

Nayara Azinheira Nobrega Cruz

**MODULAÇÕES NOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA E CALICREÍNA-CININA CONTRIBUINDO PARA
ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS À
OBESIDADE INFANTOJUVENIL**

Tese apresentada a Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Medicina Translacional, para obtenção
do título de doutor em ciências.

São Paulo

2022

Nayara Azinheira Nobrega Cruz

**MODULAÇÕES NOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA E CALICREÍNA-CININA CONTRIBUINDO PARA
ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS À
OBESIDADE INFANTOJUVENIL**

Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, para obtenção do título de doutor em ciências.

Orientadora:

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, PhD

Coorientadores:

Prof. Dr. José Geraldo Mill, MD, PhD

Profa. Dra Lilian Caroline G. de Oliveira, PhD

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Azinhiera Nobrega Cruz, Nayara

Modulações nos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e calicreína-cinina contribuindo para alterações cardiometabólicas associadas à obesidade infantojuvenil / Nayara Azinhiera Nobrega Cruz. - São Paulo, 2022.
xxv, 132f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Modulations of renin-angiotensin-aldosterone and kallikrein-kinin systems contributing to cardiometabolic alterations associated to the childhood obesity.

1. Obesidade infantojuvenil. 2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). 3. Sistema calicreína-cinina (SCC). 4. Enzima conversora de angiotensina I (ECA). 5. Doenças cardiometabólicas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRANSLACIONAL

Chefe do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. Álvaro Pacheco e Silva Filho

Coordenadora do Curso de Pós-graduação:

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Nayara Azinheira Nobrega Cruz

**MODULAÇÕES NOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA E CALICREÍNA-CININA CONTRIBUINDO PARA
ALTERAÇÕES CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS À
OBESIDADE INFANTOJUVENIL**

Presidente da banca:

Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Banca examinadora:

Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini

Profa. Dra. Mariane Bertagnolli

Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona

Prof. Dr. Miguel Ângelo de Góes Júnior

Suplentes:

Profa. Dra. Silvia Lacchini

Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen

Data de aprovação: 04 de fevereiro de 2022.

Dedicatória

Dedico aos meus pais, Silvana e Osvaldo, aos meus irmãos,
Nadia e Mateus e ao meu melhor amigo e meu marido, Rafael, por
serem a base para que eu possa voar alto sabendo que tenho
onde pousar e amar.

Agradecimientos

Nossos sinceros agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida a aluna (Proc.: 2018/16653-7) e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (Proc.: 2019/09745-5), também por todo auxílio financeiro concedido ao laboratório na forma de projetos temáticos e regulares. Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a aluna no início de seu doutorado e a Fundação Vale que financiou o projeto do Dr. José Mill do qual são advindas as amostras utilizadas neste trabalho. Agradecemos também a UNIFESP, a Escola Paulista de Medicina, ao Departamento de Medicina – Disciplina de Nefrologia, e a todos os seus colaboradores que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta tese.

“A gratidão é a memória do coração”

(Lao Tse)

Agradeço especialmente...

À **Deus**, do qual todos fazemos parte e para qual todos retornaremos, por ser o caminho, o amor, a proteção e a fortaleza.

Ao meu amado **Rafael**, que seguiu comigo nessa jornada e esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, obrigada pelo seu acolhimento, companheirismo, amor e dedicação.

Aos meus pais, **Silvana e Osvaldo**, agradeço simplesmente por tudo, pois sem eles, em especial minha mãe, eu não seria a pessoa que sou hoje. A nossa luta só nós e Deus sabemos, e por isso são vocês que quero ao meu lado nas nossas vitórias.

Aos meus irmãos, **Nadia e Mateus**, com os quais aprendi a compartilhar, a cuidar e a conciliar. Agradeço por sempre torcerem por mim.

Aos meus sogros, **Marilei e Alexandre**, que são verdadeiramente parte da minha família.

À professora **Dulce** por me receber em seu laboratório, me ensinar, me motivar, me proporcionar maravilhosas oportunidades e se tornar para mim um exemplo não só de cientista, mas de ser humano.

Agradeço...

Ao Dr **José Geraldo Mill**, pela colaboração, por sempre estar disposto a ajudar e ensinar, e sem o qual a execução deste trabalho não seria possível.

À Dra **Lilian Caroline**, um anjo na minha vida acadêmica e que se tornou uma grande amiga, obrigada pelos ensinamentos, pela colaboração e pelos momentos de descontração.

À professora **Fernanda Barrinha**, que enxergou antes de mim meu potencial e me encaminhou nessa jornada.

Aos meus amigos do laboratório:

À **Lilian Caroline, Liz Ângela, Tamires, Ana Leite, e Fernando Sontag** pelo apoio, pela troca de ideias e sobretudo pela amizade e pelos momentos de diversão, que me ajudaram a me manter sã durante essa jornada.

À **Andréia Febba, Fernanda Ronchi e Danielle Aragão** pelos conselhos e por me mostrarem que sempre há obstáculos, mas que nós sempre podemos superá-los.

À **Lilian S., Danielle S., Rodrigo, Filipo, Juliana P., Larissa E., Larissa M., Carla, e Marie** pelo apoio, pelo convívio harmonioso do dia - a - dia.

Aos colaboradores e colegas:

À **Dona Eurides**, ao **João secretário** do PPG e ao **Wagner** do apoio FAPESP por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao grupo de *mindfulness* da UNIFESP.

E a todos que porventura não foram mencionados nome a nome, mas que contribuíram para a conclusão desta tese e ou para meu bem-estar durante esse período.

Epígrafe

"A ciência nunca prova nada definitivamente,
para sempre. Espero que a ciência se
mantenha curiosa o suficiente e humilde o
suficiente para reconhecer quando
encontrarmos o próximo ponto fora da curva,
a próxima exceção, e que isso nos ensine
aquilo que não sabemos".

(Kevin B. Jones)

Resumo

Resumo

A obesidade infantojuvenil é um problema de saúde pública devido ao maior risco de desenvolvimento precoce de doenças associadas como hipertensão, dislipidemias, diabetes e síndrome metabólica. Há evidências de que o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema calicreína-cinina (SCC) possam ser modulados na obesidade. **Objetivo:** Avaliar a modulação do SRAA e do SCC em crianças e adolescentes com diferentes estados nutricionais e avaliar a contribuição destas alterações para desenvolvimento de complicações associadas a obesidade. **Métodos:** Participantes de 6 a 19 anos foram classificados como baixo peso (BP), eutrófico (EU), sobrepeso (SP) e obeso (OB) de acordo com o percentil do IMC. Também foram classificados pelo risco cardiovascular de acordo com a razão cintura e estatura (RCE). Foi realizada avaliação clínica e foram mensuradas a expressão e atividade das enzimas; renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), ECA2, endopeptidase neutra, catepsina D (CatD) e quimase na urina e no plasma. **Resultados:** Nas amostras de urina, a expressão da ECA somática (sECA) estava aumentada no grupo OB quando comparado com o grupo EU (0,530 vs 0,090 unidade arbitrária, $p=0,04$) e foi maior no grupo com RCE aumentada (0,265 vs 0,090, $p=0,046$). A isoforma N-domínio solúvel de 90 KDa da ECA (nECA de 90 KDa) foi mais frequentemente encontrada no grupo com RCE aumentada ($p=0,05$), sua expressão foi maior neste grupo (0,265 vs 0,130, $p=0,02$) e se correlacionou positivamente com parâmetros antropométricos. A atividade da CatD urinária foi maior no grupo EU do que no grupo SP (0,098 vs 0,027, $p<0,01$) e estava aumentada no grupo com RCE normal (0,095 vs 0,028, $p<0,01$). A obesidade e a RCE aumentada estavam relacionadas com a hipertrigliceridemia e a deficiência de HDL-C e houve correlação entre a atividade da ECA urinária, a expressão da quimase urinária e a expressão da CatD plasmática com estas alterações. O grupo OB apresentou maiores níveis de ácido úrico, maior número de plaquetas e maiores valores pressóricos. O último se correlacionou positivamente com a atividade da quimase urinária. **Conclusão:** A obesidade e a RCE aumentada contribuíram para maior expressão da sECA e da nECA de 90 na urina, e para uma menor atividade da CatD urinária, o que pode refletir menor síntese de CatD à nível renal ou um menor *clearance* da CatD circulante, culminando em seu acúmulo no plasma. Essas alterações podem promover o aumento dos níveis de angiotensina (Ang) I e Ang II e a diminuição dos níveis de Ang 1-7 e bradicinina. O desbalanço nos níveis destes peptídeos favorecem a hipertrigliceridemia, o acúmulo dos triglicerídeos nos adipócitos e por fim, a manutenção da obesidade. O aumento da expressão da ECA associado a hipertrigliceridemia e deficiência de HDL-C contribuem para a inflamação, o estresse oxidativo, a disfunção endotelial e a resistência à insulina; mecanismos que levam ao desenvolvimento das dislipidemias, hipertensão, diabetes e síndrome metabólica.

Abstract

Abstract

Childhood obesity is a public health issue linked to a higher risk of developing obesity associated diseases as, hypertension, dyslipidemia, diabetes, and metabolic syndrome. There is evidence that the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the kallikrein-kinin system (KKS) are modulated in obesity. **Objectives:** Evaluate the modulation of RAAS and KKS in children and adolescents with different nutritional status and evaluate the contribution of alterations in these systems to the development of obesity associated diseases. **Methods:** Participants aged from 6 to 19 years were classified into underweight (UW), normal weight (NW), overweight (OW) and obese (OB) according to body mass index percentile. They were also classified by cardiovascular risk assessed through waist to height ratio (WHtR). The clinical evaluation was performed, and we measured the expression and activity of renin, angiotensin converting enzyme (ACE), ACE2, neprilysin, cathepsin D (CatD) and chymase in urine and plasma samples. **Results:** In urine, expression of somatic ACE (sACE) was higher in OB than in NW group (0.530 vs 0.090 arbitrary unit, $p=0.04$) and it was increased in higher WHtR group (0.265 vs 0.090, $p=0.046$). The N-domain isoform of 90 KDa of ACE (nACE of 90 KDa) was more frequently found in the higher WHtR group ($p=0.05$), its expression was higher in this group (0.265 vs 0.130, $p=0.02$) and it positively correlated with anthropometric variables. The urinary CatD activity was increased in NW group compared to OW group (0.098 vs 0.027, $p<0.01$) and it was higher in normal WHtR group (0.095 vs 0.028, $p<0.01$). Obesity and higher WHtR were associated with hypertriglyceridemia and HDL-C deficiency and there was correlation between urinary ACE activity, urinary chymase expression and circulating CatD expression with these clinical alterations. The OB group presented higher levels of uric acid, increased number of platelets and augmented blood pressure values. The last was positively correlated with the expression of urinary chymase. **Conclusion:** Obesity and higher WHtR contributed to higher sACE and nACE of 90 KDa expression in urine and to lower urinary CatD activity what can be due to downregulation of CatD in the kidneys, or to decreased clearance of circulating CatD, resulting in its accumulation in plasma. These alterations can lead to higher levels of angiotensin (Ang) I and Ang II and diminished levels of Ang 1-7 and bradykinin. This imbalance contributes to the hypertriglyceridemia, triglycerides accumulation in the adipocytes and to obesity. The augmented expression of ACE associated to hypertriglyceridemia and HDL-C deficiency leads to inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, and insulin resistance; mechanisms which contribute to the development of dyslipidemia, hypertension, diabetes, and metabolic syndrome.

SUMÁRIO

Dedicatória	vi
Agradecimentos.....	viii
Epígrafe	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
Lista de figuras	xix
Lista de tabelas.....	xxi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xxii
1 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Obesidade.....	02
1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona	06
1.2.1 Renina	09
1.2.2 Eixo clássico ECA/ Ang II/ AT1 e AT2.....	09
1.2.3 Eixo ECA2/ Ang 1-7/ Mas	13
1.2.4 Vias alternativas do SRAA	17
1.2.4.1 <i>Endopeptidase Neutra</i>	17
1.2.4.2 <i>Catepsina D</i>	18
1.2.4.3 <i>Quimase</i>	20
1.3 Sistema caliceína-cinina	22
1.3.1 Caliceínas	24
1.3.2 Bradicinina.....	25
1.3.3 DesArg ⁹ -bradicinina	26
1.4 Interação entre SRAA e SCC	27
1.5 Participação do SRAA e do SCC na fisiopatologia da obesidade	29
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	35
2.1 Hipótese.....	35
2.2 Objetivo Geral	35
2.3 Objetivos Específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Delineamento do estudo	37
3.2 Aspectos éticos	37
3.3 Coleta de urina, plasma e avaliação clínica	38
3.3.1 Avaliação antropométrica.....	39
3.3.2 Aferição da pressão arterial	39
3.4 Separação dos grupos de estudo	40
3.5 Concentração e diálise de urina	41
3.6 Mensuração da atividade enzimática.....	41
3.6.1 Atividade da ECA.....	41
3.6.2 Atividade da ECA2.....	42
3.6.3 Atividade da renina	42
3.6.4 Atividade da Catepsina D.....	43
3.6.5 Atividade da NEP	43
3.6.6 Atividade da quimase.....	43
3.7 Depuração de albumina no plasma	44

3.8	Quantificação das proteínas totais e liofilização	45
3.9	Determinação da expressão das enzimas	46
3.10	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	49
4.1	Caracterização dos grupos	49
4.2	Avaliação antropométrica	55
4.3	Avaliação parâmetros bioquímicos e hematológicos	57
4.4	Avaliação cardiovascular	60
4.5	Atividade e expressão das enzimas do SRAA e SCC	62
5	DISCUSSÃO.....	82
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	100
	Apêndices.....	114
	Anexos.....	124

Lista de Figuras

Figura 1.	Vias metabólicas do SRAA.....	08
Figura 2.	Processo de <i>shedding</i> da ECA somática liberando a ECA somática solúvel e as isoformas N-domínio solúveis da ECA	12
Figura 3.	Estrutura do SARS-CoV-2 e mecanismo de entrada na célula e replicação	16
Figura 4.	Sistema calicreína-cinina e suas vias metabólicas	23
Figura 5.	Principais vias de interação entre SRAA e SCC.....	28
Figura 6.	Cromatograma de depleção de albumina no plasma	45
Figura 7.	Distribuição dos participantes nos grupos classificados por pIMC vs classificação por Z-escore	49
Figura 8.	Avaliação de risco cardiovascular pela RCE na população estudada e nos grupos classificados por pIMC	50
Figura 9.	Distribuição dos participantes do sexo masculino e feminino nos grupos de estudo.....	51
Figura 10.	Distribuição de idade nos grupos classificados por pIMC.....	52
Figura 11.	Distribuição dos participantes de acordo com o estadiamento puberal	53
Figura 12.	Distribuição dos participantes de acordo com a raça e cor	54
Figura 13.	Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes	63
Figura 14.	Expressão da ECA somática solúvel e das isoformas N-domínio solúveis da ECA na urina dos participantes nos grupos de estudo divididos por pIMC.....	65
Figura 15.	Expressão da ECA somática solúvel e das isoformas N-domínio solúveis da ECA na urina dos participantes nos grupos de estudo divididos pela RCE	66
Figura 16.	Matriz de correlação entre a expressão da sECA, nECA de 90 KDa, e nECA de 65 KDa e os parâmetros antropométricos	70
Figura 17.	Matriz de correlação entre a expressão da quimase urinária e da CatD plasmática e perfil lipídico.....	71
Figura 18.	Atividade da ECA utilizando o substrato Z-FHL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE	72
Figura 19.	Atividade da ECA utilizando o substrato h-HL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE	73
Figura 20.	Razão da atividade da ECA Z-FHL/h-HL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE	74
Figura 21.	Matriz de correlação entre a atividade da ECA e perfil lipídico.....	75

Figura 22.	Atividade da CatD avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE	76
Figura 23.	Matriz de correlação entre a atividade da CatD urinária e parâmetros antropométricos	77
Figura 24.	Matriz de correlação entre a atividade da quimase urinária e parâmetros cardiovasculares.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Valores de referência para determinação do estado nutricional em crianças e adolescentes de 2 a 19 anos utilizando as curvas de IMC para idade e sexo e valores de z-escore do IMC	40
Tabela 2.	Avaliação dos parâmetros antropométricos nos grupos de estudo classificados por pIMC	55
Tabela 3.	Análise dos parâmetros antropométricos nos grupos classificados pela RCE	56
Tabela 4.	Parâmetros bioquímicos e hematopoiéticos nos grupos de estudo classificados por pIMC	58
Tabela 5.	Parâmetros bioquímicos e hematopoiéticos nos grupos de estudo classificados pela RCE	59
Tabela 6.	Parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados por pIMC	61
Tabela 7.	Parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados pela RCE	62
Tabela 8.	Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes de acordo com estado nutricional	68
Tabela 9.	Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes de acordo com a RCE	69
Tabela 10.	Atividade das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma nos grupos de estudo classificados por pIMC	78
Tabela 11.	Atividade das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma nos grupos de estudo classificados pela RCE	79

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ABCA1 – transportadora de cassetes de ligação ao ATP tipo I

ACTH - adrenocorticotrofina

AGRP - proteína relacionada ao gene *agouti*

AGT – angiotensinogênio

Ang - angiotensina

AT1 - receptor de angiotensina tipo 1

AT2 - receptor de angiotensina tipo 2

B1 - receptor de bradicinina do tipo 1

B2 - receptor de bradicinina do tipo 2

BK - bradicinina

BP - grupo baixo peso

BRAs - bloqueadores dos receptores de angiotensina

CAPM - cininogênio de alto peso molecular

CatD - catepsina D

CBPM - cininogênio de baixo peso molecular

CDC - *Centers of Disease Control and Prevention*

CETP - proteína de transferência de colesterol esterificado

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COVID-19 - *coronavirus disease 2019*

COX - ciclooxigenase

CPM - carboxipeptidases associadas a membrana

CPN - carboxipeptidases plasmáticas

CT - colesterol total

desArg⁹BK - desArg⁹Bradicinina

DRC - doença renal crônica

DREF - doença renal em estágio final

ECA - enzima conversora de angiotensina I

ECA2 - enzima conversora de angiotensina II

EU - grupo com peso normal

EUA – Estados Unidos da América

FPLC - *fast protein liquid chromatography*

GABA - ácido gama aminobutírico

GLP1 - peptídeo semelhante a glucagon 1

Glut4 - transportador de glicose 4

HDL-C - lipoproteína de alta densidade

h-HL – Hipuril-Histidina-Leucina

HMG - CoA - 3-hidroxi-metil-glutaril coenzima A

HOMA - *homeostatic model assessment*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICQ - índice de cintura e quadril

IECAs - inibidores da enzima conversora de angiotensina I

IM - infarto do miocárdio

IMC - índice de massa corpórea

LDL-C - lipoproteína de baixa densidade

LPL - lipoproteína lipase

MAPKs - proteínas quinase ativadas por mitógeno

MG – massa gorda

MM - massa magra

nECA de 65 - isoforma de N-domínio solúvel da ECA com 65 KDa

nECA de 90 - isoforma de N-domínio solúvel da ECA com 90 KDa

NEP - endopeptidase neutra

NFκB - fator nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

NPY - neuropeptídeo Y

OB - grupo obeso

PAD - pressão arterial diastólica

PAS - pressão arterial sistólica

PI-3K - fosfoinosítídeo 3 - quinase

pIMC - percentil do índice de massa corpórea

pPAD - percentil da pressão arterial diastólica

pPAS - percentil da pressão arterial sistólica

PRR - receptor de renina e pró-renina

PVDF - difluoreto de polivinilideno

RCE - razão de cintura e estatura

SARS-CoV-2 - *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SC – superfície corporal

SCC - sistema calicreína-kinina

sdLDL-C - LDL-C de baixa densidade

sECA - ECA somática solúvel

SNS - sistema nervoso simpático

SP - grupo sobrepeso

SRAA - sistema renina-angiotensina-aldosterona

TG - triglicerídeos

TGF - fator de crescimento tumoral

TNF - fator de necrose tumoral

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VLDL-C - lipoproteína de muito baixa densidade

VOP - velocidade de onda de pulso

WHO - *World Health Organization*

Z-FHL - Z-fenilalanina – histidina – leucina

α MSH - hormônio α melanócito estimulante

λ - comprimento de onda

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial, caracterizada pelo desbalanço persistente entre o consumo e o gasto energético (1). Fatores comportamentais e socioambientais estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da obesidade, enquadram-se; fatores biológicos (genética, doenças de base, microbiota), fatores comportamentais (dieta, sedentarismo), fatores ambientais (condição social, cultura, uso de medicamentos, exposição à xenobióticos) (2).

A obesidade constitui um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia e síndrome metabólica (3). Além disto, ela é indiretamente associada com condições psicológicas como depressão, ansiedade e estresse (3). A obesidade tornou-se um problema de saúde pública global, cerca de 4 milhões de pessoas morrem ao ano em consequência de suas complicações (4).

A classificação de obesidade em indivíduos adultos é dada por um índice de massa corpórea (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$. Em 2016, estimou-se que 1,9 bilhões (39%) dos adultos apresentavam sobrepeso e cerca de 650 milhões (13%) estavam obesos (4).

Para caracterização de obesidade em crianças e adolescentes é necessário ajustar o valor de acordo com o sexo e idade, obtendo o valor de percentil do IMC em relação a uma população. Crianças com percentil do IMC acima de 95 são consideradas obesas (5). O número de crianças e adolescentes entre 6 e 19 com sobrepeso ou obesidade cresceu drasticamente de forma globalizada atingindo 340 milhões em 2016 (4). Em 2020, 39 milhões de crianças com menos de 5 anos estavam com sobrepeso ou obesidade (4).

No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgados em 2010 (6), mostram que entre 1974-75 e 2008-09 considerando a faixa etária entre 10 e 19 anos, a porcentagem de meninos com excesso de peso subiu de 3,7% para 21,7%, e em relação ao sexo feminino subiu de 7,6% para 19,4%. Na faixa etária entre 6 e 9 anos verificou-se que 1 a cada 3 crianças apresenta sobrepeso. Estes dados são preocupantes, uma vez que, estas crianças estão sujeitas ao desenvolvimento precoce de morbididades associadas ao sobrepeso e obesidade, tais como diabetes, dislipidemia, hipertensão, osteoartrite, acidente

vascular encefálico e câncer (7), o que reduz de forma significativa a qualidade e expectativa de vida.

Além dos impactos à saúde física e psicológica dos indivíduos obesos, a obesidade tem um grande impacto social e econômico. Muitos estudos associam a presença de sobrepeso e obesidade com diminuição da frequência escolar, o que compromete o desenvolvimento psicossocial destes indivíduos (8). Estudos similares em adultos demonstram que a obesidade culmina em maior índice de ausência no trabalho e em queda de produtividade (9). Estudo realizado nos EUA, estima que em 2021 os gastos médicos de pacientes obesos foram 100% maiores do que os de pacientes com peso normal (10).

Os mecanismos fisiológicos pelos quais o desenvolvimento e manutenção da obesidade ocorrem são pouco compreendidos apesar do conceito que caracteriza a doença ser muito simples; maior consumo do que gasto energético (11). Desta forma, mecanismos que regulam o balanço energético são os mais estudados, porém ainda existem muitos pontos a serem elucidados principalmente em relação a obesidade infantojuvenil.

A leptina é um dos principais hormônios envolvidos no controle da fome e saciedade e é produzida e secretada pelos adipócitos, portanto apresenta maiores concentrações conforme a porcentagem de gordura corporal aumenta (12). No núcleo arqueado do hipotálamo a leptina age estimulando a liberação de pró-ópio-melanocortina, que é convertida em hormônio α melanócito estimulante (α MSH) e em adrenocorticotrofina (ACTH) (13). O α MSH se liga a receptores de melanocortina do tipo 4 no núcleo hipotalâmico paraventricular e promove supressão do apetite. O ACTH por sua vez promove a síntese e secreção de cortisol, hormônios sexuais e aldosterona. Em concentrações elevadas o ACTH promove lipólise, captação da glicose e aminoácidos pelo músculo esquelético e secreção da insulina (11, 13). A leptina ainda inibe a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e da proteína relacionada ao gene *agouti* (AGRP). Destacando que o NPY e AGRP são secretados por neurônios do núcleo arqueado e promovem aumento da ingestão alimentar, diminuição do gasto energético e aumento da lipogênese (11).

Defeitos genéticos associados a produção de leptina ou aos seus receptores causam severa hiperalgia e obesidade, no entanto, esses casos são raros. Em contrapartida, a hiperleptinemia é uma alteração comum em indivíduos obesos e é

bem estabelecido que a obesidade é associada a resistência a leptina, embora os mecanismos que levam a essa resistência sejam desconhecidos, acredita-se que possa ser atribuído a fatores genéticos, alterações durante o desenvolvimento e ao comportamento alimentar (11, 13). Em crianças e adolescentes em diferentes fases do desenvolvimento, os níveis de leptina já apresentam correlação com a gordura corporal estando elevados em crianças obesas e reforçando que a resistência a leptina já possa ser um mecanismo relevante no desenvolvimento da obesidade infantil (14).

Hormônios gastrointestinais também participam no controle da fome e saciedade, a grelina tem importante papel orexigênico, estimulando o apetite ao agir no hipotálamo e ainda inibe a oxidação de gorduras contribuindo para aumento da reserva energética (15). A grelina é suprimida no período pós-prandial, porém em obesos esse mecanismo é prejudicado e a grelina continua a ser produzida mesmo após a saciedade. Importantemente, a grelina também tem como sua principal função estimular a produção do hormônio do crescimento (15). Foi visto que crianças com sobrepeso apresentam disfunção na regulação da secreção de grelina apresentando menores níveis do hormônio durante o jejum e menor supressão da grelina no período pós-prandial quando comparadas à crianças com peso normal (16).

Outros hormônios como o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP1) e a colecistocinina são liberados pelos enterócitos durante a ingestão de alimento, promovem saciedade e interrupção do estímulo para continuar a refeição, pois ativam através de sinalização aferente vagal, a secreção de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no núcleo parabraquial e este tem potente ação anorexígena (11). Agonistas do GLP1 têm sido apontados como terapia potencial para controle da obesidade infantojuvenil (17).

Mecanismos de partição energética também podem influenciar no desenvolvimento e manutenção da obesidade. Neste cenário as calorias advindas da dieta são preferencialmente armazenadas em forma de gordura nos adipócitos. Muito pouco se sabe sobre a regulação destes mecanismos, porém, os efeitos da leptina, a distribuição e atividade da lipoproteína lipase (LPL) e alterações no desenvolvimento parecem ter papel importante (11) .

Alterações durante o desenvolvimento dos sistemas que regulam o balanço energético podem contribuir de forma significativa para um fenótipo mais propenso a

obesidade na infância e na vida adulta. Logo após o nascimento, mecanismos básicos como a distensão gástrica são os principais responsáveis por controlar a ingestão de alimento, estímulos promovidos pelo trato gastrointestinal pós-absorção de nutrientes começam a se desenvolver a partir da segunda semana de vida (18). Mecanismos mais complexos que regulam a manutenção e utilização de reservas energéticas de curto e longo prazo são estabelecidos após o período de desmame (19). Todos esses mecanismos ainda são maturados ao longo da infância e adolescência e é estabelecido que durante o primeiro e quarto ano de vida os padrões alimentares individuais vão se estabelecer de acordo com as experiências da criança em relação a alimentação (11).

A maturação dos circuitos neuronais do núcleo arqueado do hipotálamo que incluem, o sistema melanocortina, o AGRP e o NPY, são altamente influenciados pela dieta materna durante o desenvolvimento fetal e a amamentação (11). A disponibilidade e composição do leite materno pode modular o tempo para início da produção de leptina pelo tecido adiposo, assim como, a exposição a obesidade materna durante a gestação e amamentação pode comprometer a formação de receptores de leptina, o que gera um impacto de longo prazo na resposta do organismo aos efeitos da leptina (11, 20, 21). Ainda, a desnutrição durante período de lactação tem impacto negativo na maturação de mecanismos que inibem as ações de AGRP, como a sinalização do ácido gama aminobutírico (GABA), isso ocorre de forma a permitir compensação do déficit de crescimento após cessada a privação de nutrientes, porém torna estes indivíduos mais propensos a obesidade (22, 23).

Apesar da relevância de alterações que afetam diretamente o balanço energético na fisiopatologia da obesidade, outros mecanismos fisiológicos parecem desempenhar um papel importante sendo atrelados não só ao desenvolvimento e manutenção da obesidade, mas também ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas associadas à obesidade. Esses mecanismos são pouco abordados principalmente no contexto da obesidade infantojuvenil. Mas, sabe-se que adipocinas como a apelin, adiponectina e resistina estão envolvidas no metabolismo dos carboidratos e lipídios. Ainda, dois importantes sistemas hormonais envolvidos no controle da pressão arterial e equilíbrio hemodinâmico tem relação com a obesidade sendo estes os sistemas renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e calicreína-cinina (SCC).

Vários estudos sugerem participação do SRAA e SCC na modulação e manutenção da obesidade. O tecido adiposo é capaz de produzir e secretar diversos componentes do SRAA, assim contribui não somente para ativação local do sistema, mas também para sua ativação à nível sistêmico (24). O tratamento com inibidores de componentes do SRAA mostrou efeito benéfico sobre a obesidade (25). Ainda, estudo anterior do nosso grupo mostrou desbalanço nos níveis de peptídeos do SRAA e SCC em crianças obesas e correlação com níveis de leptina (26). A modulação do SRAA e SCC na obesidade, somada a importância fisiológica destes dois sistemas justifica a investigação destes na fisiopatologia da obesidade infantojuvenil e das alterações cardiometabólicas associadas.

1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O SRAA é o mais importante sistema hormonal envolvido na fisiologia cardiorrenal, uma vez que, controla as funções hemodinâmicas através da regulação da pressão arterial, volume sanguíneo e equilíbrio eletrolítico (27).

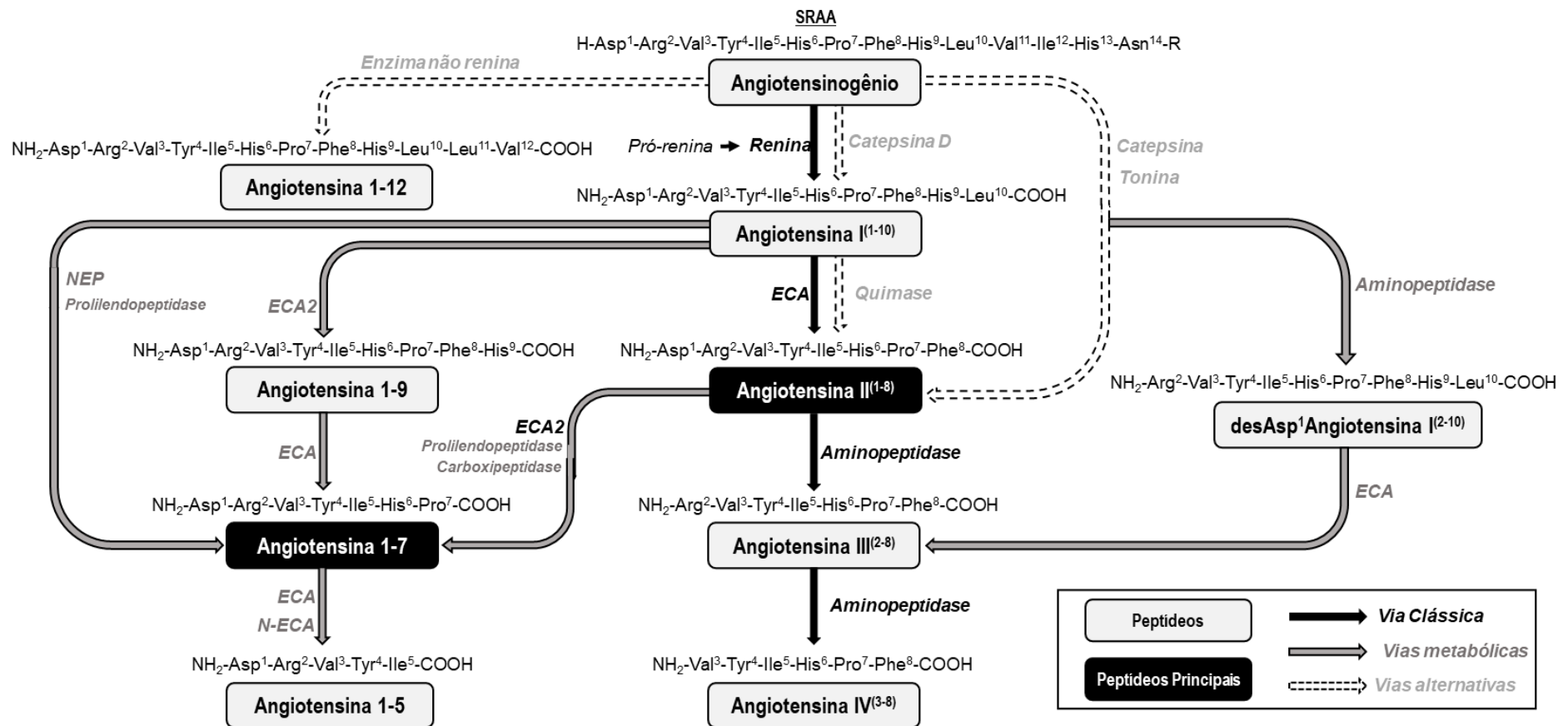
O SRAA é tradicionalmente ilustrado por sua cascata clássica, isso porque o papel da via clássica no controle da pressão arterial sistêmica é o mais bem elucidado, mas o sistema é muito mais complexo com diversas enzimas, peptídeos e receptores que interagem entre si (Figura 1) e com outros sistemas, como o SCC.

Atualmente, o SRAA tem se destacado não só pela sua importância na homeostase hemodinâmica, mas também pela sua contribuição na fisiopatologia de diversos órgãos (27). O SRAA exerce funções endócrinas, parácrinas, autócrinas e intrácrinas, sendo que a descoberta de novos peptídeos e vias alternativas para geração e inativação dos mesmos aumenta a complexidade deste sistema (28-30).

São propostos vários eixos distintos do SRAA que se interconectam. O eixo dito como clássico, é composto pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), o peptídeo efetor, angiotensina (Ang) II e seus receptores AT1 e AT2, onde resumidamente a ligação da Ang II à AT1 promove efeitos deletérios quando hiper-regulada e tem papel relevante nas doenças cardiovasculares e a ligação à AT2 promove ações opostas, protetoras (28).

O segundo eixo principal é formado pela enzima conversora de angiotensina II (ECA2), Ang 1-7 e seu receptor, Mas, consiste em uma descoberta relativamente recente, mas estudos tem sedimentado que este eixo tem papel importante ao contrabalancear as ações mediadas pela ligação da Ang II ao AT1 (29). Adicionalmente, a ECA2 recebeu destaque notório devido a seu papel na fisiopatologia da *coronavirus disease 2019* (COVID-19), uma das maiores pandemias da idade contemporânea.

Ainda, diversas enzimas desempenham papel em eixos alternativos, como a endopeptidase neutra (NEP), catepsina D (CatD), e quimase que também serão abordadas (31) (Figura 1).



Fonte: Adaptada de Casarini et al., 2012 (31).

Figura 1. Vias metabólicas do SRAA. Esquematização das vias metabólicas do SRAA destacando a formação dos dois principais peptídeos do sistema, a Angiotensina II, que pode ser formada pela ECA agindo sobre angiotensina I na via clássica ou por vias alternativas, onde a quimase age sobre a angiotensina I, ou onde a catepsina G ou a tonina agem sobre o angiotensinogênio. Destaca-se também a formação do peptídeo com funções protetoras, a angiotensina 1-7 que pode ser formado a partir da angiotensina I, angiotensina 1-9 ou angiotensina II por ação da ECA, ECA2, NEP, prolilendopeptidase ou carboxipeptidase.

1.2.1 Renina

A renina é uma aspartil protease produzida e secretada pelas células justaglomerulares renais, na sua forma inativa e na sua forma ativa, pró-renina e renina, respectivamente. A liberação de renina pelas células justaglomerulares é estimulada por ação simpática, queda na pressão de perfusão na arteríola aferente e por queda na concentração de íons cloreto. A pró-renina pode ser convertida a sua forma ativa através da ação de proteases, incluindo a calicreína (32, 33).

A renina difere de outras aspartil proteases pela sua alta especificidade, ela atua especificamente sobre o angiotensinogênio (AGT), convertendo-o em Ang I, que alimentará o sistema (34). O tratamento da hipertensão com inibidores da ECA (IECAs) e bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs), promovem o aumento da expressão e atividade plasmática da renina como forma de compensação, a Ang I acumulada pode então ser convertida à Ang II por vias independentes da ECA. Assim, emergiram os inibidores de renina como uma nova classe de anti-hipertensivos, cujo representante é o alisquireno (34). Além disso, essa classe terapêutica tem relevância na pesquisa científica já que bloqueia a reação inicial do sistema.

Por muito tempo foi sustentado que a função fisiopatológica da renina se restringia a produção basal de Ang I e que a pró-renina era um precursor inativo (35, 36). No entanto, com descoberta do receptor de renina e pró-renina descobriu-se que a renina e a pró-renina podem exercer ações independentes, uma vez que ambas podem se ligar a este receptor (36, 37). Estas ações incluem, a ativação da cascata de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), indução da contractilidade, hipertrofia, fibrose e apoptose em cardiomiócitos através do fator de crescimento tumoral (TGF)- β e estimulação da ciclooxygenase (COX) 2 (35, 37). O que abre precedente para futuros estudos de ações da renina fora do seu papel na via clássica do SRAA.

1.2.2 Eixo clássico ECA/ Ang II/ AT1 e AT2

Quando ocorre queda da pressão arterial sistólica, estímulo simpático ou diminuição de íons cloreto, há detecção pelo aparelho justaglomerular renal e ocorre liberação da renina pelas células justaglomerulares (33). A renina cliva o AGT

liberando a Ang I (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) na circulação (34). No endotélio de diversos tecidos; principalmente no pulmonar, a Ang I circulante é clivada pela enzima ECA em Ang II (34, 38).

A Ang II (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸) é um octapeptídeo e age sobre seus receptores AT1 e AT2 (33, 38). As ações sobre o receptor AT1 promovem o aumento da pressão arterial, pois estimulam a vasoconstrição das pequenas artérias, a liberação de aldosterona pela adrenal e de vasopressina pela hipófise, além disso, esses hormônios agem promovendo a retenção de sódio com consequente retenção de água e aumento da volemia (34, 38).

Além da via clássica, a Ang II pode ser produzida por via independente da renina e ECA, onde o AGT é clivado pela catepsina G ou tonina. O octapeptídeo também pode ser gerado a partir da Ang I por ação da quimase (Figura 1) (31, 39). Além de controlar a função hemodinâmica o eixo clássico exerce diversas funções nos mais diferentes órgãos através da Ang II.

A ligação da Ang II com AT1 promove na musculatura vascular lisa, vasoconstrição, proliferação celular, inflamação e fibrose (28, 40). No coração, contribui para inotropismo, hipertrofia, remodelamento e disfunção (41). Nos rins, leva a aumento da taxa de filtração glomerular, aumento da reabsorção de sódio, espessamento do ramo ascendente da alça de Henle, estresse oxidativo, inflamação e remodelamento da matriz (42, 43).

No sistema nervoso simpático (SNS), a Ang II contribui para aumento da liberação de norepinefrina e inibição da liberação de acetilcolina (44). Na adeno e neuro-hipófise, promove liberação de hormônios adeno e neuro-hipofisários (hormônio adenocorticotrófico, hormônio luteinizante, prolactina e vasopressina) e controla a ingestão de sódio e água e também a reabsorção de sódio e água pelos rins (45).

Como a pressão arterial é produto do *débito cardíaco x resistência periférica*, a principal função da Ang II é promover o aumento da pressão arterial, uma vez que, a Ang II eleva o débito cardíaco porque aumenta a contratilidade cardíaca e promove aumento da resistência periférica pela vasoconstrição e aumento de volume (41, 43).

No entanto, as ações da Ang II mediadas por AT2 são protetoras, exercendo *feedback negativo* sobre o receptor AT1, pois o receptor AT2 antagoniza as ações do AT1, inibindo sua sinalização, ligando-se a ele ou regulando

sua expressão. Assim, o receptor AT₂ promove efeitos anti-hipertensivo, anti-remodelamento e anti-aterosclerótico, parece ser o principal receptor de Ang II expresso durante o desenvolvimento fetal, mas sua expressão cai drasticamente após o nascimento (46, 47).

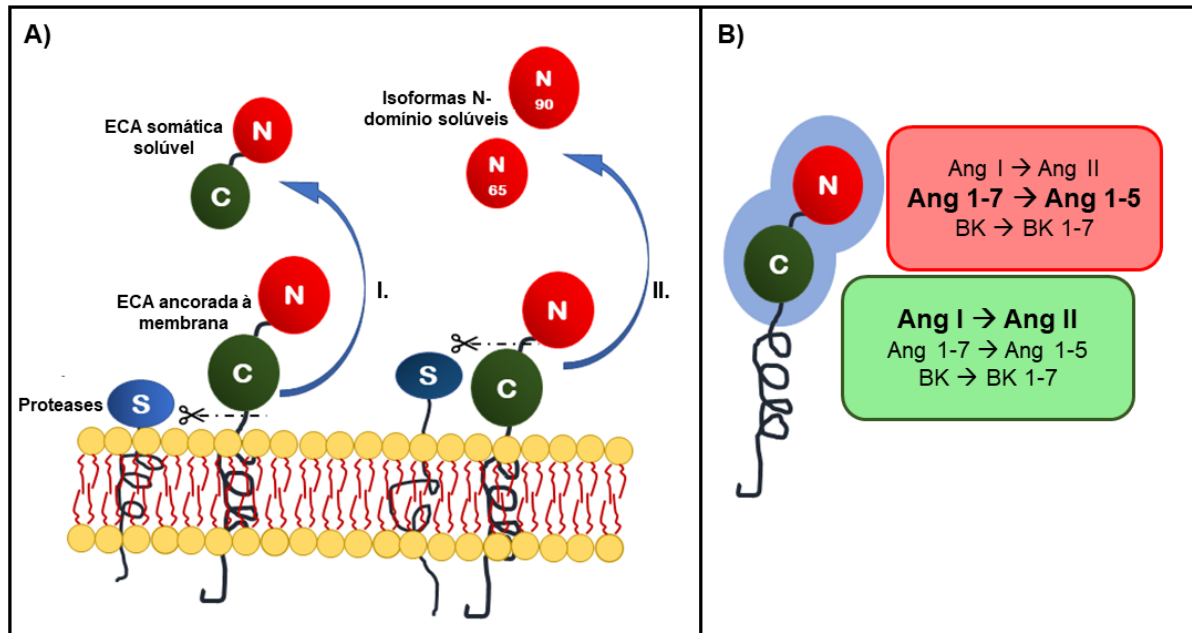
A ECA foi descoberta em 1955 e na época nomeada de enzima conversora de hipertensina, pois produzia o potente vasopressor hipertensina II a partir da hipertensina I, hoje conhecidas como Ang I e Ang II, respectivamente (48). A ECA pertence à família M2 das metalopeptidases dependentes de zinco e tem ação carboxidipeptidásica, desta forma hidrolisa dipeptídeos da porção carboxiterminal de seus substratos (49, 50). Esta enzima desempenha papel importante na regulação da pressão arterial. Primeiro porque é responsável pela formação de Ang II, como visto. Adicionalmente, inativa a bradicina (BK), um potente vasodilatador do SCC (41). Além de seu papel na via clássica do SRAA, a ECA também está presente nas vias alternativas sendo responsável pela formação de Ang III e degradação de Ang 1-7 (31).

A ECA humana apresenta duas formas, a somática e a testicular (41, 50, 51). A forma somática apresenta dois domínios; N-domínio e C-domínio, e tem peso molecular que varia entre 150 e 180kDa. A forma testicular tem entre 90 e 100kDa, apresenta apenas o C-domínio e está presente exclusivamente nos testículos (50, 51).

A forma somática da ECA já foi descrita em diversos tecidos, no tecido endotelial vascular, nas células borda escova do intestino, no túbulo contorcido proximal, túbulos seminíferos e no sistema nervoso. Porém, o local onde há maior conversão de substratos pela ECA é no tecido pulmonar. A ECA pode sofrer *shedding* (Figura 2A), processo no qual o ectodomínio de uma proteína de membrana pode ser clivado e liberado na corrente sanguínea, podendo inclusive exercer uma função diferente (52, 53). A forma solúvel da ECA somática (sECA) é encontrada no plasma, urina, fluído seminal, fluído amniótico e fluído cerebrospinal (34).

Duas isoformas de N-domínio solúveis presentes naturalmente no organismo foram encontradas em fluído ileal e urina de humanos, apresentam peso molecular de 65kDa (nECA de 65 KDa) e de 90kDa (nECA de 90 KDa) (54). Acredita-se que sejam derivadas da clivagem da sECA no ponto de ligação entre o C-domínio e o N-domínio por serino proteases (Figura 2A) (55). Estudos sugerem que a nECA de 90 KDa seja

um marcador de hipertensão, pré-eclâmpsia e inflamação, pois indivíduos que não apresentam a isoforma possuem perfil com baixa predisposição para aumento da pressão arterial e inflamação (54, 56, 57).



Elaborada pela autora.

Figura 2. Processo de *shedding* da ECA somática liberando a ECA somática solúvel e as isoformas N-domínio solúveis da ECA. (A) (I.) A ECA somática é encontrada ancorada a membrana e é susceptível ao processo de *shedding*, onde proteases clivam a base do ectodomínio que é liberado formando a ECA somática solúvel. (II.) Ainda, o processo de *shedding* pode ocorrer na ligação entre o C-domínio e o N-domínio da proteína, acredita-se que por intermédio de serino proteases, o que resulta na liberação de duas isoformas N-domínio solúveis, de 90KDa ou 65KDa. **B)** A ECA somática apresenta dois domínios funcionais o N e o C. Eles apresentam afinidade e eficiência catalítica diferentes de acordo com o substrato, o N-domínio é o principal responsável pela inativação da Ang 1-7, o C-domínio é o principal responsável pela formação de Ang II, e ambos têm afinidade e eficiência semelhantes para inativar BK.

É importante destacar que existe diferença de especificidade entre os domínios da ECA (Figura 2B). Os domínios têm afinidade equivalente pela Ang I, no entanto, a eficiência catalítica do C-domínio sobre a Ang I é três vezes maior que a do N-domínio. Camundongos com apenas o N-domínio funcional apresentam pressão arterial normal, porém atingem a homeostase promovendo a atividade da renina e por isso

apresentam níveis aumentados de Ang I, cerca de sete vezes maior que o encontrado no grupo controle. Em relação à BK, testes *in vitro* mostram que ambos os domínios têm afinidade e eficiência equivalente para hidrolisá-la (Figura 2B) (41).

Ainda, em relação a Ang 1-7, testes *in vitro* mostram que a Ang 1-7 seja um substrato específico para N-domínio, no entanto, aparentemente ambos os domínios clivam a Ang 1-7 em proporções praticamente iguais, porém considerando que o N-domínio tem menor afinidade por esta, sua atividade catalítica sobre Ang 1-7 é mais eficiente (58, 59).

Devido a suas ações, a ECA tem importante papel na fisiopatologia de diversas doenças. Variações na expressão local da ECA já foram descritas em diversas doenças, como insuficiência renal, infarto do miocárdio (IM), aterosclerose, fibrose pulmonar, entre outras (34). Estudo com crianças com síndrome metabólica mostra que há efeito benéfico dos IECAs sobre a resistência à insulina, hipertrigliceridemia e controle peso (60). Dados de estudos preliminares do nosso grupo evidenciaram maiores níveis de Ang I e desArg⁹Bradicinina (desArg⁹BK) e menores níveis de Ang 1-7 e BK, de acordo com aumento da massa corpórea (26). Desta forma, é provável que a ECA tenha papel relevante regulando SRAA e SCC na obesidade.

1.2.3 Eixo ECA2/ Ang 1-7/ Mas

A ECA2 é uma carboxipeptidase dependente de zinco pertencente à família M2 das metaloproteases (61). Esta proteína é composta por 805 aminoácidos e contém um único domínio ativo que apresenta maior semelhança com o N-domínio da ECA somática (42%), já sua porção carboxi terminal não é ativa e tem 48% de correspondência com a colectrina; uma proteína não catalítica que parece participar no controle da reabsorção de proteínas nos rins, na proliferação de células β no pâncreas e na exocitose de insulina (46, 61). Embora tenham a estrutura semelhante a ECA e a ECA2 apresentam diferentes funções e atividade catalítica; a ECA é uma carboxidipeptidase enquanto a ECA2 age como uma carboximonopectidase, retirando apenas um aminoácido da porção carboxi terminal de seus substratos (61).

A ECA2 foi identificada em 2000, quase 50 anos depois da descoberta da ECA, adicionando um nível de complexidade maior ao clássico SRAA. Esta enzima está presente em vias alternativas do SRAA (Figura 1) (29, 62), e ainda desempenha

função catalítica importante sobre peptídeos vasoativos de outros sistemas, como apelina 13, apelina 17, apelina 36, neurotensina, desArg⁹BK, desArg¹⁰calidina e dinorfina A1 -13 (61, 63, 64). Mas, sua principal ação no SRAA consiste em degradar Ang II, o mais potente vasoconstritor do sistema, para formar Ang 1-7, com ações opostas, protetoras. A ECA2 também contribui para formação de Ang 1-7 indiretamente, pois cliva a Ang I formando a Ang 1-9, que é clivada posteriormente pela ECA formando Ang 1-7 (Figura 1) (29, 31, 62).

A Ang 1-7 (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) é um heptapeptídeo ativo do SRAA que promove ações que contrabalanceiam as ações da via clássica (31) e tem sido apontada como uma antagonista do SRAA ativado, pois contrapõe as ações da Ang II (65). Esta angiotensina exerce sua ação através de ligação ao seu receptor específico, Mas, o qual se trata de um receptor transmembrana acoplado a proteína G e amplamente distribuído em diversos tecidos (61, 66). As ações da Ang 1-7 incluem: vasodilatação, por promoção da liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), efeito antiarrítmico que parece estar relacionado à bomba de sódio-potássio, modulação do SNS, efeito antiproliferativo e antiremodelamento, liberação de vasopressina em ratos hiper volêmicos, inibição de sinais promovidos pela Ang II e proteção das células β do pâncreas contra estresse oxidativo (65, 67).

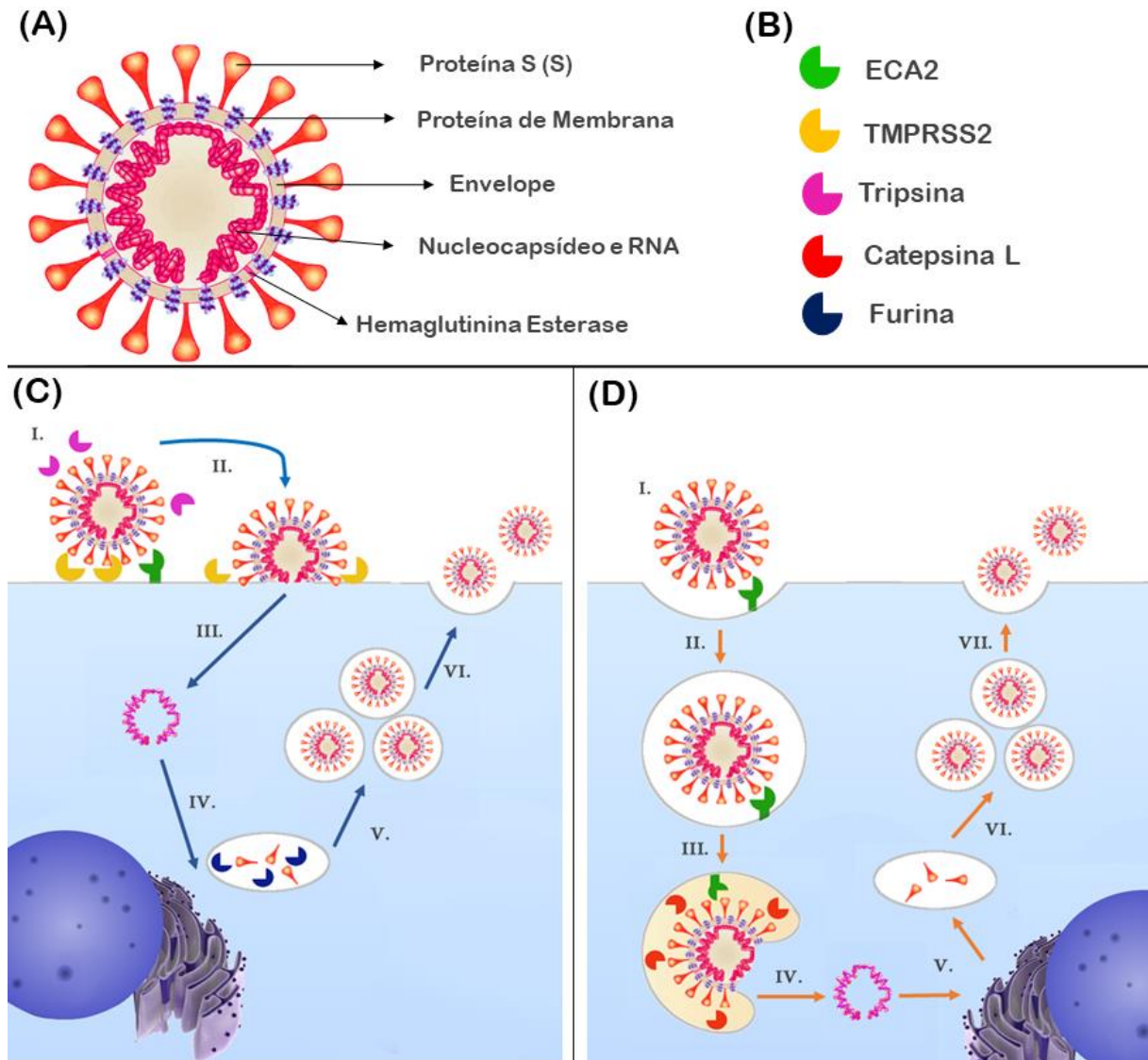
Assim como a ECA, a ECA2 também é susceptível ao processo de *shedding* (52). Estudos mostram que a ADAM-17 é a principal enzima responsável pelo *shedding* da ECA2 (68). Cerca de 2 a 4% da ECA2 é encontrada na forma solúvel (69). O aumento da forma solúvel é relatado como um marcador de doenças cardiovasculares e de diabetes não controlada (70-72). Inclusive, a Ang II agindo sobre AT1 promove a expressão de ADAM-17 e a liberação de ECA2 solúvel (73).

Além de suas ações cardiovasculares, estudos têm sugerido envolvimento da ECA2 como protetora em diversos outros processos fisiológicos e fisiopatológicos como gravidez, doenças renais, Alzheimer e hipertensão arterial pulmonar (74-77). Nos dois últimos anos a ECA2 ganhou disseminada notoriedade devido ao seu papel na fisiopatologia da COVID-19.

O vírus responsável pela COVID-19, nomeado de *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), reconhece a ECA2 e se liga a ela, reações proteolíticas subsequentes permitem a entrada do vírus na célula hospedeira (Figura

3) (78). Essa função levantou um amplo debate científico. Primeiramente, se discutiu que expressão aumentada da ECA2 aumentaria a susceptibilidade à COVID-19 e sua severidade, já que a proteína serve de receptor para o vírus (79). Em contrapartida, em determinadas ocasiões a ECA2 pode ser endocitada junto ao SARS-CoV-2 (Figura 3D), o que leva a depleção de sua função fisiológica nos tecidos (80, 81). A ECA2 tratando-se de uma enzima essencial contrabalanceando as funções deletérias do SRAA e clivando a desArg⁹BK, cinina com função inflamatória; a diminuição de suas funções nos mais diversos tecidos poderia implicar na ampla gama de sintomas presentes na COVID-19.

Três artigos publicados pelo nosso grupo exploram essa interconexão entre a COVID-19, a ECA2, o SRAA e o SCC e suas implicações em injúria renal observada em pacientes com a doença e o impacto durante a gravidez (74, 82, 83).



Fonte: Adaptada de Azinheira Nobrega Cruz et al., 2021 (82).

Figura 3. Estrutura do SARS-CoV-2 e mecanismo de entrada na célula e replicação. (A) O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA que está contido nos nucleocapsídeos, o envelope retém o material genético e contém a proteína de membrana e dímeros de hemaglutinina esterase. Ligada ao envelope está a proteína S, qual é responsável pela ligação ao receptor, ECA2. (B) Enzimas reportadas por participar do mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 na célula. (C) (I.) O vírus reconhece seu receptor, ECA2. A chamada via curta é possível quando a S foi previamente clivada pela furina durante a sua biossíntese e na presença de TMPRSS2 e ou tripsina na superfície celular para efetuar a clivagem da porção S1 da proteína S. (II.) O vírus se funde com a membrana plasmática da célula hospedeira; (III.) liberando seu material genético no citosol; (IV.) a transcrição de seu RNA e replicação ocorre no citosol, enquanto as proteínas estruturais são biosintetizadas no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, nesta etapa, a furina pode fazer o *priming* da proteína S na porção de ligação entre S1 e S2. (V.) O novo material genético é encapsulado pelo envelope e proteínas estruturais gerando os virions; (VI.) que serão liberados da célula hospedeira. (D) (I.) O SARS-CoV-2 reconhece seu receptor, ECA2. Se a S não foi previamente clivada pela furina uma segunda via de entrada é ativada e (II.) o vírus é endocitado;

(III.) devido a diminuição de pH, a catepsina L é ativada e consegue clivar a porção S1 da S, promovendo energia para a fusão do SARS-CoV-2 com a membrana do endossomo. (IV.) O material genético é liberado, (V.) a transcrição do RNA e a replicação ocorrem no citosol, enquanto as proteínas estruturais são biosintetizadas no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi. Nesta representação, não há furina para realizar o *priming* da S em S1/S2. (VI.) O material genético é encapsulado pelo envelope e proteínas estruturais gerando os virions (VII.) que serão liberados da célula hospedeira.

1.2.4 Vias alternativas do SRAA

1.2.4.1 Endopeptidase Neutra

A NEP, também conhecida como neprilisa é uma metalopeptidase dependente de zinco, assim como a ECA. A NEP foi primeiramente descrita em 1968, na borda em escova dos rins de ratos (84). Posteriormente, a NEP também foi encontrada no cérebro, onde era responsável pela clivagem de encefalinas, e foi tida como uma nova enzima, por isso também foi batizada de encefalinase (85).

A NEP é amplamente distribuída no organismo de mamíferos, sendo encontrada em abundância nas membranas em borda escova das células proximais renais, no intestino, placenta, plexo coróide e células reticulares do sistema imune (86). Também pode ser encontrada em menores concentrações; nos ovários, testículos e cérebro. Em cada órgão a NEP exerce funções diferentes dependendo dos substratos disponíveis (86).

No cérebro, inativa neurotransmissores opióides, taquicininas e peptídeo β amiloide, que é neurotóxico e predispõe a doença de Alzheimer, assim o papel da NEP nesta doença tem sido amplamente estudado. Seu papel no sistema imune ainda não é elucidado, porém sua sequência é idêntica à do antígeno de leucemia linfoblástica aguda, encontrado na superfície de leucócitos (87). Assim, a NEP constitui um importante biomarcador em determinados tipos de leucemia infantil (86).

A enzima tem papel no controle da pressão arterial, pois inativa o peptídeo natriurético atrial *in vivo*, o qual é secretado pelo tecido cardíaco, vasos, rins e cérebro, o peptídeo natriurético exerce efeito natriurético, vasodilatador, inibe os efeitos deletérios do SRAA, inibe os efeitos do SNS, além de exercer ação que previne hipertrofia e proliferação celular no tecido cardíaco (88, 89).

Ainda, a NEP inativa outro importante vasodilatador, a BK, que será descrita em detalhe posteriormente. Assim atribuiu-se alto potencial terapêutico para inibidores da NEP. No entanto, estes tiveram modesto efeito no tratamento da hipertensão essencial e insuficiência cardíaca (87). A associação entre os IECAs e o inibidor da NEP (*omapatrilat*) também foi testada no tratamento da insuficiência cardíaca, porém houve alta incidência de angioedema devido ao aumento da BK (87, 89). Recentemente, em 2015, foi aprovada para tratamento de insuficiência cardíaca crônica uma associação entre bloqueador do receptor de angiotensina (*valsartan*) e o inibidor de NEP (*sacubitril*), embora também apresente angioedema como efeito adverso importante (87).

Como visto anteriormente, a ECA2 é tida como principal produtora de Ang 1-7, a partir da Ang II (29). No entanto, a NEP é capaz de produzir Ang 1-7 a partir da Ang I (Figura 1). E em estudo realizado por Domenig et al (90), mostrou-se que nos rins principalmente, a produção de Ang 1-7 pela NEP também constitui uma via principal para formação do peptídeo. Portanto, a piora da função renal, que foi observada como um dos efeitos adversos da terapia com inibidores da NEP, pode ser devido a diminuição dos níveis de Ang 1-7, que tem efeitos renoprotetores por contrabalancear os efeitos da via clássica do SRAA.

1.2.4.2 Catepsina D

As catepsinas são proteínas lisossomais, primeiramente descritas no suco gástrico. Sua classificação varia de acordo com a atividade catalítica podendo ser classificadas em; cisteino proteases, aspartil proteases ou serino proteases (91). A CatD é uma aspartil endopeptidase solúvel (EC 3.4.23.5) (92) e é sintetizada como pré-pró-enzima com 412 aminoácidos, no retículo endoplasmático (93, 94). Após sua síntese, a pré-pró-CatD passa por glicosilação dupla em sua porção N-terminal formando a pré-CatD e segue para o complexo de golgi, as porções glicosiladas irão adquirir resíduos de manose-6-fosfato, que permitem que a pré-CatD se ligue a receptores de manose-6-fosfato contidos nos lisossomos. Uma vez dentro do compartimento lisossomal, com pH ácido, a pré-CatD sofre clivagens que a convertem na enzima madura, CatD (92, 93).

A CatD é considerada uma enzima *house keeping* devido a sua importância no processo de *turnover* de proteínas, e devido a sua regulação gênica, que permite que a proteína seja constitutivamente expressa. A CatD está presente em todas as células vivas do organismo humano com exceção aos eritrócitos (93, 94). No entanto, a transcrição do gene da CatD também pode ser regulada, o que permite que sua expressão seja aumentada em resposta a processos fisiológicos específicos (93, 94).

Segundo Liu et al (95), existe uma correlação positiva entre os níveis circulantes de CatD e resistência à insulina, assim como, com o aumento dos níveis de triglicerídeos (TG) em pacientes com diabetes tipo II recém diagnosticada e que ainda não estavam sob tratamento. A CatD parece ter importante papel na regulação dos níveis de lipoproteínas; ao comparar pacientes com baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-C), com controles do mesmo sexo e idade, observaram que o grupo com deficiência de HDL-C apresentava níveis de CatD 50% mais baixos em comparação ao controle. Este resultado foi atribuído ao fato de a CatD modular a bomba de efluxo ABCA-1 que media o efluxo de colesterol e fosfolípidios via Apolipoproteína A1 (96).

Em contrapartida estudos *in vivo* e *in vitro* estabelecem que enzimas lisossomais, como a pré-CatD, possam induzir a formação da placa de ateroma, isso porque macrófagos derivados de monócitos liberam essas enzimas e acidificam o meio, que pode ficar suficientemente ácido para que ocorra auto conversão da pré-CatD em CatD. Uma vez ativa, a CatD é capaz de induzir a hidrólise de lipoproteínas incluindo a lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) tornando-as instáveis e permitindo seu acúmulo (92).

As catepsinas em geral têm sido descritas como possíveis marcadores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma vez que, parecem estar envolvidas na fisiopatologia da obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo II e aterosclerose, todos fatores de risco para desenvolvimento de evento cardiovascular (91). Estudo avaliando os níveis de CatD, catepsina L e cistatina B no plasma de indivíduos que sofreram eventos coronarianos em relação à população controle pareada por sexo e idade, mostraram maiores níveis destas proteases no grupo que sofreu evento cardiovascular. Entretanto, estudo com crianças de 6 a 12 anos não

definiu associação entre os níveis séricos de CatD e alterações antropométricas que culminem em risco cardiovascular aumentado (97).

Em relação ao SRAA, a CatD mantém certa semelhança e homologia com renina, mas, embora a renina tenha substrato estritamente específico; o AGT, a CatD é capaz de clivar uma variedade de substratos, e as condições ótimas de atividade da CatD podem variar de acordo com o substrato em questão. No entanto, sabe-se que o pH ideal para sua atividade catalítica é de aproximadamente 4,5 (98, 99).

A CatD é capaz de formar Ang I a partir do AGT. Porém, essa via alternativa é pouco provável em condições fisiológicas normais, pois a CatD se mantém confinada dentro dos lisossomos e sua atividade em pH fisiológico é reduzida. Mas, é relevante lembrar que em situações específicas essa reação se torna plausível, como por exemplo, após infarto do miocárdio, pois a CatD é liberada dos lisossomos no tecido cardíaco lesado, e o pH tende a ser mais baixo (98, 99).

No SCC, evidenciou-se que pode ocorrer participação da CatD na liberação de cininas a partir de clivagem do cininogênio, embora sejam liberadas apenas pequenas concentrações de BK a partir de incubação com plasma humano (100).

1.2.4.3 Quimase

O termo quimase refere-se ao grupo de serino proteases com atividade quimiotriptica expressas principalmente nos mastócitos (101). Apesar de todas as quimases serem similares, o processo de evolução alterou sua atividade catalítica e especificidade e algumas quimases hoje são primariamente elastolíticas ou leucina seletivas. A quimase humana tem atividade quimiotriptica e alguns de seus substratos fisiológicos são, Ang I, albumina, profilina, endotelina, apo A-1 e proteína de transferência de colesterol esterificado (101).

Nos seres humanos, a quimase é expressa junto a diversas serino proteases em leucócitos granulócitos. A quimase madura é armazenada em grânulos junto com histamina e triptases. A ativação das pro-quimases ocorre no meio intracelular através da remoção de um dipeptídeo ácido da porção n-terminal pela dipeptidilpeptidase I, essa reação ocorre em pH 5,5. Porém, a atividade da quimase dentro dos mastócitos é inibida pelo pH baixo, mas quando liberada em meio extracelular, em pH neutro, ela

se torna ativa (101). As funções biológicas da quimase incluem; destruição de proteínas da matriz extracelular, inativação de neuropeptídeos inflamatórios, catabolismo de lipoproteínas, promoção de angiogênese (101). No SRAA, a quimase participa da via alternativa para formação de Ang II a partir da Ang I (Figura 1) (31).

Estudos propõem que a quimase apresente um papel importante na fisiopatologia de doenças cardiovasculares e metabólicas, pois compõe uma via alternativa independente da ECA para a formação do hormônio vasoconstritor, Ang II. Ainda, a quimase proveniente dos mastócitos foi identificada como a principal geradora de Ang II no tecido cardíaco e vascular humano (102). Embora, em ratos tenha sido demonstrado que a produção de Ang II no tecido vascular é completamente dependente da ECA. A diferença se dá devido as diferentes especificidades, já que a quimase humana hidrolisa a Ang I na porção C-terminal, na ligação entre os aminoácidos Phe⁸-His⁹, produzindo a Ang II. Já a quimase de rato promove a clivagem nas ligações da Tyr⁵, formando peptídeos inativos (103).

Muitos estudos sustentam a importância da ação da quimase, na formação de Ang II a nível local. Estudos clínicos mostram que a quimase tem expressão aumentada nas lesões de aterosclerose aórtica, no miocárdio ventricular após IM, e ainda na artéria torácica de pacientes com níveis elevados de LDL-C (104). Na fase aguda do IM observa-se aumento da infiltração de leucócitos mononucleares, que contêm quimase e contribuem para um aumento de três vezes na sua atividade local. Após 21 dias do IM, a quimase é a principal responsável pela formação de Ang II, tendo uma atividade muito maior do que a da ECA e catepsina G. O que infere que o estresse patológico promovido pela isquemia e IM promovem a infiltração de leucócitos e a ativação da formação da Ang II via quimase. E desta forma, a quimase, participa no processo de remodelamento cardíaco após IM (104).

Foi verificado em artérias desnudas, que o bloqueio da produção da Ang II utilizando IECAs é apenas parcial, devido a produção residual pela via alternativa da quimase. Estudos têm demonstrado que há aumento da expressão da quimase em rins diabéticos e que a inibição da enzima tem maior efeito sobre os níveis renais de Ang II do que a inibição da ECA. Ainda a inibição da quimase contribui para prevenir a proteinúria e expansão mesangial em modelo de nefropatia diabética (105). Desta

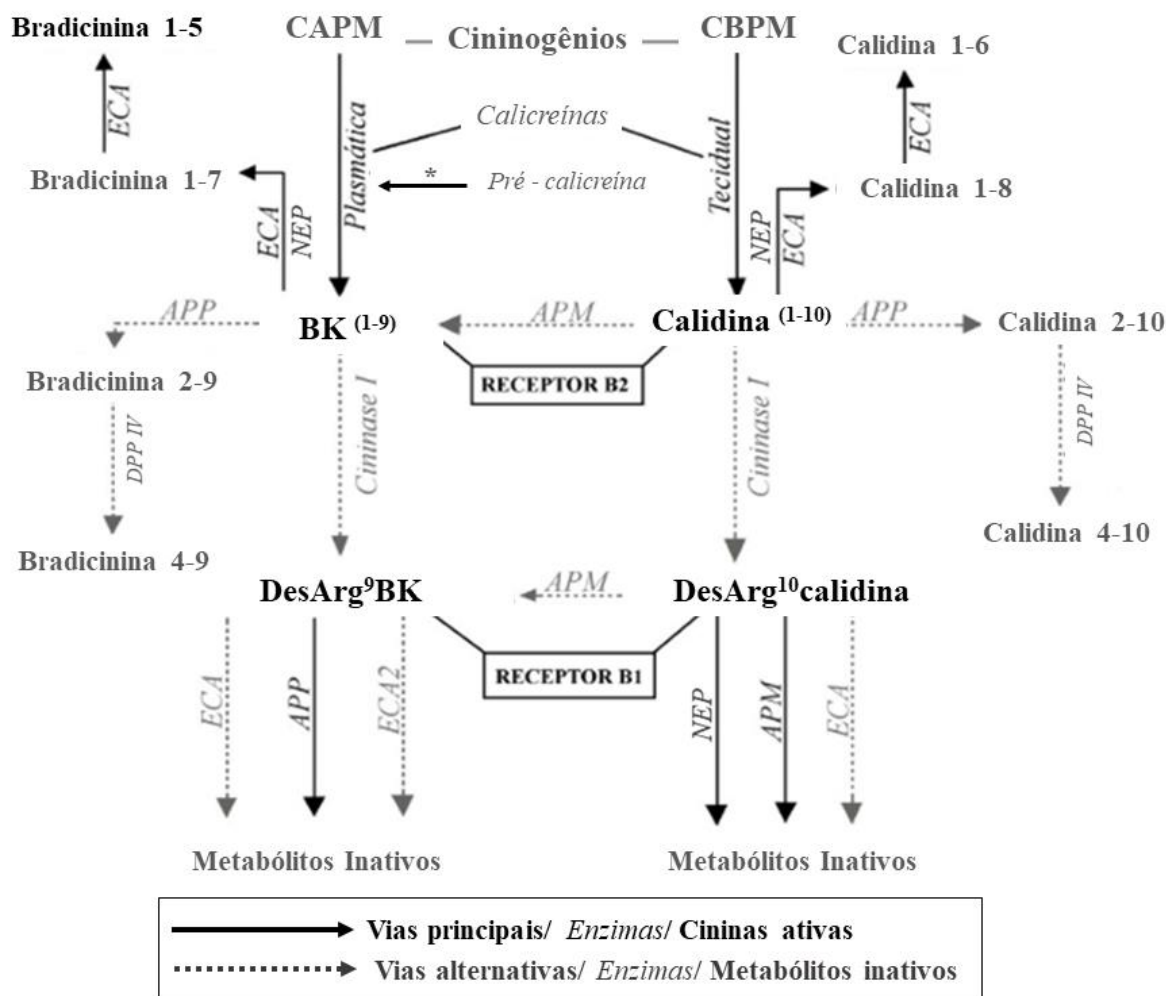
forma a quimase parece ter papel importante na regulação do SRAA em doenças cardiovasculares e renais.

1.3 Sistema calicreína-cinina

O SCC é um sistema hormonal constituído por um precursor proteico chamado cininogênio, o qual é clivado por proteases denominadas calicreínas gerando metabólitos ativos, as cininas (Figura 4). Além do já bem estabelecido papel do SCC modulando inflamação e nocicepção, este sistema também participa em diversos processos fisiopatológicos como hipertensão, trombose, diabetes, obesidade, câncer e doenças do sistema nervoso central atuando em nível sistêmico e tecidual, embora o último tenha papel mais relevante (67, 106, 107).

O cininogênio é o substrato para a produção de cininas, e pode diferir no peso molecular e afinidade pelas calicreínas. O cininogênio de alto peso molecular (CAPM), 120kDa, serve de substrato para calicreína plasmática formar a BK ($\text{Arg}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Gly}^4\text{-Phe}^5\text{-Ser}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-Arg}^9$) enquanto o cininogênio de baixo peso molecular (CBPM) é clivado principalmente pela calicreína tecidual formando calidina ($\text{Lys}^1\text{-Arg}^2\text{-Pro}^3\text{-Pro}^4\text{-Gly}^5\text{-Phe}^6\text{-Ser}^7\text{-Pro}^8\text{-Phe}^9\text{-Arg}^{10}$) (análogo de BK) (Figura 4). Deficiência de CAPM compromete a coagulação, fibrinólise, liberação de cininas e possivelmente a ativação do sistema complemento (67, 108).

As cininas podem interagir com dois tipos de receptores B1 e B2, estes pertencem a famílias de receptores transmembrana acoplados a proteína G (108, 109).



Fonte: Adaptada de Kakoki & Smithies, 2009 (110).

Figura 4. Sistema caliceína-cinina e suas vias metabólicas. A caliceína tecidual age sobre o CBPM formando a calidina, enquanto a pré-caliceína é ativada por (*) fator XII ou prolil-carboxipeptidase formando a caliceína plasmática que age sobre o CAPM formando a BK, ambas cininas agem preferencialmente sobre o receptor B2. A calidina e a BK são metabolizadas rapidamente pela ECA, formando calidina 1-8 e bradicinina 1-7, respectivamente. Estas últimas podem ser metabolizadas novamente pela ECA formando calidina 1-6 e bradicinina 1-5, que é uma cinina ativa. Uma via de metabolização alternativa para a BK e a calidina é via aminopeptidase P (APP), onde a bradicinina 2-9 e a calidina 2-10 são formadas e posteriormente clivadas pela dipeptidil dipeptidase IV (DPP IV) finalmente formando bradicinina 4-9 e calidina 4-10. Outra via de metabolização da BK e da calidina consiste nas cininases I, que removem a arginina da porção carboxiterminal destas cininas formando os metabólitos ativos desArg⁹BK e desArg¹⁰calidina, que agem preferencialmente sobre receptor B1. A desArg⁹BK é preferencialmente metabolizada pela APP, mas ECA e ECA2 são vias de metabolização alternativas. Já a desArg¹⁰calidina sofre clivagem principalmente pela NEP e aminopeptidase M (APM), e a ECA é uma via alternativa.

Os receptores B2 são expressos amplamente em diversos tecidos em condições fisiológicas normais (106, 111). A BK e a calidina apresentam maior afinidade pelo receptor B2 (Figura 4) (106). Este receptor parece mediar às ações protetoras em morbidades cardiovasculares e renais (106). Estudos com modelo animal mostram que *knockout* do receptor B2 resulta em resistência à insulina, tolerância a glicose e sensibilização aos efeitos hipertensivos do sódio (108, 112). A ativação de B2 promove efeitos protetores contra IM, pois tem efeitos anti-proliferativos em fibroblastos e anti-hipertrófico em cardiomiócitos e protege contra danos renais causados por espécies reativas de oxigênio (106). Quando B2 é expresso em baixas concentrações ou na ausência de B1, este parece exercer efeito anti-inflamatório (111).

Controversamente, o receptor B1 parece ser fortemente induzido por estímulos inflamatórios, processos de injúria e dor (113, 114). Em condições fisiológicas a expressão de B1 permanece em nível baixo, aumentando rapidamente quando um processo inflamatório ou de estresse se instala (106, 111). As principais cininas ativas sobre B1 são a desArg⁹BK e a desArg¹⁰calidina (Figura 4) (115).

1.3.1 Calicreínas

As calicreínas, tanto a plasmática quanto as teciduais, são serino proteases e são amplamente distribuídas no organismo humano. Existem atualmente 15 tipos de calicreínas teciduais secretadas, destas nos referimos normalmente a calicreína tissular 1, como calicreína tecidual (116). A principal atividade da calicreína tecidual e plasmática é a clivagem de cininogênio para formação de cininas, mas estas também participam de outros processos. A calicreína tecidual cliva calistatina, somatostatina, pro-insulina, LDL-C, fator precursor do peptídeo natriurético atrial, pró-renina, peptídeo vasoativo intestinal e AGT (116).

A calicreína tecidual ou glandular pode ser encontrada nas glândulas salivares, tecido sinovial, rins, intestino, pâncreas, fluido broncoalveolar de pacientes asmáticos e no plasma em pequenas quantidades (67). Estas agem preferencialmente sobre o CBPM liberando a lys-bradicinina, chamada de calidina (107). A regulação da secreção das calicreínas teciduais, assim como, suas funções ainda não são bem estabelecidas e variam de acordo com o tecido (67).

A calicreína plasmática é expressa principalmente pelo fígado (108). Esta circula na forma de zimogênio, pré-calicreína, também conhecida como fator Fletcher e pode ser ativada por ação do fator XII utilizando CAPM como co-fator (67). Uma via independente de fator XII é estabelecida pela enzima prolil-carboxipeptidase que é encontrada na parede do endotélio e é responsável por transformar pré-calicreína em calicreína. A calicreína plasmática age sobre o CAPM e libera BK (108). A BK ainda pode ser formada através da hidrólise da calidina pela aminopeptidase M (117, 118).

1.3.2 Bradicinina

A BK foi descoberta em 1948, pelo cientista brasileiro Maurício Rocha e Silva e seus colaboradores durante um estudo sobre choque circulatório induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca*, que visava identificar enzimas proteolíticas responsáveis pela liberação de histamina. Na época acreditava-se que a histamina era mediadora do choque circulatório (119). Foi então descoberta uma nova molécula liberada por estas enzimas, a BK (120). O grupo passou a estudar formas para evitar a destruição da cinina plasmática e isolaram peptídeos presentes no veneno de jararaca (121), mais tarde descobriu-se que esses peptídeos inibiam a ECA. Os IECAs advindos destas descobertas são até hoje um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da hipertensão arterial sistêmica (122).

A BK é o principal peptídeo ativo do SCC, atua como potente vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular, está envolvido na contração de músculo liso, geração de dor, natriurese, diurese e aumento do fluxo sanguíneo renal, estimula resposta imune inata e adaptativa e aumenta a captação de glicose pelos tecidos (108, 112). Como visto, ela é formada pela ação catalítica da calicreína plasmática sobre o CAPM enquanto seu análogo a lys-bradicinina, chamada também de calidina é formada pela clivagem do CBPM pela calicreína tecidual (116).

As duas possuem ações iguais, porém a BK desempenha ação mais potente e ambas podem ser rapidamente degradadas pela ECA ou pela NEP formando os metabólitos BK 1-7 e calidina 1-8, a ECA então age novamente sobre estes metabólitos formando BK 1-5 e calidina 1-6 (Figura 4) (118), ambos são normalmente ditos como inativos, mas alguns estudos em animais e *in vitro* apontam função

biológica para BK 1-5, como inibidor da agregação plaquetária promovida pela trombina e proteção contra efeitos deletérios promovidos por lipopolisacarídeos em ratos (123, 124). Outra via de degradação da BK e da calidina é pela aminopeptidase P, que as converte nos peptídeos inativos BK 2-9 e calidina 2-10 que posteriormente são degradados pela dipeptidil peptidase IV formando BK 4-9 e calidina 4-10 (Figura 4) (125).

Em uma outra via alternativa a BK e a calidina são metabolizadas por carboxipeptidases plasmáticas (CPN) ou associadas a membrana (CPM), estas são genericamente chamadas de cininases I. As CPNs são sintetizadas pelo fígado e depois liberadas na circulação enquanto as CPMs podem ser encontradas nos rins, pulmões, fibroblastos, células endoteliais da artéria pulmonar e placenta (126). Os produtos desta via de metabolização compreendem a desArg⁹BK e a desArg¹⁰calidina, respectivamente (127, 128).

1.3.3 DesArg⁹-bradicinina

A desArg⁹BK (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸) é um peptídeo ativo, e sua resposta é mediada pelo receptor B1, sendo principalmente considerada uma cinina pró-inflamatória, embora tenha outras funções ambíguas. Estudos mostram que a desArg⁹BK pode elevar o tônus vascular da artéria pulmonar quando este se encontra em nível normal, no entanto, quando o tônus vascular se encontra demasiadamente elevado o peptídeo age de forma contrária diminuindo-o (126). Quando administrada em coelhos previamente tratados com lipopolisacarídeos de bactérias ou endotoxinas provoca hipotensão transiente (108, 129). Em aorta desnuda e artérias mesentéricas de ratos provoca vasoconstrição (108, 129). Em coração isquêmico a desArg⁹BK tem efeito protetor dependente da liberação de mediadores como NO, fator hiper-polarizante derivado de endotélio e prostanóides (115).

Além de seus efeitos cardiovasculares a desArg⁹BK provoca contração em colón humano e duodeno e bexiga de ratos. Tem participação na fisiopatologia da obesidade, uma vez que, foi observado que a administração de desArg⁹BK em camundongo é capaz de aumentar níveis plasmáticos de leptina (130). E que camundongos com B1 e B2 *knockout* apresentam menores níveis de leptina e insulina

e são resistentes a obesidade induzida por dieta rica em gordura (109), ressaltando um possível papel desta cinina e do SCC na obesidade.

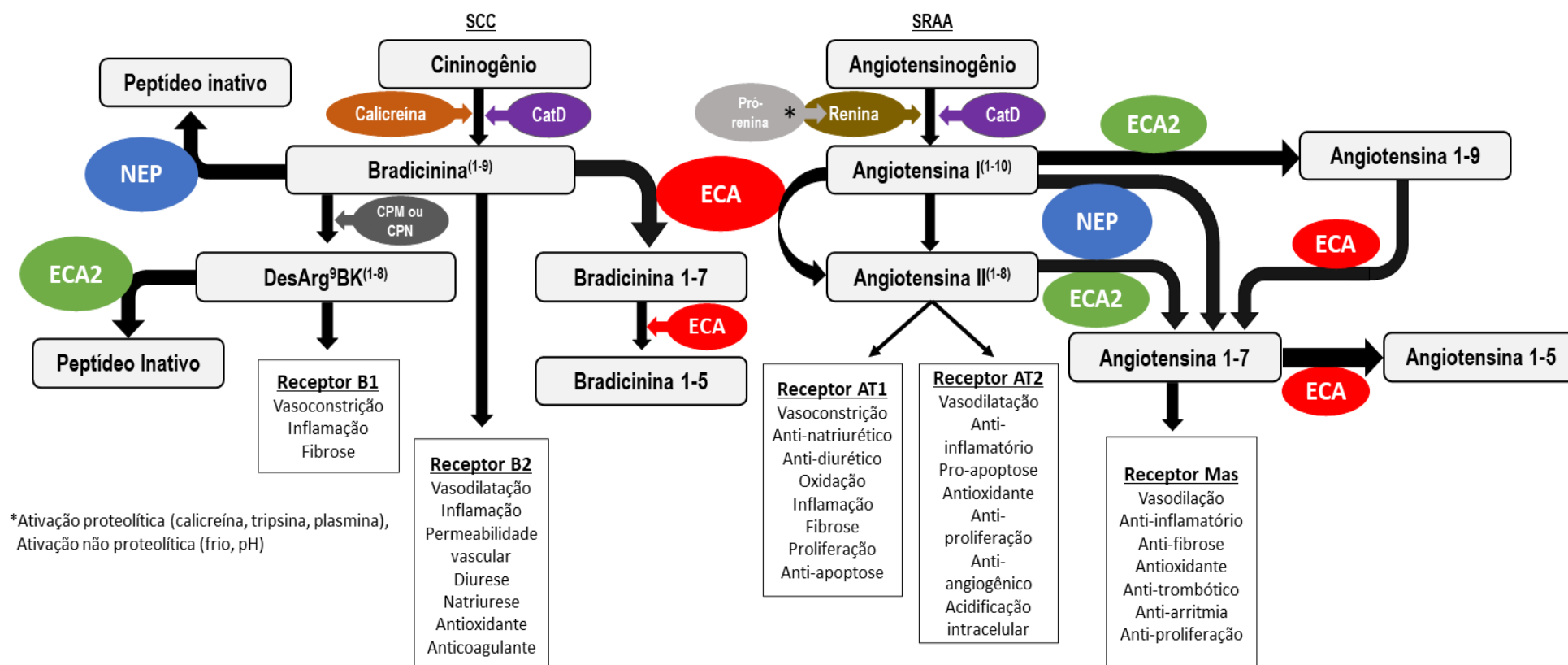
A desArg⁹BK pode ser metabolizada pela ECA ou pela aminopeptidase P e ao contrário do observado na degradação de BK, a aminopeptidase P constitui a principal via de degradação da desArg⁹BK (127). A desArg⁹BK também serve de substrato para a ECA2, embora a BK não possa ser degradada por esta (61). A desArg⁹calidina por sua vez é degradada principalmente pela aminopeptidase M e NEP e a ECA constitui uma via alternativa (131).

1.4 Interação entre SRAA e SCC

A ECA é um dos principais pontos de interação entre o SRAA e SCC, pois cliva a Ang I para formar o principal peptídeo efetor do SRAA, a Ang II, com ação vasoconstritora. Também degrada o principal peptídeo do SCC, a BK, que tem potente ação vasodilatadora (132) (Figura 5).

A ECA2 também representa um ponto de interação importante; uma vez que, degrada a Ang II formando Ang 1-7, que tem ações que se opõe a Ang II, podendo ser considerada um antagonista do SRAA ativado (65). E no SCC, a ECA2 é responsável por degradar desArg⁹BK (61), cinina pró-inflamatória, inativando-a (108) (Figura 5).

Ainda, pode-se salientar a ativação da pró-renina por intermédio da calicreína plasmática e a formação de Ang II diretamente do AGT por ação da calicreína (133).



Fonte: Adaptada de Oliveira et al., 2021 (83).

Figura 5. Principais vias de interação entre SRAA e SCC. O SRAA e o SCC interagem em múltiplos pontos, sendo a ECA, a ECA2, a NEP e a CatD enzimas que agem em ambos os sistemas. A ECA forma a Ang II no SRAA e inativa BK no SCC, ainda participa em via alternativa para formação de Ang 1-7 e constitui uma via de inativação dela. A ECA2 forma Ang 1-7 diretamente agindo sobre Ang II ou indiretamente formando Ang 1-9 que depois é clivada em Ang 1-7. No SCC a ECA2 inativa a desArg⁹BK. No SRAA, a NEP forma Ang 1-7 a partir da Ang I e no SCC trata-se de uma via de metabolização da BK. Ainda a CatD é reportada como capaz de agir sobre os precursores proteicos dos dois sistemas formando BK ou Ang I. Finalmente, a caliceína é capaz de promover a ativação proteolítica da pró-renina em renina.

Enzimas das vias alternativas também constituem pontos de interação entre os dois sistemas. A NEP tem participação no SRAA, podendo formar Ang 1-7 a partir da Ang I (31). Já no SCC a NEP pode ser responsável pela inativação da BK (87). A CatD é capaz de produzir Ang I a partir do AGT quando em pH 4,0 – 5,0, o que pode ocorrer na inflamação, esta protease também pode clivar o cininogênio produzindo pequenas concentrações de BK (99, 100). A quimase parece ter participação apenas no SRAA, contribuindo de forma significativa a nível tecidual para formação de Ang II por via independente da ECA (104).

1.5 Participação do SRAA e do SCC na fisiopatologia da obesidade

O tecido adiposo é um órgão endócrino que também comporta funções parácrinas e autócrinas (134). As substâncias produzidas pelo tecido adiposo são chamadas adipocinas, dentre elas pode-se ressaltar, a leptina, fator de necrose tumoral (TNF) α , interleucina 1 β , interferon γ , ácidos graxos livres, resistina, apelinas e adiponectina (12, 135).

Dentre as adipocinas também se incluem os componentes do SRAA e diversos estudos sugerem uma participação importante deste sistema na modulação do metabolismo do tecido adiposo (25). Sabe-se que há uma estimulação do SRAA local e sistêmico na obesidade, assim o tecido adiposo contribui não somente para níveis locais de AGT, renina, ECA e Ang II, mas também em nível plasmático (24, 136). Este efeito, de ativação do SRAA, pode ser produzido diretamente ou indiretamente devido contribuição do tecido adiposo na hiperativação do SNS que ativa o SRAA (136). Essa ação sobre o SNS pode ser mediada pela leptina, que estimula a liberação de catecolaminas (137). Adicionalmente a própria Ang II é capaz de agir centralmente aumentando a atividade simpática (138). Ainda, na obesidade ocorre a indução da resistência à insulina e a hiperinsulinemia estimula o SNS (138).

Evidências de que o SRAA está modulado na obesidade ou de que possa modula-la, incluem os fatos de que em modelos experimentais a inibição do SRAA altera o metabolismo energético, supressão da renina, ECA, Ang II e AT1 contribuem para peso reduzido e resistência a obesidade induzida por dieta rica em gordura (139). Animais com deleção da ECA apresentam maior gasto energético no metabolismo basal e maior expressão de enzimas ligadas a lipólise e beta-oxidação (140).

Inclusive, esses efeitos podem ser mediados por AT₂, uma vez que, a ativação de AT₂ inibe termogênese e gasto energético basal (141). Em humanos, bloqueadores do SRAA (captopril, losartana e alisquireno) utilizados no tratamento da hipertensão tem efeito benéfico sobre a obesidade (25). A expressão aumentada de Ang 1-7 em ratos previne a obesidade induzida por dieta rica em açúcar (142). E ainda, é observado aumento dos níveis de Ang I e diminuição dos níveis de Ang 1-7 na obesidade (26, 27). Já é bem estabelecida a contribuição do tecido adiposo para os níveis de AGT. Em condições fisiológicas normais a concentração de angiotensinas é paralela à expressão de AGT no fígado, no entanto, quando há deficiência de AT₂, a concentração de angiotensinas parece estar emparelhada com a expressão de AGT nos adipócitos (143).

Outras observações interessantes sobre o SRAA na obesidade compreendem o fato de que *in vitro* a Ang II e a Ang 1-7 parecem interferir na lipólise, sendo que a primeira inibe o processo e a segunda o favorece, nestes estudos foram usadas altas doses das angiotensinas, o que torna difícil concluir se o processo pode ocorrer *in vivo* (25). Adicionalmente, a expressão de receptores de renina é maior no tecido adiposo ectópico do que no tecido adiposo subcutâneo (143), e a ação da renina e da pró-renina sobre estes parece estar envolvida em eventos cardiovasculares (35, 37), ressaltando a importância da distribuição de gordura e como a gordura ectópica pode contribuir para desenvolvimento das comorbidades associadas a obesidade.

A formação local de Ang II encontra-se aumentada na obesidade (27) e aparentemente contribuem para disfunção nos adipócitos, pois a Ang II estimula a ativação de fator nuclear kappa B (NFκB) aumentando a secreção de citocinas e a inflamação (27). Na obesidade ainda é observado um aumento dos níveis de aldosterona, o que pode ser devido ao tecido adiposo estimular a esteroidogênese nas glândulas adrenais (27). Estudos *in vitro* com adipócitos humanos mostram que produtos da oxidação de ácidos graxos podem estimular a síntese de aldosterona. Ainda, a perda de peso contribui para diminuição dos níveis circulantes de AGT, aldosterona e para diminuição da atividade da renina plasmática (27, 144).

Destaca-se também a participação do SCC na fisiopatologia da obesidade. A BK encontra-se diminuída em obesos e a desArg⁹BK aumentada e seus níveis se correlacionam negativamente com a leptina (26), camundongos com *knockout* dos

receptores B1 e B2 apresentam menores níveis de leptina e insulina e são resistentes a obesidade induzida por dieta rica em gordura (109). Em concordância, também foi observado que bloqueio do receptor B1 previne insulite e hiperglicemia e que a administração de desArg⁹BK em camundongos é capaz de aumentar níveis plasmáticos de leptina (145). Em contrapartida, a BK tem papel importante promovendo a captação de glicose pelos tecidos (146). Estudo do nosso grupo mostrou correlação negativa entre níveis de BK e Ang 1-7 com os níveis de leptina (26).

A literatura também aponta a participação das enzimas que compõem as vias alternativas do SRAA e SCC na obesidade. A CatD encontra-se aumentada no tecido adiposo de ratos e humanos obesos (91). Estudo feito em camundongos demonstrou que a hipertrofia do tecido adiposo mediante dieta rica em gordura promove um aumento da expressão e da atividade da CatD no tecido adiposo epididimal. O aumento da expressão da CatD promove apoptose dos adipócitos através da clivagem e ativação das enzimas pró-apoptóticas, Bax e Bid. A morte celular no tecido adiposo, culmina na infiltração de macrófagos que produzem citosinas inflamatórias estabelecendo um baixo nível de inflamação crônica, que consiste em um dos principais fatores para desenvolvimento de resistência à insulina (147).

Os mastócitos e a quimase também parecem participar no desenvolvimento e manutenção das doenças cardiometabólicas. O acúmulo de mastócitos no tecido adiposo branco de camundongos obesos já foi evidenciado e contribui para a manutenção de um estado de inflamação, uma vez que, estes liberam mediadores inflamatórios, substâncias quimiotáticas, histamina, heparina e serino proteases, incluindo a quimase (148).

Camundongos com deficiência de mastócitos quando submetidos a uma dieta que induz obesidade apresentaram menor ganho de peso, nível reduzido de citocinas inflamatórias, e menor acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, além de melhor controle da glicemia, quando comparados com controles (148). Em mastócitos isolados de biopsia de tecido adiposo branco de pacientes com obesidade severa, observou-se maiores níveis de quimase do que o apresentado pelo grupo eutrófico. Em avaliação histológica observou-se que os mastócitos no tecido adiposo destes indivíduos se encontram principalmente nas áreas fibróticas, próximas a vasos (148).

Outra observação interessante é que o número de mastócitos acumulados no tecido adiposo e a concentração de quimase são maiores nos obesos diabéticos do que nos somente obesos. Sugerindo que possa haver uma interação onde o acúmulo de mastócitos contribua para inflamação e desenvolvimento de resistência à insulina e do diabetes tipo II e ou que a hiperglicemia possa interferir no fenótipo, maturação e migração dos mastócitos no tecido adiposo (148).

Em relação a NEP, camundongos NEP *knockout* apresentam aumento significativo de peso a partir do sétimo mês de vida, ocorre também aumento dos níveis de TG e VLDL-C, diminuição do HDL-C, glicemia basal aumentada e os níveis de leptina mantém correlação positiva com ganho de peso, indicando tolerância a leptina (149). Ainda, camundongos tratados com inibidor da NEP (*candoxatril*) apresentam ganho de peso significativo, e este efeito é relacionado ao aumento do consumo de alimento, demonstrando que a inibição da NEP promove efeito orexigênico (149).

Em humanos, o papel da NEP na obesidade e no desenvolvimento de doenças associadas também é bem reportado. Na presença de obesidade e disfunção do tecido adiposo ocorre ativação do eixo leptina/ aldosterona/ NEP, que promove o tráfico renal-simpático, a inativação de peptídeos natriuréticos, a retenção de sódio e a expansão do plasma (150). A NEP é expressa nos pré-adipócitos e sua expressão aumenta durante a diferenciação, embora a NEP pareça não ter função essencial durante este processo, acredita - se que este aumento de sua expressão nos adipócitos durante a diferenciação contribua para aumento dos níveis de NEP circulante na obesidade já que estes aumentam progressivamente junto com o IMC e o índice HOMA (*Homeostatic Model Assessment*) (151). Adicionalmente, existe correlação positiva entre NEP circulante e IM, pressão arterial e presença de síndrome metabólica em adultos (151).

Apesar destes dados mostrarem a relevância do SRAA e SCC na obesidade, estudos avaliando essas alterações na obesidade infantojuvenil são escassos e a maioria dos estudos avalia os sistemas à nível sistêmico ou local no tecido adiposo, mas não há relatos demonstrando a modulação do SRAA e SCC renal durante a obesidade infantojuvenil. Com base no exposto justifica-se uma investigação aprofundada de como o SRAA e o SCC estão modulados na urina e no plasma em

crianças com diferentes estados nutricionais, a fim de avaliar como possíveis alterações destes sistemas em crianças com sobrepeso e obesidade podem contribuir para desenvolvimento e manutenção da obesidade e promover um fenótipo favorável ao desenvolvimento precoce de doenças cardiometabólicas. Ambos os sistemas são alvo recorrente de terapias medicamentosas e identificação e entendimento dos mecanismos associados a obesidade infantojuvenil pode abrir precedentes para novas estratégias terapêuticas no combate à doença.

Hipótese e Objetivos

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Postulamos que a obesidade infantojuvenil desencadeia alterações na atividade e expressão das duas principais enzimas do SRAA e que participam no SCC, a ECA e a ECA2. Estas seriam responsáveis pelo desbalanço entre os eixos destes sistemas resultando na estimulação dos eixos deletérios, ECA/Ang II/AT1 e desArg⁹BK/B1, e supressão dos eixos protetores, ECA2/ Ang 1-7/ Mas e BK/B2 contribuindo para um fenótipo de vasoconstrição, oxidação, proliferação e inflamação. O que torna as crianças e adolescentes obesos mais propensos ao desenvolvimento precoce de complicações cardiometabólicas associadas a obesidade; tais como, hipertensão, diabetes, dislipidemias e síndrome metabólica.

2.2 Objetivo Geral

Investigar a modulação dos principais componentes do SRAA e SCC em crianças e adolescentes com diferentes estados nutricionais; baixo peso, eutrófico, sobrepeso e obeso, correlacionar e associar as alterações encontradas com o perfil bioquímico, cardiovascular e antropométrico destes indivíduos.

2.3 Objetivos Específicos

- Realizar avaliação transversal das crianças e adolescentes envolvidos neste estudo.
- Coletar os dados antropométricos, clínicos e bioquímicos.
- Determinar a expressão e atividade das principais enzimas do SRAA e SCC (renina, ECA, ECA2, quimase, NEP e CatD) na urina e no plasma.
- Quantificar os peptídeos do SRAA (Ang I, Ang II e Ang 1-7) e do SCC (BK e desArg⁹BK) na urina e no plasma. Estes experimentos estão em processamento.
- Correlacionar expressão e atividade das enzimas com níveis de peptídeos, após a análise dos mesmos. E correlacionar os resultados com dados antropométricos, cardiovasculares e bioquímicos.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

No presente estudo foi realizada uma avaliação transversal de 360 crianças e adolescentes com idade entre 6 e 19 anos de ambos os gêneros, que no período de 2014-2016 estavam matriculados no projeto Estação Conhecimento – Fundação Vale e ou escolas da rede pública de Vitória – ES.

Foram inclusos crianças e adolescentes que participaram do estudo “DETERMINANTES DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES” coordenado pelo Dr. José Geraldo Mill, o qual foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060. Neste estudo haviam 856 participantes que foram classificados pelo percentil do IMC (pIMC) e Z-escore do IMC nas categorias baixo peso (BP), eutrófico (EU), sobrepeso (SP) e obeso (OB), todos os participantes que apresentaram baixo peso (n=53), sobrepeso (n=120) e obesidade (n=67) e que atendiam os critérios de inclusão e exclusão foram incluídos no presente estudo, dos 616 eutróficos, 120 foram selecionados randomicamente e constituem o grupo controle, pois apresentam peso normal de acordo com sexo, altura e idade.

Os critérios de exclusão foram: suspeita ou conhecimento de diabetes *mellitus*, de doenças imunológicas ou infecto-contagiosas, hipotireoidismo ou hipertireoidismo e síndromes genéticas, uma vez que, podem desencadear alterações no SRAA e SCC. Assim como, uso crônico de medicamentos tais como: anti-hipertensivos, moderadores de apetite, estatinas e outros medicamentos que interfiram na pressão arterial.

3.2 Aspectos éticos

O presente estudo, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP, instituição coordenadora, sob o CAAE 83298217.1.0000.5505 (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFES, instituição coparticipante sob o CAAE 83298217.1.3001.5060 (Anexo 2).

3.3 Coleta de urina, plasma e avaliação clínica

Essa etapa foi realizada pelo grupo do Dr. José Geraldo Mill. Após a explanação do protocolo, da aceitação e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais ou responsáveis a criança acompanhada de um dos pais ou responsável foi orientada a comparecer à Clínica de Investigação Cardiovascular no Centro de Ciências da Saúde da UFES, em jejum de 12-14 horas, para coleta de sangue, urina, realização de exames clínicos e aplicação dos questionários.

Parte do sangue coletado foi encaminhado para análise laboratorial para determinações bioquímicas (glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol total (CT), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), LDL-C, HDL-C) e para realização do hemograma (Laboratório Tommasi, Vitória, Brasil).

Duas amostras de plasma EDTA (com e sem inibidor de proteases) foram armazenadas no biorrepositório ELSA – ES à -80° C para realização de experimentos futuros. Estas amostras foram utilizadas neste presente estudo para avaliação da modulação do SRAA e SCC circulante nesta população.

A primeira ou a segunda urina do dia e a urina das próximas 2h - 3h foram coletadas em seu volume total. Parte deste volume foi encaminhado para laboratório clínico para quantificação de sódio, potássio e creatinina (Laboratório Tommasi, Vitória, Brasil).

Duas alíquotas de 10 mL adicionadas de inibidor de proteases (Complete mini®, EDTA free (Roche)) foram armazenadas no biorrepositório ELSA – ES para realização de experimentos futuros. Estas foram utilizadas no presente estudo para avaliação da modulação do SRAA e SCC renal nesta população.

Foram também aplicados questionários para obtenção de dados gerais, demográficos, étnico-raciais, doenças previamente diagnosticadas, uso de medicamentos, prática de atividade física e padrão alimentar. Não puderam ser aplicados questionários sobre histórico familiar de doenças, dados neonatais e sobre a gestação, para evitar o constrangimento aos participantes quais não tinham contato com os genitores.

3.3.1 Avaliação antropométrica

Para as avaliações antropométricas, os participantes foram pesados descalços e vestindo apenas roupa de baixo em balança eletrônica (Toledo, Brasil) com precisão de 50g. Além da medida de peso, também foi avaliada a porcentagem de gordura corporal, massa magra (MM) (Kg) e massa gorda (MG) (Kg) por bioimpedância. A estatura dos participantes foi medida com estadiômetro (Seca GmBH & Co, Alemanha) com 0,1 cm de precisão, as medidas foram tomadas com o participante em pé com a cabeça em posição de Frankfurt. A circunferência de cintura foi medida no plano horizontal entre a crista ilíaca e a última costela com fita métrica com 0.1 cm de precisão (152, 153). A avaliação do estadiamento puberal foi feita utilizando método de Tanner (154).

3.3.2 Aferição da pressão arterial

Após 5 minutos de repouso, na posição sentada, a pressão arterial foi aferida no braço esquerdo com monitor digital de pressão arterial de braço (Omrom 705CP, intellisense, JAPAN) já validado em estudos populacionais (155). Três medidas foram tiradas com intervalo de 1 minuto entre elas. A primeira medida era descartada e fazia-se a média da segunda e terceira medidas, em caso de diferença maior do que 5 mmHg uma quarta medida era tomada e considerava-se as mais próximas para a média (153).

Também foi aferida a velocidade de onda de pulso (VOP), a pressão arterial de decúbito e realizado o eletrocardiograma de repouso, como descrito em detalhes por Zaniqueli et al., 2017 (153). Em resumo, os participantes foram colocados confortavelmente em posição supino por 5 minutos, foi então aferida a pressão arterial de decúbito sempre no braço direito e uma única vez, também foi mensurada a distância em centímetros entre o pulso femoral e a fúrcula (distância femoral). Para mensuração da VOP dois transdutores foram posicionados, ambos do lado direito, um na arterial carótida e um na artéria femoral (virilha), um software dedicado (Complior, SP; Artech Medical, Pantin, France) captava o intervalo de tempo em segundos entre o início da onda de pulso na carótida e o início da onda de pulso na artéria femoral, foram coletadas 15 medidas consecutivas e as 10 mais próximas foram utilizadas para o cálculo da média, esse valor era dividido pela distância femoral e resultava na VOP.

3.4 Separação dos grupos de estudo

Utilizando os dados antropométricos coletados foi calculado o IMC (peso (Kg)/[altura (m)]²). Uma vez obtido o IMC o valor foi ajustado de acordo com sexo e idade nos gráficos de percentil do IMC para classificação dos percentis nas categorias; BP, EU, SP e OB de acordo com os pontos de corte estipulados pelo *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC), 2014 (5) (Tabela 1) e utilizando a calculadora *Pediatric Z-score Calculator do Children's Hospital of Philadelphia*. A classificação nutricional das crianças e adolescentes participantes no estudo também foi feita através do Z-escore do IMC de acordo com os pontos de corte estipulados pela *World Health Organization* (WHO), 2006 (156) (Tabela 1), os cálculos foram feitos utilizando a mesma calculadora.

Tabela 1. Valores de referência para determinação do estado nutricional em crianças e adolescentes de 2 a 19 anos utilizando as curvas de IMC para idade e sexo e valores de z-escore do IMC.

Valor encontrado na criança		Classificação
< Percentil 5	< Escore z-2	Baixo Peso
≥ Percentil 5 e < Percentil 85	≥ Escore z-2 e < Escore z+1	Eutrófico
≥ Percentil 85 e < Percentil 95	≥ Escore z+1 e < Escore z+2	Sobrepeso
≥ Percentil 95	≥ Escore z+2 e < Escore z+3	Obeso

Nota: A tabela apresenta os pontos de corte para classificação nutricional de crianças e adolescentes por percentil do IMC e Z-escore do IMC. Os pontos de corte do percentil do IMC para as categorias Baixo Peso, Eutrófico, Sobrepeso e Obeso estão de acordo com estipulado pelo CDC, 2014. Os pontos de corte para o Z-escore nas mesmas categorias estão de acordo com estipulado pela WHO, 2006.

Também foi calculada a razão cintura estatura (RCE) (Equação 1) um indicador de obesidade e de distribuição de gordura central associada a risco de doença cardiovascular. Os valores foram classificados em normal (RCE < 0,5) e risco cardiovascular aumentado (RCE ≥ 0,5) (157).

Equação 1. Cálculo da Razão de Cintura por Estatura (RCE).

$$RCE = \frac{\text{Circunferência da Cintura (cm)}}{\text{Estatura (cm)}}$$

3.5 Concentração e diálise de urina

Com intuito de obter concentração de proteína urinária suficiente para determinação da expressão e da atividade enzimática, as urinas foram concentradas e dialisadas usando adaptação de protocolo descrito por Hattori et al., (51). As amostras foram descongeladas e o pH corrigido para 8 através da adição de tampão TRIS 1 mol/L. Posteriormente os 20 mL de cada amostra foram centrifugados em tubo com membrana semipermeável de aproximadamente 30KDa (Amicon®), até que restasse apenas 2 mL de urina contendo as proteínas com peso molecular acima de 30KDa, para obtenção de uma urina 10 vezes concentrada. Posteriormente, as amostras foram dialisadas com tampão TRIS-HCL pH 8, o volume de 1 mL desta urina foi aliquoteado para as análises de atividade enzimática. Os 1 mL restantes foram dialisados com água deionizada para retirada de sal, após a lavagem o volume de 1 mL foi aliquoteado para as análises de *western blotting*.

3.6 Mensuração da atividade enzimática

3.6.1 Atividade da ECA

A atividade da ECA na urina foi determinada por método fluorimétrico, utilizando os substratos, Z-Phe-His-Leu-OH (Z-FHL) e hipuril-His-Leu-OH (h-HL) que é mais específico para o C-domínio, ambos foram diluídos em tampão borato (158, 159). Após incubação de 50µL de amostra com substrato à 37°C, a reação foi interrompida com NaOH 0,28M, a porção His-Leu liberada por ação enzimática reagiu com o marcador fluorescente *orto*-ftaldialdeído, formando um composto fluorescente, a reação foi interrompida após 10 minutos com HCl 3N. A leitura foi realizada em microplaca em espectrofluorímetro (Infinite® 200 PRO, Tecan™), com comprimento de onda (λ) de excitação 360nm e λ de emissão de 465nm. Os cálculos foram feitos com base na curva padrão do dipeptídeo His-Leu. Os valores expressos em nmol/min/mL foram corrigidos pela concentração de creatinina urinária resultando em nmol/min/mg de creatinina. Foi calculada a razão Z-FHL/h-HL da atividade da ECA de cada participante (Equação 2).

Equação 2. Cálculo da razão da atividade da ECA

Razão da atividade da ECA

$$= \frac{\text{atividade da ECA com Z – FHL nmol/min/mg de creatinina}}{\text{atividade da ECA com h – HL nmol/min/mg de creatinina}}$$

3.6.2 Atividade da ECA2

A atividade enzimática da ECA2 na urina foi determinada fluorimetricamente, utilizando Mca-APK-Dnp como substrato fluorogênico (160, 161), este foi diluído em tampão apropriado (Tris 75 mM, NaCl 1M, pH 6,5, captopril 10 µM, ZnCl₂ 0,5 mM, Complete mini EDTA free). As amostras (50µL) foram incubadas à 37°C com o substrato na presença ou ausência de inibidor específico DX600 e as leituras foram realizadas no tempo zero e de forma cíclica a cada 2 minutos no espectrofluorímetro (Infinite® 200 PRO, Tecan™), no λ de excitação de 320nm e no λ de emissão de 420nm e temperatura 37 °C. Os cálculos foram feitos com base na curva padrão do controle fluorogênico Omni MMP™ (nas concentrações de 0,0125µM à 0,800 µM), descontando o sinal do tempo zero, subtraindo a atividade na presença de inibidor específico e considerando o tempo de maior atividade. Os valores foram expressos em µM/min/mL e depois corrigidos pela concentração de creatinina urinária resultando em µM/min/mg de creatinina.

3.6.3 Atividade da renina

Para mensuração da atividade da renina na urina e no plasma foi utilizado o tetradecapeptídeo, Abz-DRVYIHPFHLVYS-EDDnp, como substrato fluorogênico em protocolo adaptado de Rosa et al., (39). As amostras foram incubadas previamente com tampão para ensaio sem inibição específica (Tris HCl 50 mM, Captopril 10 µM, Pepstatina 20nM, Complete Mini, pH 7.5) e com inibição específica (Tris HCl 50 mM, Captopril 10 µM, Pepstatina 20µM, Complete Mini, Alisquireno 100µM, pH 7.5) à 37°C, para adesão dos inibidores. O substrato foi então adicionado. As leituras foram feitas de forma cíclica no tempo zero e a cada 2 minutos, por 40 minutos, no espectrofluorímetro, no λ de excitação de 320nm e no λ de emissão de 420nm,

temperatura 37°C. Os cálculos para atividade da renina na urina foram feitos da mesma forma descrita para ECA2 (Item 3.6.2). Para a atividade da renina plasmática foram considerados os valores em $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$.

3.6.4 Atividade da Catepsina D

A atividade da CatD na urina foi feita utilizando método fluorimétrico (39). As amostras de urina (50 μL) foram incubadas previamente com tampão acetato de sódio 50mM (pH 4,0), Complete Mini e com ou sem o inibidor específico (Pepstatina 20 μM), por 8 minutos. Depois foi adicionado o peptídeo Abz - AIAFFSRQ - EDDnp e realizada a leitura cíclica a cada 10 minutos, por 2 horas, no λ de excitação 320nm e no λ de emissão de 420nm, temperatura 37°C. Os cálculos de velocidade de reação foram feitos da mesma forma como descrito para ECA2 (item 3.6.2). Um piloto para mensuração da atividade da CatD plasmática foi realizado, mas não foi detectada atividade.

3.6.5 Atividade da NEP

A mensuração da atividade da NEP urinária foi feita utilizando método fluorimétrico adaptado de Rosa et al., (39). O volume de 50 μL de urina foi incubado previamente, por 10 minutos, com tampão Tris 50mM (pH 7,4), ZnCl_2 , Captopril 10 μM , com e sem o inibidor específico (Thiorphan 2 μM). Depois foi adicionado o peptídeo Abz - (d)Arg-Gly-Leu - EDDnp e realizada a leitura cíclica no tempo zero e a cada 2 minutos, por 40 minutos, no λ de excitação de 320nm e no λ de emissão de 420nm, temperatura 37°C. Os cálculos de velocidade foram feitos como descrito para ECA2 no item (3.6.2).

3.6.6 Atividade da quimase

A atividade enzimática da quimase na urina foi determinada por método fluorimétrico (39). As amostras de urina foram incubadas previamente, por 12 minutos, com tampão Tris 0,1 M (pH 7.5), NaCl 0,1 M, Captopril 10 μM e com ou sem o inibidor específico (quimiostatina 100 μM). Depois foi adicionado o peptídeo Abz – AIKFFSAQ– EDDnp e realizada a leitura no tempo zero e cíclica a cada 5 minutos,

por 60 minutos, no λ de excitação de 320nm e no λ de emissão de 420nm, temperatura 37°C. Os cálculos de velocidade foram feitos como o descrito para ECA2 (item 3.6.2).

3.7 Depuração de albumina no plasma

O plasma precisou ser tratado previamente à análise de *western blotting*, foram selecionadas 80 amostras de plasma, sendo 20 de cada grupo, as amostras foram depletadas de albumina utilizando o método de cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC). Resumidamente, as amostras diluídas em tampão fosfato (KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0) eram injetadas no aparelho de FPLC (AKTA™, GE HealthCare) acoplado à coluna de afinidade pela albumina (HiScreen™ Blue FF, GE HealthCare). A fase móvel A (KH_2PO_4 50 mM, pH 7,0) era utilizada para equilibrar a coluna e permitia a eluição das proteínas e retenção de albumina na coluna. Assim, o volume referente ao primeiro pico cromatográfico (tempo de eluição 1 a 10 minutos) foi coletado e após início da corrida com fase móvel B (KH_2PO_4 50 mM, KCl 1,5 M, pH 7,0) a albumina retida era eluída gerando um segundo pico cromatográfico, o volume referente a esse pico era descartado (tempo de eluição a partir de 10 minutos) (Figura 6). Foi feita a dosagem de proteína das amostras de plasma depletado de albumina assim como já descrito no item 3.6 e alíquotas para render 50 μg de proteína foram liofilizadas.

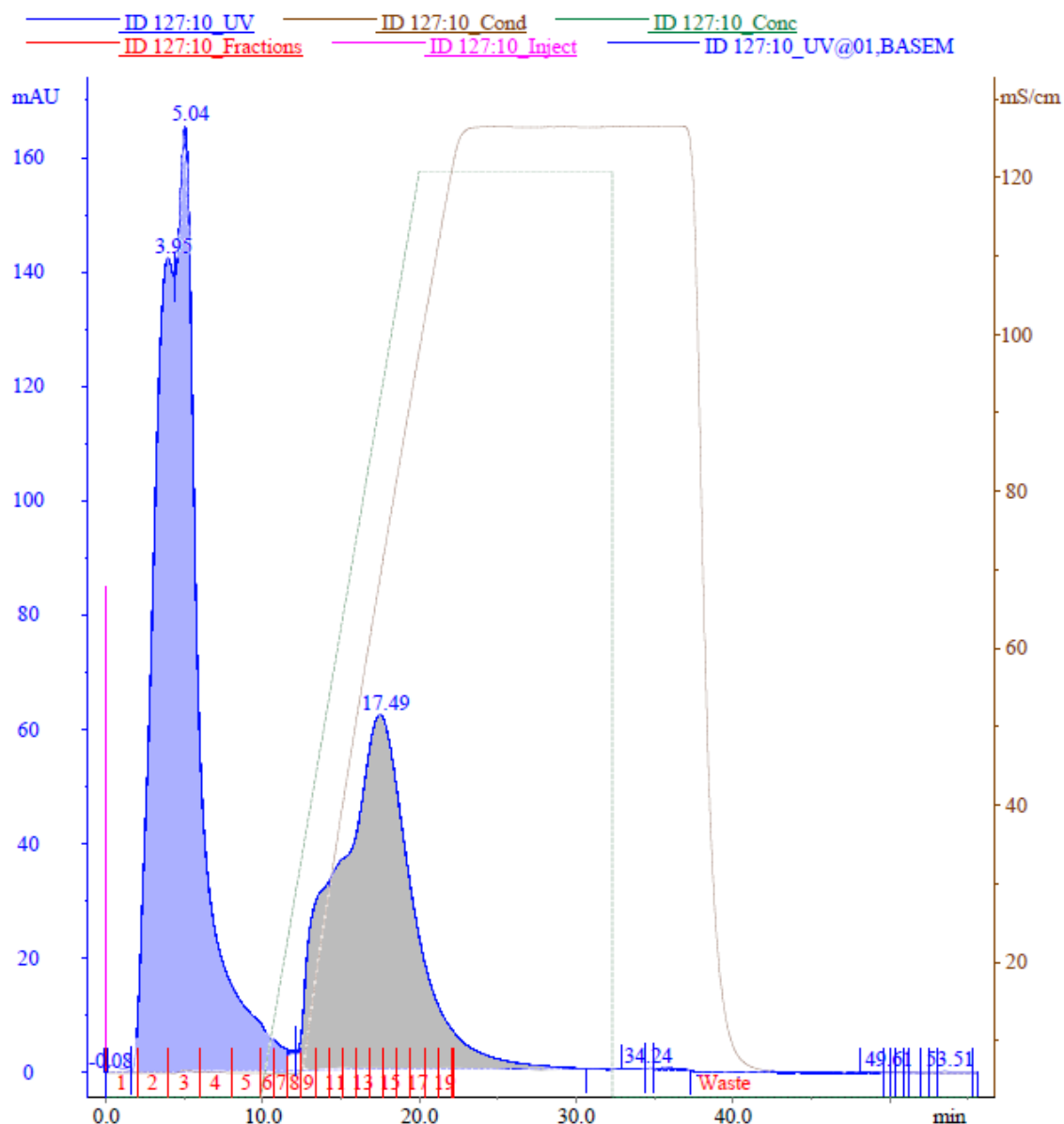


Figura 6. Cromatograma de depleção de albumina no plasma. O primeiro pico em azul é referente as proteínas de interesse, o segundo pico em cinza é referente a albumina. Os números em vermelho são referentes aos tubos de coleta.

3.8 Quantificação das proteínas totais e liofilização

A quantificação de proteínas nas amostras de urina e plasma foi necessária para controle do processo de concentração e diálise de urina (item 3.5) e do processo de depuração de albumina no plasma (item 3.7). Foi utilizado método descrito por Bradford (162), onde as proteínas reagem com azul brilhante de *Coomassie* produzindo coloração azul em intensidade proporcional a sua concentração, essa

intensidade foi mensurada por espectrofotômetro com leitor de microplaca (Infinite® 200 PRO, Tecan™) no λ 595 nm. A curva padrão foi realizada utilizando albumina de soro bovino nas concentrações de 0,025 mg/mL a 1 mg/mL.

Para cada amostra de plasma depurado de albumina e de urina concentrada e dialisada com TRIS-HCl e água deionizada, o volume equivalente a 50 μ g de proteína foi aliquoteado. As alíquotas foram secas em um concentrador a vácuo (CentriVap, Labconco®) à temperatura de 30 °C por 1 hora ou até secagem.

3.9 Determinação da expressão das enzimas

A determinação da expressão das enzimas nas amostras de urina e plasma foi realizada separadamente por eletroforese (SDS-PAGE) (163) e *western blot*. Foram utilizadas 50 μ g de proteína liofilizada, destacando que cada gel continha amostras dos quatro grupos classificados por pIMC. Para marcação do peso molecular foi utilizado marcador Rainbow® full range (Amersham). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) utilizando método de transferência molhada. Após a transferência, a proteína total presente na membrana foi determinada pela coloração de Ponceau (164). As membranas foram cortadas na altura de 55 KDa e foi aplicada solução de descoloração para Ponceau. Em seguida, as membranas foram bloqueadas utilizando 5,0% de leite desnatado (Molico®) em tampão TBST ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ 0,1M, NaCl 2,5 M, Tween® 0,05%), pH 7,5) à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, foi realizada a incubação *overnight* à 4°C com os anticorpos primários Y1 [1:1000] (*In house*), H175 [1:500] (Santa Cruz), H321 [1:5000] (Santa Cruz), H105 [1:500] (Santa Cruz), EPR3057Y [1:5000] (Abcam), E-AB-33393 [1:1000] (Elabscience) que reagem especificamente contra ECA, ECA2, NEP, renina, CatD e quimase, respectivamente. Após as lavagens com TBST. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário; anti-rabbit HRP (Amersham) em temperatura ambiente por 1 hora e meia. A detecção da proteína de interesse foi realizada pelo método de quimiluminescência no fotodocumentador Amersham Imager 600® utilizando mistura de luminol e peróxido sobre a membrana (Kit ECL Select®, Amersham) de acordo com instruções do fabricante.

A análise da expressão das enzimas foi realizada no *software* Image Lab® (BioRad) utilizando a proteína total (Ponceau) para normalização.

3.10 Análise estatística

Os resultados para as variáveis contínuas com distribuição normal foram expressos como média e desvio padrão, valores de mediana, quartis e erro padrão da mediana foram usados para resumir variáveis quando aplicável.

Para análise inferencial das variáveis numéricas com distribuição normal, foram aplicados testes paramétricos tais como *T student* (comparação de dois grupos) e ANOVA (comparação de múltiplos grupos). A comparação dos grupos para variáveis numéricas com distribuição outra foi realizada por testes não paramétricos como, Man-Whitney (comparação de dois grupos) e Kruskal – Wallis ou Mood's Median teste (comparação de múltiplos grupos).

Para comparação de variáveis categóricas foi utilizado teste Qui-quadrado ou exato de Fisher, de acordo com os pressupostos.

Foi considerado intervalo de confiança de 95% e os dados que apresentaram um valor de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e quando havia mais de dois grupos foi realizado o teste de post-hoc mais indicado para avaliar entre quais grupos existia diferença.

Correlações entre variáveis quantitativas foram avaliadas pelo teste Spearman. E para análise de regressão linear simples foram verificados os pressupostos de normalidade, ausência de *outliers* que arrastem a média, homoscedasticidade e independência dos resíduos. Todas as análises foram executadas no programa *R statistics*.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos grupos

No presente estudo, os participantes ($n = 360$) foram divididos por pIMC nas categorias baixo peso (BP) (15%), eutrófico (EU) (33%), sobrepeso (SP) (33%) e obeso (OB) (19%) (Figura 7). Além da classificação por pIMC também foi feita a classificação dos participantes nas categorias BP, EU, SP e OB de acordo com Z-escore do IMC que resultou em uma menor porcentagem de participantes nas categorias de extremidade; BP (9%) e OB (10%), e um maior número de participantes nas categorias intermediárias; SP (42%) e EU (39%) (Figura 7).

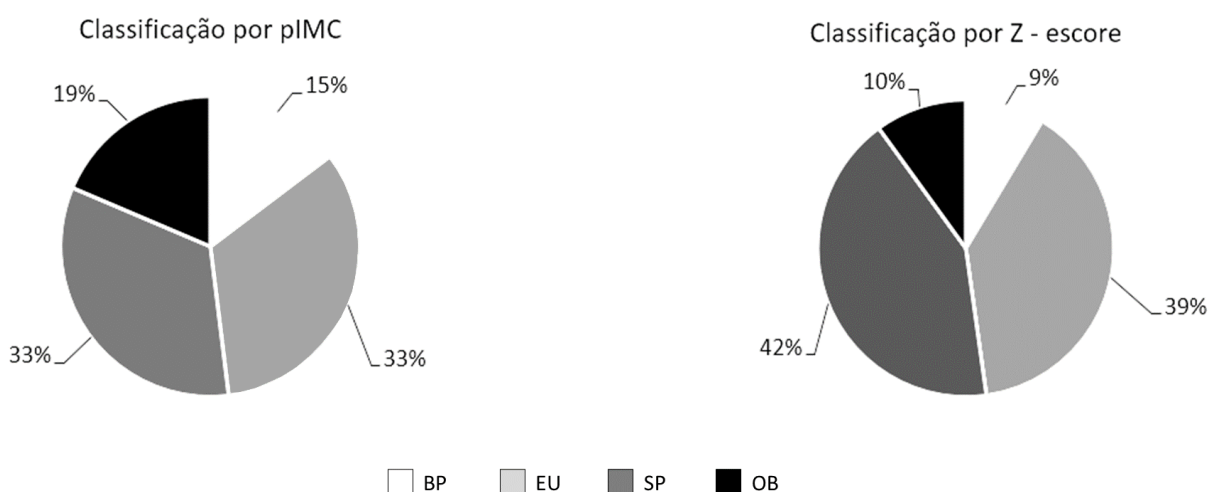


Figura 7. Distribuição dos participantes nos grupos classificados por pIMC vs classificação por Z-escore. A figura compara a distribuição dos participantes nas categorias BP, EU, SP e OB de acordo com a classificação por pIMC (à esquerda) e Z-score do IMC (à direita).

Na classificação por pIMC é possível determinar graus de obesidade, normalmente considera-se o percentil do IMC ≥ 99 como obesidade severa e alguns estudos sugerem que pIMC ≥ 97 já possa ser classificado como obesidade severa (165, 166). Na população estudada apenas 2 indivíduos apresentaram percentil > 99 e 38 apresentaram percentil > 97 . No entanto, o grupo obeso não foi subdividido.

Os participantes ($n = 360$) também foram divididos de acordo com a RCE; um método utilizado para avaliar gordura central e risco cardiovascular aumentado (157). Cerca de metade da população estudada (52%) apresentou uma RCE aumentada,

indicando maior risco cardiovascular (Figura 8A). Como esperado, ao estratificar dentro das categorias classificadas por pIMC (Figura 8B), vimos que houve diferença entre os grupos ($p < 0,01$), pois mais 95% dos pacientes que apresentaram RCE aumentado pertenciam as categorias SP e OB.

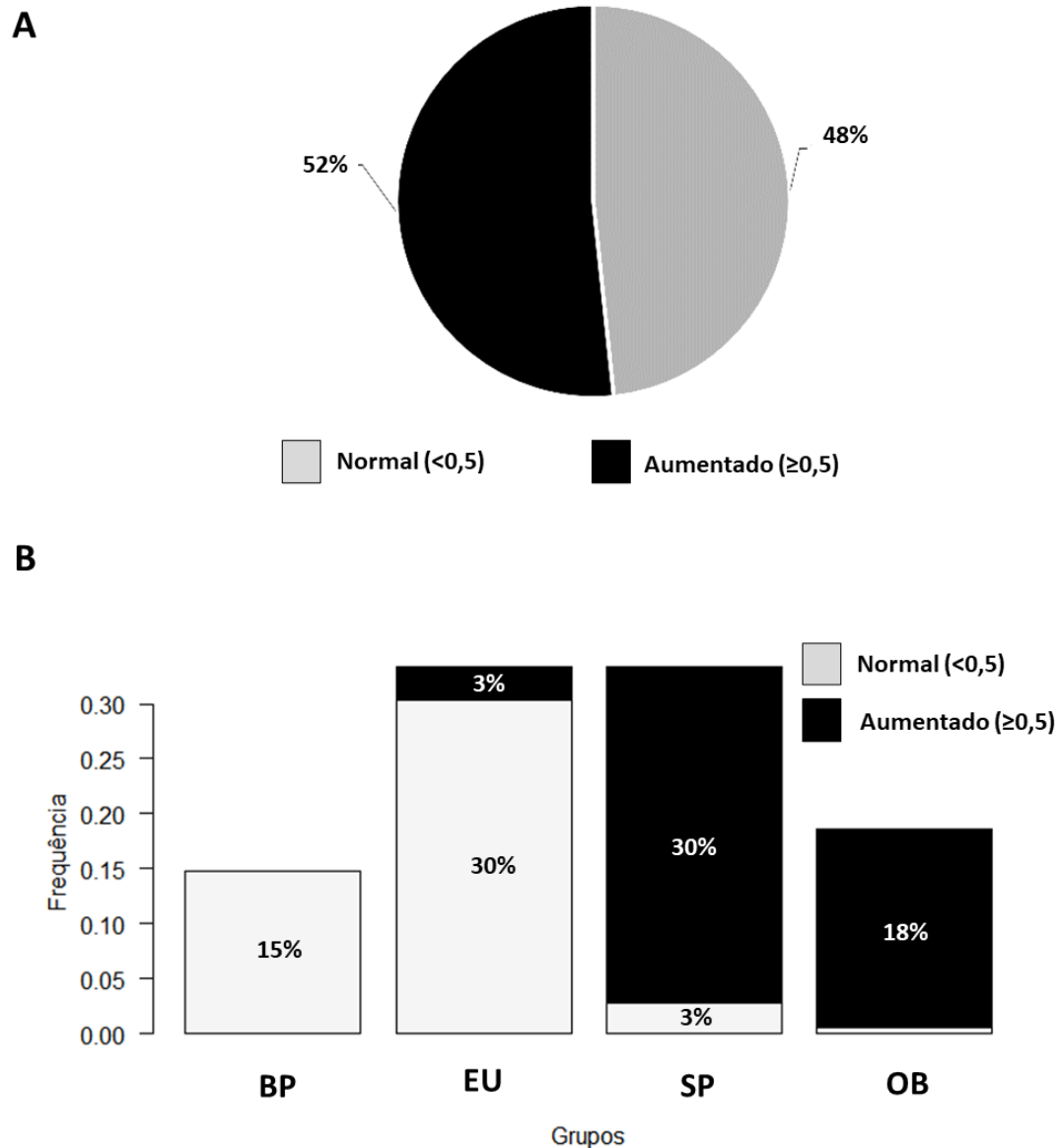


Figura 8. Avaliação de risco cardiovascular pela RCE na população estudada e nos grupos classificados por pIMC. A) Distribuição da população estudada nas categorias, risco cardiovascular aumentado e risco cardiovascular normal de acordo com a classificação do RCE. **B)** Distribuição dos participantes com risco cardiovascular aumentado e normal nos grupos classificados por pIMC. Teste exato de Fisher ($p < 0,01$).

A porcentagem de meninos (53%) foi superior à de meninas (47%) (Figura 9). Na estratificação entre as categorias classificadas por pIMC, notou-se que no grupo SP ocorreu inversão das proporções e havia maior número de meninas do que meninos ($p = 0,02$) quando comparado aos outros grupos (Figura 9).

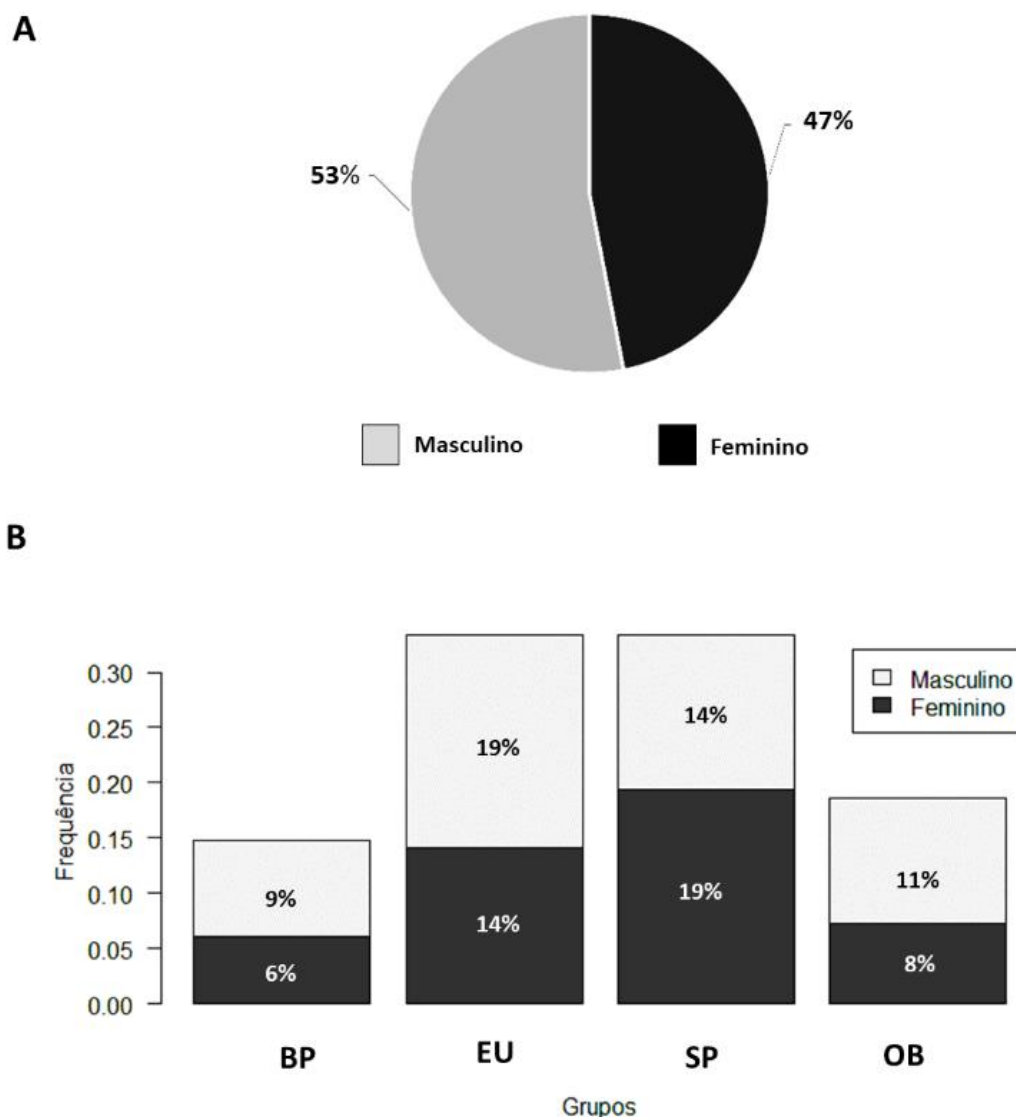


Figura 9. Distribuição dos participantes do sexo masculino e feminino nos grupos de estudo. A) Distribuição da população estudada de acordo com sexo nas categorias, feminino e masculino. **B)** Distribuição dos participantes do sexo masculino e feminino nos grupos classificados por pIMC. Teste exato de Fisher ($p=0,02$).

A idade média da população estudada foi de 11,6 anos e houve diferença na distribuição de idade entre os grupos classificados por pIMC, onde os indivíduos do

grupo EU eram mais velhos do que os participantes do grupo OB ($12,7 \pm 2,9$ vs $10,8 \pm 2,3$, $p < 0,01$) (Figura 10). Foi avaliado também os diferentes estágios do desenvolvimento sendo que, 29% dos participantes encontravam-se na pré-puberdade, 58% na puberdade, 10% na pós puberdade e 2% não foram avaliados (Figura 11A). Foi realizada a estratificação dos participantes em diferentes fases do desenvolvimento nos grupos classificados por pIMC e não houve diferença de distribuição entre os grupos ($p = 0,30$) (Figura 11B).

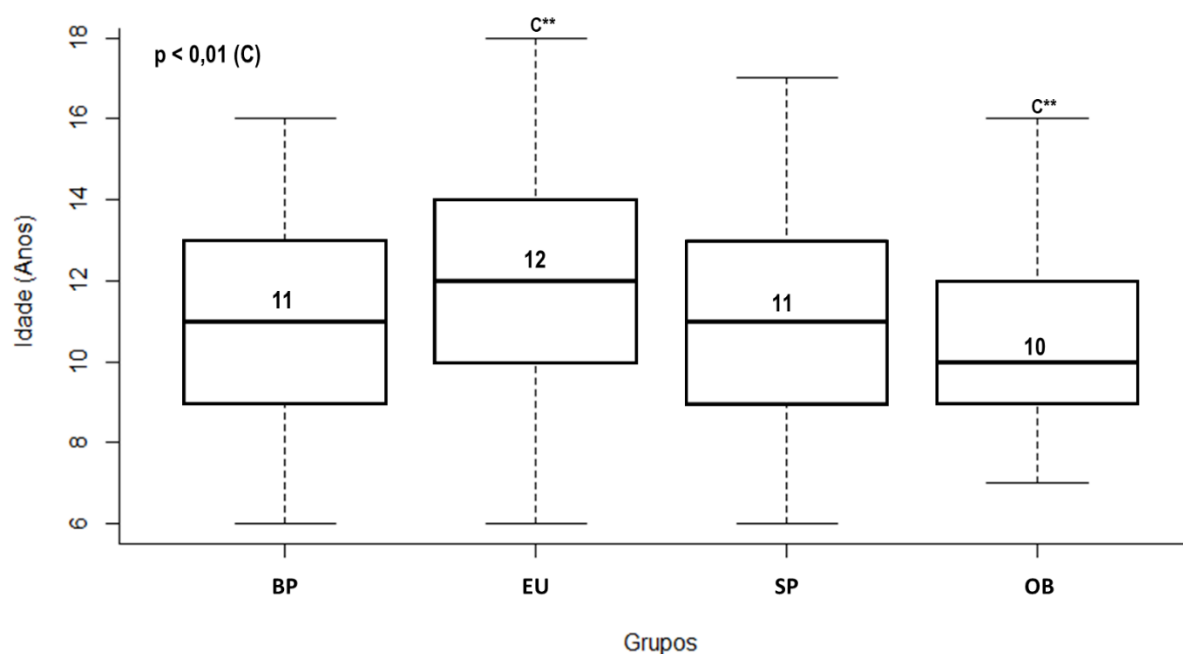


Figura 10. Distribuição de idade nos grupos classificados por pIMC. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Test e (C) $EU \neq OB$, $p < 0,01$.

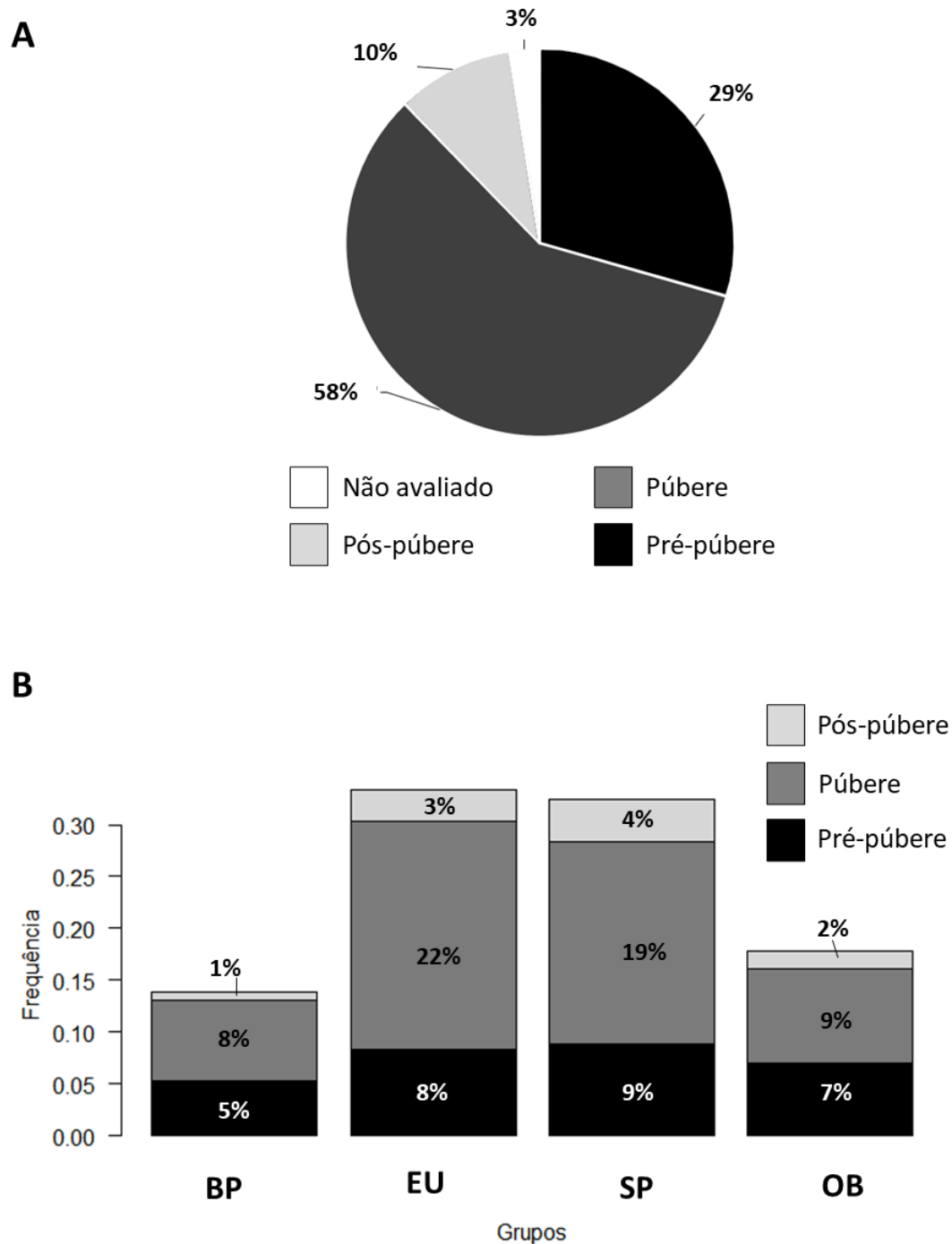


Figura 11. Distribuição dos participantes de acordo com o estadiamento puberal. A) Distribuição da população estudada nas categorias, pré – púbere, púbere, pós – púbere e não avaliado. B) Distribuição dos participantes de acordo com estágio do desenvolvimento nos grupos classificados com pIMC. Teste exato de Fisher ($p=0,30$).

Em relação a raça e cor, a maioria dos participantes eram pardos (56%), seguidos de pretos (24%), brancos (18%), indígenas (2%) e amarelos (0%) (Figura 12A). foi feita a avaliação da distribuição de raça e cor entre os grupos classificados por pIMC, e não houve diferença ($p = 0,85$) (Figura 12B).

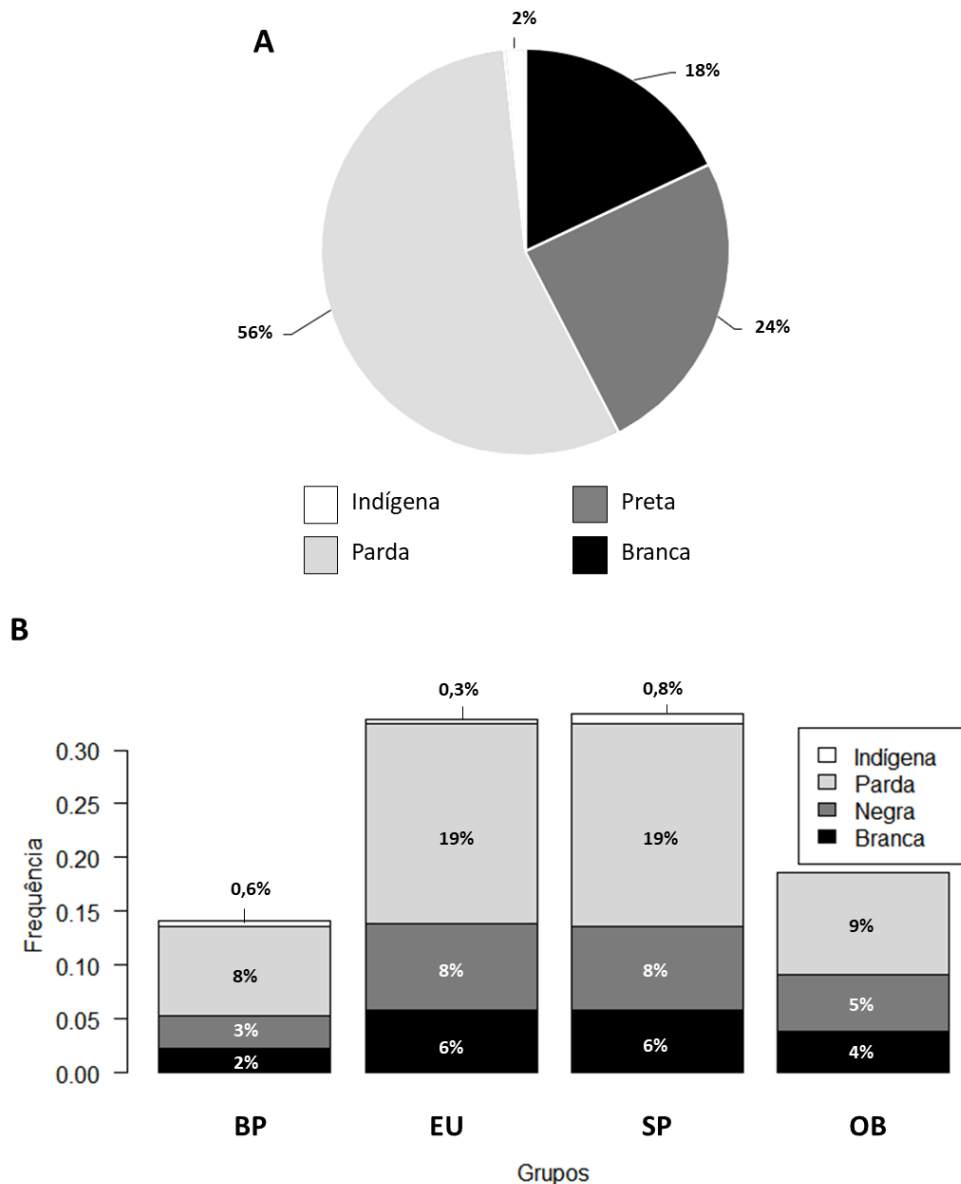


Figura 12. Distribuição dos participantes de acordo com a raça e cor. A) Distribuição de raça/cor na população estudada de acordo com autoavaliação. B) Distribuição dos participantes por raça e cor nos grupos classificados pelo pIMC. Teste exato de Fisher ($p=0,85$).

4.2 Avaliação antropométrica

As medidas de peso (Kg), IMC, pIMC, Z-escore do IMC, circunferência de cintura (cm), quadril (cm), MG (Kg) e porcentagem de gordura (%) foram maiores à medida que a massa corpórea aumentava e houve diferença estatística entre todos os grupos classificados por pIMC e o mesmo foi observado para o percentil de estatura (Tabela 2). Ainda, a massa MM (Kg) estava diminuída no grupo BP em relação aos outros grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros antropométricos nos grupos de estudo classificados por pIMC.

Variável	Grupos de estudo				Valor de p
	BP (n = 53)	EU (n = 120)	SP (n = 120)	OB (n = 67)	
Peso (Kg)	31,0±8,6	43,5±13,5	51,7±14,6	61,5±16,8	*p <0,01 (G)
IMC	14,2±1,2	18,1±2,5	22,5±2,6	26,7±2,4	*p <0,01 (G)
pIMC (%)	2,2±1,3	44,4±23,9	90,8±2,9	97,6±1,0	*p <0,01 (G)
Z-escore	-2,3±0,6	-0,2±0,7	1,4±0,2	2,1±0,2	*p <0,01 (G)
Estatura (cm)	145,1±15,9	152,2±16,3	149,5±14,1	150,2±12,8	¨p = 0,04 (A)
pEstatura (%)	43,3±28,2	53,3±27,7	63,6±24,9	77,6±21,0	¨p <0,01 (G)
Circ. Cintura (cm)	55,1±5,2	62,6±7,4	71,8±7,2	81,3±9,3	*p <0,01 (G)
Quadril (cm)	68,7±8,8	79,5±10,5	86,7±12,1	94,5±11,2	#p <0,01 (G)
ICQ	0,81±0,05	0,79±0,05	0,84±0,18	0,86±0,07	*p <0,01 (B,C,E,F)
RCE	0,40±0,02	0,41±0,03	0,49±0,03	0,53±0,08	*p<0,01 (A,C,E,F)
MM (Kg)	13,9±4,6	18,8±6,7	19,0±6,4	20,1±6,2	*p<0,01 (A,D,E)
MG (Kg)	4,2±1,6	8,4±4,8	16,4±5,6	24,6±7,9	*p <0,01 (G)
% gordura	13,7±3,6	19,0±7,5	31,7±5,3	39,5±5,0	*p <0,01 (G)

Nota: Valores representados em Média ± desvio padrão. *Mood's median test e Pairwise median test. ¨Kruskal-Wallis e Dunn's Test. #ANOVA e Tukey HSD. (A) EU ≠ BP, (B) EU ≠ SP, (C) EU ≠ OB, (D) BP ≠ SP, (E) BP ≠ OB, (F) SP ≠ OB, (G) Todos os grupos diferem entre si.

As variáveis antropométricas também foram avaliadas nos grupos classificados pela RCE. Todos os parâmetros, exceto a estatura (cm), apresentaram diferença significativa, sendo maiores no grupo com RCE aumentado (Tabela 3).

Tabela 3. Análise dos parâmetros antropométricos nos grupos classificados pela RCE.

<i>Variável</i>	<i>Grupos de estudo</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>RCE Normal</i> (<i>n</i> = 174)	<i>RCE Aumentado</i> (<i>n</i> = 186)	
Peso (Kg)	40,4±14,7	54,6±15,8	*p <0,01
IMC	17,2±3,4	23,8±3,4	*p <0,01
pIMC (%)	32,3±29,1	92,7±4,9	*p <0,01
Z-escore	-0,79±1,3	1,59±0,4	*p <0,01
Estatura (cm)	150,3±16,2	149,5±13,9	*p = 0,47
pEstatura (%)	51,6±27,9	67,4±25,5	*p <0,01
Circ. Cintura (cm)	60,0±7,0	75,4±9,2	*p <0,01
Quadril (cm)	76,4±11,4	89,3±12,4	*p <0,01
ICQ	0,79±0,05	0,86±0,15	*p <0,01
RCE	0,40±0,03	0,52±0,04	*p <0,01
MM (Kg)	17,5±6,6	19,2±6,4	*p = 0,01
MG (Kg)	7,6±5,9	19,0±7,4	*p <0,01
% gordura	17,7±7,3	34,3±6,7	*p <0,01

Nota: valores representados em Média ± desvio padrão. * Man Whitney teste. **T-test.

Como esperado, a variável sexo interferiu em algumas medidas antropométricas, devido a diferenças fisiológicas de composição corporal. A MM (Kg) era maior nos indivíduos do sexo masculino (19,2 vs 17,4, p=0,05), a porcentagem de gordura era maior nas meninas do que nos meninos (29,2 vs 23,7, p<0,01) e o índice de cintura e quadril (ICQ) era maior nos meninos (0,85 vs 0,80, p<0,01), a tabela completa está disponível nos apêndices (Apêndice 1).

4.3 Avaliação parâmetros bioquímicos e hematológicos

O estado nutricional interferiu nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. O sobrepeso e a obesidade contribuíram para maiores níveis de CT, VLDL-C, LDL-C e TG e houve diferença significativa entre os grupos SP e ou OB em relação aos grupos BP e ou EU (Tabela 4). Em contrapartida, os níveis de HDL-C encontravam-se diminuídos nos grupos SP e OB em comparação com os grupos EU e BP (Tabela 4), assim as razões entre as lipoproteínas e o HDL-C aumentaram gradativamente nos grupos de acordo com o pIMC (Tabela 4). No grupo OB, os valores médios de HDL-C são menores do que o considerado clinicamente desejado, os valores de TG estavam aumentados e a razão TG/ HDL-C estava aumentada (167) (Apêndice 2). Nos outros grupos os valores médios se encontram todos dentro da faixa clinicamente desejável para crianças e adolescentes (167) (Apêndice 2).

Além das diferenças do perfil lipídico, o marcador de inflamação e risco cardiovascular, o ácido úrico, estava aumentado nos grupos SP e OB quando comparado aos grupos BP e EU (Tabela 4), apesar da média de todos os grupos estar dentro de uma faixa clinicamente normal (168) (Apêndice 3). Ainda, os níveis do indicador de metabolismo muscular, a creatinina sérica, encontravam-se aumentados no grupo EU quando comparado aos grupos BP e OB (Tabela 4), os valores médios de creatinina sérica para ambos os grupos estavam dentro do clinicamente aceito (168) (Apêndice 3). Valores de glicemia e ureia sérica não diferiram entre os grupos (Tabela 4).

O estado nutricional também influenciou nos parâmetros hematológicos, a diminuição de parâmetros como, porcentagem de hemoglobina e hematócrito são observados na anemia e desnutrição e estes parâmetros estavam diminuídos nos grupos BP, SP e OB em comparação ao grupo EU ($p < 0,01$) (Tabela 4). Adicionalmente, um maior número de plaquetas, fator associado a aterosclerose e trombose, estava presente no grupo OB em comparação ao grupo EU ($p = 0,03$) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos e hematológicos nos grupos de estudo classificados por pIMC.

Parâmetros bioquímicos					
Variável (mg/dL)	Grupos de estudo				Valor de p
	<i>BP</i>	<i>EU</i>	<i>SP</i>	<i>OB</i>	
	(n = 50)	(n = 118)	(n = 120)	(n = 65)	
CT	137,0±25,5	145,0±30,0	149,0±28,6	152,9±28,8	*p = 0,03 ^(E)
HDL-C	50,4±8,6	49,6±9,2	46,0±9,9	42,8±8,8	*p <0,01 ^(B, C, D, E)
LDL-C	69,7±21,6	78,0±27,0	83,9±24,3	90,0±27,7	*p <0,01 ^(C, D, E)
VLDL-C	17,3±4,7	17,8±4,2	19,9±4,5	22,5±5,3	*p <0,01 ^(B, C, D, E, F)
TG	61,7±23,0	66,3±27,0	77,1±27,6	98,9±42,8	*p <0,01 ^(B, C, D, E, F)
CT/ HDL-C	2,8 ± 0,6	3,0 ± 0,6	3,3 ± 0,7	3,7 ± 0,8	ˆp <0,01 ^(G)
LDL-C/HDL-C	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,9 ± 0,6	2,2 ± 0,8	ˆp<0.01 ^(A, B, C, D, E)
TG/ HDL- C	1,3 ± 0,6	1,4 ± 0,7	1,8 ± 0,8	2,5 ± 1,5	ˆp<0.01 ^(B, C, D, E, F)
Glicose sérica	82,7±9,1	85,1±8,7	84,5±8,5	84,5±8,4	*p = 0,33
Ácido úrico	3,6±0,9	4,1±1,2	4,3±1,4	4,5±0,9	*p <0,01 ^(C, D, E)
Ureia sérica	21,6±5,3	22,3±5,1	22,3±5,3	21,1±4,3	*p = 0,51
Cr sérica	0,52±0,12	0,59±0,14	0,55±0,15	0,53±0,12	*p <0,01 ^(A, C)
Parâmetros hematológicos					
Variável	Grupos de estudo				Valor de p
	<i>BP</i>	<i>EU</i>	<i>SP</i>	<i>OB</i>	
	(n = 50)	(n = 118)	(n = 120)	(n = 65)	
Hemácias (milhões/ mm ³)	4685±328	4833±414	4758±356	4824±366	p = 0,17
Hemoglobina (g/dL)	13,1±0,9	13,6±1,0	13,2±1,0	13,0±0,9	p <0,01 ^(A, B, C)
Hematócrito	39,5±2,5	41,1±3,2	39,9±2,9	39,5±3,2	p <0,01 ^(A, B, C)
Plaquetas (milhões/mm ³)	259,3±71,1	256,7±67,5	274,5±65,7	277,8±55,1	p = 0,03 ^(C)

Nota: Média ± Desvio Padrão. * Kruskal Wallis teste – Post hoc DunnTest. ˆMood's Median test – Post hoc Pairwise teste. (A) EU ≠ BP, (B) EU ≠ SP, (C)EU ≠ OB, (D) BP ≠ SP, (E) BP ≠ OB, (F) SP ≠ OB, (G) Todos os grupos diferem entre si.

Os parâmetros bioquímicos também foram avaliados nos grupos classificados por Z - escore (Apêndice 4) e os resultados foram muito similares aos descritos para pIMC.

Na avaliação de acordo com o risco cardiovascular e RCE (Tabela 5), os valores de CT, VLDL-C, LDL-C e TG foram estatisticamente maiores no grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado e os valores de HDL-C menores. Consequentemente as razões entre as lipoproteínas e o HDL-C estavam aumentadas no grupo com RCE aumentada (Tabela 5). Os valores de ácido úrico também foram maiores no grupo com RCE aumentada (Tabela 5). Mas, diferente do observado nos grupos classificados por pIMC não houve diferença em relação a creatinina sérica.

A classificação por RCE diluiu a diferença em relação a hemoglobina e hematócrito já que de forma geral o grupo com RCE normal incluiu os indivíduos EU e BP, assim não houve diferença entre os grupos (Tabela 5). Já o número de plaquetas foi significativamente maior nos indivíduos com RCE aumentada (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos e hematológicos nos grupos de estudo classificados pela RCE.

Parâmetros bioquímicos			
Variável (mg/dL)	Grupos de estudo		Valor de p*
	RCE Normal (n = 167)	RCE Aumentado (n = 184)	
CT	141,2±27,4	151,6±29,5	$p < 0,01$
HDL-C	49,6±8,9	45,0±9,8	$p < 0,01$
LDL-C	74,2±24,4	87,3±26,3	$p < 0,01$
VLDL-C	17,8±4,6	20,7±4,8	$p < 0,01$
TG	65,2±27,2	84,5±34,4	$p < 0,01$
CT/HDL-C	2,9 ± 0,6	3,5 ± 0,8	$p < 0,01$
LDL-C/HDL-C	1,5 ± 0,5	2,0 ± 0,7	$p < 0,01$
TG/HDL-C	1,4 ± 0,7	2,0 ± 1,1	$p < 0,01$
Glicose	84,4±8,1	85,0±11,6	$p = 0,64$
Ácido úrico	3,9±1,1	4,4±1,3	$p < 0,01$
Ureia sérica	22,3±5,1	21,7±5,1	$p = 0,25$
Cr sérica	0,57±0,15	0,56±0,18	$p = 0,23$

Parâmetros hematológicos			
Variável	Grupos de estudo		Valor de p
	RCE Normal (n = 167)	RCE Aumentado (n = 184)	
Hemácias (milhões/ mm ³)	4695±397	4760±358	*p = 0,12
Hemoglobina (g%)	13,4±1,0	13,2±1,0	ˆp = 0,11
Hematócrito	40,5±3,1	39,9±3,1	*p = 0,06
Plaquetas (mil/mm ³)	255,8±65,1	277,1±64,7	*p < 0,01

Nota: Média ± Desvio Padrão. * Man Whitney teste. ˆ Teste T.

O sexo dos participantes não influenciou nos parâmetros bioquímicos avaliados, com a exceção da ureia sérica que foi maior nos meninos (22,8±4,9 vs 21,0±5,1, p<0,01), tabela completa disponível nos apêndices (Apêndice 5).

4.4 Avaliação cardiovascular

Assim como para o IMC, a avaliação da pressão arterial em crianças e adolescentes é feita através do percentil da pressão arterial sistólica (pPAS) e percentil da pressão arterial diastólica (pPAD) de acordo com idade, gênero e altura. Se o percentil de 3 medidas ocasionais for ≥95, a criança está com pressão arterial elevada, valores ≥90 e < 95 são limítrofes (169). Neste estudo, apenas três participantes apresentaram PAS e ou PAD elevada e apenas nove se encontravam na faixa limítrofe (dado não mostrado). Porém, a avaliação cardiovascular mostrou que a média dos valores pressóricos e da VOP aumentam gradualmente nos grupos classificados por pIMC (Tabela 6). Assim maiores níveis pressóricos foram encontrados nos grupos SP e OB, sendo que o grupo OB apresentou maior pPAS do que o grupo BP, e maior pPAD quando comparado ao grupo EU (Tabela 6). A frequência cardíaca e a VOP não apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 6). A avaliação dos parâmetros cardiovasculares por Z-escore apresentou resultados muito similares (Apêndice 6).

Ainda, em análise de regressão linear simples, a idade se mostrou um fator influente sobre a PAS (mmHg) (Apêndice 7), o grupo OB apresentou níveis

pressóricos maiores (Tabela 6), se os mesmos padrões comportamentais e fenótipo forem mantidos o grupo OB tem mais chance de atingir níveis hipertensivos precocemente.

Tabela 6. Parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados por pIMC.

Variável	Grupos de Estudo				Valor de p *
	BP (n = 53)	EU (n = 117)	SP (n = 120)	OB (n = 67)	
PAS mmHg	100,4±9,0	105,8±9,5	105,4±9,1	107,3±7,7	p <0,01 (A, D, E)
PAD mmHg	60,3±7,8	62,1±6,1	63,2±6,9	64,5±5,9	p < 0,01 (D, E)
pPAS	37,8±24,2	44,7±25,0	47,3±23,7	53,0±21,6	p <0,01 (E)
pPAD	46,3±22,9	47,3±18,6	52,0±20,8	55,4±18,8	p = 0,02 (C)
PAS dec.	109,7±11,6	115,4±12,2	115,7±11,5	117,7±10,6	p <0,01 (A, C, D, E)
PAD dec.	61,5±6,6	63,0±8,5	65,0±6,9	66,0±6,4	p <0,01 (C, D, E)
VOP	5,48±0,6	5,67±1,0	5,66±1,1	5,71±0,8	p = 0,59
FC bpm	74,3±11,0	73,2±13,1	74,6±11,1	75,8±10,6	p = 0,51

Nota: Média ± Desvio Padrão. *ANOVA unifatorial – Post hoc Tukey HSD. (A)EU ≠ BP, (B) EU ≠ SP, (C) EU ≠ OB, (D) BP ≠ SP, (E) BP ≠ OB, (F) SP ≠ OB, (G) Todos os grupos diferem entre si.

Houve diferenças significantes entre os grupos classificados pelo RCE e risco cardiovascular. Como esperado, o grupo com RCE aumentado apresentou valores aumentados em todos os parâmetros, exceto para a frequência cardíaca e a VOP (Tabela 7). Fazendo a análise de regressão linear da PAS (mmHg) pela idade nos grupos estratificados por RCE, verificou-se que houve influência da idade na PAS, mas os grupos mantêm níveis pressóricos similares ao longo do tempo (Apêndice 8).

Foi também feita a comparação entre os sexos e o sexo feminino apresentou maiores valores de PAD mmHg, pPAD e frequência cardíaca (Apêndice 9).

Tabela 7. Parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados pela RCE.

Variável (mg/dL)	Grupos de estudo		Valor de p*
	RCE Normal (n = 170)	RCE Aumentado (n = 187)	
PAS mmHg	103,9±9,9	106,2±8,4	p = 0,01
PAD mmHg	61,7±6,9	63,6±6,5	p < 0,01
pPAS	42,0±25,0	50,1±22,8	p < 0,01
pPAD	47,0±20,1	53,3±20,0	p < 0,01
PAS dec.	113,0±12,2	116,8±11,1	p < 0,01
PAD dec.	62,8±7,5	65,6±7,3	p < 0,01
VOP	5,59±0,9	5,69±1,0	p = 0,19
FC bpm	73,4±12,4	75,2±11,0	p = 0,06

Nota: Média ± Desvio Padrão. * Teste T.

4.5 Atividade e expressão das enzimas do SRAA e SCC

A ECA foi a enzima do SRAA e SCC mais influenciada pelo estado nutricional e ou pelo risco cardiovascular avaliado pela RCE. Na urina, três bandas distintas da ECA eram expressas nas membranas de PVDF, uma banda referente a sECA com 190 KDa, e duas referentes as isoformas N-domínio solúveis, uma com 90 KDa e outra com 65 KDa (Figura 13A). As bandas referentes as isoformas N-domínio solúveis não estavam presentes em todas as amostras, apenas 31,6% das amostras apresentavam ambas as isoformas, 14,7% apresentavam somente a nECA de 65 KDa, 14,7% apresentavam apenas a nECA de 90 KDa e 39,5% apresentavam apenas a banda referente a sECA. Ainda a presença de uma isoforma N-domínio da ECA era dependente da outra (Teste qui-quadrado, p < 0,01).

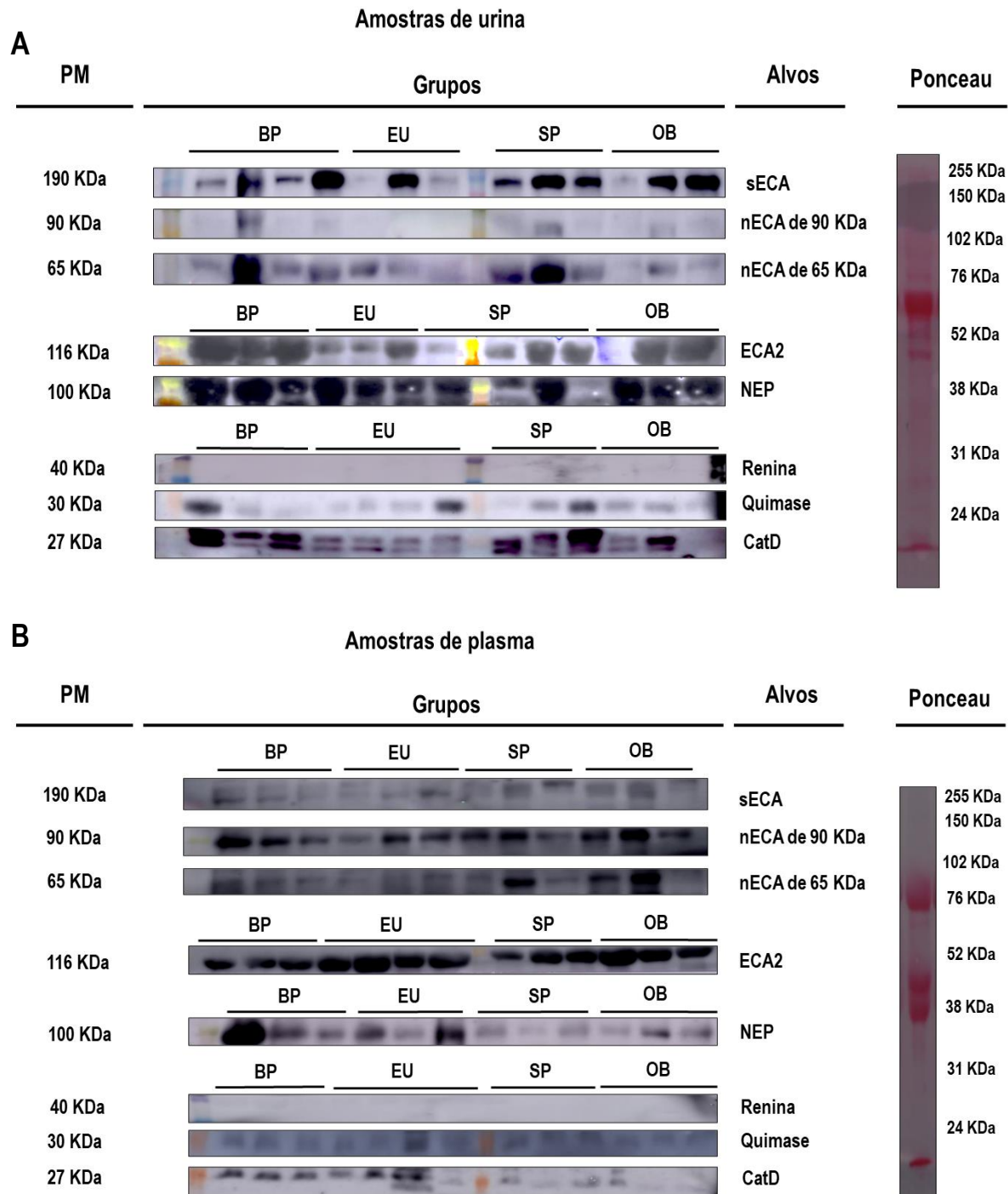


Figura 13. Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes. A) Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina dos participantes em membrana de PVDF e coloração de Ponceau característica das amostras de urina, também destaca como os grupos de estudo foram distribuídos nas membranas e o peso molecular (PM) qual a proteína de interesse (Alvo) foi ou deveria ser observada. Destacando que a ECA apresentou três bandas distintas, uma correspondente a sECA (190 KDa) e duas bandas correspondentes as isoformas N-domínio solúveis, uma com 90 KDa e a outra com 65 KDa. **B)** Expressão das enzimas do SRAA e SCC no plasma dos participantes em membrana de PVDF e coloração de Ponceau característica das amostras de plasma,

também destaca como os grupos de estudo foram distribuídos nas membranas e o peso molecular (PM) qual a proteína de interesse (Alvos) foi ou deveria ser observada. Destacando que a ECA apresentou três bandas distintas, uma correspondente a sECA (190 KDa) e duas bandas correspondentes as isoformas N-domínio solúveis, uma com 90 KDa e a outra com 65 KDa.

Nas amostras de urina avaliadas ($n = 207$), a expressão da sECA estava aumentada no grupo OB quando comparado com o grupo EU (0,530 vs 0,090 unidade arbitrária, $p=0,04$) (Figura 14A). Não houve diferença em relação a expressão da nECA de 65 KDa (Figura 14B). Houve tendência ($p=0,08$) de maior expressão da nECA de 90 KDa no grupo OB (Figura 14C). Ainda, não houve dependência entre a presença da nECA de 90 KDa e o estado nutricional (Figura 14D), assim como não houve dependência entre a presença da nECA de 65 KDa e o estado nutricional (Teste exato de Fisher, $p=0,58$) (Apêndice 10).

Nos grupos classificados pelo risco cardiovascular avaliado pela RCE, a expressão da sECA estava aumentada na urina dos participantes com risco cardiovascular aumentado (0,265 vs 0,090 unidade arbitrária, $p=0,046$) (Figura 15A). A expressão da nECA de 65 KDa não foi diferente entre os grupos (Figura 15B) e a expressão da nECA de 90 KDa também estava aumentada no grupo com risco cardiovascular aumentado (0,265 vs 0,130, $p=0,02$) (Figura 15C). Adicionalmente, a nECA de 90 KDa foi mais frequentemente encontrada no grupo com risco cardiovascular aumentado ($p=0,05$) e a mesma dependência não foi observada para nECA de 65 KDa (Teste exato de Fisher, $p=0,36$) (Apêndice 11).

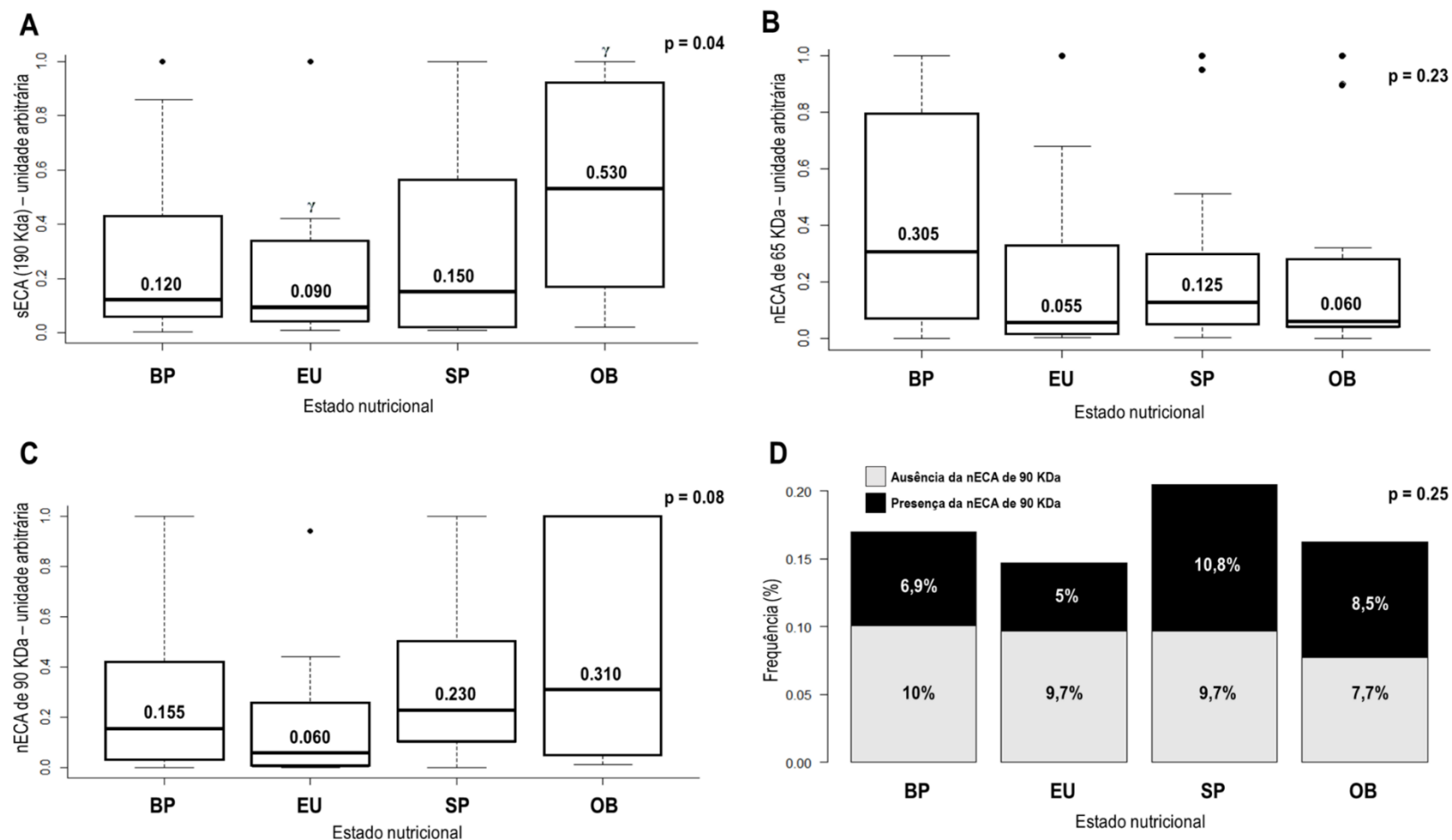


Figura 14. Expressão da ECA somática solúvel e das isoformas N-domínio solúveis da ECA na urina dos participantes nos grupos de estudo divididos por pIMC. A) Distribuição da expressão da ECA somática solúvel (sECA) - unidade arbitrária. Kruskal – Wallis seguido de Dunn's test, $p = 0,04$, γ EU $\neq$ OB. **B)** Expressão da isoforma N-domínio de 65KDa da ECA (nECA de 65 KDa). Kruskal – wallis, $p = 0,23$. **C)** Expressão da isoforma N-domínio de 90KDa da ECA (nECA de 90 KDa). Kruskal – wallis, $p = 0,08$. **D)** Presença da isoforma N-domínio de 90 KDa da ECA na urina dos participantes. Teste de dependência, teste exato de Fisher, $p = 0,25$.

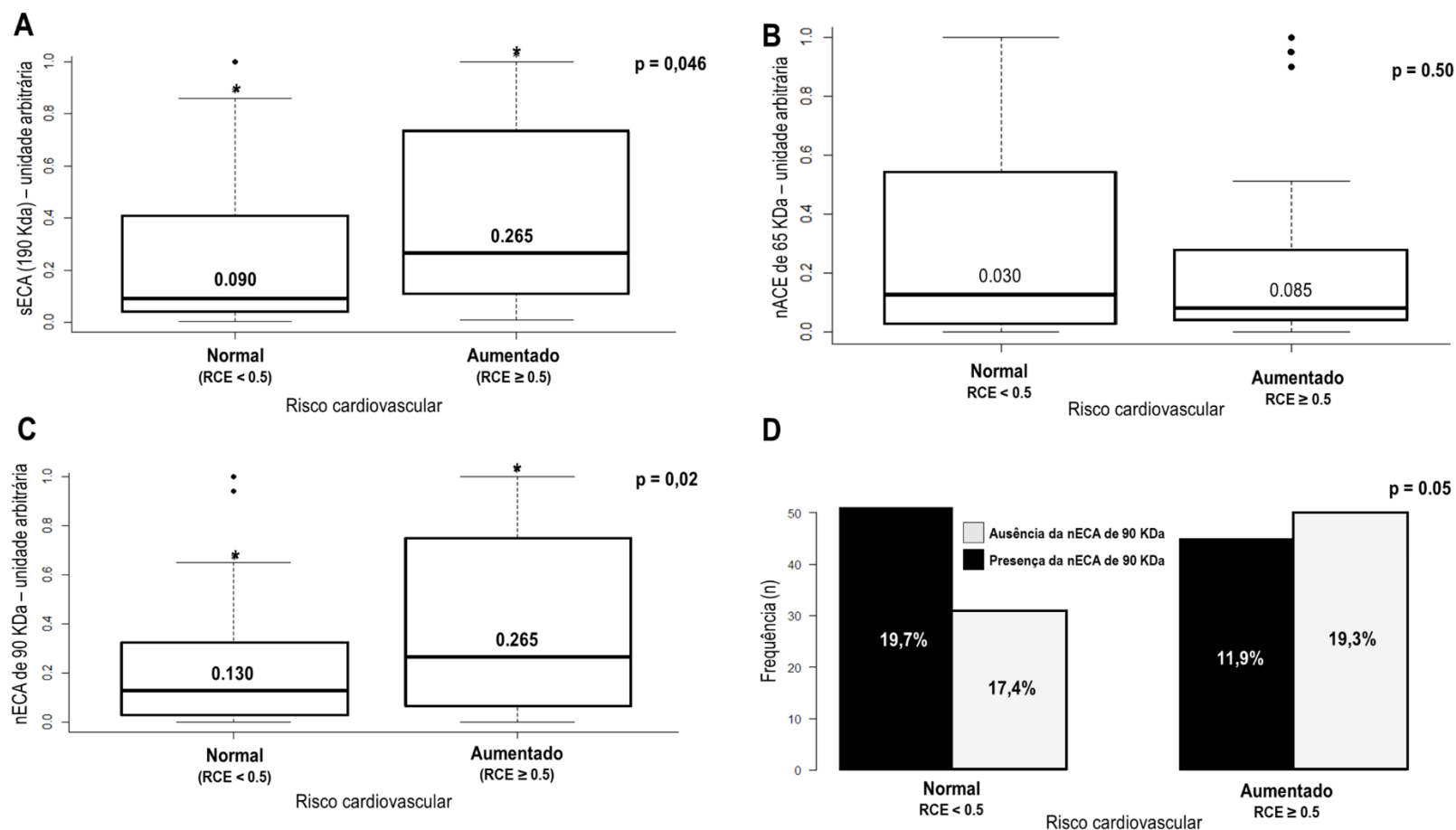


Figura 15. Expressão da ECA somática solúvel e das isoformas N-domínio solúveis da ECA na urina dos participantes nos grupos de estudo divididos pela RCE. A) Expressão da ECA somática solúvel (sECA) na urina dos participantes divididos por risco cardiovascular. Man – Whitney test, $p = 0,046$. **B)** Expressão isoforma N-domínio de 65 KDa da ECA (nECA de 65 KDa). Man – Whitney test, $p = 0,50$. **C)** Expressão isoforma N-domínio de 90KDa da ECA (nECA de 90 KDa). Man – Whitney test, $p = 0,02$. **D)** Presença da isoforma N-domínio de 90 KDa da ECA na urina. Teste de dependência, qui - quadrado, $p = 0,05$.

A expressão da ECA no plasma apresentou um perfil diferente do visto na urina (Figura 13B). As três bandas estavam presentes, e apenas 4,5% do total de amostras avaliadas não apresentaram as isoformas N-domínio solúvel (Apêndice 12 e 13), a nECA de 90 KDa apresentava a marcação mais acentuada, diferente da urina, onde a maior intensidade de expressão foi vista na banda da sECA (Figura 13). Adicionalmente, a expressão da ECA nas amostras de plasma apresentou um perfil bem homogêneo e não houve diferença na expressão da sECA, nECA de 65 KDa ou nECA de 90 KDa nos grupos classificados por estado nutricional (Tabela 8) ou por risco cardiovascular (Tabela 9), assim como, não houve dependência entre a presença das isoformas N-domínio e o estado nutricional ou risco cardiovascular (Apêndice 12 e 13).

Em relação a ECA2, NEP, Quimase e CatD, suas bandas foram detectadas, tanto na urina quanto no plasma, na altura de 116KDa, 100KDa, 30KDa e 27KDa, respectivamente (Figura 13). A análise de expressão destas na urina e no plasma não apresentou nenhuma diferença relacionada ao estado nutricional (Tabela 8). Na avaliação por risco cardiovascular apenas a quimase plasmática apresentou tendência a diferença significativa ($p=0,07$) (Tabela 9). A expressão da renina não foi avaliada, pois não foi possível detectar sua banda nem nas amostras de urina nem nas amostras de plasma (Figura 13).

Tabela 8. Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes de acordo com estado nutricional.

Expressão Enzimática na urina (unidade arbitrária)					
Enzima	Grupos				Valor de p*
	BP	EU	SP	OB	
	(n = 51)	(n = 53)	(n = 53)	(n = 49)	
ECA2	0,180±0,06	0,395±0,06	0,370±0,05	0,330±0,05	0,48
NEP	0,090±0,05	0,200±0,06	0,200±0,04	0,150±0,06	0,78
Quimase	0,280±0,05	0,070±0,04	0,140±0,04	0,170±0,06	0,12
CatD	0,185±0,06	0,100±0,05	0,108±0,04	0,260±0,04	0,69
Expressão Enzimática no plasma (unidade arbitrária)					
Enzima	Grupos				Valor de p*
	BP	EU	SP	OB	
	(n = 18)	(n = 20)	(n = 19)	(n = 19)	
sECA	0,500±0,06	0,280±0,05	0,360±0,05	0,230±0,05	0,58
nECA de 90 KDa	0,540±0,07	0,256±0,04	0,375±0,05	0,367±0,05	0,32
nECA de 65 KDa	0,320±0,06	0,262±0,04	0,290±0,04	0,244±0,06	0,77
ECA2	0,40±0,04	0,27±0,05	0,27±0,03	0,3±0,05	0,98
NEP	0,26±0,04	0,12±0,04	0,29±0,03	0,34±0,04	0,27
Quimase	0,090±0,04	0,090±0,04	0,140±0,03	0,28±0,04	0,47
CatD	0,13±0,04	0,18±0,05	0,20±0,04	0,39±0,04	0,32

Nota: Valores expressos em Mediana ± erro padrão da mediana. * Kruskal Wallis teste.

Tabela 9. Expressão das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma dos participantes de acordo com RCE.

Expressão Enzimática na urina (unidade arbitrária)			
Enzima	Grupos		Valor de p*
	RCE Normal	RCE Aumentado	
	(n = 104)	(n = 102)	
ECA2	0,340 ± 0,04	0,350 ± 0,04	0,18
NEP	0,190 ± 0,04	0,175 ± 0,04	0,85
Quimase	0,200 ± 0,03	0,145 ± 0,04	0,70
CatD	0,103 ± 0,04	0,149 ± 0,03	0,55
Expressão Enzimática no plasma (unidade arbitrária)			
Enzima	Grupos		Valor de p*
	RCE Normal	RCE Aumentado	
	(n = 38)	(n = 38)	
sECA	0,380 ± 0,04	0,285 ± 0,03	0,36
nECA de 90 KDa	0,310 ± 0,04	0,370 ± 0,03	0,70
nECA de 65 KDa	0,270 ± 0,04	0,289 ± 0,03	0,90
ECA2	0,380 ± 0,03	0,340 ± 0,03	0,67
NEP	0,220 ± 0,03	0,290 ± 0,02	0,69
Quimase	0,080 ± 0,03	0,270 ± 0,03	0,07
CatD	0,160 ± 0,03	0,260 ± 0,03	0,40

Nota: Valores expressos em Mediana ± erro padrão da mediana. * Kruskal Wallis teste.

Foi realizada análise de correlação para verificar se variações na expressão das enzimas do SRAA e SCC podem ter correlação com variáveis antropométricas, bioquímicas e cardiovasculares. A expressão da nECA de 90 KDa na urina teve correlação positiva com os parâmetros antropométricos incluindo, circunferência de cintura (cm), MM (Kg), IMC (Kg/m²), RCE, porcentagem de gordura corpórea, pIMC e Z-escore do IMC (Figura 16). Para a sECA e nECA de 65 KDa não foram evidenciadas correlações diferentes de zero de acordo com o teste de Spearman (Figura 16). Não

foram observadas outras correlações referentes a expressão enzimática e parâmetros antropométricos.

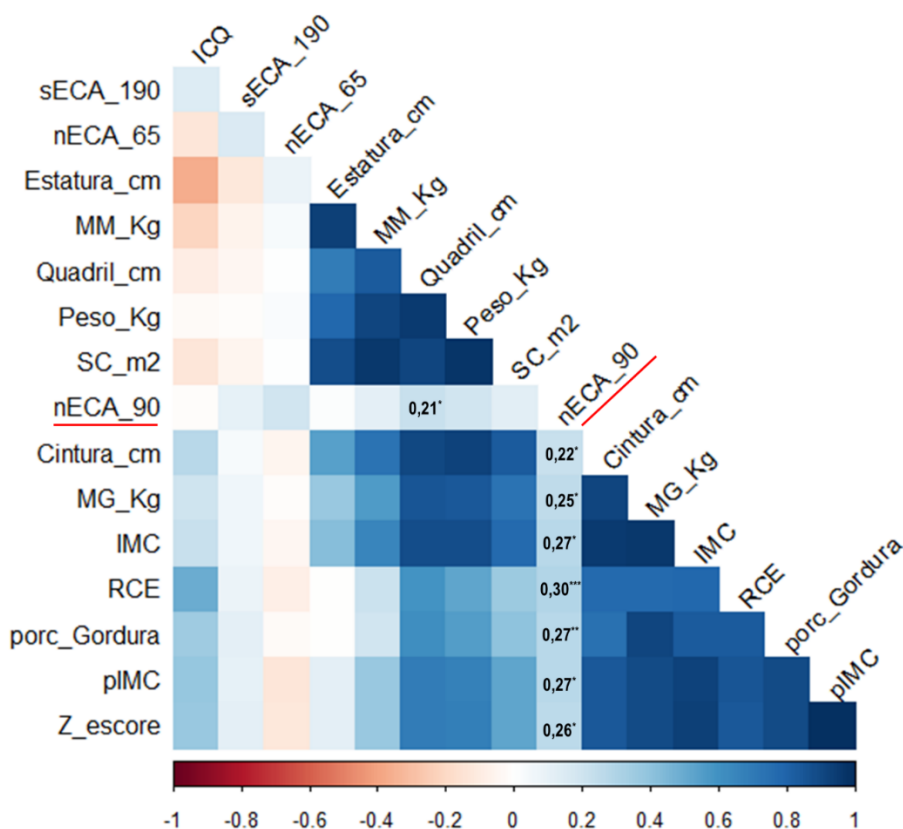


Figura 16. Matriz de correlação entre a expressão da sECA, nECA de 90 KDa, e nECA de 65 KDa e os parâmetros antropométricos. As correlações referentes a sECA, nECA de 90 KDa e nECA de 65 KDa que foram consideradas diferentes de zero pelo teste de Spearman estão com coeficiente rho destacado no quadrado, o valor de p está representado por (*) onde, *p ≤ 0,05, **p = 0,01, ***p < 0,01.

A expressão da quimase urinária e da CatD plasmática tiveram correlação com o perfil lipídico. A expressão da quimase na urina correlacionou-se negativamente com os níveis de HDL-C e com os níveis de CT (Figura 17). Já a expressão da CatD plasmática correlacionou-se positivamente com níveis de LDL-C, CT, razão do LDL-C/ HDL-C e razão do CT/ HDL-C (Figura 17). Não foram observadas outras correlações referentes a expressão enzimática e parâmetros bioquímicos.

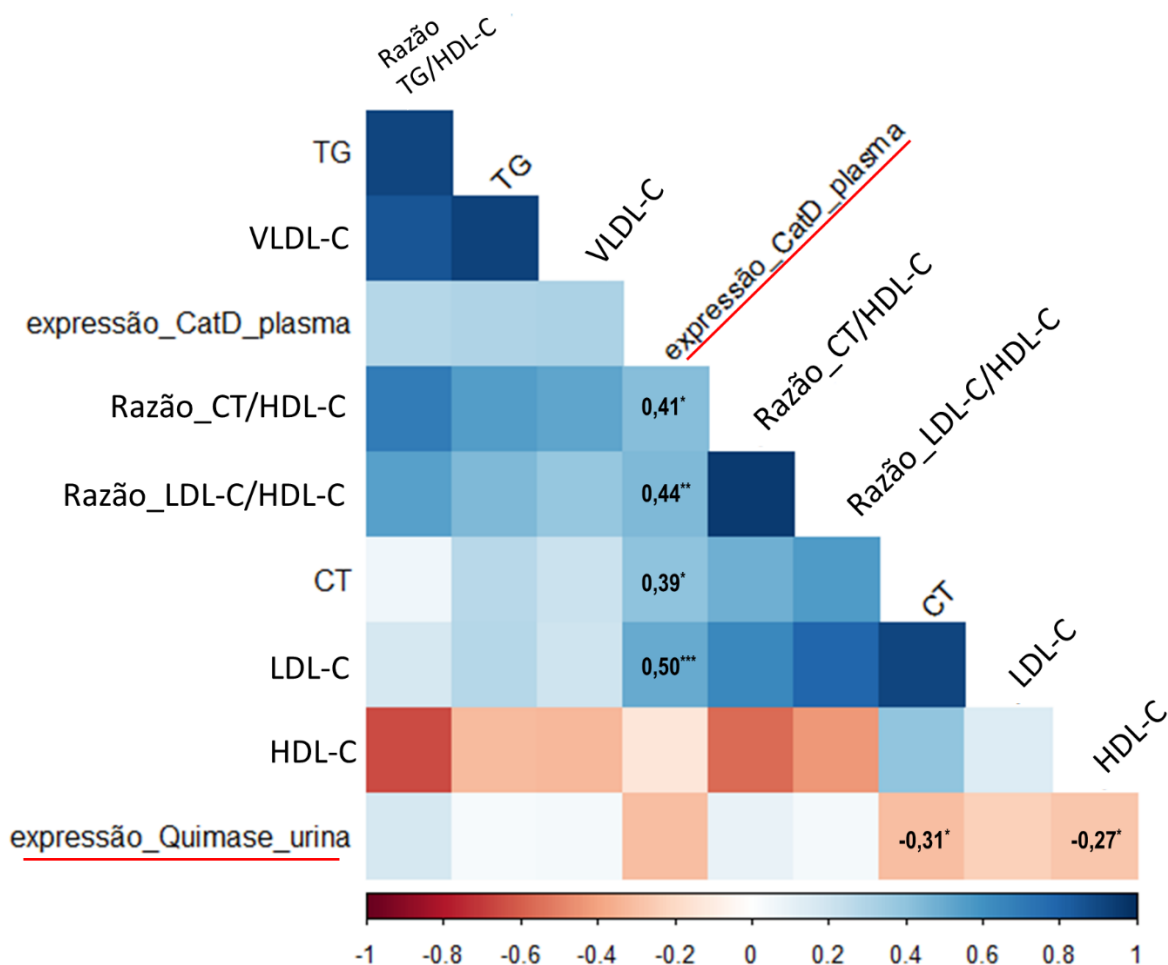


Figura 17. Matriz de correlação entre a expressão da quimase urinária e da CatD plasmática e perfil lipídico. As correlações referentes a expressão das enzimas que foram consideradas diferentes de zero pelo teste de Spearman estão com coeficiente rho destacado no quadrado, o valor de p está representado por (*) onde, * $p \leq 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p < 0,01$.

A atividade enzimática da ECA foi avaliada com o substrato Z-FHL, mais representativo para o sítio ativo N. Não houve diferença na atividade da ECA (Z-FHL) urinária (nmol/min/mg de creatinina) nos grupos de estudo classificados por estado nutricional ($p = 0,12$) (Figura 18A), assim como, não houve diferença nos grupos classificados pela RCE ($p = 0,24$) (Figura 18 B).

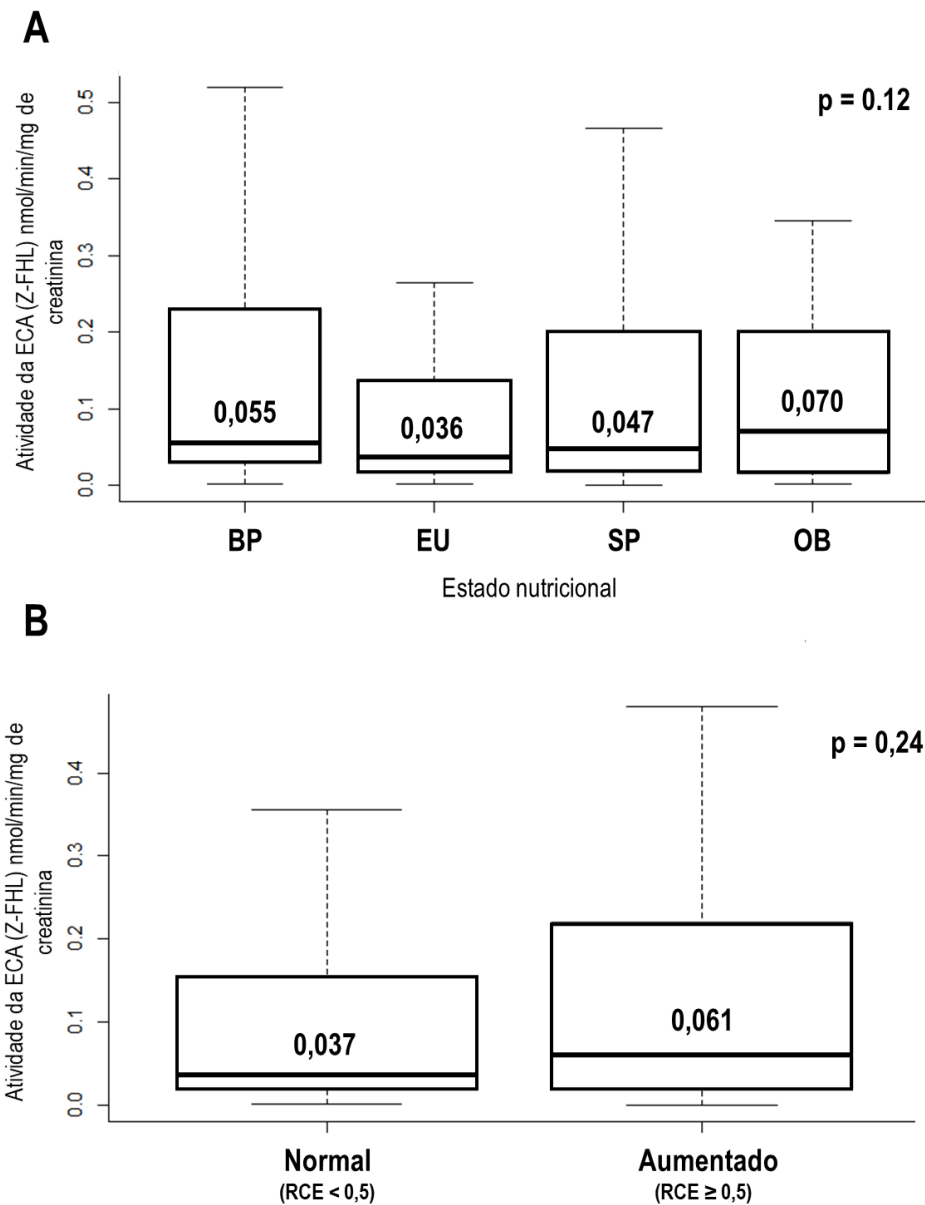


Figura 18. Atividade da ECA utilizando o substrato Z-FHL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE. A) atividade da ECA (nmol/min/mg de creatinina) utilizando o substrato Z-FHL nos grupos de estudo classificados por estado nutricional. Mood median test, $p = 0,12$. **B)** Atividade da ECA (nmol/min/mg de creatinina) utilizando o substrato Z-FHL nos grupos de estudo classificados por RCE e risco cardiovascular. Man – Whitney test, $p = 0,24$.

A atividade da ECA também foi avaliada utilizando o substrato h-HL, qual é mais específico para o C-domínio. Porém, também não houve diferença na atividade da ECA (h-HL) urinária (nmol/min/mg de creatinina) nos grupos classificados por pIMC ($p = 0,36$) (Figura 19A) e nem nos grupos classificados pela RCE ($p = 0,55$) (Figura 19B).

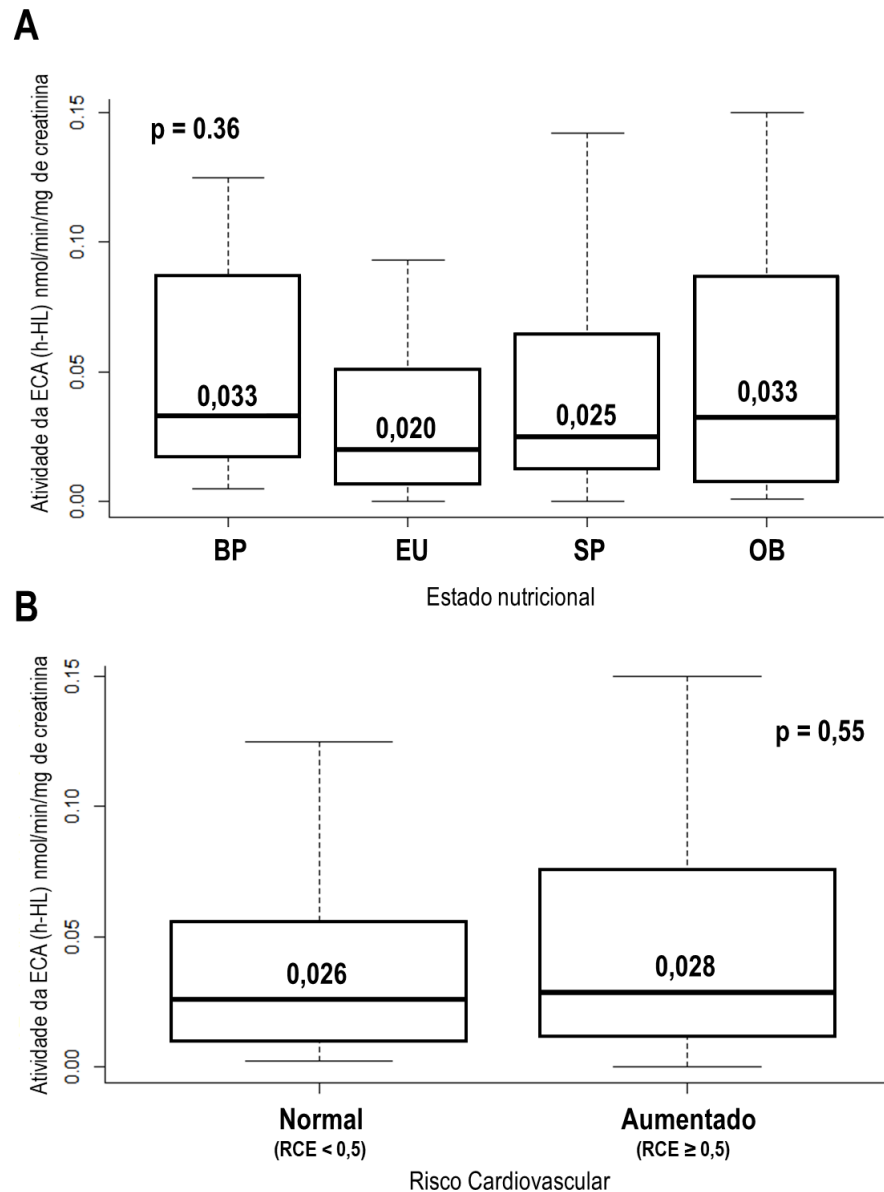


Figura 19. Atividade da ECA utilizando o substrato h-HL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE. A) atividade da ECA (nmol/min/mg de creatinina) utilizando o substrato h-HL nos grupos de estudo classificados por estado nutricional. Mood median test, $p = 0,36$. **B)** Atividade da ECA (nmol/min/mg de creatinina) utilizando o substrato h-HL nos grupos de estudo classificados por RCE e risco cardiovascular. Man – Whitney test, $p = 0,55$.

A razão entre a atividade da ECA (Z-FHL) e a atividade da ECA (h-HL) é usada para prever a atividade do N-domínio. Mas, não houve diferença na razão da atividade da ECA (Z-FHL/h-HL) na urina nos grupos de estudo classificados por estado nutricional ($p = 0,71$) (Figura 20A), assim como, não houve diferença nos grupos classificados pela RCE ($p = 0,22$) (Figura 20B). Porém valores da razão Z-FHL/h-HL maiores que 1, indicam predominância da atividade do N-domínio (170).

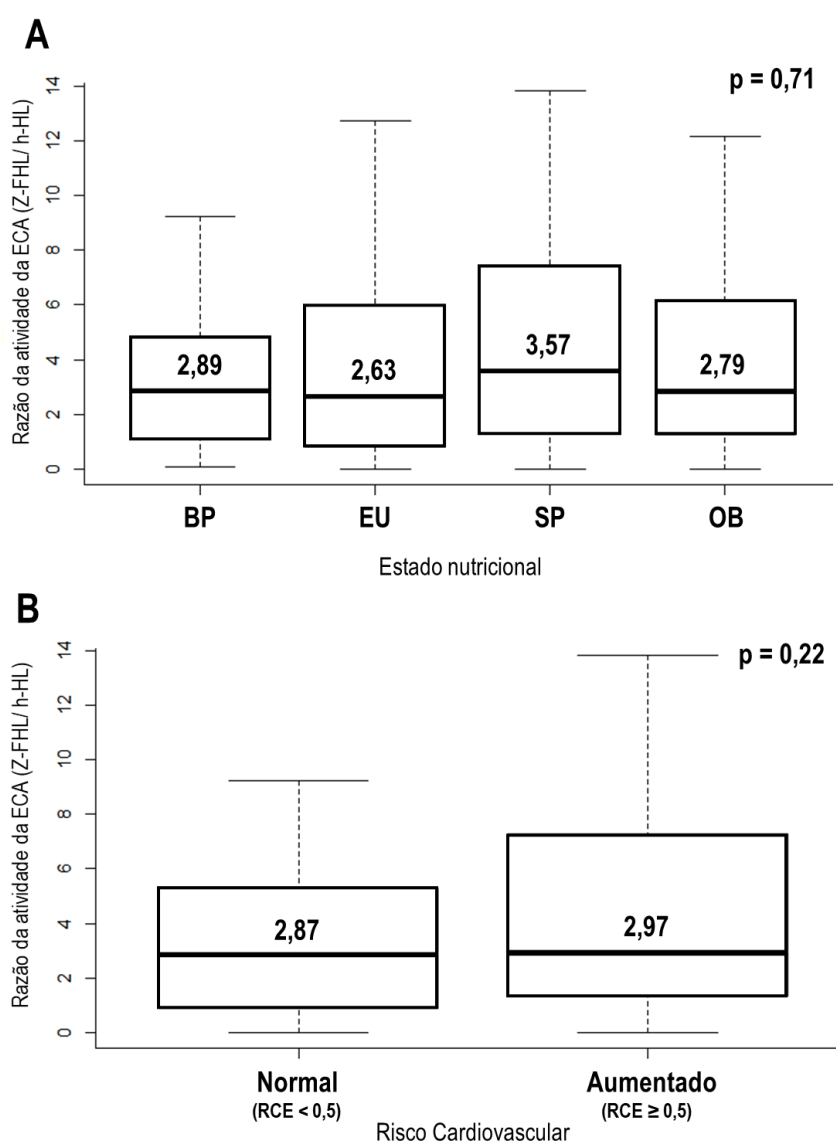


Figura 20. Razão da atividade da ECA Z-FHL/h-HL avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE. A) Razão da atividade da ECA nos grupos de estudo classificados por estado nutricional. Mood median test, $p = 0,36$. **B)** Atividade da ECA (nmol/min/mg de creatinina) utilizando o substrato h-HL nos grupos de estudo classificados por RCE e risco cardiovascular. Man – Whitney test, $p = 0,55$.

No entanto, houve correlação negativa entre a atividade da ECA (Z-FHL), e entre a razão da atividade da ECA (Z-FHL/h-HL) e os níveis de HDL-C (Figura 21). Adicionalmente, houve correlação positiva entre a atividade da ECA (Z-FHL) e os parâmetros VLDL-C e razão do TG/ HDL-C (Figura 21). A razão da atividade da ECA (Z-FHL/h-HL) também se correlacionou positivamente com a razão do CT/ HDL-C, razão do LDL-C/ HDL-C e com a razão de TG/ HDL-C (Figura 21).

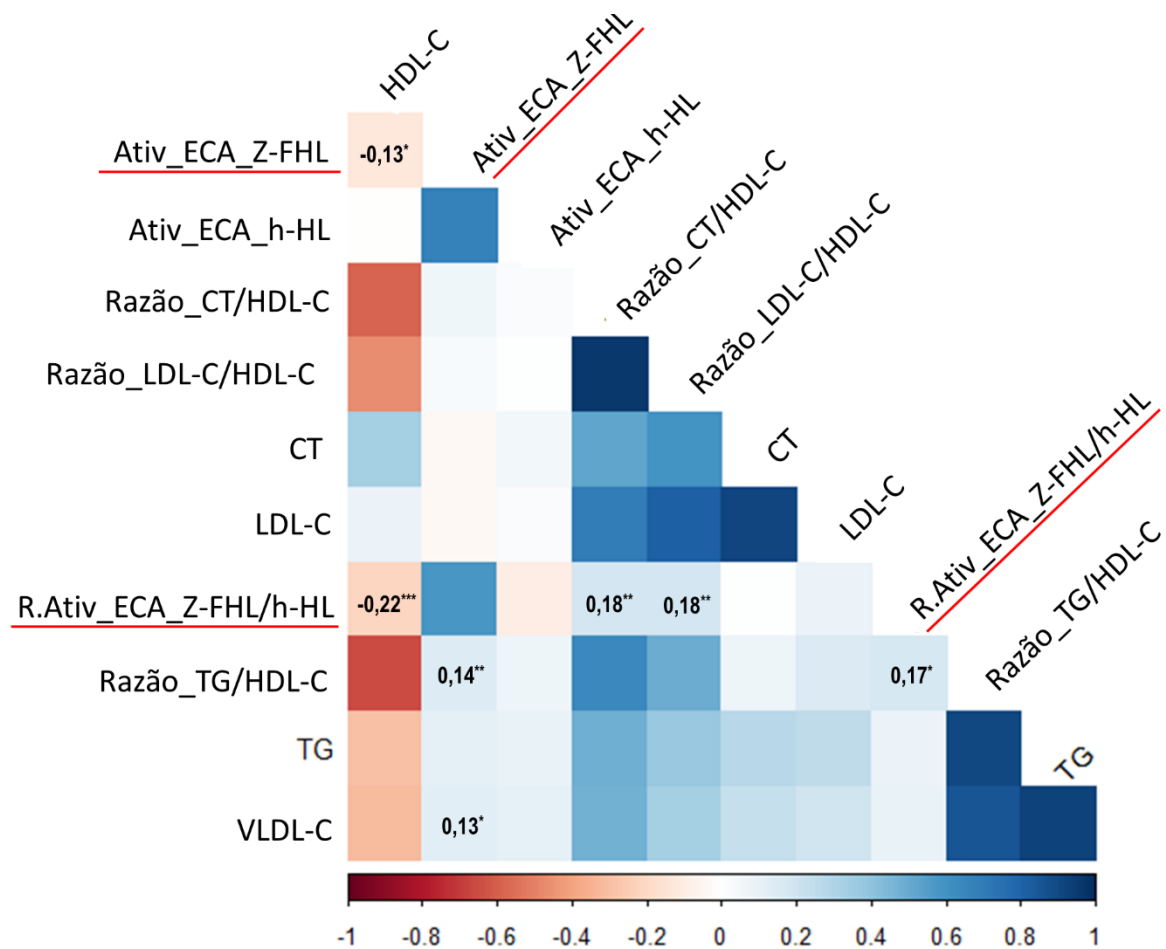


Figura 21. Matriz de correlação entre a atividade da ECA e perfil lipídico. As correlações referentes a atividade da ECA (Z-FHL), atividade da ECA (h-HL) e razão da atividade da ECA (Z-FHL/h-HL) que foram consideradas diferentes de zero pelo teste de Spearman estão com coeficiente rho destacado no quadrado, o valor de p está representado por (*) onde, *p ≤ 0,05, **p = 0,01, ***p < 0,01.

A atividade da CatD na urina ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de creatinina) foi influenciada pelo estado nutricional e pelo risco cardiovascular avaliado pela RCE. A atividade da CatD foi maior no grupo EU do que no grupo SP (0,098 vs 0,027, $p < 0,01$) (Figura 22A). Adicionalmente o grupo com RCE normal apresentou maior atividade da CatD do que o grupo com risco cardiovascular e RCE aumentados (0,095 vs 0,028, $p < 0,01$) (Figura 22B).

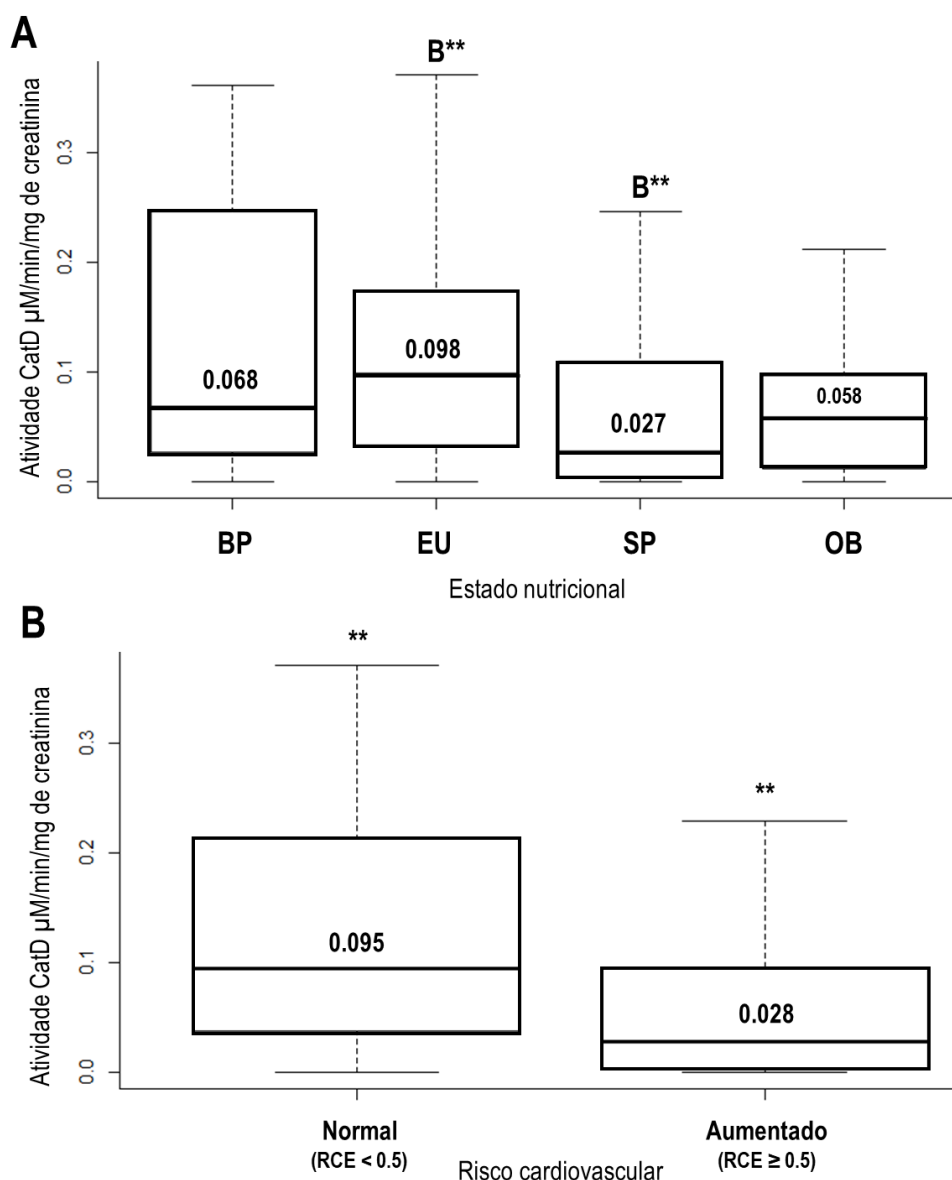


Figura 22. Atividade da CatD avaliada na urina dos participantes divididos por pIMC e RCE. A) Atividade da CatD ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de creatinina) nos grupos de estudo classificados por estado nutricional. Mood median test seguido de Pairwise Median test, $p < 0,01$, (C) EU $\neq$ SP. **B)** Atividade da CatD ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de creatinina) nos grupos de estudo classificados por RCE e risco cardiovascular. Man – Whitney test, $p < 0,01$.

Em consistência com o observado, a atividade da CatD na urina apresentou correlação negativa com diversos parâmetros antropométricos incluindo, ICQ, circunferência de cintura (cm), MG (Kg), IMC (Kg/m²), RCE, porcentagem de gordura corpórea, pIMC e Z-escore do IMC (Figura 23).

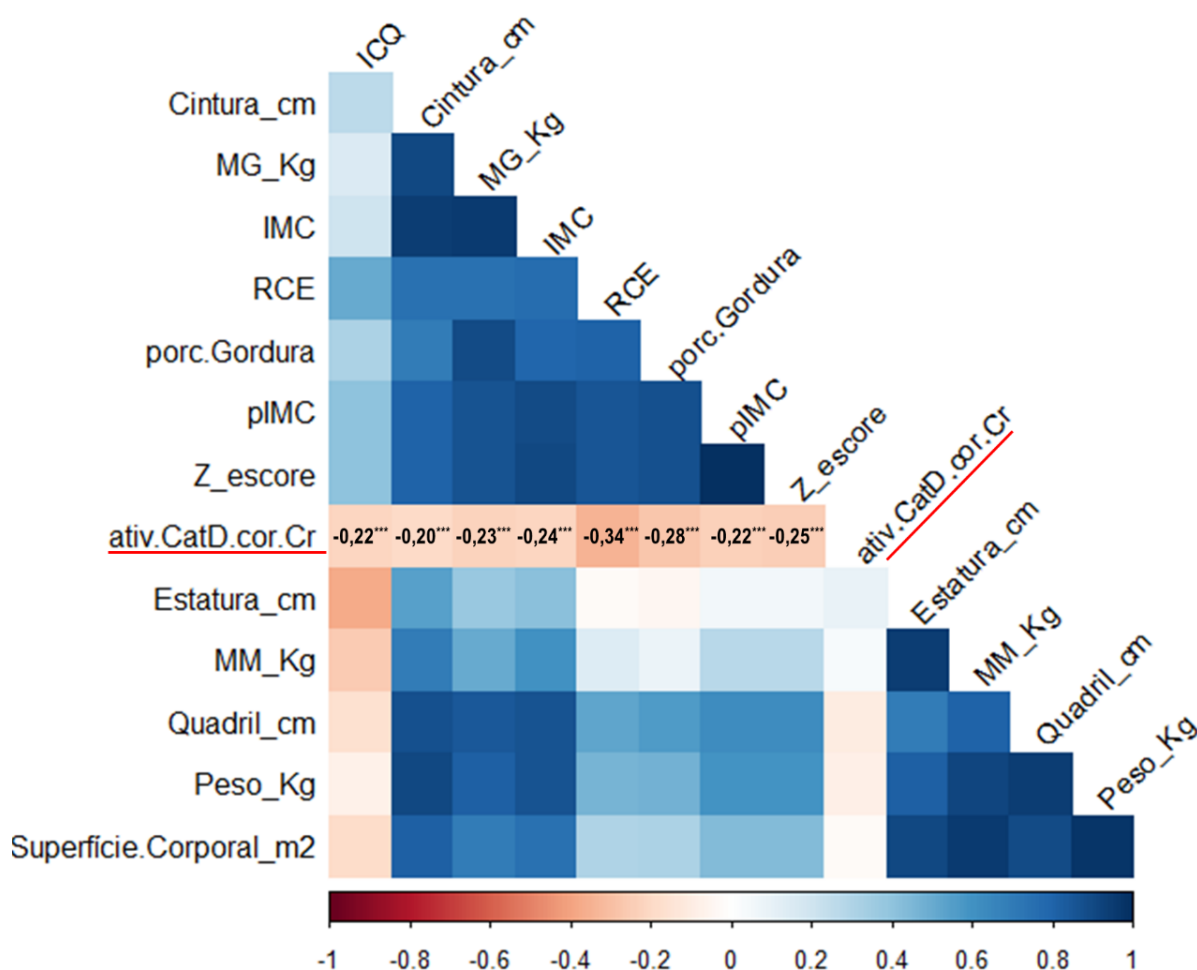


Figura 23. Matriz de correlação entre a atividade da CatD urinária e parâmetros antropométricos. As correlações referentes a atividade da CatD urinária que foram consideradas diferentes de zero pelo teste de Spearman estão com coeficiente rho destacado no quadrado, o valor de p está representado por (*) onde, *p ≤ 0,05, **p = 0,01, ***p < 0,01.

Em relação a atividade da renina, ECA2, NEP e quimase (uM/min/mg de creatinina) na urina, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos divididos pelo estado nutricional (Tabela 10) e nem entre os grupos divididos pelo risco

cardiovascular avaliado pela RCE (Tabela 11). As atividades da ECA, ECA2, NEP, quimase e renina também foram avaliadas nos grupos divididos por Z-escore e o perfil foi muito similar ao observado para pIMC, porém nessa categorização a quimase teve tendência a diferença significativa ($p = 0,08$) (Apêndice 14).

Tabela 10. Atividade das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma nos grupos de estudo classificados por pIMC.

Atividade enzimática na urina (uM/min/mg de creatinina)					
Enzima	Grupos				p value
	BP	EU	SP	OB	
	(n = 46)	(n = 95)	(n = 108)	(n = 56)	
Renina	0,198±0,05	0,184±0,03	0,173±0,04	0,162±0,05	0,785*
ECA2	0,142±0,09	0,094±0,04	0,129±0,08	0,097±0,06	0,135 [#]
NEP	0,052±0,01	0,034±0,02	0,047±0,01	0,066±0,01	0,136 [#]
Quimase	0,082±0,06	0,071±0,05	0,075±0,07	0,120±0,08	0,400 [#]
Atividade enzimática no plasma (uM/min/mL)					
Enzima	Grupos				p value
	BP	EU	SP	OB	
	(n = 43)	(n = 99)	(n = 104)	(n = 62)	
Renina	0,198±0,19	0,245±0,08	0,205±0,04	0,214±0,05	0,401*

Nota: Valores expressos como mediana ± erro padrão da mediana. *Teste de Kruskal – Wallis. [#]Mood's Median test.

Com exceção da atividade da ECA2 e da renina urinária (uM/min/mg de creatinina) que foram maiores nas meninas do que nos meninos, atividade da ECA2 (0,146±0,04 vs 0,091±0,02, $p < 0,01$) e atividade da renina (0,220±0,03 vs 0,168±0,02, $p = 0,046$), não houve influência do sexo dos participantes na atividade das enzimas (Apêndice 15).

Tabela 11. Atividade das enzimas do SRAA e SCC na urina e no plasma nos grupos de estudo classificados pela RCE.

Atividade enzimática na urina (uM/min/mg de creatinina)			
Grupos			
Enzima	Normal (n = 141)	Aumentado (n = 164)	p value*
Renina	0,192±0,03	0,169±0,03	0,137
ECA2	0,102±0,03	0,113±0,03	0,709
NEP	0,041±0,01	0,049±0,01	0,669
Quimase	0,070±0,04	0,085±0,05	0,139
Atividade enzimática no plasma (uM/min/mL)			
Grupos			
Enzima	Normal (n = 142)	Aumentado (n = 166)	p value*
Renina	0,237±0,08	0,207±0,06	0,195

Nota: Valores expressos como mediana ± erro padrão da mediana. * Teste de Man-Whitney.

Também foi feita análise de correlação para a atividade da renina, ECA2, NEP e quimase com parâmetros antropométricos, bioquímicos e cardiovasculares, utilizando o teste de Spearman. A atividade da ECA2 urinária se correlacionou negativamente com a MM (Kg) (ρ : -0,12, p = 0,05) e a atividade da renina plasmática se correlacionou positivamente com o peso (Kg) (ρ : 0,12, p = 0,03) e com a creatinina sérica (mg/dL) (ρ : 0,14, p = 0,01). Finalmente, a atividade da quimase urinária apresentou correlação positiva com diversos parâmetros cardiovasculares incluindo, PAS (mmHg), PAD (mmHg), PAS de decúbito (mmHg), PAD de decúbito (mmHg), pPAS e pPAD (Figura 24). Ainda, foi observado correlação negativa com a VOP (m/s) (Figura 24).

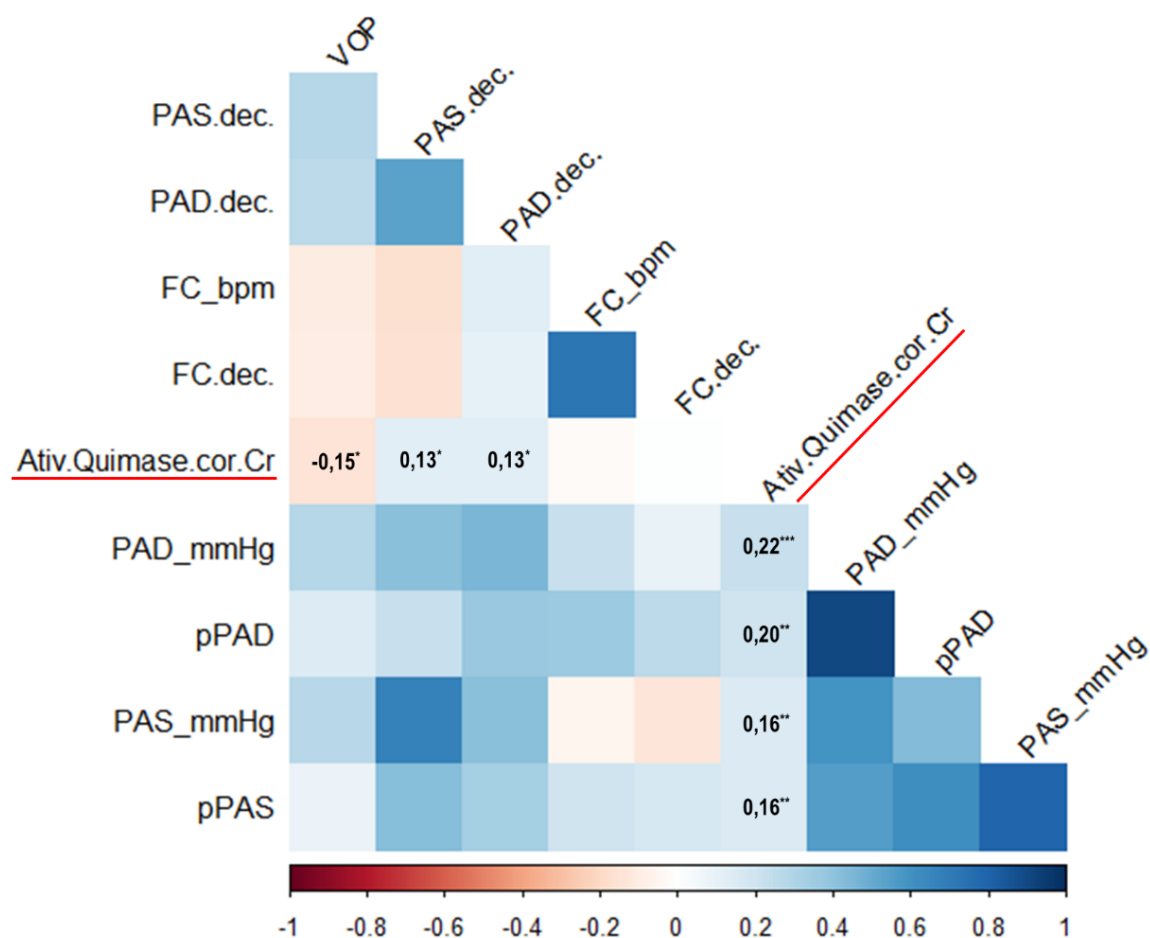


Figura 24. Matriz de correlação entre a atividade da quimase urinária e parâmetros cardiovasculares. As correlações referentes a atividade da quimase que foram consideradas diferentes de zero pelo teste de Spearman estão com coeficiente rho destacado no quadrado, o valor de p está representado por (*) onde, * $p \leq 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p < 0,01$.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado a expressão e atividade enzimática das principais enzimas do SRAA e SCC incluindo, a renina, a ECA, a ECA2, a NEP, a CatD e a quimase, de forma a identificar como estas enzimas estão moduladas de acordo com o estado nutricional e de acordo com o risco cardiovascular e assim associar as alterações observadas nestes sistemas com complicações associadas à obesidade infantojuvenil. A prevalência de sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes tem crescido drasticamente de forma globalizada nas últimas décadas (4) e identificar possíveis mecanismos fisiológicos que contribuem para o desenvolvimento e manutenção da obesidade infantojuvenil e para o desenvolvimento de complicações associadas é essencial para identificar marcadores de risco e traçar futuras estratégias terapêuticas.

Sabe-se que a obesidade é uma doença multifatorial influenciada por fatores genéticos, biológicos, socioeconômicos e comportamentais (2). Nesse estudo foi avaliada a contribuição de fatores biológicos como, sexo, raça/ cor, idade e estágio do desenvolvimento no estado nutricional e no risco cardiovascular.

O sexo masculino é atrelado a um maior risco de desenvolver doenças cardiometabólicas quando comparado a mulheres pré-menopausa. Este perfil já pode ser observado na infância e adolescência e é associado a fatores comportamentais como, tempo de tela, hábitos alimentares e menor preocupação com aparência corporal, além da diferença biológica entre os sexos (171). Neste estudo, a porcentagem geral de participantes do sexo masculino foi maior (53%) (Figura 9), porém na distribuição nos grupos por estado nutricional, o grupo SP apresentou maior porcentagem de meninas ($p = 0,02$) (Figura 9B). Desta forma, em variáveis que possam ser influenciadas pelo sexo, o grupo sobrepeso pode apresentar diferença induzida pela predominância do sexo feminino em comparação aos outros grupos.

Em relação à idade, foram avaliados crianças e adolescentes de 6 a 19 anos e a média de idade da amostra total foi de 11,6 anos $\pm$ 2,7. A idade média do grupo EU (12,7 anos $\pm$ 2,9) foi maior que a do grupo OB (10,8 anos $\pm$ 2,3) ($p < 0,01$) (Figura 10). Porém, considerando a fase da infância e adolescência, a idade isoladamente não reflete em grandes diferenças no organismo, o mais relevante é avaliar o estágio de desenvolvimento. A puberdade é um processo essencial no desenvolvimento humano

e promove mudanças físicas, endócrinas e fisiológicas direcionadas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal com o propósito de que se alcance a maturidade sexual (154, 172). Por isso, é importante que a distribuição de participantes em diferentes estágios do desenvolvimento seja parecida entre os grupos. Neste estudo, 29% dos participantes encontravam-se na pré-puberdade, 58% na puberdade, 10% na pós puberdade e 2% não foram avaliados (Figura 11A). A estratificação dos participantes em diferentes fases do desenvolvimento foi realizada nos grupos classificados por pIMC e não houve diferença de distribuição entre os grupos ($p = 0,30$) (Figura 11B). Portanto a fase do desenvolvimento puberal não afetou a incidência de BP, SP e OB nesta população.

Raça e cor têm impacto sobre a predisposição a doenças cardiometabólicas devido não só ao impacto da genética, mas também a fatores socioeconômicos atrelados a esta variável (173). No Brasil, a classificação de raça e cor é baseada na autoproclamação diferentemente do observado em estudos científicos internacionais onde a divisão é feita baseada na cor e etnia incluindo brancos, pretos, hispânicos, latinos e asiáticos (174). No presente estudo, a maioria dos participantes são pardos (56%), seguidos de pretos (24%), brancos (18%), indígenas (2%) e amarelos (0%) (Figura 12A). Não houve dependência entre raça e cor e o estado nutricional dos participantes ($p = 0,85$) (Figura 12B).

Na classificação dos participantes do estudo por estado nutricional foi utilizado o pIMC. No presente estudo, a prevalência de baixo peso (15%), sobrepeso (33%) e obesidade (19%) não pode ser comparada com a população geral, porque essa amostra foi selecionada de forma a obter uma melhor distribuição de participantes entre as categorias, aumentando as porcentagens de indivíduos de BP, SP e OB e diminuindo a porcentagem de indivíduos na categoria EU (33%) (Figura 7). Mas, segundo dados do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) de 2020 (175), no Brasil, a prevalência de baixo peso, sobrepeso, obesidade e obesidade grave entre crianças de 5 a 10 foi de 5,56%, 15,9%, 9,5% e 6,32%, respectivamente. Já entre os adolescentes (11 a 19 anos) 3,89% estavam com baixo peso, 19,97% apresentaram sobrepeso, 9,55% eram obesos e 2,41% tinham obesidade grave.

Além da classificação por pIMC também foi feita a classificação dos participantes nas categorias BP, EU, SP e OB de acordo com Z-escore do IMC e

observa-se uma menor porcentagem de participantes nas categorias de extremidade, BP (9%) e OB (10%), e um maior número de participantes nas categorias intermediárias, SP (42%) e EU (39%) (Figura 7). Isso pode ser explicado pelo Z-escore ter uma faixa limitada que varia de $z-2$ a $z+3$, entre a qual são divididas as categorias. Ainda, diversos estudos apontam que o Z-escore do IMC não é o mais indicado, principalmente se pretende-se diferenciar graus de obesidade e ou graus de desnutrição (165).

Apesar do pIMC ou Z-escore do IMC serem ferramentas práticas que dependem apenas de simples medidas de peso e altura, sendo avaliações que não exigem aparelhos sofisticados e não são invasivas, ambas têm a limitação de não fornecerem informações sobre a distribuição de gordura corporal e não diferenciam entre MM, referente aos músculos e a MG, referente a gordura corporal (176). Adicionalmente, para crianças e adolescentes é necessário a correção por gênero e idade, o que exige que sejam feitas grandes coletas de dados para gerar as curvas de crescimento utilizadas nestes cálculos (176).

Assim, de forma a complementar a classificação por estado nutricional, os pacientes também foram divididos de acordo com a razão de cintura e estatura (RCE); um método utilizado para avaliar gordura central e risco cardiovascular (157). A RCE teve boa correlação com o estado nutricional já que como esperado houve dependência entre estado nutricional e a RCE, pois mais de 95% dos indivíduos com RCE aumentada pertenciam aos grupos SP e OB (Figura 8). No entanto, é importante destacar que mesmo entre os indivíduos classificados como EU, aqueles que apresentam RCE aumentada, possuem maiores níveis de CT, TG, LDL e apresentam maior PAS e PAD (157).

A RCE é uma boa opção ao ICQ para avaliação de gordura central principalmente em crianças já que o ICQ é obtido a partir da divisão da circunferência de cintura (cm) pelo quadril (cm) e a constituição física dos meninos faz com que tenham quadril mais estreito, a tendência é que homens tenham maiores valores de ICQ (177), como foi verificado neste estudo (Apêndice 1). Por isso são adotados pontos de corte diferentes de acordo com o sexo (178), e isso não é facilmente transferível para crianças e adolescentes por conta das mudanças corporais associadas ao desenvolvimento puberal.

Ambas as classificações adotadas ofereceram boa correlação com os parâmetros antropométricos. Como o esperado, as medidas de peso (Kg), IMC, pIMC, Z-escore do IMC, circunferência de cintura (cm), quadril (cm), MG (Kg) e porcentagem de gordura (%) foram maiores à medida que a massa corpórea aumentava, e houve diferença estatística entre todos os grupos classificados por pIMC (Tabela 2). Interessantemente, a MM (Kg) estava diminuída no grupo BP em relação aos outros grupos (Tabela 2), o que mostra que a classificação pelo pIMC também prediz os efeitos associados ao baixo peso, uma vez que a desnutrição compromete o desenvolvimento da musculatura.

Esta é a grande limitação da RCE, que tem boa correlação com parâmetros alterados no sobrepeso e obesidade, mas alterações causadas pelo baixo peso são normalmente diluídas dentro do grupo com RCE normal devido à presença das crianças e adolescentes com peso normal (EU). Na classificação pela RCE, todos os parâmetros antropométricos, exceto estatura, apresentaram diferença significativa, sendo maiores no grupo com RCE aumentada (Tabela 3). Nessa avaliação os dados mais impactantes foram que o grupo com RCE aumentada apresentou porcentagem de gordura 2 vezes maior ($34,3 \pm 6,7$ vs $17,7 \pm 7,3$, $p < 0,01$) e MG (Kg) 2,5 vezes maior que o grupo com RCE normal (Tabela 3).

Também foi avaliada a interferência do sexo dos participantes nas medidas antropométricas, e os únicos parâmetros que apresentaram diferenças nesta análise foram, MG (Kg), porcentagem de gordura (%) e o ICQ (Apêndice 1). A MG (Kg) e a porcentagem de gordura foram maiores nas meninas do que dos meninos, mas essa pode ser caracterizada como uma diferença fisiológica entre os sexos (177). E, o ICQ, como já mencionado era maior no sexo masculino, mas o valor médio encontrava-se dentro da faixa considerada normal (Apêndice 1) (177).

Foi visto que o tecido adiposo é um órgão endócrino capaz de produzir e secretar componentes do SRAA e SCC (25). A ECA e a CatD se mostraram moduladas pelo estado nutricional e pela RCE e se correlacionam com medidas antropométricas. A expressão da sECA na urina das crianças obesas é maior do que nas crianças eutróficas ($0,090$ vs $0,530$, $p = 0,04$) e é maior nas crianças com RCE e risco cardiovascular aumentado do que nas crianças com RCE normal ($0,090$ vs $0,265$, $p = 0,046$) (Figura 14 e 15). Ainda, a nECA de 90 KDa foi mais frequentemente

encontrada na urina dos participantes com RCE aumentada e sua expressão foi maior na urina destes (Figura 15). Assim, evidencia-se uma hiperativação da ECA, pelo menos a nível renal, e apesar de não ter sido constatada diferença estatística na atividade da ECA urinária, o grupo OB apresentou os maiores valores e o grupo EU os menores valores tanto na avaliação com substrato Z-FHL quanto na avaliação com substrato h-HL (Figura 18 e 19). Isto associado a maior expressão da sECA e da nECA de 90 KDa contribuiria para desbalanço em níveis de peptídeos formados ou degradados a partir da ação da ECA (experimentos em processamento). Ainda, a presença da nECA de 90 KDa na urina de crianças e adolescentes pode ser um marcador de risco cardiovascular aumentado associado a obesidade. Em concordância, a expressão da nECA de 90 KDa se correlacionou positivamente com diversos parâmetros antropométricos como, quadril (cm), cintura (cm), MG (Kg), porcentagem de gordura, RCE, IMC (Kg/m^2), pIMC e Z-escore do IMC (Figura 16).

Não foram vistas alterações na expressão da ECA no plasma. Porém, estudo anterior do nosso grupo constatou alterações nos níveis de peptídeos plasmáticos em crianças obesas, que apresentaram menores concentrações de BK e Ang 1-7 em comparação as crianças eutróficas (26). O presente estudo, reforça a hipótese de que a ECA seria a principal responsável por essas alterações já que BK e Ang 1-7 são seus substratos e sua expressão estava aumentada nos participantes obesos. Ainda, o N-domínio é o principal responsável pela inativação da Ang 1-7 (58, 59), demonstrando que o aumento da presença e expressão da nECA de 90 KDa no grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado possa refletir em depleção dos níveis de Ang 1-7 nesses participantes.

Neste estudo, a atividade da CatD urinária estava diminuída no grupo SP em comparação ao grupo EU ($p < 0,01$) e o grupo com RCE aumentada também apresentou atividade da CatD urinária reduzida ($p < 0,01$) (Figura 22). Adicionalmente, a atividade da CatD na urina correlacionou-se negativamente com o ICQ, RCE, cintura (cm), MG (Kg), porcentagem de gordura, IMC, pIMC e Z-escore (Figura 23).

Os relatos sobre alterações na expressão da CatD são ambíguos. Isso porque a CatD parece ter funções diferentes de acordo com a célula e as funções da CatD circulante divergem da intracelular (179). Muitos estudos evidenciaram efeitos deletérios relacionados ao aumento dos níveis da CatD circulante como, resistência à

insulina, hipertrofia e inflamação do tecido adiposo, formação de placa de ateroma e insuficiência cardíaca (91, 95, 147, 180). Em contrapartida, foi evidenciado que pacientes com deficiência de HDL-C possuem macrófagos derivados de monócitos com expressão reduzida do mRNA da CatD, o que está associado a função diminuída da proteína ABCA1, envolvida no efluxo de colesterol (96). Estudos com animais CatD *knockout*, mostraram que a enzima é essencial para desenvolvimento e sua ausência promove neurodegeneração, atrofia da retina, cegueira e atrofia da mucosa intestinal resultando em perda de peso e anorexia (92). Nos rins, a CatD se mostrou protetora, camundongos com *knockout* de CatD especificamente nos podócitos desenvolvem proteinúria que se agrava em glomérulo esclerose (181).

A diminuição da CatD na urina do grupo SP e do grupo com RCE aumentada, pode estar relacionada a uma diminuição da síntese de CatD à nível renal nestes indivíduos. Adicionalmente, os rins têm a função de excretar algumas proteínas do plasma e assim interferem nos níveis circulantes ou meia vida desses elementos na circulação (182). A CatD circulante tem peso molecular baixo, aproximadamente 34KDa, podendo ser filtrada ou secretada pelos rins em condições fisiológicas normais (179). A atividade diminuída da CatD na urina dos participantes com SP e com RCE e risco cardiovascular aumentado poderia refletir uma diminuição no *clearance* da CatD circulante, que resultaria em uma maior concentração desta no plasma. Porém, não foi possível confirmar essa hipótese, já que não foram vistas diferenças na expressão da CatD tanto na urina, quanto no plasma (Tabelas 8 e 9). Apesar de a expressão da CatD no plasma se correlacionar com o perfil lipídico, como será discutido a seguir.

Sabidamente, o sobrepeso e a obesidade infantil contribuem para o desenvolvimento de doenças como dislipidemias, diabetes e síndrome metabólica na vida adulta. No entanto, alguns estudos descrevem que disfunções já possam ser visualizadas na infância e adolescência (183). Os parâmetros bioquímicos foram avaliados nos grupos classificados por pIMC, Z-score do IMC e RCE. Foram observadas diferenças nesses parâmetros em decorrência do sobrepeso e obesidade, sendo alguns parâmetros já clinicamente alterados.

Os níveis de CT, VLDL-C, LDL-C e TG aumentaram gradativamente com o aumento de massa corpórea. Houve diferença significativa entre os grupos SP e ou

OB em relação aos outros grupos BP e ou EU (Tabela 4). Por outro lado, os níveis de HDL-C encontravam-se diminuídos nos grupos SP e OB quando comparados aos grupos BP e EU (Tabela 4). Adicionalmente, foram avaliadas as razões entre as lipoproteínas e o HDL-C, pois um HDL-C elevado pode contrabalancear níveis aumentados de CT, LDL-C e TG (184). No entanto, as razões das lipoproteínas pelo HDL-C também foram maiores nos grupos SP e OB em comparação aos grupos BP e EU (Tabela 4).

Importantemente, os valores médios de HDL-C no grupo OB são menores do que o considerado clinicamente desejado, os valores de TG estão aumentados e a razão TG/ HDL-C está aumentada (167) (Apêndice 2). Na avaliação pela RCE, o grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado apresentou níveis menores de HDL-C e valores aumentados de CT, TG, LDL-C, VLDL-C e de suas razões quando comparado ao grupo com RCE normal (Tabela 5), porém apenas o HDL-C pôde ser considerado clinicamente alterado (Apêndice 2).

Essas observações são condizentes com a dislipidemia associada a obesidade, onde a hipertrigliceridemia é uma alteração importante que desencadeia outras alterações no perfil lipídico (185). O acúmulo de TG e ácidos graxos livres no fígado leva a produção aumentada de VLDL-C, o que compromete a lipólise dos quilomícrons devido a competição pela LPL (185). O excesso de TG também contribui para diminuição dos níveis de HDL-C e para a formação de LDL-C de baixa densidade, a sdLDL-C, que migra mais facilmente para a camada íntima dos vasos e tem maior predisposição à oxidação, sendo altamente aterogênica (185). Tanto a sdLDL-C quanto os quilomícrons e VLDL-C acumulados na camada íntima do vaso podem ser captados por macrófagos resultando na formação das células espumosas (185).

Interessantemente, o perfil lipídico teve correlação com a expressão ou atividade das enzimas do SRAA e SCC. A atividade da ECA medida com substrato Z-FHL se correlacionou com menores níveis de HDL-C, maior razão TG/ HDL-C e níveis maiores de VLDL-C (Figura 21). A razão da atividade da ECA urinária Z-FHL/ h-HL, que estima a atividade do N-domínio, também se correlacionou com níveis menores de HDL-C, maior razão CT/ HDL-C e maior razão TG/ HDL-C (Figura 21). Essas observações corroboram com evidências de que a ECA participa na fisiopatologia das dislipidemias e consequentemente da aterosclerose, pois forma a Ang II, que age

estimulando a 3-hidroxi-metil-glutaril coenzima A (HMG – CoA) e a síntese de colesterol nos macrófagos. Contribui para formação de células espumosas porque promove influxo de LDL-C nos macrófagos via receptor AT1 e ainda contribui para disfunção endotelial através da oxidação, inflamação e vasoconstrição (186). A ECA ainda degrada a BK que parece ter papel protetor prevenindo a disfunção endotelial. IECAs e BRAs mitigam esses efeitos (186).

A quimase contribui de forma importante para níveis locais de Ang II e esta enzima proveniente dos mastócitos foi identificada como a principal geradora de Ang II no tecido cardíaco e vascular humano (102). Neste estudo, a expressão da quimase na urina estava correlacionada com uma diminuição dos níveis de HDL-C (Figura 17). É sabido que a quimase contribui na fisiopatologia da aterosclerose possivelmente por ser uma via de degradação da Apolipoproteína A1, por comprometer a função da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), que permite o transporte de colesterol ésteres e TG entre o HDL-C e outras lipoproteínas (187, 188). E ainda pela ação da Ang II, a expressão de Ang II dependente de quimase é aumentada em aortas ateroscleróticas de humanos (189). Também foi observado que hipertrigliceridemia promove aumento da expressão da quimase na aorta e que a inibição da quimase diminui a formação de placa de ateroma sem influenciar na pressão arterial, peso ou perfil lipídico (189). Lembrando que a quimase é uma enzima presente nos grânulos dos leucócitos, que migram para a parede vascular no início da lesão aterosclerótica (190).

A expressão da CatD no plasma estava correlacionada com menores níveis de HDL-C e maiores valores de CT, razão CT/ HDL-C e razão LDL-C/ HDL-C (Figura 17). Isto poderia ser esperado já que os níveis circulantes de CatD são associados a aterosclerose e evento cardiovascular (97). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que enzimas lisossomais, como a pré-CatD, possam induzir a formação da placa de ateroma, isso porque macrófagos derivados de monócitos liberam essas enzimas e acidificam o meio, que pode ficar suficientemente ácido para que ocorra auto conversão da pré-CatD em CatD. Uma vez ativa, a CatD é capaz de induzir a hidrólise de lipoproteínas, incluindo a LDL-C tornando-as instáveis e permitindo seu acúmulo e oxidação (92).

Ainda em relação aos parâmetros bioquímicos, os valores de ácido úrico foram maiores nos grupos SP e OB em relação aos outros e também foram maiores no grupo com a RCE aumentada (Tabelas 4 e 5). Apesar da média de todos os grupos estarem dentro de uma faixa normal (168) (Apêndice 3), níveis maiores de ácido úrico na infância promovem um aumento precoce dos valores de pressão arterial (191). Nos adultos, valores elevados de ácido úrico são associados com doenças cardiovasculares, obesidade, síndrome metabólica e doenças renais. É proposto que os níveis de ácido úrico aumentem em indivíduos obesos devido a resistência à insulina, pois o acúmulo de insulina promove reabsorção de sódio e urato (192). Não se sabe ao certo a contribuição do ácido úrico na fisiopatologia das doenças cardiometabólicas, mas há indícios de que o ácido úrico promova a disfunção endotelial através da promoção de estresse oxidativo, inflamação e proliferação celular. Ainda, níveis aumentados de ácido úrico são associados a ativação plaquetária (192).

Interessantemente, o grupo OB apresentou maior número de plaquetas em comparação ao grupo EU ($p = 0,03$), o mesmo foi observado no grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado ($p < 0,01$) (Tabelas 4 e 5). As plaquetas e ativação plaquetária são fatores importantes na fisiopatologia da aterosclerose e trombose (193). A obesidade pode promover ativação plaquetária por conta do baixo grau de inflamação crônico. As plaquetas possuem receptores de leptina e agonistas destes receptores podem promover agregação plaquetária e contribuir para que se estabeleça associação entre obesidade e desenvolvimento de doenças aterotrombóticas (193).

Alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos refletiram as alterações provocadas tanto pelo baixo peso quanto pela obesidade. A creatinina sérica foi maior no grupo EU quando comparado aos grupos BP e OB (Tabela 4), provavelmente porque ela reflete metabolismo muscular e o grupo baixo peso tem musculatura menos desenvolvida e o grupo obeso tem uma menor proporção de MM (Kg) do que gordura. Ainda, o grupo EU apresentou maior porcentagem de hemoglobina e maior hematócrito do que os grupos; BP, SP e OB ($p < 0,01$) (Tabela 4). Apesar dos valores estarem todos dentro do clinicamente aceito (Apêndice 3). Estes resultados realçam que a massa corpórea não é um indicativo de nutrição e saúde.

Estudos sugerem que 25% dos pais de crianças com sobrepeso ou obesidade enxergam seu filho como dentro do peso normal principalmente na faixa etária de 5 – 9 anos de idade (194). Esse comportamento pode ser explicado pelo fenômeno de transição epidemiológica, pois há algumas décadas a principal preocupação quanto ao desenvolvimento infantil era a desnutrição e a criança “gordinha” era vista como saudável. Porém, é comum haver carência de nutrientes e anemia entre crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade devido à dieta desbalanceada (195).

A obesidade também é um dos principais fatores de risco para hipertensão arterial porque promove alteração de parâmetros metabólicos e estruturais que sobrecarregam o sistema cardiovascular. Se sabe que indivíduos obesos desde a infância tem maior risco de desenvolverem hipertensão, sofrerem evento cardiovascular e acidente vascular encefálico (3). E como visto, vários parâmetros antropométricos, bioquímicos e referentes ao SRAA e SCC que são relacionados ao maior risco de doenças metabólicas e cardiovasculares foram observados no grupo OB e no grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado.

No presente estudo, apenas três participantes apresentaram pPAS e ou pPAD elevada e apenas nove se encontravam na faixa limítrofe (dado não mostrado). Porém, a média da PAS (mmHg), PAD (mmHg), pPAS e pPAD aumentaram gradualmente nos grupos classificados por pIMC (Tabela 6). Assim maiores níveis pressóricos foram encontrados no OB, sendo que a diferença foi significativa entre o grupo BP e OB no caso do pPAS, e entre os grupos EU e OB no caso do pPAD (Tabela 6). Apesar das médias dos valores pressóricos nos grupos classificados por pIMC estarem todos dentro de valores clinicamente normais, considerando que os valores pressóricos são influenciados pela idade e que grupo OB já partia de valores maiores (Apêndice 7), os indivíduos do grupo OB podem atingir níveis hipertensivos precocemente se mantidos os mesmos hábitos e fenótipo. Em relação a classificação por RCE, todos os parâmetros foram maiores no grupo com RCE e risco cardiovascular aumentado (Tabela 7). A frequência cardíaca não apresentou diferença entre os grupos (Tabelas 6 e 7).

A atividade da quimase urinária se correlacionou com maiores níveis de PAS (mmHg), PAD (mmHg), pPAS, pPAD, PAS decúbito e PAD decúbito. E se correlacionou com menores valores de VOP (m/s) (Figura 24). Seria esperada uma

correlação positiva com a VOP, já que está é uma ferramenta que prediz a rigidez vascular, e quanto maior a VOP (m/s), menor a distensibilidade dos vasos e maior a rigidez arteriolar (196). Porém, na infância e adolescência a VOP é influenciada principalmente pela estatura, mas também pela idade, estágio do desenvolvimento, raça e sexo (153, 197). Sabe-se que a correlação da VOP com risco cardiovascular aumentado e a interferência na pressão arterial é mais acentuada na fase adulta, assim como foi demonstrado que as diferenças na VOP influenciadas pela raça e cor começam a aparecer apenas na puberdade (153).

Não foram verificadas diferenças relacionadas ao estado nutricional e a RCE e risco cardiovascular para expressão ou atividade da renina, ECA2 e NEP (Tabelas 8, 9, 10 e 11). Era esperado encontrar uma diminuição na expressão ou atividade da ECA2 nos participantes obesos e com RCE e risco cardiovascular aumentado. Isto porque, foi verificado que crianças obesas tem menores níveis de Ang 1-7, principal produto da ECA2, e maiores níveis de desArg⁹BK, qual é degradada pela ECA2 (26, 61, 65). Porém, a ECA2 se mostrou influenciada pelo sexo dos participantes, as meninas apresentaram maior atividade da ECA2 urinária do que os meninos ($0,146 \pm 0,04$ vs $0,091 \pm 0,03$, $p < 0,01$). Essa diferença observada pode constituir um dos fatores para o menor risco de hipertensão e doença cardiovascular em mulheres pré-menopausa. A avaliação de componentes do SRAA (Ang II, Ang 1-7 e atividade da ECA 2 no tecido adiposo) em camundongos de ambos os sexos submetidos a dieta rica em gordura para desenvolvimento de hipertensão relacionada a obesidade demonstrou que, apesar das fêmeas apresentarem maior ganho de peso e massa de gordura, tinham menores níveis de Ang II e maiores níveis de Ang 1-7 associados a maior atividade da ECA2 no tecido adiposo (198). Consequentemente, os machos apresentaram hipertensão associada a obesidade enquanto as fêmeas não, porém a mesma proteção não foi vista em fêmeas ovariectomizadas (198).

Em resumo, a obesidade e a RCE aumentada contribuíram para maior expressão da sECA e da nECA de 90 KDa na urina, e para uma menor atividade da CatD urinária, o que pode refletir um menor *clearance* da CatD circulante culminando em seu acúmulo no plasma, ou pode indicar menor síntese renal desta enzima. Essas alterações podem promover o aumento dos níveis de Ang I e Ang II e a diminuição dos níveis de Ang 1-7 e BK, o que já foi constatado em crianças obesas, em estudo

anterior do nosso grupo (26). Essas alterações podem refletir no desenvolvimento e na manutenção da obesidade. A Ang II, inibe a lipólise e a captação de glicose pelos tecidos, por outro lado a Ang 1-7 e a BK favorecem estes processos (25, 146). Desta forma, o desbalanço nos níveis destes peptídeos favorece a hipertrigliceridemia e o acúmulo dos TG nos adipócitos aumentado a massa de gordura corpórea. Em contrapartida, o tecido adiposo contribui para hiperativação do SRAA a nível local e sistêmico alimentando este fenótipo (24). Estas considerações são reforçadas pela correlação positiva entre a expressão da nECA de 90 KDa e correlação negativa da CatD urinária com as medidas antropométricas.

É importante ressaltar que as principais alterações foram vistas na urina; que representa mais fielmente o SRAA e SCC renal. O aumento da expressão e atividade da ECA é um fator importante no desenvolvimento de doenças renais como, nefropatias, glomerulopatias, doença renal crônica (DRC), doença renal em estágio final (DREF) e hipertensão associada a transplante renal (75, 199). A diminuição da expressão e atividade da CatD também está associada a lesão glomerular e desenvolvimento de DRC (181). Embora, estudos mostrem que a obesidade infantil está associada a maior mortalidade por DREF e que o aumento da obesidade infantil coincide com aumento da incidência de insuficiência renal crônica e DREF nessa população (200), o entendimento sobre como a obesidade infantil contribui para doença renal é muito limitado. Nesse contexto, nosso estudo contribui de forma significativa demonstrando que a obesidade infantil está atrelada a alterações do SRAA e SCC renal, alterações estas que são similares as observadas em estudos experimentais e clínicos de doença renal. Infelizmente não foi realizada a avaliação da função renal, mas estes resultados justificam estudos mais aprofundados sobre a contribuição da obesidade infantil para doença renal.

Adicionalmente, as crianças e adolescentes obesos e com RCE aumentada apresentaram um perfil propício ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. Foi constatado aumento de marcadores inflamatórios como a nECA de 90 KDa e o ácido úrico (54, 192). E o aumento da expressão da sECA e nECA de 90 KDa associado a hipertrigliceridemia e deficiência de HDL-C observadas no grupo OB, favorece a oxidação das lipoproteínas por ação da Ang II, que também promove inflamação atraindo leucócitos e favorecendo a formação de células espumosas, e

nesse contexto mecanismos protetores associados a Ang 1-7 e BK estariam diminuídos (185, 186). Como discutido, a quimase e a CatD parecem participar neste processo, pois houve correlação da expressão da quimase urinária e da CatD plasmática com o aumento das lipoproteínas e a diminuição do HDL-C. Ainda, o aumento dos níveis de ácido úrico juntamente ao aumento do número de plaquetas observados no grupo OB contribuem para ativação plaquetária (192, 193). Essas alterações somadas criam um ambiente propício a dislipidemia e disfunção endotelial que predispõem a aterosclerose e lesão vascular.

É importante observar que o aumento da expressão ECA observado no grupo OB promove um estado pró-hipertensivo, devido ao desbalanço entre os níveis de Ang II que promove a retenção de sódio e água, a vasoconstrição e a fibrose, e os níveis de Ang 1-7 e a BK, que promovem vasodilatação. Não foram observadas alterações clínicas referentes a pressão arterial, porém os valores pressóricos estavam aumentados no grupo OB em comparação aos grupo BP e ou EU. Assim, a manutenção deste estado pró-hipertensivo pode levar a hipertensão precocemente.

As alterações também podem contribuir para a diabetes tipo II. A Ang II promove a ação da NADPH oxidase, principal responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio, o aumento destas promove inibição da fosfoinositídeo 3 – quinase (PI-3K), que em resposta a ativação do receptor de insulina promove translocação do transportador de glicose 4 (Glut4) para a membrana permitindo que a glicose seja captada pelo músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo (201, 202). A Ang II ainda promove a sinalização do NFκB, promovendo inflamação e ativação do TNFα que diminui a sensibilidade a insulina do músculo esquelético, promove lipogênese no fígado e a hiperlipidemia (202). A ECA inibi as ações da BK e Ang 1-7, a BK favorece a captação de glicose pelos tecidos, e ambas promovem a produção de NO, sendo antioxidantes e vasodilatadoras, a Ang 1-7 ainda exerce efeito anti-inflamatório inibindo a sinalização de NFκB (203). A hipertrigliceridemia e deficiência de HDL-C observadas no grupo OB também contribuem para o estresse oxidativo e inflamação. A manutenção destas alterações pode promover resistência à insulina e disfunção das células β pancreáticas, o que a longo prazo culmina na diabetes tipo II (202, 204).

Por fim, a ECA é a principal enzima do SRAA e SCC modulada na obesidade infantojuvenil e sua regulação aumentada promove o desbalanço nos peptídeos Ang II, Ang 1-7 e BK, criando um fenótipo propício ao desenvolvimento das complicações associadas a obesidade incluindo, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo II e síndrome metabólica.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Este estudo contribui de forma significativa demonstrando que alterações no SRAA e SCC estão presentes na obesidade infantojuvenil antes do surgimento da hipertensão arterial. Adicionalmente, os resultados refletem que ocorre principalmente uma modulação do SRAA e SCC renal na obesidade infantojuvenil, o que se trata de um dado novo e que contribui para o surgimento da hipótese de que o aumento da incidência de doença renal em crianças e adolescentes obesos pode ser atrelado a alterações no SRAA e SCC renal.

A ECA é o principal integrante do SRAA e SCC modulado na obesidade infantojuvenil. A maior expressão da sECA e da nECA de 90 KDa nas crianças obesas pode explicar os níveis diminuídos da Ang 1-7 e da BK observados no plasma de crianças obesas em estudo anterior, e diferentemente do esperado, não foram vistas alterações na expressão e atividade da ECA2 que poderiam justificar o aumento de desArg⁹BK nas crianças obesas, indicando que outras vias metabólicas talvez sejam mais relevantes nesse contexto. Ainda, a nECA de 90 KDa na urina foi identificada como possível marcador de aumento de risco cardiovascular associado a obesidade. A CatD também é afetada pelo estado nutricional, essas alterações podem ser relevantes para alterar o metabolismo das lipoproteínas, mas futuros estudos são necessários para esclarecer a função da CatD na obesidade.

A obesidade infantojuvenil estava associada com alterações clínicas do perfil lipídico; hipertrigliceridemia e deficiência de HDL-C. A presença destas alterações junto a regulação aumentada da ECA nas crianças e adolescentes obesos ativa mecanismos que levam a manutenção da obesidade e que contribuem para desenvolvimento das dislipidemias, hipertensão, diabetes e síndrome metabólica.

Não foram observadas alterações clínicas referentes aos parâmetros cardiovasculares ou metabolismo da glicose em função da obesidade infantojuvenil. Porém, marcadores de inflamação e disfunção endotelial como ácido úrico e nECA de 90 KDa estavam aumentados no grupo OB e os valores pressóricos eram maiores no grupo OB e com RCE aumentada.

Por fim, a regulação da ECA é alterada na obesidade infantojuvenil e pode contribuir para alterações nos níveis de peptídeos do SRAA e SCC ativando mecanismo fisiopatológicos que contribuem para manutenção da obesidade e para o

desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e renais associadas a esta. Desta forma, justifica-se o monitoramento da expressão e atividade da ECA em crianças e adolescentes obesos, e a investigação de possíveis benefícios de terapia voltada à supressão da ECA para essa população.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

1. Clément K, Ferré P. Genetics and the pathophysiology of obesity. *Pediatr Res*. 2003;53(5):721-5.
2. Spruijt-Metz D. Etiology, Treatment and Prevention of Obesity in Childhood and Adolescence: A Decade in Review. *J Res Adolesc*. 2011;21(1):129-52.
3. Griffiths LJ, Dezateux C, Hill A. Is obesity associated with emotional and behavioural problems in children? Findings from the Millennium Cohort Study. *Int J Pediatr Obes*. 2011;6(2-2):e423-32.
4. World Health Organization W. Obesity and overweight 2021 [updated 9th June 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
5. Center of Disease Control and Prevention C. Defining Childhood Obesity [updated 3rd June 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/obesity/childhood/defining.html>.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional 2010 [Available from: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/13884-asi-pof-2008-2009-desnutricao-cai-e-peso-das-criancas-brasileiras-ultrapassa-padrao-internacional>.
7. Gurevich-Panigrahi T, Panigrahi S, Wiechec E, Los M. Obesity: pathophysiology and clinical management. *Curr Med Chem*. 2009;16(4):506-21.
8. An R, Yan H, Shi X, Yang Y. Childhood obesity and school absenteeism: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2017;18(12):1412-24.
9. Goettler A, Grosse A, Sonntag D. Productivity loss due to overweight and obesity: a systematic review of indirect costs. *BMJ Open*. 2017;7(10):e014632.
10. Cawley J, Biener A, Meyerhoefer C, Ding Y, Zvenyach T, Smolarz BG, et al. Direct medical costs of obesity in the United States and the most populous states. 2021;27(3):354-66.
11. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity pathogenesis: an endocrine society scientific statement. 2017;38(4):267-96.
12. Thon M, Hosoi T, Ozawa KJFie. Possible integrative actions of leptin and insulin signaling in the hypothalamus targeting energy homeostasis. 2016;7:138.
13. Negirão AB, Licinio JJABdE, Metabologia. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. 2000;44(3):205-14.
14. Ellis KJ, Nicolson MJPR. Leptin levels and body fatness in children: effects of gender, ethnicity, and sexual development. 1997;42(4):484-8.
15. Romero CEM, Zanesco AJRdN. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. 2006;19:85-91.
16. Bacha F, Arslanian SAJTJoCE, Metabolism. Ghrelin suppression in overweight children: a manifestation of insulin resistance? 2005;90(5):2725-30.
17. Chadda KR, Cheng TS, Ong KK. GLP-1 agonists for obesity and type 2 diabetes in children: Systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2021;22(6):e13177.
18. Swithers SE, Hall WJP, behavior. A nutritive control of independent ingestion in rat pups emerges by nine days of age. 1989;46(5):873-9.

19. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JSJTJoci. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. 1998;101(5):1020-7.
20. Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano EJPr. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. 2008;63(4):358-63.
21. Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, Enriori PJ, Fisher SK, Evans AE, et al. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. 2010;151(4):1598-610.
22. De Solis AJ, Baquero AF, Bennett CM, Grove KL, Zeltser LMJMm. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. 2016;5(3):198-209.
23. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RDJS. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. 2005;310(5748):683-5.
24. Wu C, Lu H, Cassis LA, Daugherty A. Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review. *N Am J Med Sci (Boston)*. 2011;4(4):183-90.
25. Caminhotto ReO, Sertié RA, Andreotti S, Campaãa AB, Lima FB. Renin-angiotensin system blockers regulate the metabolism of isolated fat cells in vitro. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(8).
26. Fernandes FB, Fernandes AB, Febba ACS, Leite APO, Leite CA, Vitale MSS, et al. Association of Ang-(1-7) and des-Arg(9)BK as new biomarkers of obesity and cardiometabolic risk factors in adolescents. *Hypertens Res*. 2021;44(8):969-77.
27. Muñoz-Durango N, Fuentes CA, Castillo AE, González-Gómez LM, Vecchiola A, Fardella CE, et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
28. Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res*. 2015;116(6):960-75.
29. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 2013;216(2):R1-R17.
30. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013;112(8):1104-11.
31. Casarini DE, Arita DY, Cunha TS, Ronchi FA, Aragão DS, Rosa RM, et al. Up-Regulation of Renin-Angiotensin System in Diabetes and Hypertension: Implications on the Development of Diabetic Nephropathy. In: Chan JSD, editor. *Diabetic Nephropathy*: IntechOpen; 2012.
32. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2001;38(6):1246-9.
33. Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(2):H137-52.
34. Handbook of proteolytic enzymes. 3rd edition ed: Academic Press; 2013.

35. Nguyen G, Danser AH. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp Physiol*. 2008;93(5):557-63.
36. Tan P, Blais C, Nguyen TM, Schiller PW, Gutkowska J, Lavoie JL. Prorenin/renin receptor blockade promotes a healthy fat distribution in obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(9):1946-54.
37. Jan Danser AH, Batenburg WW, van Esch JH. Prorenin and the (pro)renin receptor--an update. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(5):1288-92.
38. Skeggs LT, Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M. The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med*. 1976;60(6):737-48.
39. Rosa RM, Colucci JA, Yokota R, Moreira RP, Aragao DS, Ribeiro AA, et al. Alternative pathways for angiotensin II production as an important determinant of kidney damage in endotoxemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(3):F496-504.
40. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens*. 1991;9(1):3-15.
41. Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WL, Shah KH, Giani JF, Gonzalez-Villalobos RA, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):1-46.
42. Herrera M, Silva GB, Garvin JL. Angiotensin II stimulates thick ascending limb superoxide production via protein kinase C(alpha)-dependent NADPH oxidase activation. *J Biol Chem*. 2010;285(28):21323-8.
43. Bernardi S, Michelli A, Zuolo G, Candido R, Fabris B. Update on RAAS Modulation for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Disease. *J Diabetes Res*. 2016;2016:8917578.
44. Grobe JL, Rahmouni K, Liu X, Sigmund CD. Metabolic rate regulation by the renin-angiotensin system: brain vs. body. *Pflugers Arch*. 2013;465(1):167-75.
45. Dzau VJ. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension*. 1986;8(7):553-9.
46. Zhang F, Liu C, Wang L, Cao X, Wang YY, Yang JK. Antioxidant effect of angiotensin (17) in the protection of pancreatic beta cell function. *Mol Med Rep*. 2016;14(3):1963-9.
47. Li Y, Li XH, Yuan H. Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2012;2(1):56-62.
48. SKEGGS LT, KAHN JR, SHUMWAY NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*. 1956;103(3):295-9.
49. Yang HY, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta*. 1970;214(2):374-6.
50. Ehlers MR, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry*. 1991;30(29):7118-26.
51. Hattori MA, Del Ben GL, Carmona AK, Casarini DE. Angiotensin I-converting enzyme isoforms (high and low molecular weight) in urine of premature and full-term infants. *Hypertension*. 2000;35(6):1284-90.
52. Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010;293(6):925-37.

53. Ehlers MR, Gordon K, Sturrock EDJSAMJ. Shedding the load of hypertension: the proteolytic processing of angiotensin-converting enzyme: forum-review. 2012;102(6):461-4.
54. Maluf-Meiken LC, Fernandes FB, Aragão DS, Ronchi FA, Andrade MC, Franco MC, et al. N-domain isoform of Angiotensin I converting enzyme as a marker of hypertension: populational study. *Int J Hypertens*. 2012;2012:581780.
55. Aragão DS, de Andrade MC, Ebihara F, Watanabe IK, Magalhães DC, Juliano MA, et al. Serine proteases as candidates for proteolytic processing of angiotensin-I converting enzyme. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:673-9.
56. Krauspenhar B, Sontag F, Ronchi FA, Casarini DE, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE. Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform: Biomarker for diagnosis of preeclampsia? *Med Hypotheses*. 2014;83(5):526-9.
57. Fernandes FB, Plavnik FL, Teixeira AM, Christofalo DM, Ajzen SA, Higa EM, et al. Association of urinary N-domain Angiotensin I-converting enzyme with plasma inflammatory markers and endothelial function. *Mol Med*. 2008;14(7-8):429-35.
58. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 1998;31(4):912-7.
59. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 2004;383(Pt 1):45-51.
60. Bitkin EC, Boyraz M, Taskin N, Akcay A, Ulucan K, Akyol MB, et al. Effects of ACE inhibitors on insulin resistance and lipid profile in children with metabolic syndrome. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013;5(3):164-9.
61. Guang C, Phillips RD, Jiang B, Milani F. Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis*. 2012;105(6-7):373-85.
62. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5):E1-9.
63. Kalea AZ, Batlle D. Apelin and ACE2 in cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(3):273-82.
64. Wang W, McKinnie SM, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension*. 2016;68(2):365-77.
65. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2014;63(6):1138-47.
66. Hrenak J, Paulis L, Simko F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
67. Sharma JN, Narayanan P. The kallikrein-kinin pathways in hypertension and diabetes. *Prog Drug Res*. 2014;69:15-36.
68. Moss ML, Lambert MH. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem*. 2002;38:141-53.

69. Danser AHJ, Epstein M, Batlle D. Renin-Angiotensin System Blockers and the COVID-19 Pandemic: At Present There Is No Evidence to Abandon Renin-Angiotensin System Blockers. *Hypertension*. 2020;75(6):1382-5.
70. Burns KD, Lytvyn Y, Mahmud FH, Daneman D, Deda L, Dunger DB, et al. The relationship between urinary renin-angiotensin system markers, renal function, and blood pressure in adolescents with type 1 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(2):F335-F42.
71. Ortiz-Pérez JT, Riera M, Bosch X, De Caralt TM, Perea RJ, Pascual J, et al. Role of circulating angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: a prospective controlled study. *PLoS One*. 2013;8(4):e61695.
72. Uri K, Fagyas M, Kertész A, Borbély A, Jenei C, Bene O, et al. Circulating ACE2 activity correlates with cardiovascular disease development. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2016;17(4).
73. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;66:167-76.
74. Azinheira Nobrega Cruz N, Stoll D, Casarini DE, Bertagnolli M. Role of ACE2 in pregnancy and potential implications for COVID-19 susceptibility. *Clin Sci (Lond)*. 2021;135(15):1805-24.
75. Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. *World J Nephrol*. 2015;4(1):74-82.
76. Li Y, Cao Y, Zeng Z, Liang M, Xue Y, Xi C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF-kappaB pathways. *Sci Rep*. 2015;5:8209.
77. Kehoe PG, Wong S, Al Mulhim N, Palmer LE, Miners JS. Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid-beta and tau pathology. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8(1):50.
78. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80.e8.
79. Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves ANA, Ogava RLT, et al. ACE2 Expression is Increased in the Lungs of Patients with Comorbidities Associated with Severe COVID-19. *medRxiv*. 2020.
80. Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res*. 2020;178:104792.
81. Mahmudpour M, Roozbeh J, Keshavarz M, Farrokhi S, Nabipour I. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. *Cytokine*. 2020;133:155151.
82. Azinheira Nobrega Cruz N, Gonçalves de Oliveira LC, Tedesco Silva Junior H, Osmar Medina Pestana J, Casarini DE. Angiotensin-Converting Enzyme 2 in the Pathogenesis of Renal Abnormalities Observed in COVID-19 Patients. 2021;12(1372).
83. Oliveira LCG, Cruz NAN, Ricelli B, Tedesco-Silva H, Jr., Medina-Pestana JO, Casarini DE. Interactions amongst inflammation, renin-angiotensin-aldosterone and kallikrein-kinin systems: suggestive approaches for COVID-19 therapy. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2021;27:e20200181.

84. Wong-Leung YL, Kenny AJ. Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney. *Biochem J.* 1968;110(2):5P.
85. Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature.* 1978;276(5687):523-6.
86. Turner AJ. Neprilysin. *Handbook of proteolytic enzymes*: Elsevier; 2004. p. 419-26.
87. Campbell DJ. Neprilysin Inhibitors and Bradykinin. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:257.
88. Roques BP, Beaumont A. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11(6):245-9.
89. Jessup M. Neprilysin inhibition--a novel therapy for heart failure. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1062-4.
90. Domenig O, Manzel A, Grobe N, Konigshausen E, Kaltenecker CC, Kovarik JJ, et al. Neprilysin is a Mediator of Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human Kidney. *Sci Rep.* 2016;6:33678.
91. Hua Y, Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(2):195-208.
92. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(1):12-28.
93. Khalkhali-Ellis Z, Goossens W, Margaryan NV, Hendrix MJ. Cleavage of Histone 3 by Cathepsin D in the involuting mammary gland. *PLoS One.* 2014;9(7):e103230.
94. Margaryan NV, Kirschmann DA, Lipavsky A, Bailey CM, Hendrix MJ, Khalkhali-Ellis Z. New insights into cathepsin D in mammary tissue development and remodeling. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(5):457-66.
95. Liu L, Chen B, Zhang X, Tan L, Wang DW. Increased Cathepsin D Correlates with Clinical Parameters in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Dis Markers.* 2017;2017:5286408.
96. Haidar B, Kiss RS, Sarov-Blat L, Brunet R, Harder C, McPherson R, et al. Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem.* 2006;281(52):39971-81.
97. Dencker M, Tanha T, Karlsson MK, Wollmer P, Andersen LB, Thorsson O. Cystatin B, cathepsin L and D related to surrogate markers for cardiovascular disease in children. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187494.
98. Woessner JF, Jr., Shamberger RJ, Jr. Purification and properties of cathepsin D from bovine uterus. *J Biol Chem.* 1971;246(7):1951-60.
99. Naseem RH, Hedegard W, Henry TD, Lessard J, Sutter K, Katz SA. Plasma cathepsin D isoforms and their active metabolites increase after myocardial infarction and contribute to plasma renin activity. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(2):139-46.
100. Okamoto H, Greenbaum LM. Kininogen substrates for trypsin and cathepsin D in human, rabbit and rat plasmas. *Life Sci.* 1983;32(17):2007-13.
101. Barrett AJ, Woessner JF, Rawlings ND. *Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 1*: Elsevier; 2012.
102. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004;5 Suppl 1:S7-10.

103. Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther.* 2006;112(3):668-76.
104. Tojo H, Urata H. Chymase inhibition and cardiovascular protection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(2):139-43.
105. Maeda Y, Inoguchi T, Takei R, Sawada F, Sasaki S, Fujii M, et al. Inhibition of chymase protects against diabetes-induced oxidative stress and renal dysfunction in hamsters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):F1328-38.
106. Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(2):135-42.
107. Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia.* 2007;11(3):124-8.
108. Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Compr Physiol.* 2011;1(2):971-93.
109. Morais RL, Silva ED, Sales VM, Filippelli-Silva R, Mori MA, Bader M, et al. Kinin B1 and B2 receptor deficiency protects against obesity induced by a high-fat diet and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:399-407.
110. Kakoki M, Smithies O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney Int.* 2009;75(10):1019-30.
111. Chao J, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein-kinin therapy in hypertension and organ damage. *Prog Drug Res.* 2014;69:37-57.
112. Potier L, Waeckel L, Fumeron F, Bodin S, Fysekidis M, Chollet C, et al. Tissue kallikrein deficiency, insulin resistance, and diabetes in mouse and man. *J Endocrinol.* 2014;221(2):297-308.
113. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):27-77.
114. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004;143(7):803-18.
115. Kouyoumdjian M, Nagaoka MR, Loureiro-Silva MR, Borges DR. Portal hypertensive response to kinin. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):431-42.
116. Li HX, Hwang BY, Laxmikanthan G, Blaber SI, Blaber M, Golubkov PA, et al. Substrate specificity of human kallikreins 1 and 6 determined by phage display. *Protein Sci.* 2008;17(4):664-72.
117. Bader M. *Cardiovascular Hormone Systems: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutics*; John Wiley & Sons; 2008.
118. Campbell DJ. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(6):665-77.

119. Hawgood BJ, Mauricio Rocha e Silva MD: snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. *Toxicon*. 1997;35(11):1569-80.
120. ROCHA E SILVA M, BERALDO WT, ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949;156(2):261-73.
121. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJJB. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. 1970;9(13):2583-93.
122. Cushman DW, Ondetti MA. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*. 1991;17(4):589-92.
123. Murphey LJ, Malave HA, Petro J, Biaggioni I, Byrne DW, Vaughan DE, et al. Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. 2006;318(3):1287-92.
124. Morinelli TA, Webb JG, Jaffa AA, Privitera PJ, Margolius HSJJoP, Therapeutics E. A metabolic fragment of bradykinin, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, protects against the deleterious effects of lipopolysaccharide in rats. 2001;296(1):71-6.
125. Dendorfer A, Wolfrum S, Wellhoner P, Korsman K, Dominiak P. Intravascular and interstitial degradation of bradykinin in isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol*. 1997;122(6):1179-87.
126. DeWitt BJ, Cheng DY, Kadowitz PJ. des-Arg9-bradykinin produces tone-dependent kinin B1 receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. *Circ Res*. 1994;75(6):1064-72.
127. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(1):H275-83.
128. Erdos EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*. 2010;55(2):214-20.
129. deBlois D, Bouthillier J, Marceau FJBjop. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg9-bradykinin: possible role of interleukin-1. 1991;103(1):1057-66.
130. Mori MA, Araujo RC, Pesquero JBJIi. Kinin B1 receptor stimulation modulates leptin homeostasis. Evidence for an insulin-dependent mechanism. 2008;8(2):242-6.
131. Pelorosso FG, Brodsky PT, Zold CL, Rothlin RPJJoP, Therapeutics E. Potentiation of des-Arg9-kallidin-induced vasoconstrictor responses by metallopeptidase inhibition in isolated human umbilical artery. 2005;313(3):1355-60.
132. Campbell DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(6):784-91.
133. Schalekamp MA, Derkx FH. Plasma kallikrein and plasmin as activators of prorenin: links between the renin-angiotensin system and other proteolytic systems in plasma. *Clin Sci (Lond)*. 1981;61(1):15-21.
134. Thethi T, Kamiyama M, Kobori HJChr. The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome. 2012;14(2):160-9.
135. Paniagua JAJWjod. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. 2016;7(19):483.

136. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa NJOR. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. 2012;13(2):136-49.
137. Gavello D, Vandael D, Gosso S, Carbone E, Carabelli VJTJop. Dual action of leptin on rest-firing and stimulated catecholamine release via phosphoinositide 3-kinase-driven BK channel up-regulation in mouse chromaffin cells. 2015;593(22):4835-53.
138. Davy KP, Orr JSJN, reviews b. Sympathetic nervous system behavior in human obesity. 2009;33(2):116-24.
139. Mitchell CS, Premaratna SD, Bennett G, Lambrou M, Stahl LA, Jois M, et al. Inhibition of the renin-angiotensin system reduces gene expression of inflammatory mediators in adipose tissue independent of energy balance. 2021;12.
140. Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, et al. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. 2008;105(18):6531-6.
141. Littlejohn NK, Keen HL, Weidemann BJ, Claflin KE, Tobin KV, Markan KR, et al. Suppression of resting metabolism by the angiotensin AT2 receptor. 2016;16(6):1548-60.
142. Blanke K, Schlegel F, Raasch W, Bader M, Dähnert I, Dhein S, et al. Effect of Angiotensin(1-7) on Heart Function in an Experimental Rat Model of Obesity. *Front Physiol.* 2015;6:392.
143. Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SEJChr. Local adipose tissue renin-angiotensin system. 2008;10(2):93.
144. Bhandari SK, Batech M, Shi J, Jacobsen SJ, Sim JJJKr, practice c. Plasma renin activity and risk of cardiovascular and mortality outcomes among individuals with elevated and nonelevated blood pressure. 2016;35(4):219-28.
145. Mori MA, Araújo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, Barros CC, et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes.* 2008;57(6):1491-500.
146. Gregnani MF, Hungaro TG, Martins-Silva L, Bader M, Araujo RCJFip. Bradykinin B2 receptor signaling increases glucose uptake and oxidation: evidence and open questions. 2020;11:1162.
147. Eguchi A, Feldstein AEJA. Lysosomal Cathepsin D contributes to cell death during adipocyte hypertrophy. 2013;2(3):170-5.
148. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, et al. Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. 2012;97(9):E1677-E85.
149. Becker M, Siems W-E, Kluge R, Gembardt F, Schultheiss H-P, Schirner M, et al. New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late-onset obesity. 2010;5(9):e12793.
150. Packer M, Kitzman DWJJHF. Obesity-related heart failure with a preserved ejection fraction: the mechanistic rationale for combining inhibitors of aldosterone, neprilysin, and sodium-glucose cotransporter-2. 2018;6(8):633-9.
151. Standeven KF, Hess K, Carter AM, Rice GI, Cordell PA, Balmforth AJ, et al. Neprilysin, obesity and the metabolic syndrome. 2011;35(8):1031-40.

152. Zaniqueli D, Alvim RO, Baldo MP, Luiz SG, Cunha RS, Mill JGJC, et al. Excess weight in children and adolescents is associated with altered subendocardial blood supply among girls but not boys. 2018;45(5):471-4.
153. Zaniqueli D, Alvim RO, Luiz SG, Oliosia PR, de Sá Cunha R, Mill JGJJoh. Ethnicity and arterial stiffness in children and adolescents from a Brazilian population. 2017;35(11):2257-61.
154. Meneses C, Ocampos DL, de Toledo TBJAeS. Estagiamento de Tanner: um estudo de confiabilidade entre o referido e o observado. 2008;5(3):54-6.
155. Artigao L, Llavador J, Puras A, Abril L, Rubio M, Torres C, et al. Evaluation and validation of Omron Hem 705 CP and Hem 706/711 monitors for self-measurement of blood pressure. 2000;25(2):96-102.
156. Organization WH. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development: World Health Organization; 2006.
157. Ashwell M, Gibson S. Waist-to-height ratio as an indicator of 'early health risk': simpler and more predictive than using a 'matrix' based on BMI and waist circumference. *BMJ Open*. 2016;6(3):e010159.
158. Piquilloud Y, Reinharz A, Roth M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophys Acta*. 1970;206(1):136-42.
159. Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*. 1976;66(2):416-24.
160. Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, et al. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. 2006;55(7):2132-9.
161. Pedersen KB, Sriramula S, Chhabra KH, Xia H, Lazartigues EJAJoP-R, Integrative, Physiology C. Species-specific inhibitor sensitivity of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its implication for ACE2 activity assays. 2011;301(5):R1293-R9.
162. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
163. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
164. Goldman A, Harper S, Speicher DW. Detection of Proteins on Blot Membranes. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016;86:10.8.1-8.1.
165. Freedman DS, Butte NF, Taveras EM, Goodman AB, Ogden CL, Blanck HMJTJop. The limitations of transforming very high body mass indexes into z-scores among 8.7 million 2-to 4-year-old children. 2017;188:50-6. e1.
166. Kelly AS, Barlow SE, Rao G, Inge TH, Hayman LL, Steinberger J, et al. Severe obesity in children and adolescents: identification, associated health risks, and treatment approaches: a scientific statement from the American Heart Association. 2013;128(15):1689-712.
167. Departamento Científico de Endocrinologia D. Dislipidemia na criança e no adolescente - Orientações ao pediatra: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2020 [Available from: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/22336c-GPA_-_Dislipidemia_Crianca_e_Adoles.pdf].

168. Kahl L, Hughes HK. The Harriet Lane Handbook E-Book: Elsevier Health Sciences; 2017.
169. Children NHBPEPWGoHBPI, Pediatrics AJ. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. 2004;114(Supplement_2):555-76.
170. Williams TA, Danilov S, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. A study of chimeras constructed with the two domains of angiotensin I-converting enzyme. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(1):11-4.
171. Barstad LH, Júlíusson PB, Johnson LK, Hertel JK, Lekhal S, Hjelmæsæth JJBp. Gender-related differences in cardiometabolic risk factors and lifestyle behaviors in treatment-seeking adolescents with severe obesity. 2018;18(1):1-8.
172. Breehl L, Caban OJS. *Physiology, puberty*. 2020.
173. Javed Z, Maqsood MH, Amin Z, Nasir K. Race and Ethnicity and Cardiometabolic Risk Profile: Disparities Across Income and Health Insurance in a National Sample of US Adults. 2022;28:S91-S100.
174. Travassos C, Williams DRJCdsp. The concept and measurement of race and their relationship to public health: a review focused on Brazil and the United States. 2004;20:660-78.
175. Moreira NF, Soares CdA, Junqueira TdS, Martins RdCBJCSC. Tendências do estado nutricional de crianças no período de 2008 a 2015: dados do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (Sisvan). 2020;28:447-54.
176. Centers for Disease Control and Prevention C. Body mass index: Considerations for practitioners 2011 [cited 2021 30th August 2021]. 1-4]. Available from: <https://www.cdc.gov/obesity/downloads/bmiforpractitioners.pdf>.
177. Taylor RW, Grant AM, Williams SM, Goulding AJO. Sex differences in regional body fat distribution from pre-to postpuberty. 2010;18(7):1410-6.
178. World Health Organization W. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. 2011.
179. Cocchiario P, De Pasquale V, Della Morte R, Tafuri S, Avallone L, Pizard A, et al. The multifaceted role of the lysosomal protease cathepsins in kidney disease. 2017;5:114.
180. Hoes MF, Tromp J, Ouwerkerk W, Bommer N, Oberdorf-Maass SU, Samani NJ, et al. The role of cathepsin D in the pathophysiology of heart failure and its potentially beneficial properties: a translational approach. 2020;22(11):2102-11.
181. Yamamoto-Nonaka K, Koike M, Asanuma K, Takagi M, Trejo JAO, Seki T, et al. Cathepsin D in podocytes is important in the pathogenesis of proteinuria and CKD. 2016;27(9):2685-700.
182. Jia L, Zhang L, Shao C, Song E, Sun W, Li M, et al. An attempt to understand kidney's protein handling function by comparing plasma and urine proteomes. 2009;4(4):e5146.
183. Raj MJJoe, metabolism. Obesity and cardiovascular risk in children and adolescents. 2012;16(1):13.
184. Nagao M, Nakajima H, Toh R, Hirata K-i, Ishida TJJoa, thrombosis. Cardioprotective effects of high-density lipoprotein beyond its anti-atherogenic action. 2018:RV17025.

185. Klop B, Elte JWF, Cabezas MCJN. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. 2013;5(4):1218-40.
186. Singh BM, Mehta JLJAoim. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia: relevance in the therapy of hypertension and coronary heart disease. 2003;163(11):1296-304.
187. Nguyen SD, Maaninka K, Lappalainen J, Nurmi K, Metso J, Oorni K, et al. Carboxyl-Terminal Cleavage of Apolipoprotein A-I by Human Mast Cell Chymase Impairs Its Anti-Inflammatory Properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(2):274-84.
188. Lee-Rueckert M, Vikstedt R, Metso J, Jauhiainen M, Kovanen PT. Association of cholesteryl ester transfer protein with HDL particles reduces its proteolytic inactivation by mast cell chymase. *J Lipid Res.* 2008;49(2):358-68.
189. Uehara Y, Urata H, Ideishi M, Arakawa K, Saku KJCr. Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. 2002;55(4):870-6.
190. Jones DP, True HD, Patel JJMoi. Leukocyte trafficking in cardiovascular disease: insights from experimental models. 2017;2017.
191. Park B, Lee HA, Lee SH, Park BM, Park E, Kim HS, et al. Association between serum levels of uric acid and blood pressure tracking in childhood. 2017;30(7):713-8.
192. Johnson RJ, Kang D-H, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? 2003;41(6):1183-90.
193. Samocha-Bonet D, Justo D, Rogowski O, Saar N, Abu-Abeid S, Shenkerman G, et al. Platelet counts and platelet activation markers in obese subjects. 2008;2008.
194. Boa-Sorte N, Neri LA, Leite MEQ, Brito SM, Meirelles AR, Luduvise F, et al. Maternal perceptions and self-perception of the nutritional status of children and adolescents from private schools. 2007;83:349-56.
195. Pinhas-Hamiel O, Newfield R, Koren I, Agmon A, Lilos P, Phillip MJJjoo. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. 2003;27(3):416-8.
196. Pereira T, Correia C, Cardoso JJJom, engineering b. Novel methods for pulse wave velocity measurement. 2015;35(5):555-65.
197. Zaniqueli D, Baldo MP, Sartório CL, de Sá Cunha R, de Oliveira Alvim R, Mill JGJC, et al. Early sex differences in central arterial wave reflection are mediated by different timing of forward and reflected pressure waves. 2018;45(2):166-73.
198. Gupte M, Thatcher SE, Boustany-Kari CM, Shoemaker R, Yiannikouris F, Zhang X, et al. Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice. 2012;32(6):1392-9.
199. Leite CA, Bertoncello NS, Watanabe IK, Fernandes FB, Andrade MC, Ronchi FA, et al. 90-kDa N-domain angiotensin I-converting enzyme (ACE): possible marker for hypertension in a renal transplant model. *J Bras Nefrol.* 2017;39(1):11-4.
200. Wang Y, Chen X, Klag MJ, Caballero BJAickd. Epidemic of childhood obesity: implications for kidney disease. 2006;13(4):336-51.

201. Rubattu S, Mennuni S, Testa M, Mennuni M, Pierelli G, Pagliaro B, et al. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):23011-32.
202. Mor A, Aizman E, George J, Kloog YJPo. Ras inhibition induces insulin sensitivity and glucose uptake. 2011;6(6):e21712.
203. Khajah MA, Fateel MM, Ananthalakshmi KV, Luqmani YA. Anti-Inflammatory Action of Angiotensin 1-7 in Experimental Colitis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150861.
204. Parhofer KGJD, journal m. Interaction between glucose and lipid metabolism: more than diabetic dyslipidemia. 2015;39(5):353-62.

Apêndices

Apêndice 1. Tabela de avaliação dos parâmetros antropométricos nos grupos classificados por gênero.

<i>Varíavel</i>	<i>Grupos de estudo</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>Feminino</i>	<i>Masculino</i>	
Peso (Kg)	47,5±16,2	47,9±17,3	*p = 0,87
IMC	20,9±4,7	20,4±4,8	*p = 0,32
pIMC (%)	66,8±34,9	60,4±37,8	*p = 0,44
Z-escore	1,2±1,4	1,0±1,6	*p = 0,45
Estatura (cm)	148,7±13,7	150,9±16,1	*p = 0,20
pEstatura (%)	66,8±27,0	60,6±28,6	*p = 0,83
Circ. Cintura (cm)	67,3±10,3	68,7±12,1	*p = 0,36
Quadril (cm)	84,8±13,1	81,6±13,7	**p = 0,03
ICQ	0,80±0,06	0,85±0,15	*p <0,01
RCE	0,46±0,07	0,46±0,07	p = 0,93
Massa Magra (Kg)	17,4±5,5	19,2±7,2	*p = 0,05
Massa Gorda (Kg)	14,8±8,7	12,2±8,7	*p <0,01
% gordura	29,2±9,2	23,7±11,6	*p <0,01

Nota: Valores representados em Média ± desvio padrão. * Man Whitney teste. **T-test.

Apêndice 2. Valores de Referência para perfil lipídico em crianças e adolescentes.

	<i>Idade (anos)</i>	<i>Em jejum</i>	<i>Sem jejum</i>
		<i>Aceitável (mg/dL)</i>	<i>Aceitável (mg/dL)</i>
CT	2 - 19	< 170	<170
LDL-C	2 - 19	< 110	<110
HDL-C	2-19	> 45	> 45
TG	< 10	<75	<85
	10 - 19	<90	<100
Não HDL-C	2-19	<120	-
Valor calculado de referência para as razões			
CT/HDL-C	2-19	< 3,8	<3,7
LDL-C/ HDL-C	2-19	< 2,4	<2,4
TG/HDL-C	< 10	< 1,6	<1,8
	10 - 19	< 2,0	<2,2

Nota: Adaptado de Guia Prático de Atualização – Departamento Científico de Endocrinologia (2019 – 2021). As razões foram calculadas com base nos valores de referência aceitáveis para idade.

Apêndice 3. Valores de Referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos em crianças e adolescentes.

Paramêtros Bioquímicos		
Parâmetros no sangue	Faixa etária	Valores Aceitáveis
Ácido úrico (mg/dL)	6 - 11 anos	2,2 - 6,6
	12 - 19 anos (masculino)	3,0 - 7,7
	12 -19 anos (feminino)	2,7 - 5,7
Nitrogênio ureico	Criança	5,0 -18,0
	Adulto	6,0 - 20,0
Glicose (mg/dL)	Criança	60 -100
	>16 anos	70 - 105
Creatinina (mg/dL)	Criança	0,3 - 0,7
	Adolescente	0,5 - 1,0
	Adulto (masc.)	0,9 - 1,3
	Adulto (femin.)	0,6 -1,1
Paramêtros hematológicos		
Parâmetro	Faixa etária	Valores aceitáveis
Hemoglobina (g/dL)	6 -12 anos	11,5 - 13,5
	12 - 18 anos (masc.)	13,0 - 14,5
	12 - 18 anos (femin.)	12,0 - 14,0
Hematócrito (%)	6 -12 anos	35 - 40
	12 -18 anos (masc.)	36 - 43
	12 - 18 anos (femin.)	37 - 41
Hemácias (g/dL)	6 - 18 anos	31,0 - 34,0
Plaquetas (10 ³ /mL)	6 -18 anos	150 - 350

Nota: Adaptado de Hughes & Kahl – Harriet Lane Handbook (2018).

Apêndice 4. Tabela de parâmetros bioquímicos nos grupos de estudo classificados por Z-escore.

Variável (mg/dL)	Grupos de estudo				Valor de p *
	BP	EU	SP	OB	
CT	137,7±27,8	143,5±29,3	149,6±28,7	153,6±28,0	p = 0,03 ^{''}
HDL-C	50,3±9,3	49,7±9,1	45,8±9,5	41,1±9,1	p < 0,01 ^(B, C, D, E)
LDL-C	70,2±22,8	76,5±26,4	84,6±24,7	93,5±28,2	p < 0,01 ^(B, C, D, E)
VLDL-C	17,5±4,6	17,7±4,4	20,2±4,7	23,3±5,1	p < 0,01 ^(B, C, D, E, F)
TG	60,9±21,2	65,5±26,8	79,5±29,4	107,5±47,2	p < 0,01 ^(B, C, D, E, F)
Glicose	84,1±8,6	84,7±8,2	84,7±12,3	85,5±6,9	p = 0,97
Ácido úrico	3,5±0,99	4,0±1,1	4,4±1,3	4,6±0,87	p < 0,01 ^(B, C, D, E)
Ureia sérica	22,7±5,0	22,1±5,1	21,8±5,3	21,6±4,2	p = 0,73
Cr sérica	0,53±0,13	0,59±0,15	0,55±0,19	0,56±0,12	p = 0,16

Nota: Média ± Desvio Padrão. * Kruskal Wallis teste – Post hoc DunnTest. (A) Eutrófico ≠ Baixo Peso, (B) Eutrófico ≠ Sobrepeso, (C) Eutrófico ≠ Obeso, (D) Baixo Peso ≠ Sobrepeso, (E) Baixo Peso ≠ Obeso, (F) Sobrepeso ≠ Obeso, (G) Todos os grupos diferem entre si. ^{''} DunnTest não identificou qual grupo difere.

Apêndice 5. Tabela parâmetros bioquímicos nos grupos de estudo classificados por gênero.

Variável (mg/dL)	Grupos de estudo		Valor de p*
	Feminino	Masculino	
CT	147,5±28,1	146±29,8	p = 0,48
HDL-C	48,1±10,1	46,4±9,2	p = 0,13
LDL-C	81,1±25,0	81,0±27,3	p = 0,47
VLDL-C	19,6±5,0	19,1±4,8	p = 0,50
TG	75,5±31,3	75,2±33,9	p = 0,70
Glicose	84,0±7,5	85,4±11,8	p = 0,11
Ácido úrico	4,1±1,2	4,3±1,2	p = 0,16
Ureia sérica	21,0±5,1	22,8±4,9	p < 0,01
Cr sérica	0,55±0,14	0,58±0,19	p = 0,16

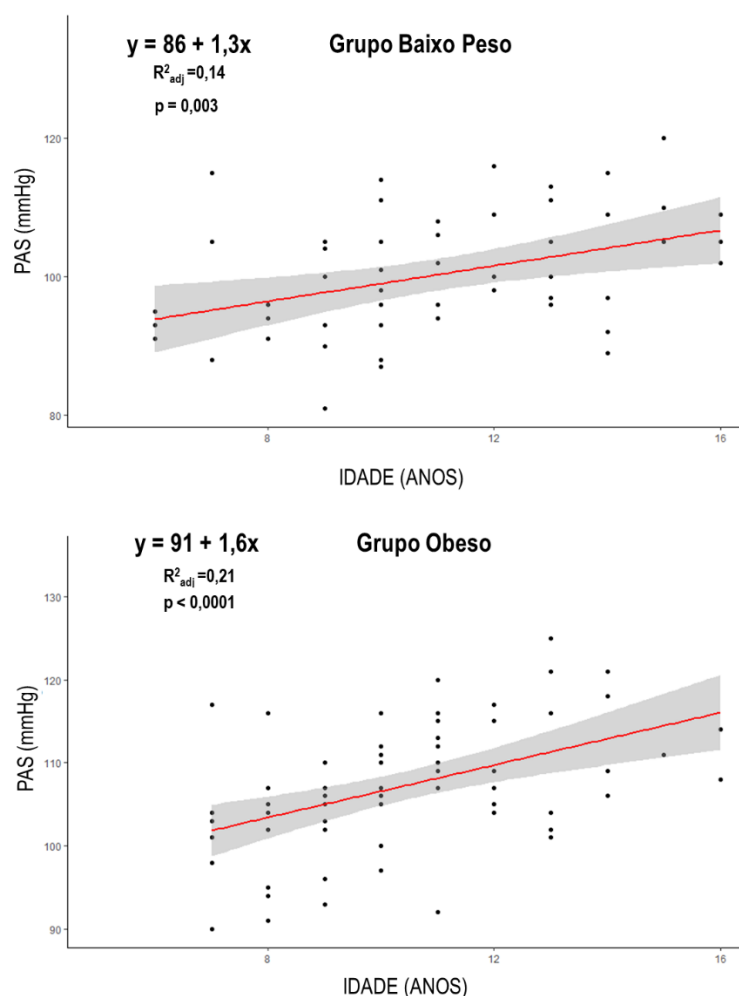
Nota: Média ± Desvio Padrão. * Man Whitney teste.

Apêndice 6. Tabela de parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados por Z-escore.

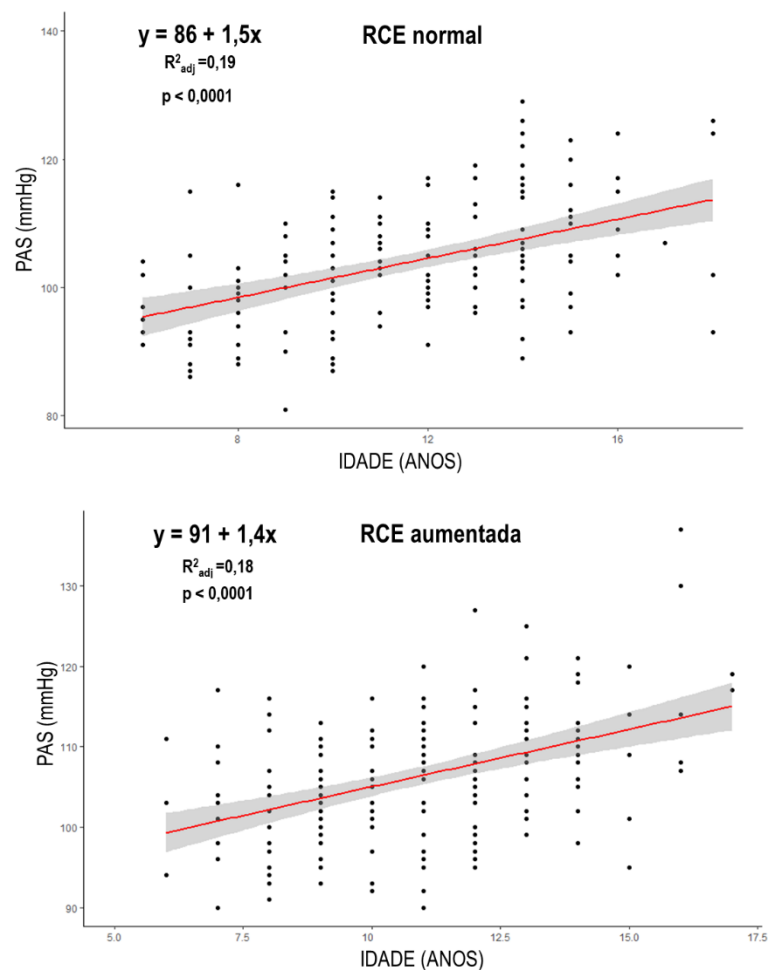
<i>Variável</i>	<i>Grupos de Estudo</i>				<i>Valor de p *</i>
	<i>BP</i>	<i>EU</i>	<i>SP</i>	<i>OB</i>	
PAS mmHg	99,1±9,4	105,5±9,7	105,4±8,8	109,0±7,0	p <0,01 ^(A, D, E)
PAD mmHg	61,2±9,0	61,7±6,4	63,2±6,6	65,6±6,2	p = 0,01 ^(C, E)
pPAS	36,4±25,5	44,4±25,2	47,6±23,3	56,6±21,1	p <0,01 ^(C, E)
pPAD	50,3±25,5	46,3±19,1	52,1±20,3	57,3±19,3	p = 0,02 ^(C)
FC bpm	75,7±11,6	72,9±12,7	75,0±11,4	74,8±9,0	p = 0,42

Nota: Média ± Desvio Padrão. * ANOVA unifatorial – Post hoc Tukey HSD. (A) EU ≠ BP, (B) EU ≠ SP, (C) EU ≠ OB, (D) BP ≠ SP, (E) BP ≠ OB, (F) SP ≠ OB, (G) Todos os grupos diferem entre si.

Apêndice 7. Equação da reta de modelo de regressão linear avaliando a correlação entre PAS e a idade no grupo BP e no grupo OB.



Apêndice 8. Equação da reta de modelo de regressão linear avaliando a correlação entre PAS e a idade nos grupos classificados pela RCE.

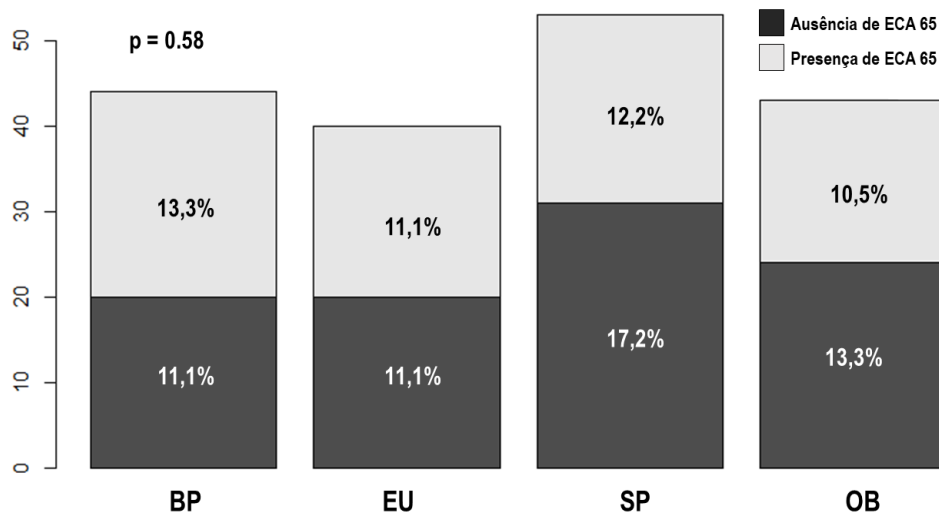


Apêndice 9. Tabela de parâmetros cardiovasculares nos grupos de estudo classificados por gênero.

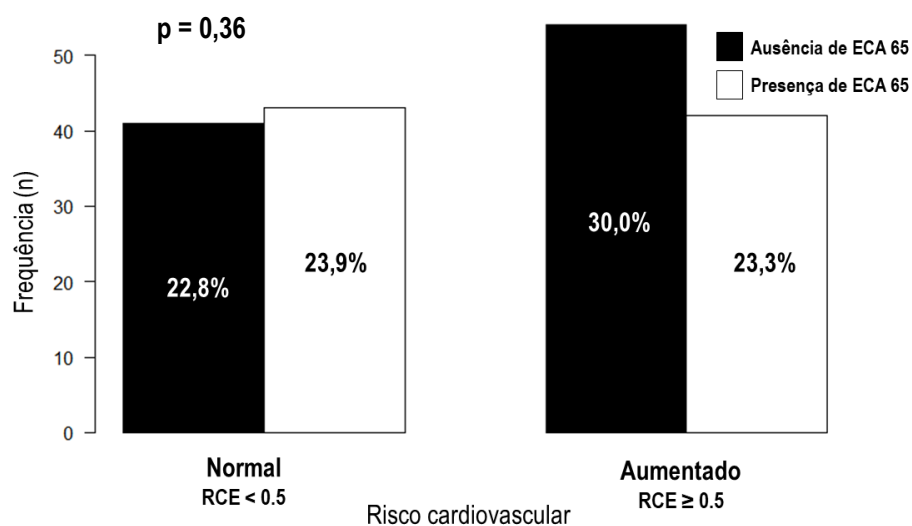
Grupos	Variável/ valor de p				
	PAS mmHg	PAD mmHg	% PAS	% PAD	FC bpm
	p = 0,09	p < 0,01	p = 0,84	p = 0,01	p < 0,01
Feminino	104,2±8,2	63,7±6,4	46,3±24,0	53,1±20,0	77,5±11,3
Masculino	106,0±9,9	61,8±6,9	46,0±24,3	47,7±20,1	71,5±11,4

Média ± Desvio Padrão. * Teste T.

Apêndice 10. Figura presença da nECA de 65 KDa nos grupos de estudo classificados por pIMC.



Apêndice 11. Presença da nECA de 65 KDa nos grupos de estudo classificados por RCE.



Apêndice 12. Tabela teste dependência entre estado nutricional e presença das isoformas N-domínio da ECA no plasma.

Presença de nECA de 90 KDa	Estado Nutricional				*p = 0,43
	BP	EU	SP	OB	Total
Não	0,0%	3,0%	1,5%	0,0%	4,5%
Sim	23,9%	20,9%	26,9%	23,8%	95,5%
Total	23,9%	23,9%	28,4%	23,8%	100%

Presença de nECA de 65 KDa	Estado Nutricional				*p = 1,00
	BP	EU	SP	OB	Total
Não	1,5%	1,5%	1,5%	0,0%	4,5%
Sim	22,4%	22,4%	26,9%	23,8%	95,5%
Total	23,9%	23,9%	28,4%	23,8%	100%

Apêndice 13. Tabela teste dependência entre RCE e presença das isoformas N-domínio da ECA no plasma.

Presença de nECA de 90 KDa	Estado Nutricional		*p = 0,24
	RCE normal	RCE aumentada	Total
Não	4,5%	0,0%	4,5%
Sim	46,3%	49,2%	95,5%
Total	50,8%	49,2%	100%

Presença de nECA de 65 KDa	Estado Nutricional		*p =
	RCE normal	RCE aumentada	Total
Não	4,5%	0,0%	4,5%
Sim	46,3%	49,2%	95,5%
Total	50,8%	49,2%	100%

Apêndice 14. Tabela de avaliação da atividade enzimática da ECA, renina, ECA2, NEP e quimase nos grupos classificados por Z-escore.

Atividade enzimática na urina						
Enzima		Grupos				p value
		BP	EU	SP	OB	
ECA (Z-FHL)	nmol/min/mg de Cr	0,085±0,06	0,037±0,12	0,052±0,16	0,063±0,09	0,218 [#]
ECA (h-HL)		0,049±0,18	0,024±0,02	0,027±0,04	0,028±0,02	0,169 [#]
Razão (Z-FHL/h-HL)		3,67±1,38	2,63±0,89	3,18±0,93	3,28±1,37	0,442 [#]
Renina	uM/min/mg de creatinina	0,202±0,06	0,178±0,03	0,177±0,03	0,127±0,04	0,244 [*]
ECA2		0,218±0,18	0,095±0,03	0,128±0,01	0,096±0,03	0,218 [#]
NEP		0,070±0,02	0,038±0,01	0,049±0,01	0,097±0,04	0,309 [#]
Quimase		0,098±0,10	0,066±0,04	0,075±0,06	0,153±0,05	0,078 [#]
Atividade enzimática no plasma (uM/min/mL)						
Enzima		Grupos				p value [*]
		BP	EU	SP	OB	
Renina		0,203±0,04	0,236±0,02	0,207±0,07	0,220±0,12	0,772

Valores expressos como mediana ± erro padrão da mediana. [#]Mood's Median Test. ^{*} Teste de Kruskal – Wallis.

Apêndice 15. Tabela de avaliação da atividade enzimática da ECA, renina, ECA2, NEP e quimase nos grupos classificados pelo sexo.

Atividade enzimática na urina				
Enzima		Grupos		p value*
		Feminino	Masculino	
ECA (Z-FHL)	nmol/min/mg de Cr	0,045±0,09	0,048±0,17	0,807
ECA (h-HL)		0,020±0,03	0,030±0,04	0,112
Razão (Z-FHL/h-HL)		2,88±1,01	2,83±0,71	0,849
Renina	uM/min/mg de creatinina	0,202±0,03	0,168±0,02	0,046
ECA2		0,146±0,04	0,091±0,03	<0,01
NEP		0,052±0,01	0,041±0,01	0,132
Quimase		0,075±0,04	0,083±0,05	0,480
Atividade enzimática no plasma (uM/min/mL)				
Enzima		Grupo		p value*
		Normal	Aumentado	
Renina		0,236±0,09	0,209±0,06	0,441

Valores expressos como mediana ± erro padrão da mediana. * Teste de Man-Whitney.

Anexos

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da UNIFESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E CININAS-CALECREÍNAS NA OBESIDADE INFANTO JUVENIL E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS A

Pesquisador: NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83298217.1.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.580.987

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n:0150/2018 (parecer final)

A frequência do sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes no Brasil vem crescendo de forma preocupante nas últimas décadas. As comorbidades, como hipertensão arterial, resistência a insulina, dislipidemia e síndrome metabólica e as consequências físicas, sociais, psicológicas e econômicas atreladas à obesidade fazem com que esta seja um problema de saúde pública. Há evidências de que o SRA tenha algum papel na modulação de diversas doenças como, diabetes mellitus, Alzheimer, síndrome metabólica e obesidade, além de seu papel já bem estabelecido na hipertensão. O SRA atualmente é muito mais do que uma simples cascata representada por AGT, duas proteases, renina, ACE e um peptídeo efetor, a Ang II. Com a descoberta dos novos eixos como, ACE 2/ Ang 1-7/ Mas e Ang A/ Alamandina/ MrgD, e seus peptídeos ativos com funções que se assemelham a da AngII ou que a contrabalanceiam, é possível verificar um complexo balanço no SRA permitindo que no mesmo sistema haja funções contra regulatórias que contribuam para manutenção da homeostase no organismo. A ECA2 participa ativamente tanto no SRA quanto no SCC, sendo responsável pela degradação da Ang II e Ang A para formar Ang 1-7 e Alamandina, respectivamente, e ainda pode degradar desArg9BK, peptídeo agonista B1 com funções deletérias. Estudos

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-050

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.580.987

preliminares do nosso grupo mostraram que os sistemas SRA e SCC estariam modulados na obesidade, pois existe uma correlação positiva entre diminuição dos níveis plasmáticos de Ang 1-7 e BK e o aumento da massa corpórea, assim como, foi verificada concentrações maiores de Ang I e des-Arg9BK em adolescentes obesos e obesos graves. Desta forma o balanço entre a ECA e ECA2 parece desempenhar papel importante na fisiopatologia da obesidade. Ainda, outras enzimas destes sistemas podem contribuir para estas variações de acordo com a massa corpórea. Desta forma, este estudo tem como objetivo quantificar os peptídeos do SRA e SCC em uma população maior e mais significativa, assim como avaliar a expressão e atividade das enzimas envolvidas na formação destes peptídeos, em especial a ECA e ECA2. Para então compreender melhor a participação do SRA e SCC na fisiopatologia da obesidade visando o futuro desenvolvimento de novas estratégias de prognóstico e terapêutica, assim, possibilitando uma intervenção prévia, a fim de evitar o desenvolvimento da obesidade em si e das complicações atreladas a esta.

Objetivo da Pesquisa:

-OBJETIVO PRIMÁRIO: Investigar a modulação dos principais componentes do SRA e SCC e sua correlação com aumento da massa corpórea e desenvolvimento de outras doenças atreladas a obesidade na população infanto juvenil de Vitória-ES.

-OBJETIVO SECUNDÁRIO: - Análise antropométrica e clínica/bioquímica das crianças e adolescentes envolvidos neste estudo.- Quantificar os peptídeos do SRA e SCC, a fim de correlacionar sua variação com a fisiopatologia da obesidade e das complicações atreladas a esta.- Determinar a expressão e atividade das principais enzimas do SRA e SCC com intuito de investigar a causa de possíveis alterações nas concentrações de peptídeos.- Quantificar os níveis de adipocinas nos diferentes grupos e estabelecer relação com fisiopatologia da obesidade.

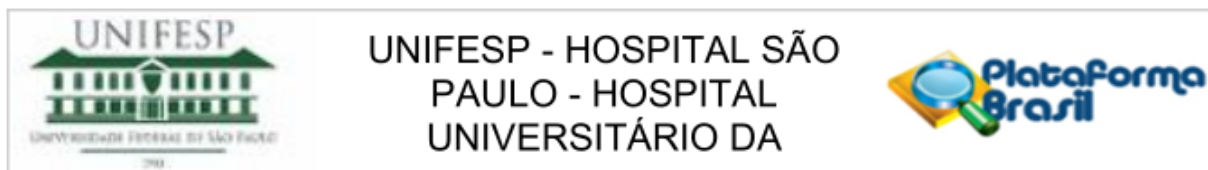
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-RISCOS: não oferece riscos aos participantes, uma vez que, as amostras já foram coletadas no período de 2014-2016 para o projeto "DETERMINANTES DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES" o qual foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060.

-BENEFÍCIOS: um estudo populacional avaliando como estão modulados o SRA e SCC em crianças e adolescentes eutróficos, com sobrepeso e obesos pode esclarecer como se dá e qual contribuição

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.580.987

dos mesmos no desenvolvimento e manutenção da obesidade e das co-morbidades associadas. Assim, o estudo poderia contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da obesidade, assim como, para o prognóstico das complicações do sobrepeso e obesidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-Trata-se de projeto de doutorado de NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ. Orientadora: Dulce Elena Casarini; Co-orientadora: Fernanda Barrinha Fernandes. Projeto vinculado ao Departamento de Medicina, SP-EPM, UNIFESP.

-Centro Coparticipante: Centro de Ciências da Saúde; responsável: JOSÉ GERALDO MILL; CEP: UFES - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

TIPO DE ESTUDO: será realizada uma avaliação transversal.

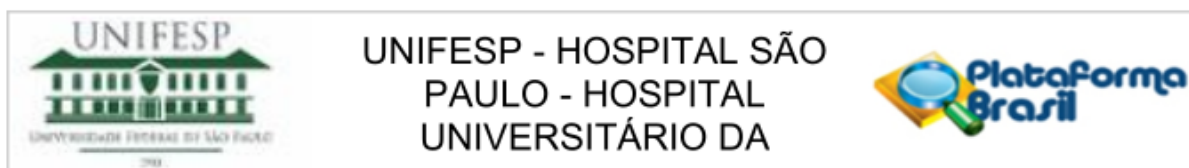
LOCAL: Disciplina de Medicina Translacional.

PARTICIPANTES: amostra de sangue e urina de crianças obesas (amostras já coletadas).

PROCEDIMENTOS: Este projeto utilizará amostras de urina e plasma que serão coletadas no período de 2018 – 2019 para o projeto "DETERMINANTES DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES" o qual foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060. O responsável pelo projeto, Dr José Geraldo Mill, CPF 343.387.137-04, fará a transferência deste material biológico para utilização no presente projeto: "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS SISTEMAS RENINA ANGIOTENSINA E CININAS-CALICREÍNAS NA OBESIDADE E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À OBESIDADE". O material será armazenado no biorrepositório do projeto ELSA-ES e depois será transferido para UNIFESP, onde ficará sob a responsabilidade da Dra Dulce Elena Casarini, para utilização em projetos da mesma e de seus colaboradores. O armazenamento e a transferência estão declarados no TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, assim os participantes da pesquisa estão cientes de como seus dados e material

biológico serão utilizados. -No presente estudo será realizada uma avaliação transversal de crianças e adolescentes com idade entre 6 e 19 anos de ambos os sexos matriculados no projeto Estação Conhecimento – Fundação Vale e escolas da rede pública de Vitória - ES. -DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS: a partir das amostras de plasma e urina, serão realizados vários estudos sobre referentes aos sistema renina-angiotensina e cininas-calcreínas (mais detalhes estão no projeto detalhado).

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.580.987

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.
- 2-TCLE a ser aplicado aos participantes: c)- modelo de TCLE aplicado para o projeto CAAE 30385014.8.0000.5060. ; está contemplada a participação da UNIFESP. (Pasta: TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência - Submissão 5; Documento: TCLE.docx)
- 3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:
 - a)-documento referente ao biorepositório do projeto ELSA-ES (Pasta: outros- Submissão 5; Documento: Biorrepositorio_Regimento.pdf) b)-autorização para o envio das amostras da Coordenadora do programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas- Centro de Ciências da Saúde, UFES (Pasta: outros- Submissão 5; Documento: autorizacao_transeferencia_material.pdf)
 - c)- carta de esclarecimentos sobre as amostras que serão estudadas (Pasta: outros- Submissão 5; Documento: Carta_esclarecimento_sobre_projeto.docx)

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

- 1- Não foi enviado nenhum documento assinado pelo pesquisador JOSÉ GERALDO MILL dando ciência/autorização a respeito do uso de amostras coletas em seu projeto. Será necessário enviar esta autorização.

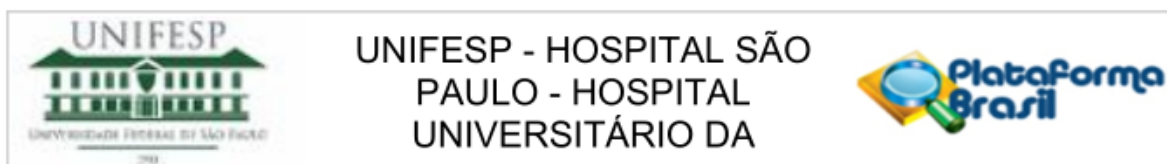
RESPOSTA: Em resposta informo que uma carta de autorização de transferência e uso do material assinada pelo Dr José Geraldo Mill foi anexada aos documentos

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

- 2- Favor adequar as informações: no formulário de submissão da Plataforma Brasil, campo "riscos", foi informado que as amostras já foram colhidas (no período de 2014-2016). Entretanto no campo "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador", e na metodologia informam que o material ainda será coletado (no período de 2018 – 2019). Favor esclarecer e adequar.

RESPOSTA: Em resposta foram feitas as adequações no campo "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador", onde agora consta:

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55		
Bairro: VILA CLEMENTINO		CEP: 04.020-050
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.580.987

"Este projeto utilizará amostras de urina, plasma e soro que foram coletadas no período de 2014 - 2016 para o projeto "DETERMINANTES DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES" o qual foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060. O responsável pelo projeto, Dr José Geraldo Mill, CPF 343.387.137-04, fará a transferência deste material biológico para utilização no presente projeto: "ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E CININAS-CALICREÍNAS NA OBESIDADE E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O ESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À OBESIDADE". O material foi armazenado no Biorrepositório do projeto ELSA-ES e sua transferência e uso foram também autorizados pela Dra Sônia Alves Gouvea, Coordenadora do programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES e responsável pelo Biorrepositório ELSA - ES." Também outra versão do Projeto detalhado está sendo anexada. Onde no tópico "5.2

ASPÉCTOS ÉTICOS" agora consta: "Este projeto utilizará amostras de urina e plasma coletadas no período de 2014 - 2016 para o projeto "DETERMINANTES DA ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES", o qual foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060. Estas amostras foram armazenadas pelo Biorrepositório ELSA - ES, até obtenção de autorização de transferência e uso pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)." Informo ainda que houve divergência de informações nos itens em questão, pois foi avaliada a possibilidade de utilização de material que ainda será coletado para continuação do estudo ELSA. Porém foi considerado mais conveniente utilizar as amostras já coletadas no período de 2014 - 2016, só que algumas das informações erroneamente não foram corrigidas antes da submissão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais e o relatório final, quando do término do estudo.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos .

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55		CEP: 04.020-050
Bairro: VILA CLEMENTINO		
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.580.987

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_955435.pdf	08/03/2018 17:04:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	08/03/2018 17:02:18	NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ	Aceito
Outros	Autorizacao_Jose_Mill.pdf	08/03/2018 16:59:51	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencia.pdf	08/03/2018 16:55:17	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	CADASTRO_CEP.pdf	19/02/2018 12:37:34	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Biorrepositorio_Regimento.pdf	19/02/2018 12:35:44	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	autorizacao_transeferencia_material.pdf	19/02/2018 12:34:19	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Carta_esclarecimento_sobre_projeto.docx	19/02/2018 12:32:15	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/02/2018 12:27:28	NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/08/2017 18:10:51	NAYARA AZINHEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Abril de 2018

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da UFES

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DOS SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E CININAS-CALECREÍNAS NA OBESIDADE INFANTO JUVENIL E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS A

Pesquisador: NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83298217.1.3001.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.673.274

Apresentação do Projeto:

Estudo de caráter transversal cujo título é ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA E CININAS-CALICREÍNAS NA OBESIDADE INFANTO JUVENIL E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS À OBESIDADE que utilizará amostras de urina e plasma que foram coletadas no período de 2014 – 2016 para o projeto “DETERMINANTES DA ELEVÇÃO DAPRESSÃO ARTERIAL EMCRIANÇAS E ADOLESCENTES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES”, o qual foi aprovado pela Pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob o CAAE 30385014.8.0000.5060.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Investigar a modulação dos principais componentes do SRA e SCC e sua correlação com aumento da massa corpórea e desenvolvimento de outras doenças atreladas a obesidade na população infanto juvenil de Vitória-ES.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme a pesquisadora "NÃO OFERECE RISCOS AOS PARTICIPANTES, UMA VEZ QUE, AS AMOSTRAS JÁ FORAM COLETADAS NO PERÍODO DE 2014-2016".

Benefícios

Um estudo populacional avaliando como estão modulados o SRA e SCC em crianças e adolescentes

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO**



Continuação do Parecer: 2.673.274

eutróficos, com sobrepeso e obesos pode esclarecer como se dá e qual contribuição dos mesmos no desenvolvimento e manutenção da obesidade e das co-morbidades associadas. Assim, o estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da obesidade, assim como, para o prognóstico das complicações do sobrepeso e obesidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante considerando a possibilidade de novas terapêuticas para o tratamento da obesidade infantil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados conforme recomendações anteriores

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências, todas as pendência foram atendidas e anexadas na nova versão.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1107514.pdf	16/05/2018 10:02:54		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias_Cco.pdf	16/05/2018 09:55:31	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2621779.pdf	16/05/2018 09:54:13	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Orçamento	Planilha_orcamentaria.docx	16/05/2018 09:53:05	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Atualizado_para_Cco.pdf	16/05/2018 09:52:45	NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_UFESassinada.pdf	16/05/2018 09:31:19	NAYARA AZINHEIRA	Aceito

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO**



Continuação do Parecer: 2.673.274

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	08/03/2018 17:02:18	NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ	Aceito
Outros	Autorizacao_Jose_Mill.pdf	08/03/2018 16:59:51	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencia.pdf	08/03/2018 16:55:17	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	CADASTRO_CEP.pdf	19/02/2018 12:37:34	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Biorrepositorio_Regimento.pdf	19/02/2018 12:35:44	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	autorizacao_transeferencia_material.pdf	19/02/2018 12:34:19	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
Outros	Carta_esclarecimento_sobre_projeto.docx	19/02/2018 12:32:15	NAYARA AZINHEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/02/2018 12:27:28	NAYARA AZINHEIRA NOBREGA CRUZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 24 de Maio de 2018

Assinado por:

**Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador)**

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com