PA: Pressão Arterial; FC: Frequência Cardíaca; Preensão Manual: Força máxima isométrica.....	30
<b>Figura 6 -</b>	Demonstração da seqüência do intron 16 onde os iniciadores ( <i>primers</i> ) sense e antisense reconhecem a sua seqüência complementar, demonstradas pelas setas cheias, a seta pontilhada é a seqüência do iniciador interno, local onde ocorre a deleção.....	35
<b>Figura 7 -</b>	Eletroforese em gel de agarose 2%. II – homozigoto para inserção, ID heterozigoto, e DD- homozigoto para deleção; B – Branco; Marcador de massa molecular (M) 100pb.....	39
<b>Figura 8 -</b>	Eletroforese em gel de agarose 2% com a utilização de iniciador interno; II- homozigoto para inserção, ID- heterozigoto; Marcador de massa molecular (M); Branco (B).....	40
<b>Figura 9 -</b>	Pressão arterial média (PAM) durante o repouso verificado em cada genótipo.....	42
<b>Figura 10</b>	Pressão arterial média (PAM) durante o teste de força para cada genótipo. .....	42
<b>Figura 11</b>	Pressão arterial média (PAM) no final do teste de força.....	43
<b>Figura 12</b>	Médias dos resultados de preensão manual dos grupos com genótipos II, DD e ID ( $p>0,05$ ).....	44
<b>Figura 13</b>	Atividade da ECA no plasma dos voluntários de genótipo II, ID e DD. UAF/min: Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto. *** II x ID, e ††† II x DD – $p<0,001$ .....	44
<b>Figura 14</b>	Atividade da ECA no plasma com substrato Abz-SDK(Dnp)P específico para o N- Domínio. ***IIxID, ††† IIxDD. UAF/min: Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto.....	45

<b>Figura 15</b>	Atividade da ECA utilizando substrato Abz-LFK(Dnp)P específico para C-Domínio. **IIxID; *** IIxDD. UAF: Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto.....	46
<b>Figura 16</b>	Atividade da caliceína plasmática dos indivíduos II, DD. UFA/min. Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto. * (comparando II com DD – p<0,05).....	47
<b>Figura 17</b>	Concentrações de Ac-SDKP entre os grupos P>0,05.....	47

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>SRA</b>	Sistema Renina Angiotensina
<b>SCC</b>	Sistema Caliceína-Cininas
<b>ECA</b>	Enzima Conversora de Angiotensina I
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>Ang I</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>AT1</b>	Receptor do tipo 1 de angiotensina II
<b>AT2</b>	Receptor do tipo 2 de angiotensina II
<b>D</b>	Deleção
<b>I</b>	Inserção
<b>Pb</b>	Pares de bases nitrogenadas
<b>Kb</b>	Quilobases
<b>kDa</b>	QuiloDalton
<b>ECAs</b>	Enzima Conversora de Angiotensina I somática
<b>ECA<sub>t</sub></b>	Enzima Conversora de Angiotensina I testicular
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RFLP</b>	Polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 Epidemiologias das Doenças Cardiovasculares	14
1.2 Sistema Caliceína-Cinina	16
1.3 Caliceínas	17
1.4 Sistema Renina Angiotensina	18
1.5 Enzima Conversora de Angiotensina	21
1.5.1 O gene da ECA	22
1.5.2 Controle genético de níveis de ECA	24
1.5.3 Polimorfismo funcional do gene da ECA	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
<b>3 MÉTODO</b>	29
3.1 Voluntários	29
3.2 Procedimentos	29
3.2.1 Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca	31
3.2.2 Teste de prensão manual	31
3.2.3 Índice de Massa Corporal (IMC)	32
3.2.4 Coleta de Sangue	32
3.2.5 Genotipagem do polimorfismo do gene da ECA	33

3.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
3.2.7 Condições da PCR.....	35
3.2.8 Atividade da ECA plasmática.....	36
3.2.9 Atividade da caliceína no plasma.....	36
3.2.10 Concentrações plasmáticas de Ac-SDKP.....	37
3.3 Análise de Dados.....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 Características gerais dos voluntários.....	39
4.2 Polimorfismo da ECA.....	39
4.3 Parâmetros Hemodinâmicos.....	41
4.3.1 Relação entre força e genótipo da ECA.....	43
4.4 Parâmetros metabólicos.....	44
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>8 ANEXOS</b> .....	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologias das doenças cardiovasculares

O processo de industrialização e o avanço tecnológico, característico das sociedades modernas urbanas, vêm contribuindo categoricamente para alterações epidemiológicas. Anteriormente as principais causas de morte e morbidade, eram as doenças infectocontagiosas e algumas causadas por deficiência nutricional, agora as principais causas são predominantemente relacionadas a doenças não transmissíveis (YUSUF *et al.*, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a categoria “condições crônicas” inclui as doenças transmissíveis como AIDS, por exemplo, e as não transmissíveis como problemas cardiovasculares, câncer e diabetes. Essas doenças são um grande problema de saúde e solicitam contínuo gerenciamento por décadas. De acordo com essa instituição, em 2003 o total de mortes do mundo, cerca de 16 milhões, ou seja, 47% do total de mortes resultaram de etiologia cardiovascular (OMS, 2003). Já em 2005 foi estimado que 17,5 milhões de pessoas morreram por decorrência de doenças cardiovasculares, sendo que 7,6 milhões de mortes foram devidas a ataques cardíacos e derrame cerebral. Cerca de 80% dessas mortes ocorreram em países de média e baixa renda (OMS, 2005).

Dados recentes mostram que este grupo de doenças por condições crônicas de saúde atinge uma média de aproximadamente 60% do ônus causados por doenças em todo o mundo. Algumas estimativas apontam que esses valores alcançarão 80% em países em desenvolvimento em 2020. As doenças coronarianas e cerebrovasculares há várias décadas constituem as principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo sendo responsáveis por uma em cada três mortes registradas neste grupo de doenças (OMS), e ainda continuarão liderando as estatísticas de mortalidade e morbidade (MURRAY e LOPEZ, 1996).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde (Brasil, MS, 2004) revelam que as doenças cardiovasculares (DCV) representaram a principal causa de morte (28%), sendo que, entre elas, as doenças cerebrovasculares ocuparam o primeiro lugar (39%), seguida das doenças isquêmicas do coração (30%). Em cerca de 95% dos pacientes, não se estabelece a etiologia da hipertensão arterial, denominada essencial ou primária. Os 5% restantes estão na classe de hipertensão secundária.

Trabalhos realizados em diferentes populações indígenas (HOLLENBERG *et al.*, 1997), que mostram estilo de vida primitivos, a pressão arterial aumenta de acordo com a idade, mostrando que a idade é um fator que influencia na prevalência da hipertensão arterial na população.

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial, isto é, causada por vários fatores que dão origem a falhas no complexo e delicado sistema de controle da pressão arterial, sendo um desses fatores pode ser resultante da interação de fatores ambientais sobre a expressão de certos genes (PEREIRA *et al.*, 2005). Essas modificações comprometem fundamentalmente o equilíbrio dos sistemas vasodilatadores e vasoconstritores, que mantêm o tônus vasomotor, e levam a redução na luz dos vasos com danos a órgãos alvos (KAPLAN *et al.*, 2000; MOSCA *et al.*, 2004). A hipertensão também pode ser dita como uma doença poligênica, resultando de anormalidades em mecanismos de controle da pressão, pois um grande número de substâncias biologicamente ativas pode interagir com diferentes sistemas fisiológicos, de maneira complexa para garantir a homeostasia cardiovascular (KAPLAN *et al.*, 2000; MOSCA *et al.*, 2004).

Os Sistemas Renina-Angiotensina (SRA) e Calicreína-Cininas (SCC) têm papéis fundamentais na regulação da pressão arterial, sendo importantes candidatos no papel da patogênese da hipertensão. Uma parte significativa dos pacientes com hipertensão arterial exibe alterações nas concentrações séricas dos peptídeos desses sistemas. O SRA e o SCC estão também envolvidos na patogênese dos danos cardíacos e renais associados à elevada pressão sanguínea. Ambos, SRA e SCC estão localizados no sistema vascular, onde os efeitos da Bradicina (BK) se opõem às ações da Angiotensina II (Ang II).

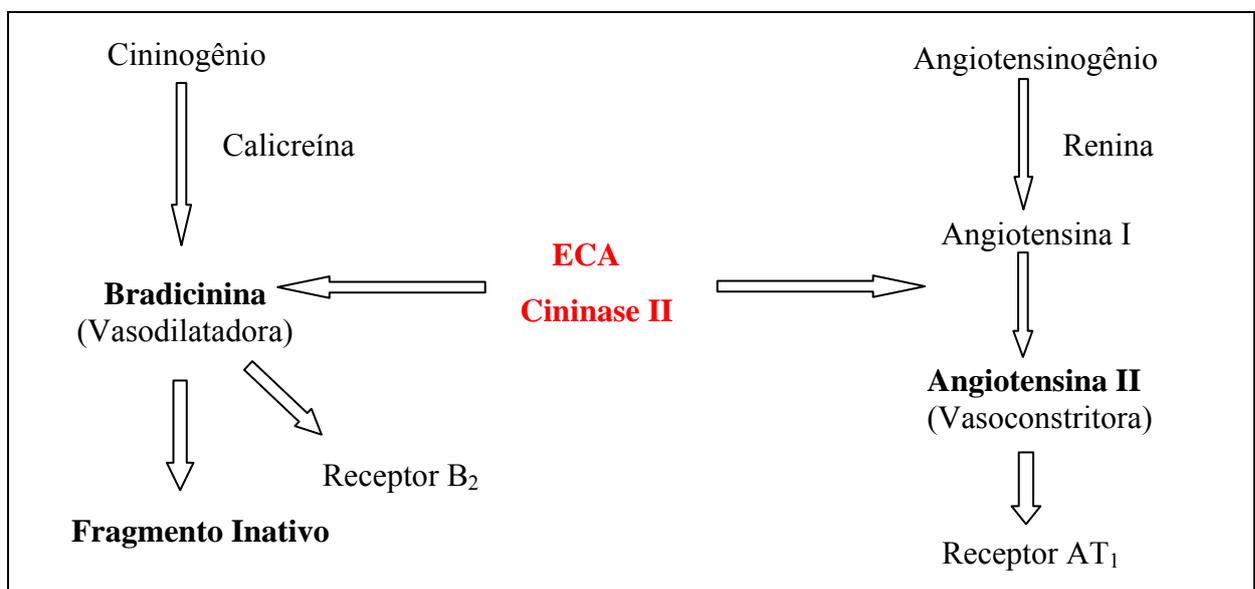
Na década de 50, Skeggs *et al.*, (1956), mostraram que a ECA era uma enzima capaz de clivar Ang I e BK no sangue, mas somente nos anos 70 foi verificado que era possível bloquear a conversão de Ang I à Ang II e diminuir a eliminação de BK empregando-se veneno de cobra, e subseqüentemente demonstrando que ECA e cininase II, a qual degrada BK em metabólito inativo, são a mesma enzima (YANG *et al.*, 1970; ERDOS e SKIDGEL, 1987).

Com a descoberta da participação da ECA simultaneamente em dois sistemas diferentes, estabeleceu-se um importante elo entre esses sistemas. No SCC, a ECA age inativando a BK pela hidrólise do dipeptídeo Phe-Arg e em seguida o Ser-Pro, da região C-terminal (ZACEST *et al.*, 1974), abolindo assim sua atividade vasodilatadora (YANG *et al.*, 1970). Dessa maneira, a ECA exerce um proeminente papel na regulação da pressão

sanguínea e sua atividade está relacionada com a vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica.

Devido a essa crítica contribuição no controle da pressão sanguínea, qualquer anormalidade em um desses componentes pode conduzir a hipertensão e doenças cardiovasculares (KILPELAINEN *et al.*, 2008). Poucos estudos no Brasil correlacionam os fenótipos intermediários da hipertensão e os polimorfismos dos genes dos componentes desses sistemas.

Na figura 1 o SRA e o SCC estão esquematizados.



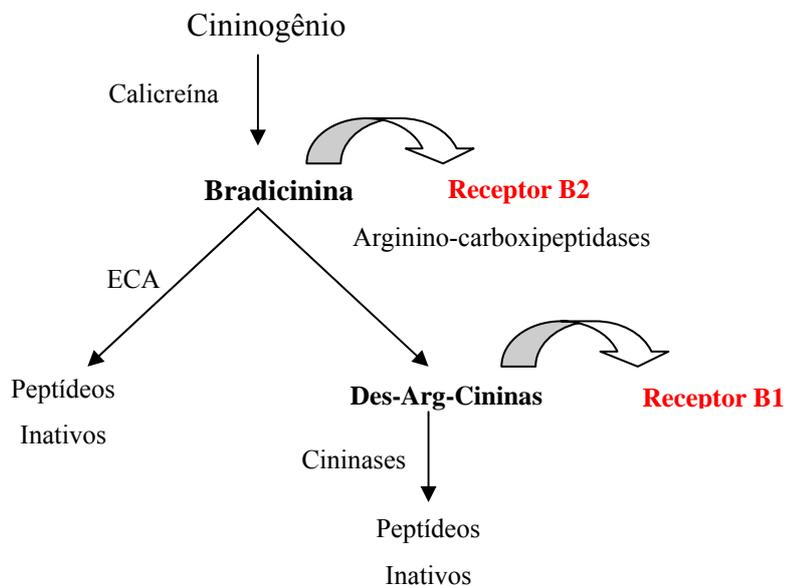
**Figura 1:** Esquema representando a interação da ECA nos sistemas Calicreína-cininas e Renina-angiotensina.

## 1.2 Sistema Calicreína-Cininas (SCC)

O SCC é formado pelos cininogênios (substratos glicoprotéicos) precursores da BK e análogos, que estão envolvidos na cascata de coagulação e inflamação; calicreínas (enzimas proteolíticas da família das serino-proteases), presentes nas células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos, que são responsáveis pela geração de cininas; cininas (peptídeos vasoativos), provenientes da hidrólise dos cininogênios pelas calicreínas; cininases (enzimas de degradação); e receptores de membranas, B1 e B2 (dois receptores transmembrânicos específicos) acoplados a proteína G (REGOLI e NANTEL, 1990; BHOOLA *et al.*, 1992), que estão ligados a mecanismos variados de transdução.

O SCC está envolvido em muitos processos biológicos, dentre os quais estão os mecanismos de resposta inflamatória (BHOOLA *et al.*, 1992), nocicepção e transmissão de dor (DRAY e PERKINS, 1993). Além disso, atua no processo de captação de glicose por células musculares e adipócitos por meio da translocação do seu principal carreador de glicose, GLUT4, para a membrana citoplasmática, independente da ação da insulina. Esse mecanismo é mediado pela ação da bradicinina sobre os receptores B2 de cininas (KISHI *et al.*, 1998). Esse sistema também é importante no fluxo local de sangue, no transporte de eletrólitos e glicose, e na proliferação celular (BHOOLA *et al.*, 1992), atuando também no trato gastrointestinal (ALLOGHO *et al.*, 1995).

Este sistema esta representado de forma esquemática na figura 2.



**Figura 2:** Representação do Sistema Caliceína-Cinina.

### 1.3 Caliceínas

As enzimas que são capazes de liberar cininas são coletivamente chamadas de cininogenases, termo genérico que inclui as caliceínas, catepsinas, etc. (MULLER-ESTERL, 1989).

As caliceínas são divididas em dois grupos: teciduais e plasmáticas. A função dessas duas enzimas em humanos é liberar os peptídeos vasoativos calidina (Lis-BK) e bradicinina

(BK), respectivamente. A Lis-BK, um decapeptídeo, é gerada através do cininogênio de baixo peso molecular. A BK é um nonapeptídeo e é gerado a partir do cininogênio de alto peso molecular (BHOOLA *et al.*, 1992)

A calicreína plasmática é encontrada no sangue em sua forma inativa, a pré-calicreína, que está ligada ao cininogênio de alto peso molecular (HK). Após ativada, a calicreína cliva o HK para liberar a BK (BHOOLA *et al.*, 1992). A BK liberada no plasma age predominantemente no receptor B2 de cininas induzindo um efeito hipotensor via formação de Óxido Nítrico (NO).

A BK livre no plasma pode sofrer ação da carboxipeptidase N através da remoção da arginina C-terminal da BK formando a des-Arg<sup>9</sup>-BK, um agonista do receptor B1. A carboxipeptidase M pode através Lis-BK, gerar des-Arg<sup>10</sup>-BK, também agonista do receptor B1. O mecanismo de formação dos agonistas do receptor B1 tem especial importância em condições inflamatórias, quando endotoxinas e citocinas induzem um aumento das carboxipeptidases.

#### **1.4 Sistema Renina Angiotensina (SRA)**

A pressão e o volume sanguíneo no corpo são controlados pelo SRA. Esse sistema tem sido caracterizado como um dos mais importantes sistemas de controle cardiovascular a curto e longo prazo e homeostasia hidroeletrólítica do organismo (SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2006). O SRA é constituído por um complexo sistema hormonal formado por vários peptídeos e enzimas, e tem como seu principal efector a Ang II. Esse peptídeo não atua somente no plasma, visto que tem sido observada a expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos componentes desse sistema em vários tecidos (SAAVEDRA *et al.*, 1992; KATSUYA *et al.*, 1995), o que sugere um novo modelo de atuação do SRA com produção de Ang II tecidual.

A síntese de Ang II envolve uma série de etapas catalíticas, onde sua cadeia inicia-se a partir do angiotensinogênio, uma  $\alpha$ 2-globulina sintetizada no fígado e liberada na circulação por meio de estímulos hormonais (BEN-ARI e GARRISON, 1988). O angiotensinogênio então é clivado pela renina, uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada sob a forma inativa (denominada pró-renina) pelas células justaglomerulares do rim.

Estas células musculares lisas modificadas localizam-se nas paredes das arteríolas aferentes imediatamente proximais aos glomérulos. A pró-renina é liberada quando a pressão sanguínea está baixa (condições de baixa de sal, ou perda de sangue), e são sinalizadas reações intrínsecas nos próprios rins causando a decomposição de moléculas de pró-renina para a liberação de renina.

A descoberta do clássico papel da renina realizado pelo fisiologista Filandês Robert Tigerstedt e seu estudante Sueco, Per Bergman em 1898 (BASSO e TERRAGNO, 2001) foi baseado no experimento executado em 1896-97 no Instituto Karolinka. Nesse experimento o extrato de salina de fígado de coelho mostrou lentamente o aumento da pressão sanguínea (PS) quando injetado em coelhos. O princípio causador estava presente no córtex renal, mas não na medula e foi destruído quando aquecido. O autor concluiu que a substância era uma proteína e ele a nomeou de renina. Eles especularam que “a renina pode de algum modo ser, direta ou indiretamente, associada com hipertrofia do coração encontrado em doenças renais e alta pressão sanguínea”. Porém, estes resultados não puderam ser repetidos em outros laboratórios, e foi só mais tarde em 1930 quando a renina foi redescoberta.

A renina é uma enzima sem ação vasoativa. Ela atua clivando o angiotensinogênio produzindo o decapeptídeo Ang I, que possui propriedades vasoconstritoras discretas, mas não o suficiente para causar alterações significativas da função circulatória. A Ang I é convertida em Ang II através da ação da ECA, que está presente em vários tecidos, removendo dois aminoácidos da região carboxiterminal da Ang I formando um octapeptídeo, a Ang II, um potente vasoconstritor (ERDOS, 1990; WOODS *et al.*, 2001).

A Ang II apresenta inúmeras funções, agindo em diversos órgãos ao ligar-se a dois diferentes receptores de Ang II: receptor do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>) que são larga e distintamente distribuídos pelos órgãos e tecidos. Ambos receptores pertencem ao clássico grupo de receptores acoplados a Proteína-G com sete domínios transmembrana. Ligando-se aos receptores do tipo AT<sub>1</sub>, é conferido a mais clássica ação do peptídeo Ang II que é promover a vasoconstrição no músculo liso vascular e atuando no córtex da adrenal causando liberação de aldosterona, que estimula os túbulos renais, a reabsorver mais sódio e água (BREWSTER e PERAZELLA, 2004), e estimulação do sistema nervoso simpático via receptores localizados no cérebro. Estes efeitos resultam em um aumento da volemia, aumentando a pressão sanguínea e interagindo em outros eventos relacionados ao controle da pressão. A Ang II também medeia o crescimento e proliferação celular estimulando a produção de citocinas e fatores de crescimento (SCHELLING *et al.*, 1991).

Também via AT<sub>1</sub> a Ang II possui efeitos como a hipertrofia e liberação de catecolaminas (TIMMERMANS *et al.*, 1993; MUNZENMAIER e GREENE, 1996; MATSUBARA, 1998). No endotélio, a modulação de receptores AT<sub>1</sub>, é caracterizada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (RAJAGOPALAN e HARRISON, 1996). Uma visão clássica do papel do receptor AT<sub>2</sub> é sua interação com Ang II, desencadeando uma série de reações intracelulares visando atenuar os efeitos do receptor AT<sub>1</sub> citados anteriormente (RAJAGOPALAN e HARRISON, 1996). Ao contrário dos receptores AT<sub>1</sub>, a ligação da Ang II nos receptores AT<sub>2</sub>, provoca vasodilatação (KATSUYA *et al.*, 1995; MASAKI *et al.*, 1998), desempenhando uma ação protetora da parede vascular. Mais recentemente, demonstrou-se que o receptor AT<sub>2</sub> está envolvido em algumas importantes ações de Ang II quando atua no tecido cardíaco (HEIN *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2002; BOVE *et al.*, 2005; ISBELL *et al.*, 2007).

Em adição aos componentes do clássico SRA, diversos novos participantes tem sido descoberto recentemente. Um análogo a ECA, a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), foi descoberta e mostrou degradar Ang II em Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000). A ECA2 é análoga a ECA possuindo 42% de homologia entre seus aminoácidos. A ECA2 hidrolisa a Ang I a partir da remoção da fenilalanina da região carboxil-terminal desse peptídeo formando o inativo nonapeptídeo Angiotensina 1-9 (Ang 1-9) (WELCHES *et al.*, 1993), o qual pode ser convertido no heptapeptídeo Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) pela ECA (VICKERS *et al.*, 2002). A Ang 1-7 antagoniza em humanos o efeito vasoconstritor da angiotensina II (STRAWN *et al.*, 1999; UEDA *et al.*, 2000; FERREIRA e SANTOS, 2005). Este heptapeptídeo tem seu próprio receptor, e também está relacionada com uma potencialização do efeito da bradicinina mediada pelos receptores B<sub>2</sub> (MARCIC B. *et al.*, 1999; ERDOS EG *et al.*, 2002). A Ang 1-7 pode ser clivada formando Ang 1-5, um peptídeo inativo. Este sistema está representado na figura 3.

A complexidade do SRA mostra que seus efeitos podem ser algumas vezes antagonísticos. Por esse sistema possuir interações com outros sistemas como demonstrado, podendo assim ajudar na manutenção da estabilidade cardiovascular, mas também pode ser o principal agente de processos patológicos.

Numerosos estudos do SRA no coração conduziram a desenvolvimentos terapêuticos que utilizam os inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT<sub>1</sub>, visando impedir a hipertrofia cardíaca e remodelamento cardíaco. A inibição da ECA bloqueia a geração de Ang II e reduz a degradação da BK, enquanto que antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> bloqueiam o receptor AT<sub>1</sub> e induzem o acúmulo de Ang II (ZHU YC., *et al.*, 1997).

**Figura 3-** Representação do Sistema Renina Angiotensina.

### **1.5 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)**

A ECA ou cininase II é uma metalo-peptidase largamente distribuída na superfície da membrana de células endoteliais e epiteliais em vários tecidos tais como, o miocárdio (KAPLAN *et al.*, 2000) tecido adiposo (WOODS *et al.*, 2001), músculo esquelético (LINDERMAN e GREENE, 2001) e, também, em fluidos corporais. Ela possui um papel importante na homeostase circulatória, convertendo o decapeptídeo inativo Ang I, no octapeptídeo ativo Ang II (SKEGGS *et al.*, 1956), um potente vasoconstritor e o principal efector do SRA (ERDOS e SKIDGEL, 1987), pela remoção dos resíduos His-Leu da região carboxiterminal desse peptídeo (HELMER, 1957).

A principal atividade da ECA é catalisar a clivagem de dipeptídeos da extremidade C-terminal livre de vários substratos, sendo considerada uma peptidil-dipeptidase. Esta peptidase é uma das muitas metalo-peptidases que usa o zinco como cofator e está

organizada como ectoenzima, possuindo o seu domínio catalítico no espaço extracelular. Essa enzima não atua em substratos que possuem um resíduo prolina na penúltima posição da cadeia polipeptídica (YANG *et al.*, 1970).

Como revisto por Erdos e Skidgel em 1987, essa metalo-peptidase não está exclusivamente limitada a sua ação peptidil-dipeptidásica, mas também tem a capacidade de atuar como carboxitripeptidase ou endopeptidase sobre alguns substratos. Embora a importância fisiológica da ECA seja indiscutível, até meados de 1990 pouco se conhecia sobre sua estrutura, seu mecanismo de catálise e os requisitos conformacionais dos seus substratos. Com a aplicação das técnicas de biologia molecular, foi possível a clonagem da ECA e um grande avanço foi dado no estudo desta metalo-peptidase (ALHENC-GELAS *et al.*, 1989; EHLERS *et al.*, 1989).

### **1.5.1 O gene da ECA**

A ECA é encontrada em uma grande variedade de espécies animais. O gene codificador da enzima em *Homo sapiens*, está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q23), possui 21 Kilo bases (Kb) e compreende 26 exons e 25 introns (SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2006)(figura 4). No Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (NCBI), são registrados mais de 160 polimorfismos, no gene da ECA, sendo a maioria de simples nucleotídeo (SNPs). Somente 34 desses polimorfismos são localizados em regiões codificadoras.

O gene da ECA codifica duas isoformas da enzima: uma forma somática (ECAs), com uma massa molecular entre 150 e 180 kDa, e a forma testicular (ECAt), com uma menor massa molecular de 90 kDa, expresso nas células germinais. Estas duas formas resultam da ativação de dois promotores diferentes. A ECAs é transcrita por um promotor localizado na região 5' anterior ao exon 1 do gene, e conduz a transcrição de todos os 26 exons, exceto o exon 13, que sofre um “*splicing*”.

A ECAt, com massa de 90 kDa, é transcrita por um promotor interno específico, encontrado no intron 12 (LANZILLO *et al.*, 1985). O RNA mensageiro da ECA germinal inclui os exons 13 aos 26 (HOWARD *et al.*, 1990). As duas formas diferem em relação aos sítios ativos: a ECAs possui dois sítios ativos, localizados na região C- domínio e a outra na

região N-domínio; a ECA<sub>t</sub> possui somente o C-domínio que corresponde ao C-domínio da ECAs (JASPARD *et al.*, 1993).

As duas formas da ECA são enzimas do tipo ectoproteínas transmembrana do tipo I, com seu sítio catalítico na extremidade extracelular. Outra forma de ECA é a circulante, gerada a partir da clivagem da enzima somática, e presente nos fluidos biológicos como soro (DAS *et al.*, 1977) e fluido amniótico (YASUI *et al.*, 1984). Essa liberação (*'shedding'*) da ECA como proteína solúvel, ocorre através de clivagem proteolítica específica por uma classe de proteases solubilizantes de proteínas de membrana, conhecidas como sheddases (OPPONG e HOOPER, 1993; MILLS *et al.*, 2001).

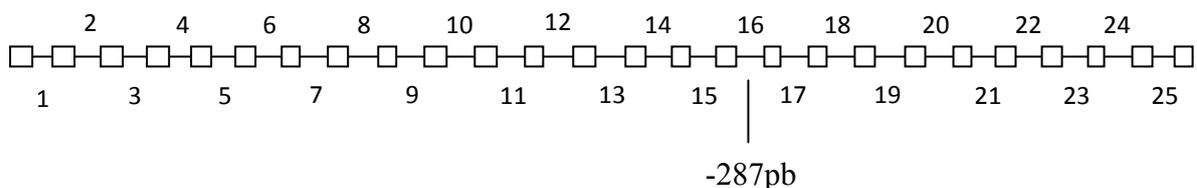
A ECAs está presente em células endoteliais, epiteliais e neuronais e possui dois domínios catalíticos denominados de N-domínio e C-domínio (SOUBRIER *et al.*, 1988), cada um dos domínios contém um sítio ativo e possuem 60% de homologia nas suas seqüências. Cada domínio contém como típico ligante, o zinco, encontrado em muitas zinco peptidases. A ECAs humana é composta por 1306 resíduos de aminoácidos, dos quais 14 são resíduos de cisteína, que tem um papel fundamental na manutenção da sua estrutura terciária ao formarem ligações dissulfeto entre os grupos tiol, aumentando a estabilidade molecular e a resistência à proteólise. Também possui 17 sítios potenciais de N-glicosilação. A seqüência da ECAs revela ainda a presença na molécula de duas porções hidrofóbicas: um peptídeo sinal N-terminal de 29 aminoácidos, que está ausente na enzima madura e um domínio transmembranar de 17 aminoácidos, situado próximo à região C-terminal (SOUBRIER *et al.*, 1988).

É importante notar que os dois domínios da ECA somática são diferentes na especificidade de seus substratos sendo que o peptídeo N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP) é um substrato específico para o domínio-N (ROUSSEAU *et al.*, 1995). O Ac-SDKP é um potente inibidor natural de proliferação de células tronco hematopoiéticas (GUIGON e BONNET, 1995; ROUSSEAU *et al.*, 1995) e o tratamento com inibidores da ECA resulta em um significativo aumento das concentrações plasmáticas do Ac-SDKP em humanos (AZIZI *et al.*, 1996).

### 1.5.2 Controle Genético dos Níveis da ECA

As concentrações séricas da ECA mostram pequenas variações quando mensuradas em um mesmo indivíduo em momentos diferentes (SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2006). Entretanto as concentrações dessa enzima podem ser consideravelmente variáveis quando mensuradas em indivíduos diferentes (ALHENC-GELAS *et al.*, 1991), o que permite pensar em uma forte influência genética.

Em 1988, Cambien *et al.*, realizaram estudos com 87 famílias saudáveis e demonstraram grande variabilidade na atividade plasmática da ECA. Em 1990, Rigat *et al.*, publicaram um importante estudo adicional sobre um dos polimorfismos encontrados neste gene. No estudo foi descrito como um polimorfismo no gene da ECA humana envolvendo a presença (inserção, I) ou a ausência (deleção, D) de 287-pb da seqüência do DNA na região do intron 16 (figura 4). Esse polimorfismo foi primeiramente detectado por análise de Polimorfismos no Tamanho do Fragmento de Restrição (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms - RFLP) (RIGAT *et al.*, 1990). A primeira detecção pela técnica da PCR deste polimorfismo foi publicada por Rigat *et al.*, (1992) onde foi utilizado um par de iniciadores (*primers*) que flanqueiam a seqüência onde ocorre a inserção de 287 pares de bases no gene da ECA. Porém, estudos realizados por Shanmugam *et al.*, (1993), mostraram que não foi possível distinguir os indivíduos heterozigotos ID por ocorrer uma preferencial amplificação do alelo D. Esse fato pode causar uma dificuldade na visualização dos resultados e assim causar uma má classificação de aproximadamente 4 à 5% entre o genótipos ID e DD. Uma amplificação adicional pela PCR foi então formulada para a confirmação do genótipo DD obtido no primeiro PCR padrão, incluindo um novo primer sense específico, localizado na região onde ocorre a deleção (SHANMUGAM *et al.*, 1993). Esta combinação da primeira PCR padrão com a reação confirmatória da PCR utilizando-se o iniciador localizado onde ocorre à deleção foi subseqüentemente usada em diversos estudos.



**Figura 4:** Ilustração dos 26 exons (quadrados) e 25 introns (linhas) do gene ECA. Intron 16 é o local onde ocorre a deleção de 287pb. (de acordo com Tavares A., 2000)

Marcadores genéticos são pequenas variações normais na seqüência de nucleotídeos, chamadas de polimorfismos, espalhadas em centenas de milhares de posições diferentes através do genoma. Os polimorfismos de DNA distribuídos ao longo do genoma são excelentes marcadores genéticos e permitem seguir a herança de um cromossomo. O polimorfismo humano da ECA é causado pela inserção de uma seqüência Alu resultando nos três genótipos na população (Alu+/+, Alu +/-, Alu -/-, ou ACE II, ACE ID e ACE DD, respectivamente) (HAMDI e CASTELLON, 2004). O nome *Alu* foi dado a essa repetitiva seqüências de cerca de 300 pares de bases, por ela conter um sítio de clivagem para a endonuclease de restrição *AluI* (HAMDI e CASTELLON, 2004).

Recentemente, uma análise detalhada do desenho do genoma humano tem indicado mais de um milhão de cópias da seqüência Alu, e que estas são as mais numerosas, o que faz dela o mais abundante de todos os elementos móveis no genoma humano (ZHUO *et al.*, 2001). Pelo motivo deste grande número de cópias, o gene da família Alu compreende mais que 10% da massa do genoma humano (ZHUO *et al.*, 2001), e sua seqüência não é uniformemente distribuídas no genoma (ZHUO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002). Essas seqüências moderadamente repetitivas ocorrem em segmentos que vão de 100 a vários milhares de pares de bases intercaladas com blocos maiores de DNA.

Constantes estudos de associação genética têm implicado esse polimorfismo a saúde, esportes e também com doenças.

A combinação genética dos alelos, determina, na população, o aparecimento de três genótipos, os homocigotos II e DD e heterocigoto ID. Os valores da atividade da ECA em portadores do genótipo DD eram aproximadamente 2 vezes maiores quando comparados com indivíduos que possuíam o genótipo II. Em indivíduos que apresentavam o genótipo heterocigoto ID, foi observado níveis intermediários da atividade ECA. Outros estudos revelaram que o envolvimento do polimorfismo I/D não é limitado somente as concentrações da ECA plasmática, mas que ele também determina as concentrações da ECA tecidual (COSTEROUSSE *et al.*, 1993; DANSER *et al.*, 1995).

Esse polimorfismo explica as variações da ECA circulante e se esse fato é devido as maiores concentrações e atividade enzimáticas em tecidos como coração, rim e tecido adiposo ainda é controverso (WOODS *et al.*, 2000).

### 1.5.3 Polimorfismo funcional do gene da ECA

Ueda e Elliott em 1995, em um experimento com homens normotensos, observaram após a infusão de Ang I, que concentrações venosas de Ang II e maiores valores de pressão sanguínea eram características de indivíduos com genótipo DD. Esses resultados não foram observados em outro estudo publicado no mesmo ano por Lachurie e Azizi *et al.*, em 1995. Algumas alterações em outras funções da ECA, como a degradação de bradicinina, foram também estudadas *in vivo*, em indivíduos normotensos após a administração desse peptídeo (MURPHEY *et al.*, 2000). Uma grande correlação foi observada entre concentração do alelo D e peptídeo inativo de BK (BK 1-5). As evidências favorecem a hipótese de que o polimorfismo I/D pode estar envolvido nas condições patofisiológicas entre os SRA e SCC.

Os resultados dos artigos anteriormente citados mostram que a presença do alelo D leva a um aumento de Ang II e uma maior degradação da BK. O aumento da ECA tem sido associado com o crescimento da musculatura lisa vascular observadas em regiões que foram submetidas à angioplastia (OHISHI *et al.*, 1993) e também um remodelamento cardíaco (DANSER *et al.*, 1995). Com a observação dessas alterações, levantou-se a hipótese de que o alelo D poderia estar associado à disfunção do endotélio resultando em uma maior degradação de cininas e assim inibindo a síntese de NO (LINZ *et al.*, 1996). Essas associações levaram a um grande número de estudos publicados sobre a associação entre este polimorfismo e doenças cardiovasculares. Estas investigações não incluem somente a presença ou incidência da doença, mas também outros aspectos, como sintomas e manifestações, eficácia de terapias com drogas, taxas de recuperação, progressão de doenças e outras interações com fatores genéticos ou ambientais.

De fato, estudos recentes na literatura têm evidenciado associações do polimorfismo D do alelo da ECA e risco da síndrome coronariana aguda (CAMBIEN *et al.*, 1992; PALMER *et al.*, 2003). Apesar de resultados controversos, alguns estudos sugerem a relação do polimorfismo da ECA com processos patológicos, que estão intimamente ligados à hipertensão arterial sistêmica (CORVOL *et al.*, 1997), hipertrofia do ventrículo esquerdo (SCHUNKERT *et al.*, 1994) e nefropatia diabética (STAESSEN *et al.*, 1997).

Estas variáveis encontradas no SRA também influenciam em outros efeitos fisiológicos, podendo expressar alguns outros fenótipos. Estudos têm associado à hipertrofia do ventrículo esquerdo ao alelo D da ECA (MYERSON *et al.*, 1999; FATINI *et al.*, 2000;

NAGASHIMA *et al.*, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 2003). Em atletas esse polimorfismo pode relacionar-se com hipertrofia ventricular fisiológica, pois indivíduos que levam o alelo D, teoricamente apresentam uma maior produção de Ang II, e estão mais aptos a promover hipertrofia ventricular do que indivíduos que carregam o alelo I. Muitos estudos mostram que indivíduos que possuem o alelo D são mais freqüentes em modalidades esportivas que exigem força (WOODS *et al.*, 2001). Outros estudos mostraram que atletas portadores do genótipo DD apresentam hipertrofia ventricular mais acentuada que portadores do genótipo II. (MONTGOMERY *et al.*, 1997) constatou em voluntários jovens uma forte correlação entre hipertrofia cardíaca com o genótipo ID e DD, após 10 semanas de treinamento físico militar, sendo esse um dos poucos estudos longitudinais realizados com recrutas do exército inglês.

O rendimento do sistema cardiovascular constitui-se em um elemento-chave no desempenho de atletas de provas aeróbias, por ser responsável pela oferta de substrato e de oxigênio para os músculos. Alguns estudos relacionando o polimorfismo da ECA com o desempenho esportivo identificaram o alelo I como um fator genético de predisposição para o melhor rendimento em provas aeróbias (COLLINS *et al.*, 2004; TURGUT *et al.*, 2004). Esses resultados foram observados em corredores especialistas em provas de longas distâncias (acima de 5.000 metros) (MYERSON *et al.*, 1999) e também em remadores da seleção australiana (GAYAGAY *et al.*, 1998).

Apesar dos estudos fenotípicos para os determinados genótipos da ECA apontar uma predisposição ou proteção contra várias doenças, os domínios da ECA envolvidos nessas características relacionadas aos polimorfismos I/D ainda não foram caracterizados em indivíduos saudáveis. Também não há relatos se esse polimorfismo pode afetar os componentes do SCC e as concentrações séricas de outros peptídeos como o Ac-SDKP.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo deste trabalho foi identificar o polimorfismo de inserção (I) e deleção (D) do gene da ECA em indivíduos jovens saudáveis e mensurar a atividade dos dois domínios dessa enzima e ainda correlacionar os genótipos com a pressão arterial, força e índice de massa corporal. Também foi objetivo avaliar a atividade da caliceína plasmática relacionando com o polimorfismo da ECA bem como a concentração do Ac-SDKP.

### **2.2 Específicos**

- Verificar a porcentagem alélica e genômica dos polimorfismos de Inserção (I) e Deleção (D) encontrada nos indivíduos saudáveis.
- Verificar a correlação dos genótipos dos voluntários com as médias de pressão arterial e frequência cardíaca encontradas na população.
- Correlacionar o polimorfismo I/D e a média de força muscular realizado com o teste de prensão manual.
- Verificar a correlação do polimorfismo com o índice de massa corporal dos voluntários.
- Verificar a atividade caliceína plasmática dos voluntários com genótipo II, ID e DD.
- Verificar a atividade dos domínios C e N da enzima conversora de angiotensina.
- Verificar a concentração sérica do peptídeo Ac-SDKP.

## **3 Método**

### **3.1 Voluntários**

Foram selecionados 62 voluntários adultos com idade entre 18 e 40 anos, do sexo masculino, residentes na cidade de Mogi das Cruzes. A maior parte (40 pessoas) foi recrutada no Tiro de Guerra de Mogi das Cruzes, os demais voluntários eram estudantes da Universidade de Mogi das Cruzes. Todos os voluntários eram normotensos e sedentários. Os testes foram realizados no Laboratório de Obesidade e Exercício do Departamento de Biofísica da Unifesp.

Os critérios de exclusão foram o uso de inibidores da ECA e/ou bloqueadores de receptor do tipo 1 de angiotensina II, hipertensão arterial (com pressão arterial sistólica acima de 139 mmHg e diastólica acima de 89 mmHg), fumantes, diabéticos, obesos (IMC acima de 30Kg/m<sup>2</sup>).

Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) e todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos de Mogi das Cruzes, CAAE n.º 0078.0.237.000-07 (anexo II).

### **3.2 Procedimentos**

Os voluntários realizaram os testes em dois dias. No primeiro dia foram realizadas a mensuração da pressão arterial e frequência cardíaca. Nesse mesmo dia foi realizado o teste de força máxima isométrica (preensão manual) por meio de dinamometria. Na segunda visita foram coletadas amostras de sangue venoso para posterior análise bioquímica (ver figura 5).

**Figura 5** – Protocolo experimental; **P.A:** Pressão Arterial; **F.C:** Frequência Cardíaca; **Preensão Manual:** Força máxima isométrica.

### **3.2.1 Medida de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca**

A média da pressão arterial foi mensurada por via auscultatória, utilizando-se um esfigmomanômetro aneróide e estetoscópio (BD,USA). Para avaliar-se a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), os voluntários foram colocados na posição sentada e mantidos por cinco minutos em repouso antes da mensuração com esfigmomanômetro. Após esse período, o braço esquerdo foi colocado em uma superfície plana à altura do deltóide. A fixação do manguito no braço ocorreu aproximadamente a 2,5 cm de distância entre sua extremidade proximal e a fossa cubital. Após o manguito ser inflado, iniciou-se o processo de esvaziamento numa razão de 2 mmHg por segundo até distinguir o 1º e 5º ruído de Korotkoff, correspondente aos valores sistólico e diastólico, respectivamente (PERLOFF *et al.*, 1993). Este procedimento foi realizado logo após os três testes isométricos (preensão manual) para verificar a ocorrência de possíveis alterações da pressão arterial durante o teste.

Quando realizado o teste de força, o início do esvaziamento do manguito coincidiu com o momento de finalização do teste de preensão manual. Esse procedimento permitiu tempo suficiente para a determinação da PAS simultaneamente ao término da preensão. A PAD foi aferida até quatro segundos após o término das repetições estabelecidas. O padrão de medida da PA seguiu as normas da American Heart Association (1990). Durante todos os testes cada indivíduo foi instruído a não realizar a Manobra de Valsalva, ou seja, movimentar ou contrair o braço, para que a medida da PA fosse realizada sem comprometimentos.

A frequência cardíaca foi medida por telemetria durante o repouso e ao final dos testes através de um frequencímetro (Polar modelo A1).

### **3.2.2 Teste de preensão manual**

Os voluntários foram submetidos a um teste de força máxima isométrica (preensão manual), que foi realizado utilizando-se um dinamômetro da marca JAMAR. Este teste foi realizado para verificar se existia associação da ocorrência de maior força em voluntários

portadores do genótipo DD, pois vários estudos sugerem que esses indivíduos apresentam maior predisposição genética para ganho de massa muscular do que indivíduos que apresentam os genótipos II e ID (FOLLAND *et al.*, 2000).

Neste teste os participantes realizaram a compressão de um dinamômetro de empunhadura com sua mão dominante, a fim de gerar tanta força quanto for possível. O teste realizado foi desenvolvido para medir a força da mão e do braço. O avaliado ficou sentado em uma cadeira sem apoio para os braços e, com os pés planos sobre o chão. A alça do dinamômetro foi primeiramente ajustada para acomodar a mão do avaliado. Quando o dinamômetro era comprimido, a segunda falange deveria repousar sobre a alça ajustável. Uma vez que o dinamômetro estava ajustado na posição correta, o avaliado comprimia a alça o mais forte possível. A posição do antebraço foi ajustada de forma se posicionar lateralmente sem encostar-se na cadeira.

Foram feitas três tentativas, com um intervalo de três minutos entre cada uma. Era observado o valor máximo atingido pelo voluntário e então o ponteiro era retornado ao zero ao fim de cada uma das tentativas. O valor obtido ao fim de cada teste foi ajustado para a média em quilograma mais próxima. Era considerada a melhor execução como resultado efetivo do teste.

### **3.2.3 Índice de Massa Corporal (IMC)**

O Índice de Massa Corporal (IMC) expresso em  $\text{Kg.m}^2$ , foi calculado dividindo o peso pelo quadrado da estatura de cada indivíduo. Estes dados foram obtidos pelo questionário previamente aplicado a cada voluntário.

### **3.2.4 Coleta de Sangue**

Todas as coletas de sangue foram feitas por um enfermeiro habilitado. Cada participante compareceu a visita pela manhã, tendo observado jejum de 10 a 12 horas. Para

os procedimentos da coleta foram utilizadas luvas de procedimento e agulha descartável. Após assepsia local com álcool, foram realizadas coletas de sangue no antebraço da veia antecubital. Foram coletados 3 tubos de sangue de cada voluntário, com aproximadamente 4,9 ml de sangue por tubo. Foram utilizados tubos a vácuo (S-Monovette) e cada um continha um reagente específico. O primeiro tubo contendo citrato de sódio 1% para obtenção de amostras de plasma, o segundo tubo continha 1.6 mg EDTA/ml sangue, neste tubo foi adicionado 10µl de inibidor de protease, e um terceiro tubo seco, para obtenção do soro. O plasma e o soro foram obtidos por centrifugação e esses transferidos para tubos Eppendorf.

### **3.2.5 Genotipagem do polimorfismo do gene da ECA**

Uma amostra de sangue de 20µl foi utilizada para extração de DNA total dos leucócitos utilizando-se o ChargeSwitch® gDNA Blood Kits (Invitrogen™) empregado para purificação de DNA genômico de pequenos volumes de sangue humano. Seguiram-se os passos indicados pelo fabricante para a extração do DNA genômico. Todos os indivíduos foram genotipados para identificar a presença do alelo deleção (D) ou inserção (I) em seu genótipo.

### **3.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A genotipagem dos alelos do polimorfismo de I/D do gene da ECA foi conduzida utilizando um sistema de 2 iniciadores (“*primers*”) específicos que franqueiam a seqüência onde ocorre o polimorfismo no gene, na finalidade de amplificá-los e classificar os indivíduos em homozigotos II ou DD ou em heterozigoto ID. Um terceiro iniciador interno (*primer*) foi utilizado para confirmação dos voluntários que apresentaram genótipos DD. Os locais do gene da ECA onde os primers se anelam estão demonstrados na figura 6. A seqüência dos iniciadores (*primers*), reagentes e suas respectivas quantidades utilizadas para realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) estão demonstradas em seguida.

Primer ECAS 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT- 3'

Primer ECAAS 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT- 3'

Primer interno ECA 5'-GTCTCGATCTCCTGACCTCGTG-3'

Reagentes utilizados na primeira PCR para identificação dos genótipos.

10 µL do DNA extraído  
5 µL de Tampão de PCR (10x)  
2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
1,0 µL de dNTPs (10 mM)  
0,5 µL de primer ECAS (50 ηg/µL)  
0,5 µL de primer ECAAS (50 ηg/µL)  
0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL)  
5 µL de H<sub>2</sub>O *milli-Q* autoclavada  
25 µL total.

Reagentes utilizados na segunda PCR para confirmação do genótipo dos voluntários DD, com a utilização do primer interno.

10 µL do DNA extraído  
5 µL de Tampão de PCR (10x)  
2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
1,0 µL de dNTPs (10 mM)  
**0,5 µL de primer ECASint (50 ηg/µL)**  
0,5 µL de primer ECAAS (50 ηg/µL)  
0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL)  
5 µL de H<sub>2</sub>O *milli-Q* autoclavada  
25 µL total.



**Figura 6** – Demonstração da seqüência do intron 16 onde os iniciadores (*primers*) sense e antisense reconhecem a sua seqüência complementar, demonstradas pelas setas cheias, a seta pontilhada é a seqüência do iniciador interno, local onde ocorre a deleção.

### 3.2.7 Condições da PCR

As duas PCR foram feitas utilizando as condições abaixo:

- 1 - 95°C por 5 min
- 2 - 95°C por 45 s
- 3 - 60°C por 45 s
- 4 - 72°C por 45 s
- 5 – Voltar ao passo 2 – 35 vezes
- 6 - 72°C por 7 min
- 7 - 4°C tempo indeterminado

### **3.2.8 Atividade da ECA plasmática**

A determinação da atividade dos dois domínios da ECA plasmática foi realizada utilizando o substrato de supressão intramolecular de fluorescência contendo Abz (ácido aminobenzóico) na extremidade N-terminal e Dnp acoplado ao grupo  $\epsilon$ -amino do resíduo de lisina (Abz-FRK(Dnp)P-OH) utilizado para se observar a atividade em ambos os domínios da ECA, o substrato Abz-SDK(Dnp)P foi utilizado para verificar a atividade do N-Domínio e o substrato Abz-LFK(Dnp)P para verificar a atividade do C-Domínio da ECA. Todos estes substratos foram sintetizados pela metodologia da fase sólida (BARLOS *et al*, 1989), e gentilmente fornecido pela Dra Adriana K. Carmona, do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O tampão de incubação utilizado para determinação da ECA no plasma foi Tris-HCl 100mM, NaCl 50 mM, pH 7,0.

Foram utilizados 10 $\mu$ L do plasma para os ensaios de atividade adicionados em tampão de incubação. A reação foi iniciada após a adição de 20 $\mu$ L do substrato de supressão intramolecular em 2 mL de tampão, e a hidrólise foi acompanhada diretamente na cubeta de quartzo 10.00 mm (Hellma<sup>®</sup>, Alemanha), no fluorímetro Hitachi F-2500, (EX= 320nm; EM=420nm) com abertura de 5/5 a 700V, a 37°C. Após 300 segundos foi adicionado 5 $\mu$ L de Captopril 2M, para inibição da ECA.

### **3.2.9 Atividade da Caliceína no Plasma**

A atividade da caliceína no plasma foi realizada utilizando o substrato ZFR-MCA. O plasma utilizado foi obtido através da centrifugação do sangue retirado durante as coletas em tubo contendo citrato. O tampão de incubação onde foi realizada a reação para verificar a atividade da caliceína era composto de Tris-HCl 50mM, 100 mM de NaCl, pH 7,4.

A reação foi iniciada após a adição de 7,2 $\mu$ L do substrato ZFR-MCA ao tampão de incubação contendo 5  $\mu$ L de plasma. A reação de hidrólise ocorreu a 37 °C em cubeta de quartzo no fluorímetro Hitachi F-2500 (EX=380nm; EM=460nm e aberturas de 5/5 com uma voltagem de 700V). Após 300 segundos de reação foi adicionado 5 $\mu$ L de PKSI (inibidor),

para confirmar a atividade da caliceína plasmática. A fluorescência foi novamente observada por mais 100 segundos.

A atividade da caliceína plasmática foi calculada subtraindo-se o valor obtido após a adição do inibidor do primeiro valor, sem inibidor, no final de 300 segundos.

### **3.2.10 Concentrações plasmáticas de Ac-SDKP**

A determinação dos níveis plasmáticos do substrato específico para o N-domínio da ECA, o Ac-SDKP, foi obtida através da utilização do kit de imunensaio específico para detecção desse peptídeo em plasma, soro, ou urina de humanos (ALPCO Diagnostics™). Para o teste foi utilizado 1 mL de plasma de cada voluntário, onde 0,15 mL foram obtidos do sobrenadante após centrifugação de 15 minutos a 4500 rpm a 4°C. Foi então adicionado 1 ml de metanol e novamente centrifugado e logo em seguida todo o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e centrifugado a vácuo por aproximadamente 6 horas para secagem. Seguiram-se os passos indicados no kit pelo fabricante para a verificação dos níveis de Ac-SDKP.

### **3.2.11 Análise dos Dados**

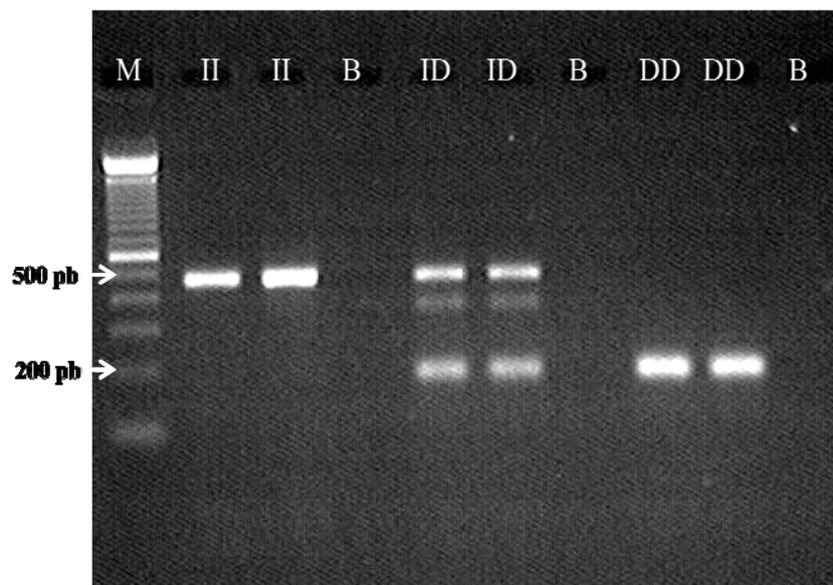
Os valores obtidos foram analisados com a utilização do programa GrafPad Prism. Os dados encontrados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado Test *t* Student. Para análise de mais de duas amostras foi aplicado análise de variância (One Way ANOVA) seguida de verificação *post-hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em nível de 95% onde os valores de p foram menores que 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características Gerais dos voluntários

### 4.2 Polimorfismos da ECA

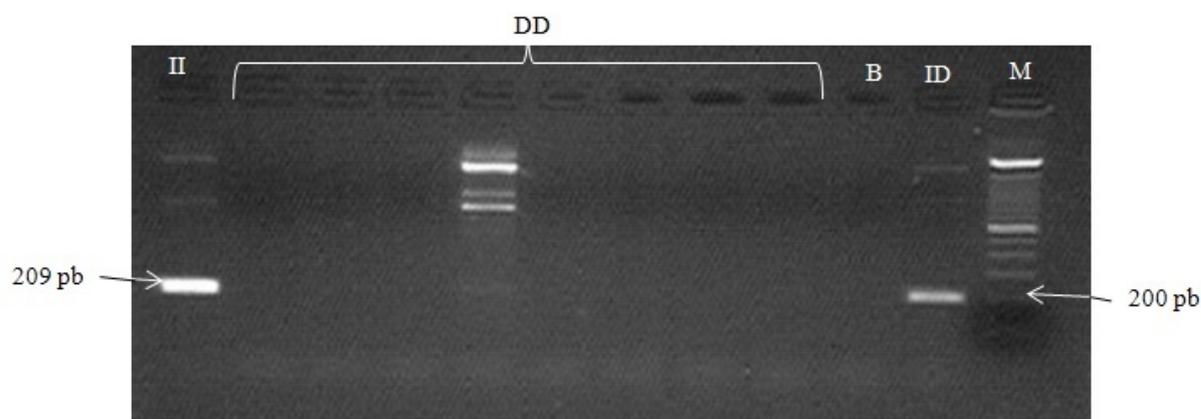
O resultado do produto da primeira reação da PCR utilizado para identificação do genótipo da ECA foi visualizado em gel de eletroforese (gel de agarose a 2%) com brometo de etídio. Foram observadas bandas de 490 pares de bases nitrogenadas para indivíduos homocigotos para Inserção (I) e bandas de 190 pares de bases nitrogenadas para homocigotos que possuem a Deleção (D). Os indivíduos heterocigotos demonstraram as duas bandas, uma de inserção e outra de deleção. A figura 7 apresenta as bandas de DNA genômico amplificado após a PCR de seis voluntários. Todos os dados foram armazenados na forma digital.



**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 2%. II – homocigoto para inserção, ID heterocigoto, e DD-homocigoto para deleção; B – Branco; Marcador de massa molecular (M) 100pb.

Devido ao fato do alelo D ser preferencialmente amplificado, por ser mais curto, todas as amostras do primeiro PCR que obtiveram o genótipo DD, foram submetidas a uma segunda

e independente amplificação com um iniciador interno e o óligo antisense utilizado na primeira reação. Este iniciador reconhece somente uma seqüência onde ocorre a inserção dos 287pb. Os resultados da segunda reação de PCR estão demonstrados na figura 8.



**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose 2% com a utilização de iniciador interno; II- homozigoto para inserção, ID- heterozigoto; Marcador de massa molecular (M); Branco (B).

O resultado desta segunda PCR mostrou a ausência de bandas de 209 pb dos indivíduos DD, banda essa específica para os indivíduos que possuem o gene de Inserção. Neste teste foram utilizados dois controles positivos, um indivíduo possuindo o genótipo II e outro indivíduo possuindo o genótipo ID onde uma banda de 209 pb foi observada. Em suma, mediante a segunda reação foi possível confirmar que não houve uma amplificação preferencial do alelo D em nenhum dos indivíduos genotipados e classificados como DD na primeira PCR.

O resultado da distribuição dos genótipos e distribuição alélica da ECA dos 62 voluntários que participaram do estudo está apresentado na tabela 1.

**Tabela 1** – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo I/D ECA.

Genótipo	N	%
II	16	26
ID	28	45
DD	18	29
Total	62	
I	60	48
D	64	52

II: inserção-inserção; ID: inserção-deleção; DD: deleção-deleção.

As características gerais de todos os voluntários são apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2** – Distribuição das médias  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros: idade, peso, estatura, índice de massa corpórea (IMC) em indivíduos normotensos.

<b>Parâmetros</b>	<b>II</b>	<b>ID</b>	<b>DD</b>
Idade (anos)	26 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2
Peso (Kg)	75 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2	76 $\pm$ 3
Estatura (cm)	1,77 $\pm$ 0,02	1,76 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,02
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23,7 $\pm$ 0,6	23,7 $\pm$ 0,5	23,7 $\pm$ 0,9

(p > 0,05) para todas as variáveis entre os diferentes genótipos.

### 4.3 Parâmetros Hemodinâmicos

Todos os parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) foram aferidos durante o repouso, e no final de cada repetição do teste de força. Os dados da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) utilizado para obtenção da PAM estão demonstrados na tabela 3. A média da frequência cardíaca (FC) obtida no início e no fim do teste de força está presente na tabela 3. Os resultados obtidos nestes testes demonstraram que não houve diferença significativa dos voluntários acima descritos, no repouso e no final do exercício.

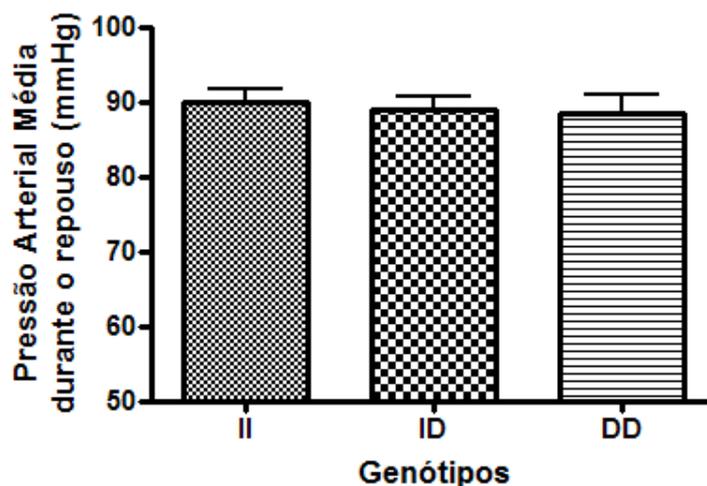
**Tabela 3** – Médias  $\pm$  erro padrão da média de pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica medida em repouso, durante o exercício, final do exercício e frequência cardíaca (FC) no repouso e no final do exercício.

	<b>FCr</b>	<b>PASr</b>	<b>PADr</b>	<b>PASex</b>	<b>PADex</b>	<b>PASex</b>	<b>PADex</b>	<b>PASf</b>	<b>PADf</b>	<b>FCf</b>
II	70 $\pm$ 3	113 $\pm$ 2	78 $\pm$ 2	115 $\pm$ 3	75 $\pm$ 3	116 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2	117 $\pm$ 3	78 $\pm$ 3	76 $\pm$ 3
ID	73 $\pm$ 2	112 $\pm$ 2	77 $\pm$ 2	116 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2	119 $\pm$ 3	79 $\pm$ 2	116 $\pm$ 3	80 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2
DD	71 $\pm$ 3	111 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2	116 $\pm$ 4	78 $\pm$ 3	114 $\pm$ 4	79 $\pm$ 3	114 $\pm$ 3	81 $\pm$ 3	75 $\pm$ 3

FCr: frequência cardíaca no repouso; PASr: pressão arterial sistólica no repouso; PADr: pressão arterial diastólica no repouso; PASex: pressão arterial sistólica durante o exercício; PADex: pressão arterial diastólica durante o exercício; PADf: pressão arterial sistólica no final do exercício; PADf: pressão arterial diastólica no final do exercício; FCf: frequência cardíaca no final do exercício. (p>0,05) para todas as medias.

A PAM é a principal medida clínica para a verificação da PA. E de acordo com os nossos resultados não foi possível observar diferença no início, durante e final do exercício na PAM, levando em consideração os genótipos da ECA.

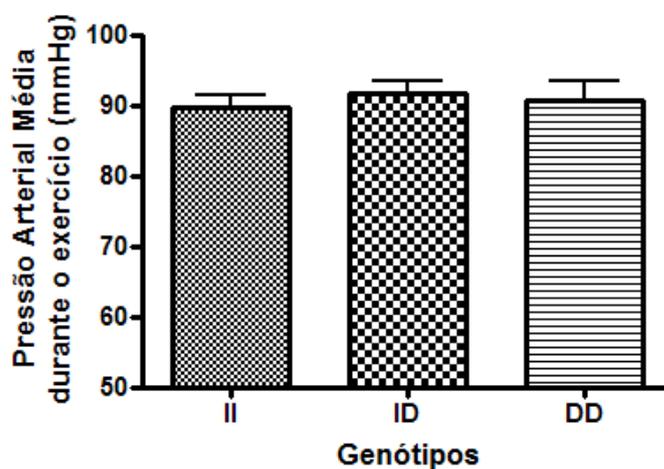
A figura 9 mostra a PAM na condição de repouso.



**Figura 9** – Pressão arterial média (PAM) durante o repouso verificado em cada genótipo.

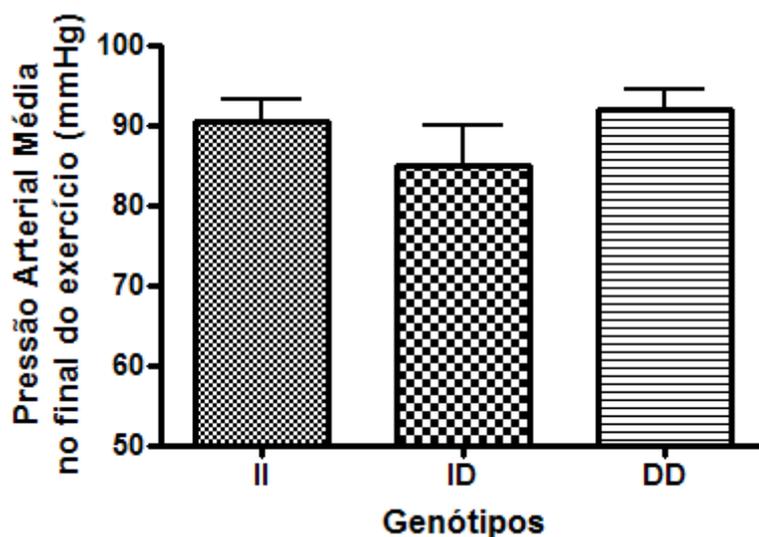
Também não ocorreu nenhuma diferença significativa na PAM dos voluntários normotensos durante o repouso relacionado com o genótipo.

Logo após a medida da pressão arterial em repouso os voluntários realizaram os testes de prensão manual (handgrip) e a pressão arterial foi medida no final de cada teste. A figura 10 mostra a média das três primeiras aferições da PAM para cada genótipo durante os testes de força.



**Figura 10** – Pressão arterial média (PAM) durante o teste de força para cada genótipo.

Logo após o ultimo teste de força foi aferida a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) para obtenção da Pressão Arterial Média (PAM). Os resultados da PAM estão demonstrados na figura 11.

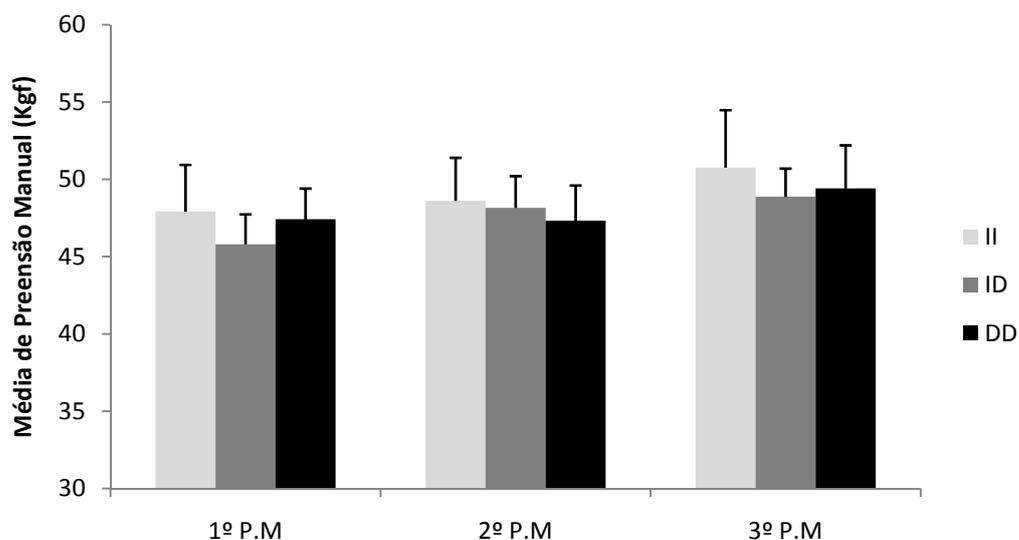


**Figura 11** – Pressão arterial média (PAM) no final do teste de força.

Não ocorreu diferença significativa na pressão arterial média no final do exercício para nenhum dos genótipos da ECA.

#### **4.3.1 Relação entre força e genótipo da ECA**

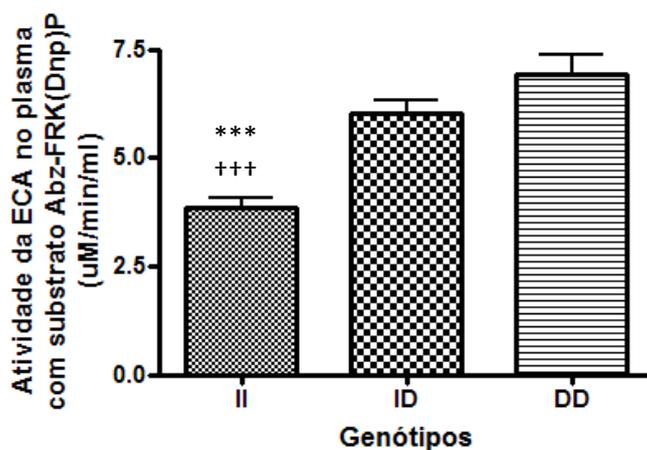
Alguns estudos demonstram que indivíduos portadores do genótipo DD, quando submetidos a treinamento tem um maior ganho de força devido a uma maior ganho de massa muscular (FOLLAND *et al.*, 2000) quando comparados a indivíduos do genótipo II e ID. Os indivíduos de genótipo II são associados com uma melhoria no desempenho de resistência. Porém nos indivíduos normotensos sedentários que realizaram os testes, não foi observada esta diferença de força durante os 3 testes de prensão manual. A figura 12 mostra a média da força obtida durante todos os três testes.



**Figura 12** - Medidas dos resultados de preensão manual (P.M) dos grupos com genótipos II, DD e ID ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4 Parâmetros Metabólicos

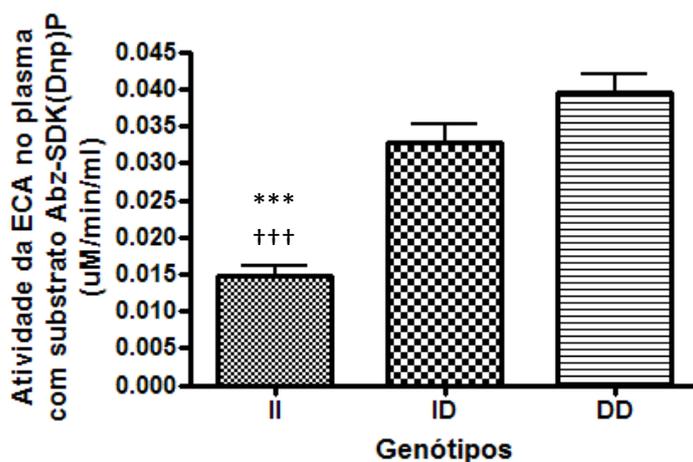
A figura 13 apresenta os valores da atividade da ECA plasmática mensurados com substrato para o C-N domínio, Abz-FRK(Dnp)P, quando agrupados pelos genótipos.



**Figura 13** – Atividade da ECA no plasma dos voluntários de genótipo II, ID e DD utilizando substrato Abz-FRK(Dnp)P para o C – N Domínios. \*\*\* II x ID, e ††† II x DD –  $p < 0,001$ .

Ao comparar os resultados obtidos, foi possível observar diferença significativa do grupo II em relação aos grupos ID e DD ( $p < 0,001$ ) na atividade dessa enzima. Entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo ID e DD. Estes resultados foram obtidos com a utilização do substrato Abz-FRK(Dnp)P, substrato semelhante ao utilizado em trabalhos que determinaram a atividade da ECA, ou seja, substrato específico para os dois domínios dessa enzima. Os próximos resultados são decorrentes da utilização de substratos específicos para cada domínio da ECA, sendo que dados que avaliam atividade de cada domínio da ECA relacionando com o genótipo I/D não são encontrados na literatura.

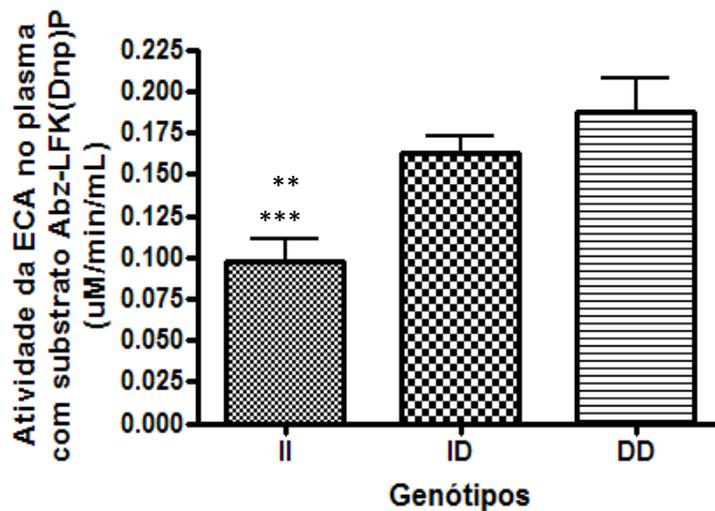
A figura 14 mostra a atividade da ECA com substrato específico para o N-Domínio desta enzima, Abz-SDK(Dnp)P.



**Figura 14** – Atividade da ECA no plasma com substrato Abz-SDK(Dnp)P específico para o N- Domínio. \*\*\*IIxID, ††† IIxDD. UAF/min:

Com a utilização deste substrato, foi observada diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre o genótipo II em relação aos grupos de genótipos ID e DD.

A atividade da ECA plasmática com substrato específico para o C-domínio Abz-LFK(Dnp)P, está representada na figura 15.



**Figura 15** – Atividade da ECA utilizando substrato Abz-LFK(Dnp)P específico para C-Domínio. ( $p < 0,01$ ) \*\*IIxID; ( $p < 0,001$ ) \*\*\* IIxDD.

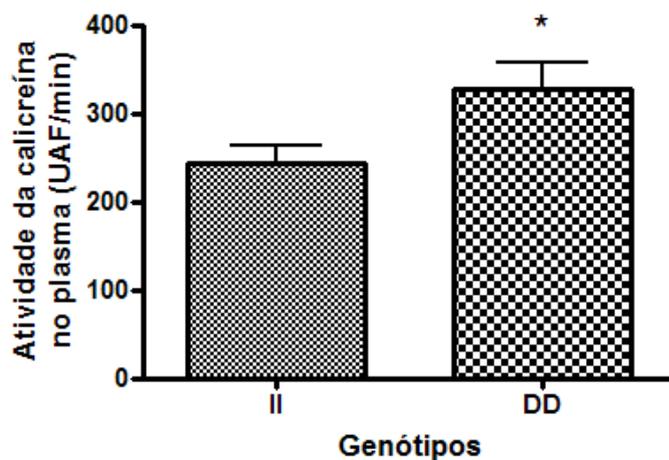
Ao comparar os determinados genótipos do polimorfismo foi observado diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os genótipos IIxID e diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os genótipos IIxDD.

Como explanado anteriormente, a utilização destes substratos específicos não é encontrado em trabalhos na literatura, e os resultados obtidos em nosso trabalho com a utilização destes, mostram não haver diferença significava entre os grupos ID e os indivíduos do grupo DD, apontando que a presença de um alelo D é o suficiente para ter um aumento significativo da atividade da ECA.

Foi verificada uma maior atividade de ECA em indivíduos portadores dos genótipos ID e DD, entretanto não observamos alteração na pressão arterial. Por este motivo, nós resolvemos verificar outros sistemas em que a ECA está relacionada e que possam compensar, teoricamente, uma maior produção de Ang II.

Primeiramente resolvemos averiguar o SCC, mas especificamente a calicreína plasmática, relacionada com a conversão de BK, um potente vasodilatador.

A figura 16 apresenta o resultado das concentrações plasmáticas de calicreína plasmática entre os grupos II e DD.

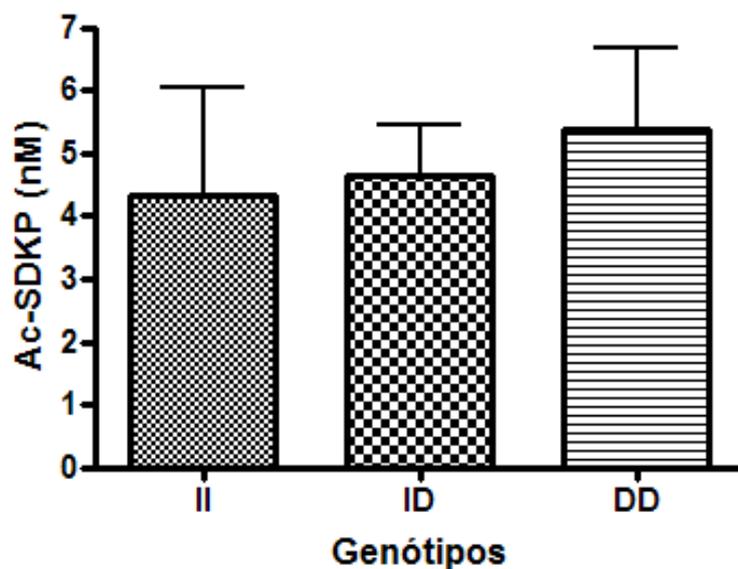


**Figura 16-** Atividade da calicreína plasmática dos indivíduos II e DD. UFA/min. Unidades arbitrárias de fluorescência por minuto. \* (Comparando II com DD –  $p < 0,05$ ).

Os indivíduos DD apresentaram uma atividade da calicreína plasmática 25% maior comparadas aos indivíduos II sendo essa diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença significativa entre o grupo ID e os demais grupos. A relevância desses dados será investigada pela dosagem das outras enzimas plasmáticas envolvidas nesses sistemas.

Outro peptídeo conhecido como substrato específico da ECA, o N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP), substrato natural para o N-domínio (PEREIRA *et al.*, 2003).

A figura 17 mostra o resultado dos níveis circulantes do Ac-SDKP nos grupos do polimorfismo da ECA.



**Figura 17-** Níveis de Ac-SDKP circulante.

Não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos níveis circulantes do peptídeo Ac-SDKP para nenhum dos genótipos do polimorfismo da ECA, mesmo para aqueles grupos que apresentaram maior atividade da ECA em testes anteriores.

## 5 DISCUSSÃO

A ECA participa de diversas vias metabólicas, pois atua clivando uma diversidade muito grande de peptídeos fisiologicamente ativos. Desde as primeiras observações da hidrólise da angiotensina I pela ECA, um grande caminho foi percorrido no estudo desta metalopeptidase, sendo que agora novas funções fisiológicas vêm sendo descritas e atribuídas a esta enzima, como por exemplo, sua participação na hematopoiese (ABALI *et al.*, 2002), fertilidade (HAGAMAN *et al.*, 1998), hidrólise de neuropeptídios, (NORTH *et al.*, 1999) dentre outras.

Após o relato de Cambien *et al.*, (1988) descrevendo que as concentrações circulantes da ECA de humanos estão sob controle genético, vários outros artigos foram publicados demonstrando os polimorfismos dessa enzima. A atenção foi voltada para um polimorfismo de Inserção/Deleção no intron 16, quando Rigat *et al.*,(1990) demonstraram que este responde por aproximadamente metade da variação observada em níveis plasmáticos da ECA na população. Fundamentando-se nos trabalhos de Rigat, *et al.*, (1990), Tiret, *et al.*, (1992), que demonstraram uma grande variação na frequência do alelo D, o primeiro passo do nosso trabalho foi a genotipagem para verificar a porcentagem do polimorfismo da ECA encontrada na população em estudo.

Neste trabalho encontramos a prevalência de 26% para o genótipo II, 45% para ID e 29% para DD. A distribuição do genótipo da ECA, encontrada em estudo nacional, mostra uma prevalência do polimorfismo DD de 28%, o que está de acordo com os nossos resultados (PEREIRA *et al.*, 2003).

Um outro estudo realizado por Inacio *et al.*, (2004), visava determinar a frequência genotípica e alélica do polimorfismo na população Brasileira. O resultado se mostrou semelhante ao de outras populações estudadas, mas houve uma variabilidade genotípica entre as regiões do país, com variações principalmente entre os homozigotos II e DD na região Sul, onde se observou uma tendência ao aumento do genótipo DD (54%) e diminuição do heterozigoto (24%), devido provavelmente à composição étnica. Em nosso estudo, as frequências dos alelos D e I foram de 52% e 48%, respectivamente, e são semelhantes às encontradas por Inacio *et al.*,(2004), demonstrando que na região sudeste a frequência alélica do I é próxima a do alelo D.

Dados sobre esse polimorfismo, publicados em vários estudos, demonstraram que indivíduos com genótipo DD possuem maior concentração plasmática da ECA circulante, resultando em maiores concentrações plasmáticas de Ang II. Pode-se admitir um aumento da resistência vascular periférica causada pelo aumento plasmático de angiotensina II, assim, como pela degradação da bradicinina em indivíduos com genótipo DD, contribuindo assim para o aumento da pressão arterial. Entretanto outros artigos publicados avaliaram normotensos x hipertensos e não observaram correlação da hipertensão em relação aos genótipos ou alelos (ISHIGAMI *et al.*, 1995; ABBUD *et al.*, 1998).

No estudo realizado por Chiang *et al.*, em 1997, avaliando 3095 chineses, foi encontrada correlação entre os alelos e hipertensão arterial, mas não entre os genótipos. Foi observada uma positiva correlação da pressão arterial diastólica nos indivíduos do sexo masculino com genótipo DD. Nakano *et al.*, em 1998, evidenciaram que o alelo D está associado a hipertensão arterial precoce e Abbud, *et al.*, em 1998 constataram correlação do genótipo DD com a hipertensão arterial.

Estudos que delineiam as ligações, entre os alelos e genótipos da ECA com o fenótipo da pressão arterial, são muito discrepantes (RIGAT *et al.*, 1990; CAMBIEN e TIRET, 2007). E muitos estudos epidemiológicos associam o alelo D com o avanço de risco de enfermidades cardiovasculares (BARLEY *et al.*, 1994; STAESSEN *et al.*, 2001).

Como já descrito na literatura os genótipos da ECA também estão envolvidos com adaptações a determinados tipos de exercício. Segundo Montgomery *et al.* (1997) o polimorfismo de D está associado com o crescimento de músculo liso vascular e hipertrofia cardíaca, que podem resultar em alterações e diferentes respostas do sistema vascular, e este genótipo é mais encontrado em indivíduos que tem maior predisposição para provas anaeróbias, e que indivíduos com predisposição para melhor rendimento em provas aeróbias carregam o alelo I (GAYAGAY *et al.*, 1998).

Utilizando desses dados da literatura, realizamos testes de força (handgrip) em nossos voluntários para verificar possíveis diferenças na pressão arterial e frequência cardíaca no repouso e no final do teste. Este teste de força foi escolhido por ser um teste de fácil realização, sem custos, e que se ajusta melhor ao perfil de voluntários saudáveis que não praticam esportes específicos.

O efeito das manobras do handgrip em respostas a função ventricular esquerda foi intensivamente investigado (GROSSMAN *et al.*, 1973; CRAWFORD *et al.*, 1979). Tavli, *et al.*, em 2003 analisaram variáveis hemodinâmicas durante o repouso e após as manobras de

handgrip e mostraram que houve aumento da pressão após as manobras, porém estas mudanças não foram estatisticamente significativas. Nossos resultados estão de acordo com esses autores e mostraram um aumento da pressão no fim do teste em relação ao início, mas esse aumento não foi significativo.

Nossos resultados não sugeriram relação entre o genótipo ID ou DD com o fenótipo de alteração na pressão arterial. No trabalho realizado por Zee, et al., em 1992, foi observado que o polimorfismo da ECA estava associado com hipertensão arterial em uma população australiana. Em uma população japonesa foi relatado que indivíduos DD apresentaram 79% de risco para desenvolver hipertensão quando comparado aqueles indivíduos do genótipo II (HIGASHIMORI *et al.*, 1993). Deve-se ressaltar que neste estudo os indivíduos eram jovens saudáveis, e trabalhos mostram que a hipertensão está relacionada com o envelhecimento.

A pressão arterial aumenta com a idade (VASAN *et al.*, 2001), que pode ser esclarecido pela rigidez arterial, ocasionador da hipertensão arterial, relacionada ao envelhecimento. Segundo dados da literatura, este pode ser um motivo por não verificarmos alterações na pressão arterial de jovens durante a execução dos testes.

A força de preensão manual tem sido usada na ciência de exercícios e educação física como índice de força na mão e no antebraço, e é conhecido que a força é modificada diretamente com a massa corporal de cada indivíduo. Realizamos as medidas necessárias para verificar o IMC dos grupos estudados. Os voluntários que participaram do estudo não apresentaram diferença no índice de massa muscular, sendo que a média obtida para os grupos foram II=  $23,7 \pm 0,6$ ; ID=  $23,7 \pm 0,5$  e DD=  $23,7 \pm 0,9$ , não interferindo assim nos testes de força.

Como não foi observado diferenças no IMC dos grupos, foram utilizados os dados do teste de força para verificar a variação na pressão arterial e a possível variação na força dos voluntários de acordo com cada genótipo encontrado. Como descrito anteriormente, um maior desenvolvimento da massa muscular está ligada aos genótipos DD da ECA. Alguns autores observaram diferença de força encontrada entre os genótipos, Folland *et al.*, em 2000, mostraram que o alelo D está relacionado com um maior ganho de força muscular. A presença do alelo D está associada à maior resposta hipertrófica, especialmente, em situações de estresse cardiovascular como exercício e hipertensão. Com os dados obtidos com o teste de força, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) de força entre os genótipos DD e II como observados em outros estudos. Uma diferença no nosso estudo em relação aos encontrados na literatura, é que os nossos voluntários não foram submetidos a um programa de exercícios e sim a um simples teste de força.

Uma das informações descritas na literatura é a ligação entre os alelos e as concentrações plasmáticas da ECA. O alelo D proporciona maior concentração plasmática da enzima comparada ao alelo I. Se correlacionados os genótipos e a concentração da enzima, de maneira crescente, estes se apresentam da seguinte forma: II, ID e DD. Esse fato foi também constatado em pessoas centenárias e brancos caucásianos (FAURE-DELANEF *et al.*, 1998). Com base nestes dados, demos início à avaliação da atividade da ECA circulante de nossos voluntários.

A primeira mensuração foi realizada com o substrato Abz-FRK(Dnp)P, que é reconhecido pelos dois domínios catalíticos da ECA, sendo assim clivado tanto pelo domínio N como pelo domínio C. Os resultados obtidos neste presente trabalho demonstraram uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado o grupo de genótipo II com os grupos ID e DD. Os grupos ID e DD quando comparados não apresentaram diferença significativa. É importante ressaltar que, os valores de atividade da ECA encontrados na literatura utilizaram substrato que tem igual afinidade pelos dois domínios, ou seja, é clivado pelos domínios C e N da ECA.

Um dos pontos de maior interesse deste projeto foi à utilização de substratos específicos para os domínios da ECA plasmática. No primeiro ensaio foi verificada a atividade do domínio N da enzima, utilizando-se o substrato específico Abz-SDK(Dnp)P. Com este ensaio foi possível verificar diferença significativa ( $p < 0,001$ ) novamente comparando o grupo II com os grupos ID e DD, mas não se observou diferença significativa entre os grupos ID e DD. Estes resultados sugerem não haver diferença entre os indivíduos que possuem uma ou duas cópia do gene da deleção, relacionando a atividade relativa ao domínio N da ECA, o que sugere uma maior produção da enzima sem afetar o sítio catalítico N.

O último ensaio utilizando o substrato de supressão molecular Abz-LFK(Dnp)P, o qual é clivado somente pelo C-domínio da ECA, mostrou novamente uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre o grupo II e o DD. Foi também observada diferença significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparado o grupo II aos indivíduos do grupo ID.

A análise dos resultados obtidos com os três substratos utilizados para a determinação da atividade da ECA mostrou um resultado até agora inédito na literatura, os indivíduos portadores de um único D têm a atividade da ECA próxima aos indivíduos portadores dos dois alelos para a deleção. Até hoje era observada atividade da ECA relacionada aos genótipos, onde os indivíduos DD produziam mais ECA, e os II que produziam menos e os

indivíduos heterozigotos, ID eram os que apresentavam atividade plasmática intermediária (CAMBIEN *et al.*, 1988; RIGAT *et al.*, 1990; COSTEROUSSE *et al.*, 1993; DANSER *et al.*, 1995).

Estes achados são de fundamental importância uma vez que esta proteína tem sido alvo de intensa utilização de drogas inibidoras, e os dados desses trabalhos sugerem que a presença de um único alelo D é suficiente para que ocorra um aumento significativo da ECA. Isso mostra que a investigação do papel da ECA em diferentes patologias deveria ser analisada de forma diferente da habitualmente utilizada, ou seja, os indivíduos deveriam ser agrupados em somente dois grupos e a prescrição dos inibidores dessa enzima deveriam levar esse fato em consideração.

Uma vez que trabalhos na literatura demonstram a interação da ECA nos SRA e SCC, e também clivando outros peptídeos (SKEGGS *et al.*, 1956; YANG *et al.*, 1970; ROUSSEAU *et al.*, 1995), resolvemos avaliar se as diferentes concentrações séricas da ECA decorrente do polimorfismo I/D podem interagir com outros sistemas que estejam relacionados com a manutenção da pressão arterial. A enzima calicreína plasmática é responsável pela conversão de cininogênio de alto peso molecular em BK, um potente vasodilatador (BHOOLA *et al.*, 1992). Verificamos os níveis séricos da calicreína e observamos uma maior concentração desta enzima em indivíduos pertencentes ao grupo DD, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada aos indivíduos do grupo II. Não se observou diferença entre o grupo II e ID, como também entre o grupo ID e DD.

Os resultados encontrados nos dão idéia do por que indivíduos jovens saudáveis não apresentaram modificações de pressão arterial e nem aumento da pressão durante a realização do teste de força, existe uma compensação na atividade enzimática da calicreína no grupo que apresenta níveis elevados de ECA. Provavelmente este fato levará a maior produção de BK contrapondo o efeito vasoconstritor da Ang II.

Esses resultados mostram a inter-relação dos sistemas calicreína-cininas e renina angiotensina. Não sabemos ainda se a maior atividade da ECA resulta numa menor concentração plasmática de BK. Entretanto estes dados sugerem que existe uma interdependência entre os dois sistemas.

Por imunoensaio, verificamos os níveis séricos do peptídeo Ac-SDKP, que é um substrato natural para ECA, e é clivado preferencialmente pelo domínio N dessa enzima (PEREIRA *et al.*, 2003). Neste ensaio não se observou diferença significativa para nenhum dos genótipos da ECA, demonstrando uma compensação em sistemas que estão relacionados

com esta enzima. Também a partir desses resultados podemos verificar que a alteração em um dos sistemas de regulação pode possivelmente ser o fator decisivo para desencadear desordens cardiovasculares.

De acordo com nossos resultados fica clara a importância de futuros estudos utilizando-se os substratos específicos para cada domínio da ECA para melhor entender a função desta enzima, sua possível participação em outras vias metabólicas bem como sua interação com o desenvolvimento de doenças.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- A percentagem alélica encontrada na população em estudo foi igual às encontradas em estudos anteriores;
- Não houve diferença na correlação do genótipo e pressão arterial e frequência cardíaca;
- Não houve diferença entre os genótipos da ECA em relação ao teste de força (handgrip);
- Não houve diferença no índice de massa corporal entre os indivíduos participantes do estudo.
- A atividade da ECA plasmática total ou dos domínios C e N foram maiores nos indivíduos ID e DD quando comparados aos indivíduos II.
- Indivíduos DD apresentaram maior atividade da caliceína plasmática do que aqueles que apresentaram o genótipo II.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALI, H., I. H. GULLU, H. ENGIN, I. C. HAZNEDAROGLU, M. ERMANG. TEKUZMAN. Old antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. **Med Hypotheses**, v.59, n.3, Sep, p.344-8. 2002.

ABBUD, Z. A., A. C. WILSON, N. M. COSGROVEJ. B. KOSTIS. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in systemic hypertension. **Am J Cardiol**, v.81, n.2, Jan 15, p.244-6. 1998.

ALHENC-GELAS, F., J. RICHARD, D. COURBON, J. M. WARNETP. CORVOL. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. **J Lab Clin Med**, v.117, n.1, Jan, p.33-9. 1991.

ALHENC-GELAS, F., F. SOUBRIER, C. HUBERT, J. ALLEGRINIP. CORVOL. The peculiar characteristics of the amino acid sequence of angiotensin I-converting enzyme, as determined by cDNA cloning of the human endothelial enzyme. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.14 Suppl 4, p.S6-9. 1989.

ALLOGHO, S. N., F. GOBEIL, L. H. PHENG, X. K. NGUYEN-LE, W. NEUGEBAUERD. REGOLI. Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. **Can J Physiol Pharmacol**, v.73, n.12, Dec, p.1759-64. 1995.

AZIZI, M., A. ROUSSEAU, E. EZAN, T. T. GUYENE, S. MICHELET, J. M. GROGNET, M. LENFANT, P. CORVOLJ. MENARD. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **J Clin Invest**, v.97, n.3, Feb 1, p.839-44. 1996.

BARLEY, J., A. BLACKWOOD, N. D. CARTER, D. E. CREWS, J. K. CRUICKSHANK, S. JEFFERY, A. O. OGUNLESIG. A. SAGNELLA. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. **J Hypertens**, v.12, n.8, Aug, p.955-7. 1994.

BASSO, N.N. A. TERRAGNO. History about the discovery of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v.38, n.6, Dec 1, p.1246-9. 2001.

BEN-ARI, E. T.J. C. GARRISON. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. **Am J Physiol**, v.255, n.1 Pt 1, Jul, p.E70-9. 1988.

BHOOLA, K. D., C. D. FIGUEROA, WORTHY. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**, v.44, n.1, Mar, p.1-80. 1992.

BOVE, C. M., W. D. GILSON, C. D. SCOTT, F. H. EPSTEIN, Z. YANG, J. M. DIMARIA, S. S. BERR, B. A. FRENCH, S. P. BISHOP, M. KRAMER. The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. **J Cardiovasc Magn Reson**, v.7, n.2, p.459-64. 2005.

BREWSTER, U. C.M. A. PERAZELLA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. **Am J Med**, v.116, n.4, Feb 15, p.263-72. 2004.

CAMBIEN, F., F. ALHENC-GELAS, B. HERBETH, J. L. ANDRE, R. RAKOTOVAO, M. F. GONZALES, J. ALLEGRINI, BLOCH. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. **Am J Hum Genet**, v.43, n.5, Nov, p.774-80. 1988.

CAMBIEN, F., O. POIRIER, L. LECERF, A. EVANS, J. P. CAMBOU, D. ARVEILER, G. LUC, J. M. BARD, L. BARA, S. RICARDET AL. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature**, v.359, n.6396, Oct 15, p.641-4. 1992.

CAMBIEN, F.L. TIRET. Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. **Circulation**, v.116, n.15, Oct 9, p.1714-24. 2007.

CHEN, C., A. J. GENTLES, J. JURKAS, KARLIN. Genes, pseudogenes, and Alu sequence organization across human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.5, Mar 5, p.2930-5. 2002.

COLLINS, M., S. L. XENOPHONTOS, M. A. CARIOLOU, G. G. MOKONE, D. E. HUDSON, L. ANASTASIADIS, D. NOAKES. The ACE gene and endurance performance during the South African Ironman Triathlons. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.8, Aug, p.1314-20. 2004.

CORVOL, P., F. SOUBRIERX, JEUNEMAITRE. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. **Pathol Biol (Paris)**, v.45, n.3, Mar, p.229-39. 1997.

COSTEROUSSE, O., J. ALLEGRINI, M. LOPEZ, ALHENC-GELAS. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J**, v.290 ( Pt 1), Feb 15, p.33-40. 1993.

CRAWFORD, M. H., D. H. WHITER. A. O'ROURKE. Effects of oral quinidine on left ventricular performance in normal subjects and patients with congestive cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v.44, n.4, Oct, p.714-8. 1979.

DANSER, A. H., M. A. SCHALEKAMP, W. A. BAX, A. M. VAN DEN BRINK, P. R. SAXENA, G. A. RIEGGERH. SCHUNKERT. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation**, v.92, n.6, Sep 15, p.1387-8. 1995.

DAS, M., J. L. HARTLEYR. L. SOFFERS. Serum angiotensin-converting enzyme. Isolation and relationship to the pulmonary enzyme. **J Biol Chem**, v.252, n.4, Feb 25, p.1316-9. 1977.

DONOGHUE, M., F. HSIEH, E. BARONAS, K. GODBOUT, M. GOSSELIN, N. STAGLIANO, M. DONOVAN, B. WOOLF, K. ROBISON, R. JEYASEELAN, R. E. BREITBARTS. ACTON. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, v.87, n.5, Sep 1, p.E1-9. 2000.

DRAY, A.M. PERKINS. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v.16, n.3, Mar, p.99-104. 1993.

EHLERS, M. R., E. A. FOX, D. J. STRYDOMJ. F. RIORDAN. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, n.20, Oct, p.7741-5. 1989.

ERDOS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v.16, n.4, Oct, p.363-70. 1990.

ERDOS, E. G.R. A. SKIDGEL. The angiotensin I-converting enzyme. **Lab Invest**, v.56, n.4, Apr, p.345-8. 1987.

FATINI, C., R. GUAZZELLI, P. MANETTI, B. BATTAGLINI, F. GENSINI, R. VONO, L. TONCELLI, P. ZILLI, A. CAPALBO, R. ABBATE, G. F. GENSINIG. GALANTI. RAS genes influence exercise-induced left ventricular hypertrophy: an elite athletes study. **Med Sci Sports Exerc**, v.32, n.11, Nov, p.1868-72. 2000.

FAURE-DELANEF, L., B. BAUDIN, B. BENETEAU-BURNAT, J. C. BEAUDOIN, J. GIBOUDEAUD. COHEN. Plasma concentration, kinetic constants, and gene polymorphism of angiotensin I-converting enzyme in centenarians. **Clin Chem**, v.44, n.10, Oct, p.2083-7. 1998.

FERREIRA, A. J.R. A. SANTOS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.4, Apr, p.499-507. 2005.

FOLLAND, J., B. LEACH, T. LITTLE, K. HAWKER, S. MYERSON, H. MONTGOMERYD. JONES. Angiotensin-converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. **Exp Physiol**, v.85, n.5, Sep, p.575-9. 2000.

GAYAGAY, G., B. YU, B. HAMBLY, T. BOSTON, A. HAHN, D. S. CELERMAJERR. J. TRENT. Elite endurance athletes and the ACE I allele--the role of genes in athletic performance. **Hum Genet**, v.103, n.1, Jul, p.48-50. 1998.

GROSSMAN, W., L. P. MCLAURIN, S. B. SALTZ, J. A. PARASKOS, J. E. DALENL. DEXTER. Changes in the inotropic state of the left ventricle during isometric exercise. **Br Heart J**, v.35, n.7, Jul, p.697-704. 1973.

GUIGON, M.D. BONNET. Inhibitory peptides in hematopoiesis. **Exp Hematol**, v.23, n.6, Jun, p.477-81. 1995.

HAGAMAN, J. R., J. S. MOYER, E. S. BACHMAN, M. SIBONY, P. L. MAGYAR, J. E. WELCH, O. SMITHIES, J. H. KREGED. A. O'BRIEN. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.5, Mar 3, p.2552-7. 1998.

HAMDI, H. K.R. CASTELLON. A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v.318, n.1, May 21, p.187-91. 2004.

HEIN, L., G. S. BARSH, R. E. PRATT, V. J. DZAUB. K. KOBILKA. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. **Nature**, v.377, n.6551, Oct 26, p.744-7. 1995.

HELMER, O. M. Differentiation between two forms of angiotonin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. **Am J Physiol**, v.188, n.3, Mar, p.571-7. 1957.

HERNANDEZ, D., A. DE LA ROSA, A. BARRAGAN, Y. BARRIOS, E. SALIDO, A. TORRES, B. MARTIN, I. LAYNEZ, A. DUQUE, A. DE VERA, V. LORENZO. GONZALEZ. The ACE/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. **J Am Coll Cardiol**, v.42, n.3, Aug 6, p.527-32. 2003.

HIGASHIMORI, K., Y. ZHAO, J. HIGAKI, A. KAMITANI, T. KATSUYA, J. NAKURA, T. MIKI, H. MIKAMIT. OGIHARA. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. **Biochem Biophys Res Commun**, v.191, n.2, Mar 15, p.399-404. 1993.

HOLLENBERG, N. K., G. MARTINEZ, M. MCCULLOUGH, T. MEINKING, D. PASSAN, M. PRESTON, A. RIVERA, D. TAPLIN. VICARIA-CLEMENT. Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. **Hypertension**, v.29, n.1 Pt 2, Jan, p.171-6. 1997.

ISELL, D. C., S. VOROS, Z. YANG, J. M. DIMARIA, S. S. BERR, B. A. FRENCH, F. H. EPSTEIN, S. P. BISHOP, H. WANG, R. J. ROY, B. A. KEMP, H. MATSUBARA, R. M. CAREY. M. KRAMER. Interaction between bradykinin subtype 2 and angiotensin II type 2 receptors during post-MI left ventricular remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.6, Dec, p.H3372-8. 2007.

ISHIGAMI, T., T. IWAMOTO, K. TAMURA, S. YAMAGUCHI, K. IWASAWA, K. UCHINO, S. UMEMURAM. ISHII. Angiotensin I converting enzyme (ACE) gene polymorphism and essential hypertension in Japan. Ethnic difference of ACE genotype. **Am J Hypertens**, v.8, n.1, Jan, p.95-7. 1995.

JASPARD, E., L. WEIF. ALHENC-GELAS. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **J Biol Chem**, v.268, n.13, May 5, p.9496-503. 1993.

KAPLAN, J. M., S. H. KIM, K. N. NORTH, H. RENNKE, L. A. CORREIA, H. Q. TONG, B. J. MATHIS, J. C. RODRIGUEZ-PEREZ, P. G. ALLEN, A. H. BEGGSM. R. POLLAK. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Genet**, v.24, n.3, Mar, p.251-6. 2000.

KATSUYA, T., G. KOIKE, T. W. YEE, N. SHARPE, R. JACKSON, R. NORTON, M. HORIUCHI, R. E. PRATT, V. J. DZAUS. MACMAHON. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **Lancet**, v.345, n.8965, Jun 24, p.1600-3. 1995.

KILPELAINEN, T. O., T. A. LAKKA, D. E. LAAKSONEN, U. MAGER, T. SALOPURO, A. KUBASZEK, B. TODOROVA, O. LAUKKANEN, J. LINDSTROM, J. G. ERIKSSON, H. HAMALAINEN, S. AUNOLA, P. ILANNE-PARIKKA, S. KEINANEN-KIUKAANNIEMI, J. TUOMILEHTO, M. LAAKSOM. UUSITUPA. Interaction of single nucleotide polymorphisms in ADRB2, ADRB3, TNF, IL6, IGF1R, LIPC, LEPR, and GHRL with physical activity on the risk of type 2 diabetes mellitus and changes in characteristics of

the metabolic syndrome: The Finnish Diabetes Prevention Study. **Metabolism**, v.57, n.3, Mar, p.428-36. 2008.

KISHI, K., N. MUROMOTO, Y. NAKAYA, I. MIYATA, A. HAGI, H. HAYASHIY. EBINA. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. **Diabetes**, v.47, n.4, Apr, p.550-8. 1998.

LANZILLO, J. J., Y. DASARATHY, J. STEVENS, C. W. BARDIN. L. FANBURG. Human testicular angiotensin-converting enzyme is a mixture of two molecular weight forms. Only one is similar to the seminal plasma enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v.128, n.1, Apr 16, p.457-63. 1985.

LINDERMAN, J. R.A. S. GREENE. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. **Microcirculation**, v.8, n.4, Aug, p.275-81. 2001.

LINZ, W., G. WIEMER. B. A. SCHOLKENS. Role of kinins in the pathophysiology of myocardial ischemia. In vitro and in vivo studies. **Diabetes**, v.45 Suppl 1, Jan, p.S51-8. 1996.

MASAKI, H., T. KURIHARA, A. YAMAKI, N. INOMATA, Y. NOZAWA, Y. MORI, S. MURASAWA, K. KIZIMA, K. MARUYAMA, M. HORIUCHI, V. J. DZAU, H. TAKAHASHI, T. IWASAKA, M. INADAH. MATSUBARA. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. **J Clin Invest**, v.101, n.3, Feb 1, p.527-35. 1998.

MATSUBARA, H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. **Circ Res**, v.83, n.12, Dec 14-28, p.1182-91. 1998.

MILLS, M., N. YANG, R. WEINBERGER, D. L. VANDER WOUDE, A. H. BEGGS, S. EASTEALK. NORTH. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Hum Mol Genet**, v.10, n.13, Jun 15, p.1335-46. 2001.

MONTGOMERY, H. E., P. CLARKSON, C. M. DOLLERY, K. PRASAD, M. A. LOSI, H. HEMINGWAY, D. STATTERS, M. JUBB, M. GIRVAIN, A. VARNAVA, M. WORLD, J. DEANFIELD, P. TALMUD, J. R. MCEWAN, W. J. MCKENNAS. HUMPHRIES. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**, v.96, n.3, Aug 5, p.741-7. 1997.

MOSCA, L., L. J. APPEL, E. J. BENJAMIN, K. BERRA, N. CHANDRA-STROBOS, R. P. FABUNMI, D. GRADY, C. K. HAAN, S. N. HAYES, D. R. JUDELSON, N. L. KEENAN,

P. MCBRIDE, S. OPARIL, P. OUYANG, M. C. OZ, M. E. MENDELSON, R. C. PASTERNAK, V. W. PINN, R. M. ROBERTSON, K. SCHENCK-GUSTAFSSON, C. A. SILA, S. C. SMITH, JR., G. SOPKO, A. L. TAYLOR, B. W. WALSH, N. K. WENGER. L. WILLIAMS. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. **J Am Coll Cardiol**, v.43, n.5, Mar 3, p.900-21. 2004.

MULLER-ESTERL, W. Kininogens, kinins and kinships. **Thromb Haemost**, v.61, n.1, Feb 28, p.2-6. 1989.

MUNZENMAIER, D. H.A. S. GREENE. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. **Hypertension**, v.27, n.3 Pt 2, Mar, p.760-5. 1996.

MURPHEY, L. J., S. KUMARN. J. BROWN. Endogenous bradykinin and the renin and pressor responses to furosemide in humans. **J Pharmacol Exp Ther**, v.295, n.2, Nov, p.644-8. 2000.

MURRAY, C. J.A. D. LOPEZ. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**, v.274, n.5288, Nov 1, p.740-3. 1996.

MYERSON, S., H. HEMINGWAY, R. BUDGET, J. MARTIN, S. HUMPHRIES. MONTGOMERY. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **J Appl Physiol**, v.87, n.4, Oct, p.1313-6. 1999.

NAGASHIMA, J., H. MUSHI, H. TAKADA, T. AWAYA, H. OBA, N. MORI, K. OHMIYA, S. NOBUOKA. MURAYAMA. Influence of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on development of athlete's heart. **Clin Cardiol**, v.23, n.8, Aug, p.621-4. 2000.

NORTH, K. N., N. YANG, D. WATTANASIRICHAIGOON, M. MILLS, S. EASTEAL. H. BEGGS. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. **Nat Genet**, v.21, n.4, Apr, p.353-4. 1999.

OHISHI, M., K. FUJII, T. MINAMINO, J. HIGAKI, A. KAMITANI, H. RAKUGI, Y. ZHAO, H. MIKAMI, T. MIKITA. OGIHARA. A potent genetic risk factor for restenosis. **Nat Genet**, v.5, n.4, Dec, p.324-5. 1993.

OPPONG, S. Y.N. M. HOOPER. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. **Biochem J**, v.292 ( Pt 2), Jun 1, p.597-603. 1993.

PALMER, B. R., A. P. PILBROW, T. G. YANDLE, C. M. FRAMPTON, A. M. RICHARDS, M. G. NICHOLLSV. A. CAMERON. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism interacts with left ventricular ejection fraction and brain natriuretic peptide levels to predict mortality after myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v.41, n.5, Mar 5, p.729-36. 2003.

PEREIRA, A. C., A. A. MORANDINI FILHO, A. S. HEIMANN, E. T. RABAK, A. P. VIEIRA, G. F. MOTAJ. E. KRIEGER. Serum angiotensin converting enzyme activity association with the I/D polymorphism in an ethnically admixed population. **Clin Chim Acta**, v.360, n.1-2, Oct, p.201-4. 2005.

PEREIRA, A. C., G. F. MOTA, R. S. CUNHA, F. L. HERBENHOFF, J. G. MILLJ. E. KRIEGER. Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes. **Hypertension**, v.41, n.1, Jan, p.25-30. 2003.

PERLOFF, D., C. GRIM, J. FLACK, E. D. FROHLICH, M. HILL, M. MCDONALDB. Z. MORGENSTERN. Human blood pressure determination by sphygmomanometry. **Circulation**, v.88, n.5 Pt 1, Nov, p.2460-70. 1993.

RAJAGOPALAN, S.D. G. HARRISON. Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors. A new trend. **Circulation**, v.94, n.3, Aug 1, p.240-3. 1996.

REGOLI, D.F. NANTEL. Direct activation of G proteins. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.10, Oct, p.400-1. 1990.

RIGAT, B., C. HUBERT, F. ALHENC-GELAS, F. CAMBIEN, P. CORVOLF. SOUBRIER. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest**, v.86, n.4, Oct, p.1343-6. 1990.

ROUSSEAU, A., A. MICHAUD, M. T. CHAUVET, M. LENFANTP. CORVOL. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **J Biol Chem**, v.270, n.8, Feb 24, p.3656-61. 1995.

SAAVEDRA, J. M., F. M. CORREA, A. SELTZER, J. E. PINTO, P. VIGLIONEK. TSUTSUMI. Enhanced angiotensin converting enzyme binding in arteries from spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v.10, n.11, Nov, p.1353-9. 1992.

SAYED-TABATABAEI, F. A., B. A. OOSTRA, A. ISAACS, C. M. VAN DUIJNJ. C. WITTEMAN. ACE polymorphisms. **Circ Res**, v.98, n.9, May 12, p.1123-33. 2006.

SCHELLING, P., H. FISCHERD. GANTEN. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? **J Hypertens**, v.9, n.1, Jan, p.3-15. 1991.

SCHUNKERT, H., H. W. HENSE, S. R. HOLMER, M. STENDER, S. PERZ, U. KEIL, B. H. LORELLG. A. RIEGGER. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. **N Engl J Med**, v.330, n.23, Jun 9, p.1634-8. 1994.

SHANMUGAM, V., K. W. SELB. K. SAHA. Mistyping ACE heterozygotes. **PCR Methods Appl**, v.3, n.2, Oct, p.120-1. 1993.

SKEGGS, L. T., JR., J. R. KAHNN. P. SHUMWAY. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J Exp Med**, v.103, n.3, Mar 1, p.295-9. 1956.

SOUBRIER, F., F. ALHENC-GELAS, C. HUBERT, J. ALLEGRINI, M. JOHN, G. TREGARP. CORVOL. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.24, Dec, p.9386-90. 1988.

STAESSEN, J. A., J. G. WANG, E. BRAND, C. BARLASSINA, W. H. BIRKENHAGER, S. M. HERRMANN, R. FAGARD, L. TIZZONIG. BIANCHI. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. **J Hypertens**, v.19, n.8, Aug, p.1349-58. 2001.

STAESSEN, J. A., J. G. WANG, G. GINOCCHIO, V. PETROV, A. P. SAAVEDRA, F. SOUBRIER, R. VLIETINCKR. FAGARD. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. **J Hypertens**, v.15, n.12 Pt 2, Dec, p.1579-92. 1997.

STRAWN, W. B., C. M. FERRARIOE. A. TALLANT. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. **Hypertension**, v.33, n.1 Pt 2, Jan, p.207-11. 1999.

TIMMERMANS, P. B., P. C. WONG, A. T. CHIU, W. F. HERBLIN, P. BENFIELD, D. J. CARINI, R. J. LEE, R. R. WEXLER, J. A. SAYER. D. SMITH. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol Rev**, v.45, n.2, Jun, p.205-51. 1993.

TIPNIS, S. R., N. M. HOOPER, R. HYDE, E. KARRAN, G. CHRISTIEA. J. TURNER. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v.275, n.43, Oct 27, p.33238-43. 2000.

TURGUT, G., S. TURGUT, O. GENÇ, A. ATALAYE. O. ATALAY. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Turkish athletes and sedentary controls. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v.47, n.2, p.133-6. 2004.

UEDA, S., S. MASUMORI-MAEMOTO, K. ASHINO, T. NAGAHARA, E. GOTOH, S. UMEMURAM. ISHII. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. **Hypertension**, v.35, n.4, Apr, p.998-1001. 2000.

VASAN, R. S., M. G. LARSON, E. P. LEIP, W. B. KANNELD. LEVY. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. **Lancet**, v.358, n.9294, Nov 17, p.1682-6. 2001.

VICKERS, C., P. HALES, V. KAUSHIK, L. DICK, J. GAVIN, J. TANG, K. GODBOUT, T. PARSONS, E. BARONAS, F. HSIEH, S. ACTON, M. PATANE, A. NICHOLSP. TUMMINO. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v.277, n.17, Apr 26, p.14838-43. 2002.

WELCHES, W. R., K. B. BROSNIHANC. M. FERRARIO. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. **Life Sci**, v.52, n.18, p.1461-80. 1993.

WOODS, D., M. HICKMAN, Y. JAMSHIDI, D. BRULL, V. VASSILIOU, A. JONES, S. HUMPHRIESH. MONTGOMERY. Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism. **Hum Genet**, v.108, n.3, Mar, p.230-2. 2001.

WOODS, D. R., D. BRULLH. E. MONTGOMERY. Endurance and the ACE I/D polymorphism. **Sci Prog**, v.83, n.Pt 4, p.317-36. 2000.

YANG, H. Y., E. G. ERDOSY. LEVIN. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochim Biophys Acta**, v.214, n.2, Aug 21, p.374-6. 1970.

YANG, Z., C. M. BOVE, B. A. FRENCH, F. H. EPSTEIN, S. S. BERR, J. M. DIMARIA, J. J. GIBSON, R. M. CAREYC. M. KRAMER. Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. **Circulation**, v.106, n.1, Jul 2, p.106-11. 2002.

YASUI, T., F. ALHENC-GELAS, P. CORVOLJ. MENARD. Angiotensin I-converting enzyme in amniotic fluid. **J Lab Clin Med**, v.104, n.5, Nov, p.741-51. 1984.

YUSUF, S., S. HAWKEN, S. OUNPUU, L. BAUTISTA, M. G. FRANZOSI, P. COMMERFORD, C. C. LANG, Z. RUMBOLDT, C. L. ONEN, L. LISHENG, S. TANOMSUP, P. WANGAI, JR., F. RAZAK, A. M. SHARMAS. S. ANAND. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. **Lancet**, v.366, n.9497, Nov 5, p.1640-9. 2005.

ZACEST, R., S. OPARILR. C. TALAMO. studies of plasma bradykininases using radiolabelled substrates. **Aust J Exp Biol Med Sci**, v.52, n.4, Aug, p.601-6. 1974.

ZHUO, D., W. D. ZHAO, F. A. WRIGHT, H. Y. YANG, J. P. WANG, R. SEARS, T. BAER, D. H. KWON, D. GORDON, S. GIBBS, D. DAI, Q. YANG, J. SPITZNER, R. KRAHE, D. STREDNEY, A. STUTZB. YUAN. Assembly, annotation, and integration of UNIGENE clusters into the human genome draft. **Genome Res**, v.11, n.5, May, p.904-18. 2001.

# 9 ANEXOS

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

## *Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. NOME DO PARTICIPANTE:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

---

### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “**Caracterização Bioquímica e Funcional do Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina em Indivíduos Normotensos**”. PESQUISADORES: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araujo/Sandro Soares de Almeida

CARGO/FUNÇÃO: Orientador de Mestrado da Universidade de Mogi das Cruzes e Escola Paulista de Medicina / Mestrando em Biotecnologia

### 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

### III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa ; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos;

1. **Justificativa e Objetivos da Pesquisa:** O Sr(a) está sendo convidado para participar de uma pesquisa que visa estabelecer a ocorrência do polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e correlacioná-la com a pressão arterial apresentada pelos voluntários e os níveis séricos de Angiotensina II (Ang II) e Bradicina (BK). Estaremos pesquisando também a influencia do polimorfismo em alterações na pressão arterial e em níveis de força.

2. **Procedimentos:** Serão 2 visitas ao laboratório: 1º. Será realizada uma anamnese, uma coleta de sangue capilarizado, teste de força manual (hand-grip), mensuração da pressão arterial; 2º. Em uma segunda visita será coletado sangue venoso, para análise enzimática.

#### 2.1 - 1ª visita:

No dia da primeira visita apresentaremos aos Sr (a) todos os procedimentos que iremos realizar detalhadamente e lhe apresentaremos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento, o qual o Sr (a) deverá assinar caso concorde com todos os procedimentos. Em seguida iniciaremos o preenchimento de uma Anamnese, que é composto por varias perguntas sobre sua condição de saúde. Depois será realizado um teste de força por prensão manual (hand-grip), utilizando um dinamômetro. Também neste mesmo dia será coletada uma amostra de 100µl de sangue capilarizado realizado por punção digital, que será utilizado para análise do polimorfismo do seu gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). A pressão arterial será avaliada em repouso por auscultatória, e será utilizado um esfingomanômetro aneróide e estetoscópio. Estes resultados serão utilizados para observar possíveis diferenças na pressão com relação aos diferentes genótipos encontrados;

## **2.2 – 2º visita:**

Em uma segunda visita, o Sr (a) deverá estar em jejum de 12h, para ser coletada uma amostra de 15 ml de sangue venoso de seu antebraço para dosagem de Angiotensina II (Ang II) e Bradicinina (BK). Todos os procedimentos da coleta de sangue serão realizados seguindo todas as normas de assepsia descritas abaixo nesse Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento.

### **Coletas de Sangue:**

Serão coletados 100µl de sangue capilarizado do dedo anelar . Para isto todos os procedimentos de higiene serão utilizados. Haverá constante utilização de luvas descartáveis, algodão e álcool. O sangue será acondicionado em capilares de vidro descartáveis e posteriormente transferido para tubos eppendorfs, para análise do polimorfismo do gene da ECA.

### **Sangue Venoso:**

Serão coletados 15 ml de sangue venoso de seu braço da mesma forma como é realizado no laboratório quando o senhor é encaminhado pelo médico para fazer exame de sangue. O sangue será coletado em 3 tubos a vácuo (S-Monovette), cada um específico para determinadas análises enzimáticas. Nesse procedimento a agulha é inserida somente uma única vez e ocorrerá somente a troca dos tubos. . Essas coletas serão realizado por um enfermeiro (a), devidamente treinado para isso.

## **3. Desconfortos e Riscos:**

### **Coleta de Sangue:**

O Sr (a) poderá sentir algum desconforto durante a coleta de sangue.

Na ocorrência de qualquer mal-estar momentâneo, o senhor terá atendimento imediato, e se necessário for, encaminharemos imediatamente o Sr (a) a enfermaria da faculdade.

## **4. Benefícios que poderão ser obtidos:**

Para você: conhecerá o seu genótipo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). O polimorfismo de I/D da ECA esta relacionado com maior ou menor predisposição a hipertrofia muscular, mas também a alguns tipos de patologias. O alelo deleção (D) do gene esta associando com aumento da atividade da ECA, e tem sido ligado a um maior ganho de massa muscular, mas também relacionado a doenças cardiovasculares. Esta ligação esta atribuída a um aumento da formação de Angiotensina II em indivíduos que possuam o alelo D. Uma hipótese complementar é que o alelo D esta relacionado com a maior degradação de um peptídeo protetor, a Bradicinina. Com o conhecimento desses dados, associa-se esse polimorfismo a predisposição a doenças do coração (hipertrofia), diabetes e outras doenças ainda em estudo.

Para os pesquisadores: Encontrar uma relação entre os níveis enzimáticos de Angiotensina II e Bradicinina com os genótipos I/D da ECA encontrados em indivíduos sedentário e atletas, e verificar a influencia do polimorfismo com o ganho de massa muscular e doenças como citadas acima.

---

## **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

---

## **V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO.**

Sandro Soares de Almeida – Av. Dante Jordão Stoppa n. 200 – Fone: (11) 4798-7087 ou (011) 8380-5669 – sanscientific@gmail.com

---

## **VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, estando de acordo com a utilização dos dados coletados para fins acadêmicos sem a identificação de meus dados pessoais.

Mogi das Cruzes, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

\_\_\_\_\_  
ass. do participante da pesquisa ou responsável legal

Nome por extenso: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador  
(Sandro Soares de Almeida)

\_\_\_\_\_  
Assinatura testemunha

Nome por extenso: \_\_\_\_\_

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – EXTRAÇÃO de DNA e NÍVEIS ENZIMÁTICOS**

**Descrição do Projeto:** este projeto destina-se a compreender melhor a relação encontrada entre o polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) e os níveis plasmáticos de Angiotensina II, um potente vasoconstritor e Bradicinina, um vasodilatador. Para esclarecer esses níveis diferentes encontrados na população, é necessário analisar concentrações de Angiotensina II, e Bradicinina plasmática, as quais estão envolvidas no controle da pressão arterial.

Existem evidências de que pessoas que tenham algumas características genéticas podem estar mais predispostas ao desenvolvimento de alterações nos controles pressóricos, e por isso esse estudo também objetiva analisar variações genéticas como, nesse caso, o polimorfismo do gene da Enzima Conversora de Angiotensina, envolvida na maior produção dessa enzima, a qual parece ter relação com a predisposição para Hipertensão e Diabetes tipo 2. O entendimento desses mecanismos permitirá aos pesquisadores a elaboração de futuras pesquisas, bem como a criação de estratégias que visam um melhor controle do Diabetes tipo 2, assim como sugestões de práticas preventivas para essa doença.

Você está sendo convidado a participar deste estudo na qualidade de voluntário. Você tem toda a liberdade em decidir se deseja ou não participar do mesmo. Não há nenhuma consequência negativa caso você decida não participar. Se você decidir participar o procedimento será o seguinte:

Você será submetido a uma coleta de sangue, que será realizada no seu antebraço, braço ou na parte posterior da sua mão. Você ficará sentado, em repouso, e então será utilizado um torniquete, para que o sangue circule mais para seu braço, antebraço e mão, sendo realizada a assepsia com álcool 70% e algodão. Em seguida, uma agulha descartável e um adaptador vacuette®, fixado na agulha será introduzida no local a ser coletado o sangue, e um tubo vacutainer®, contendo EDTA e 10µl de inibidor de protease, será posicionado ao adaptador e agulha, iniciando assim a coleta de seu sangue (em torno de 5ml), imediatamente após a retirada do tubo será inserido outro com citrato de sódio 1% e um ultimo tubo, este seco. Imediatamente após a retirada do ultimo tubo, com o conteúdo sanguíneo, a agulha e o adaptador serão retirados e micropore (fita adesiva porosa) será fixada no local onde ocorreu a coleta sanguínea. Estas amostras de sangue serão utilizadas para análises bioquímicas das enzimas relacionadas com o polimorfismo da ECA.

As amostras de DNA serão extraídas do sangue coletado por punção digital e serão utilizadas para estudar marcadores genéticos. As amostras biológicas têm o único propósito de

investigar o papel da variabilidade genética molecular na determinação de fenótipos. Essas amostras biológicas não serão disponibilizadas para qualquer outro estudo em qualquer hipótese.

As amostras biológicas coletadas nesse estudo serão armazenadas no Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília e no Laboratório de do Núcleo de Ciências Genômicas da Universidade de Mogi das Cruzes. Somente os pesquisadores envolvidos nessa pesquisa terão acesso aos materiais biológicos coletados.

Em qualquer momento e por qualquer circunstância você tem toda a liberdade de contatar o coordenador do projeto e requerer sua retirada do projeto.

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_ autorizo a coleta de uma amostra de sangue para o desenvolvimento de estudos genéticos a ser realizado na Universidade Católica de Brasília e na Universidade de Mogi das Cruzes como descrito acima.

Durante a leitura deste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO me senti completamente esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de pesquisa e assim autorizo a coleta de amostra de sangue por punção venosa.

O pesquisador, abaixo assinado se compromete com a privacidade das informações realizadas no âmbito da pesquisa.

Responsáveis pelo Projeto de Pesquisa:

Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araujo e Prof. Sandro Soares de Almeida (representante).

\_\_\_\_\_  
Assinatura do representante da pesquisa

Sandro Soares de Almeida

RG: 29.432.375-2

CIC: 160.111.118-58

\_\_\_\_\_  
Assinatura do doador

Nome: \_\_\_\_\_

## Anexo II -



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

**Título:** EFEITOS DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM INDIVÍDUOS NORMOTENSOS SEDENTÁRIOS E ATLETAS COM RELAÇÃO A PRESSÃO ARTERIAL E OS NÍVEIS DE ANGIOTENSINA II E BRADICININA

**Área de conhecimento:** 2.01- Biologia geral

**Responsável pelo projeto:** Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

**Autor:** Sandro Soares de Almeida

**Processo CEP:** 079/2007

**CAAE:** 0078.0.237.000-07

Em reunião de 25 de setembro de 2007 o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos aprovou o parecer que segue aqui descrito.

#### Resumo

Este projeto visa identificar se o polimorfismo encontrado no gene da ECA está relacionado com alterações na pressão arterial e níveis plasmáticos de bradicinina e angiotensina II. Serão avaliados 90 participantes (45 sedentários e 45 atletas) com idade entre 18 – 40 anos.

#### Parecer após alteração

O projeto foi satisfatoriamente reformulado. Porém, em relação do número de voluntários (total de 90 entre indivíduos sedentários e praticantes de atividade física) sugiro ao pesquisador reavaliar a real necessidade de estudar este número elevado de indivíduos. Acredito que um total de 10 voluntários por grupo geraria resultados suficientes para a obtenção de dados seguros.

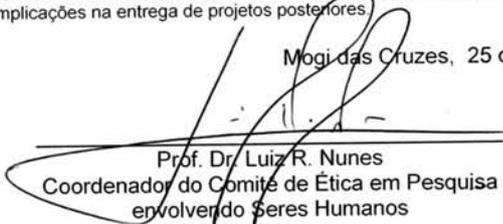
É importante também solicitar o número de um documento de identificação do voluntário e acrescentar o número deste documento no termo de consentimento livre e esclarecido.

#### Conclusão

Projeto aprovado de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

**Obs.:** O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador responsável que encaminhe o relatório final (em CD ou disquete) ou cópia da publicação do artigo ou resumo (em papel) referentes a este projeto no mês de **DEZEMBRO de 2007** com carta de encaminhamento ao Coordenador do CEP-UMC. Caso contrário, deve ser entregue uma justificativa para que não haja complicações na entrega de projetos posteriores.

Mogi das Cruzes, 25 de setembro de 2007.

  
Prof. Dr. Luiz R. Nunes  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
envolvendo Seres Humanos



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

<b>PROJETO RECEBIDO NO CEP</b>		<b>CAAE - 0078.0.237.000-07</b>	
<b>Projeto de Pesquisa</b> Efeitos do Polimorfismo do Gene da Enzima Conversora de Angiotensina I em Indivíduos Normotensos Sedentários e Atletas Com Relação a Pressão Arterial e os Níveis de Angiotensina II e Bradicina.			
<b>Área(s) Temática(s) Especial(s)</b> Genética Humana		<b>Grupo</b>	<b>Fase</b> Não se aplica
<b>Pesquisador Responsável</b>			
<b>CPF</b> 65170903634	<b>Pesquisador Responsável</b> Ronaldo de Carvalho de Araujo	<b>Assinatura</b>	
<b>Comitê de Ética</b>			
<b>Data de Entrega</b> 09/10/2007	<b>Recebimento:</b>	<b>Assinatura</b>	

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

<b>PROJETO RECEBIDO NO CEP</b>		<b>CAAE - 0078.0.237.000-07</b>	
<b>Projeto de Pesquisa</b> Efeitos do Polimorfismo do Gene da Enzima Conversora de Angiotensina I em Indivíduos Normotensos Sedentários e Atletas Com Relação a Pressão Arterial e os Níveis de Angiotensina II e Bradicina.			
<b>Área(s) Temática(s) Especial(s)</b> Genética Humana		<b>Grupo</b>	<b>Fase</b> Não se aplica
<b>Pesquisador Responsável</b>			
<b>CPF</b> 65170903634	<b>Pesquisador Responsável</b> Ronaldo de Carvalho de Araujo	<b>Assinatura</b>	
<b>Comitê de Ética</b>			
<b>Data de Entrega</b> 09/10/2007	<b>Recebimento:</b>	<b>Assinatura</b>	

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

<b>PROJETO RECEBIDO NO CEP</b>		<b>CAAE - 0078.0.237.000-07</b>	
<b>Projeto de Pesquisa</b> Efeitos do Polimorfismo do Gene da Enzima Conversora de Angiotensina I em Indivíduos Normotensos Sedentários e Atletas Com Relação a Pressão Arterial e os Níveis de Angiotensina II e Bradicina.			
<b>Área(s) Temática(s) Especial(s)</b> Genética Humana		<b>Grupo</b>	<b>Fase</b> Não se aplica
<b>Pesquisador Responsável</b>			
<b>CPF</b> 65170903634	<b>Pesquisador Responsável</b> Ronaldo de Carvalho de Araujo	<b>Assinatura</b>	
<b>Comitê de Ética</b>			
<b>Data de Entrega</b> 09/10/2007	<b>Recebimento:</b>	<b>Assinatura</b>	

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)