

Andréia Cristina Febba Gomes

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS ISOFORMAS DA ECA E HIPERTENSÃO ARTERIAL
SISTÊMICA NA SEGUNDA FASE DO ESTUDO PROSPECTIVO (PROJETO MONICA)
COM A POPULAÇÃO DE VITÓRIA- ES, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências no
Programa de Pós-Graduação em
Nefrologia

São Paulo

2017

Andréia Cristina Febba Gomes

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS ISOFORMAS DA ECA E HIPERTENSÃO ARTERIAL
SISTÊMICA NA SEGUNDA FASE DO ESTUDO PROSPECTIVO (PROJETO MONICA)
COM A POPULAÇÃO DE VITÓRIA- ES, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências no
Programa de Pós-Graduação em
Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Co-Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

São Paulo

2017

Gomes, Andréia Cristina Febba

Associação entre as isoformas da ECA e hipertensão arterial sistêmica na segunda fase do estudo prospectivo (projeto MONICA) com a população de vitória- ES, Brasil

Andréia Cristina Febba Gomes – São Paulo, 2017

xxii, 71 páginas.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Nefrologia - Departamento de Medicina - Disciplina de Nefrologia.

Título em Inglês: Association between ACE isoforms and systemic arterial hypertension in the second phase of the prospective study (MONICA project) with the population of Vitória- ES, Brazil

1. Hipertensão 2. Enzima Conversora de Angiotensina 3. Isoformas da ECA 4. Marcador Genético

Este trabalho foi realizado na Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina, sob orientação da Profa. Profa. Dra. Dulce Elena Casarini e co-orientação do Prof. Dr. José Geraldo Mill.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DISCIPLINA DE NEFROLOGIA

Chefe do departamento de Medicina: Profa. Dra. Ana Luisa Godoy Fernandes

Chefe da Disciplina de Nefrologia: Profa. Dra. Ita Pfeferman Heilberg

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação: Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS ISOFORMAS DA ECA E HIPERTENSÃO ARTERIAL
SISTÊMICA NA SEGUNDA FASE DO ESTUDO PROSPECTIVO (PROJETO MONICA)
COM A POPULAÇÃO DE VITÓRIA- ES, BRASIL**

Data da defesa da tese:

26/09/2017

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Fernanda Barrinha Fernandes

Titular

Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

Titular

Profa. Dra. Gianna Mastroianni Kirsztajn

Titular

Profa. Dra. Tatiana Sousa Cunha

Titular

Profa. Dra. Kátia de Angelis

Suplente

Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic

Suplente

**Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP, Processos nº 2010/51904-9
(Temático) e CNPq 141907/2008-8**

Dedicatória

Aos meus pais, Hilário (sempre presente) e Argélia, exemplos de superação, sempre me dando total apoio em minhas decisões, com muita sabedoria e amor. A vocês, dedico toda gratidão.

As duas maiores riquezas da minha vida, meus maiores presentes, Giovanna e Henrique. Por vocês encontrei forças para sempre seguir em frente, apesar de todo o esforço e cansaço.

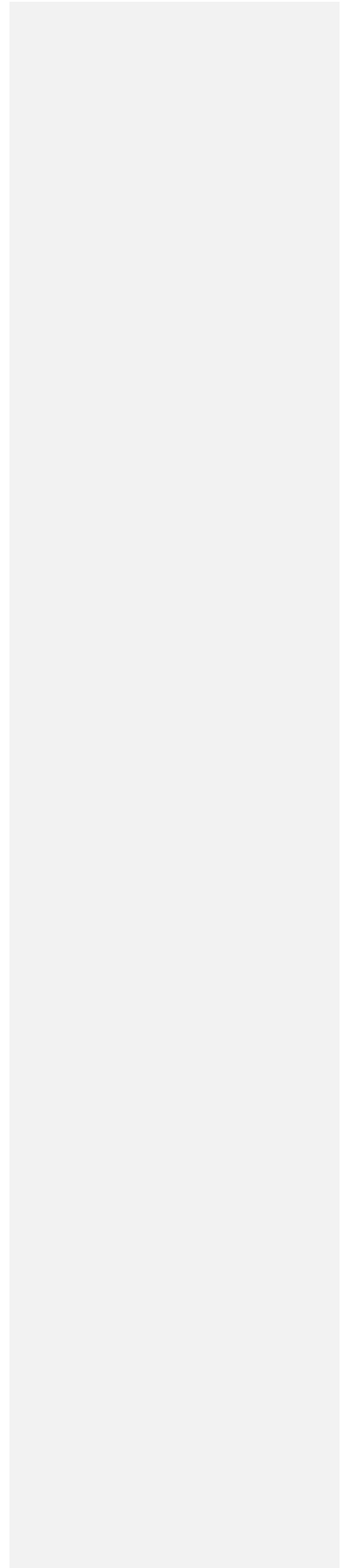
Vocês chegaram para me mostrar o amor incondicional.

Ao meu esposo, Roberto, meu companheiro sempre ao meu lado me aconselhado e apoiando.

Você é minha fortaleza, com você tive os melhores momentos de minha vida e construí a razão do meu viver; nossa família.

Amo vocês!

Agradecimientos



Agradeço,

A Deus, por me conceder força e sabedoria, sempre iluminando meus caminhos em momentos bons e ruins.

À Dra Dulce, minha orientadora, que me acolheu em seu laboratório, proporcionando novos aprendizados. Obrigada pelo carinho, incentivo, apoio, por seu exemplo de profissional e pela confiança reportada a mim.

Ao Dr. José Geraldo Mill, por me auxiliar na execução do trabalho com toda a atenção imediata nos momentos em que lhe solicitei ajuda.

Ao professor, Mário Luis, por confiar em mim e me apresentar à minha orientadora, pela amizade e pelos bons conselhos em meus momentos de desânimo.

Aos meus avós, não mais presentes, mas que jamais poderiam ser esquecidos neste agradecimento. Vocês ensinaram-me os reais valores da vida: sinceridade, honestidade e gratidão. Vocês estarão sempre vivos dentro de mim.

À minha mãe e ao meu irmão, por sempre me estenderem a mão, me apoiando nas decisões tomadas, por estarem ao meu lado nas alegrias e tristezas da vida. Mãe, sem você, nada disso seria possível. Obrigada por cuidar de meus filhos nos momentos em que este trabalho foi desenvolvido com toda dedicação e amor, obrigada por você existir e por você ser uma "vovozona".

Aos meus padrinhos, pelo carinho e ensinamento. Querida madrinha, sei que onde você estiver, estará sempre torcendo por mim.....saudade eterna.

À querida tia Rita, por sempre ter cuidado de mim, por ser uma grande amiga, ser a melhor tia do mundo para meus filhos, por participar deste trabalho ajudando a cuidar dos meus filhos.

Aos meus tios e primos, por serem maravilhosos.

À minha grande sogra, Maria Geni. Se eu não tivesse uma sogra como a senhora, este trabalho não existiria. Muito obrigada por ser a segunda mãe dos filhos, amiga, conselheira, uma grande mãe e uma avó maravilhosa.

Ao meu sogro, Roberto, muito obrigada por ser meu sogro, quando me casei, ganhei um grande presente; ser sua nora. Obrigada por ser um grande avô e padrinho, obrigada por tudo.

À minha cunhada, Aline, muito obrigada por toda dedicação dada aos meus filhos, por ser uma madrinha e tia sempre presente e amorosa.

À tia Candida, obrigada por ser minha psicóloga, amiga e tia, sempre escutando meus desabafos, me aconselhando da melhor maneira possível.

À prima Raquel, obrigado por me aceitar como prima, ser uma grande madrinha e por toda atenção dada para minha família.

Às amigas, Priscila, Lucélia, Luciene, Beatriz, Viviane, Elisa e Ana Lúcia, pelos vinte e dois anos de amizade, mesmo distantes. Obrigada por sempre compreenderem minha ausência em alguns encontros marcados e por todo apoio recebido.

Aos amigos do laboratório, Amanda, Ana Leite, Claudina, Dani Aragão, Dani Arita, Fernanda Ronchi, Juliana Colucci, Juliana Perez, Lilian, Marie, Nayara, Ralmony, Rodolfo e Zaira. Obrigada por bons momentos dentro e fora do laboratório, juntos demos muitas gargalhadas.

Aos meninos do laboratório Rodrigo e Filipo, por muitas risadas compartilhadas.

À Larissinha, por toda ajuda oferecida no final deste trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade que estamos construindo.

Às queridas amigas, Ana Bechara, Gabriela, Roseli, Larissa Emi e Lys, pela cumplicidade, carinho e amizade construída. A nossa amizade fez com que os dias no laboratório fossem mais agradáveis. Agradeço pelos momentos de descontração, pelas inúmeras gargalhadas, pelos abraços de conforto, por vocês existirem em minha vida.

À Fernanda Barrinha, pelos ensinamentos, amizade, ajuda nos momentos difíceis, pelas boas risadas, pela cumplicidade, por ser minha companheira em minha primeira viagem internacional e por ter cuidado de mim direitinho, como meu marido pediu.

À Dra Maria do Carmo, pela amizade que construímos ao longo desses anos, obrigada por toda a ajuda, dedicação e conselhos cedidos.

Aos funcionários da secretaria, Pablo, Paulo, Alexandre e Priscila, pelo apoio e atenção.

Às minhas queridas companheiras de bom papo, Dona Mila, Hilária, Maria de Fátima e Dona Eurídice.

Aos meus amados filhos, por me escolherem como mãe, me darem a alegria de sempre ter uma abraço e um beijo cheio de amor ao chegar em casa após dias difíceis, por conhecerem a mãe que têm e já logo de cara saberem que alguma coisa estava errada comigo, por serem filhos maravilhosos, sempre alegres e cheios de carinho, com um brilho no olhar mais lindo que já vi, por serem minha maior riqueza.

Ao Roberto, esposo carinhoso e atencioso, por toda cumplicidade ao longo desses dezessete anos juntos, por todo cuidado em sempre me ver feliz, por toda a ajuda dada em casa, pelos jantares sempre feitos com muito carinho, sempre pensando em mim e nas crianças, por você ser o amor da minha vida, no qual preciso ter sempre ao meu lado para seguir meu caminho.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Hipertensão Arterial	1
1.3. Enzima Conversora de Angiotensina I	7
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos Gerais	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. Material e Métodos	15
3.1. Dados Demográficos	16
3.2. Parâmetros Antropométricos	17
3.5. Preparo das urinas para detecção das isoformas da ECA	18
3.6. Dosagem de Proteína	19
3.7. Western Blotting	19
3.8. Classificação dos grupos de acordo com a presença das Isoformas da ECA	20
3.9. Análise estatística	20
4. Resultados	23
4.1. Distribuição das características demográficas e clínicas da amostra estudada	23
4.2. Fatores associados ao aumento da pressão arterial	28
4.3. Análise da expressão da ECA	31
4.4. Avaliação dos níveis pressóricos de acordo com a presença das isoformas da ECA	33
4.5. Avaliação das características antropométricas e metabólicas de acordo com a presença das isoformas da ECA	34
4.6. Novos casos de hipertensão e isoformas da ECA	36
4.7. Expressão das isoformas da ECA associadas à pressão arterial	37
4.8. Comparação dos níveis pressóricos entre as duas fases da pesquisa de acordo com a presença das isoformas da ECA	38

4.9. Fatores de risco associados à hipertensão.....	42
5. Discussão.....	44
6. Conclusão.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	58
8. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	70

Lista de Figuras

- Figura 1:** Prevalência mundial de pressão arterial elevada, em indivíduos acima de 18 anos de ambos os sexos, estimativas referentes a 2014. Adaptado de WHO, 2016. (<http://www.who.int/beatncds/take-action/policy-brief-reduce-high-blood-pressure.pdf>). 2
- Figura 2:** Sistema Renina Angiotensina e vias alternativas de síntese das angiotensinas. 5
- Figura 3:** Esquema da ECA somática ancorada à membrana plasmática. A porção N-domínio está localizada no meio extracelular e porção C-terminal ancorada na membrana da célula. Adaptado (Fleming *et al.*, 2005). 8
- Figura 4:** Esquema da ECA somática e ECA testicular com as regiões N e C-domínios, região de ligação com íons zinco e região de ligação com a membrana em preto. (Modificado de Andrade e colaboradores, 2010). 9
- Figura 5:** Análise da expressão urinária das isoformas da ECA por *Western Blotting*. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa. Foi utilizado o anticorpo policlonal Y4 anti-ECA (1:1000). O padrão usado no experimento (Rainbow - Amersham Biosciences, Suécia) está representado de forma colorida como coluna 1 e as amostras de urina estão representadas como coluna 2. 31
- Figura 6:** Distribuição das isoformas da ECA nos grupos de estudo. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa. 32
- Figura 7:** Frequência de normotensos e hipertensos na comparação entre as duas fases do Projeto MONICA. 36

Lista de tabelas

Tabela 1: Distribuição das características demográficas estudadas na amostra. Valores expressos como número (n) e porcentagem (%).	24
Tabela 2: Distribuição das características clínicas e bioquímicas estudadas na amostra, média \pm EPM, frequência n (%).	25
Tabela 3: Parâmetros demográficos dos grupos normotensos e hipertensos. Valores estão expressos como frequência (n) e porcentagem (%).	26
Tabela 4: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos grupos normotensos e hipertensos. Valores estão expressos como frequência (n) e porcentagem (%).	27
Tabela 5: Dados clínicos e laboratoriais avaliados nos grupos normotensos e hipertensos.	28
Tabela 6: Variáveis associadas a alterações da pressão sistólica.	29
Tabela 7: Variáveis associadas a alterações da pressão diastólica.	29
Tabela 8: Associação multivariada entre fatores de risco e pressão arterial sistólica da população de Vitória – ES.	30
Tabela 9: Associação multivariada entre fatores de risco e pressão arterial diastólica da população de Vitória – ES.	30
Tabela 10: Distribuição das isoformas da ECA urinária entre os grupos normotensos e hipertensos dentro dos 3 grupos de estudo.	33
Tabela 11: Pressão sistólica e diastólica ajustada por fatores demográficos, antropométricos e metabólicos nos diferentes grupos de estudo.	34
Tabela 12: Variáveis antropométricas e bioquímicas da população de acordo com a distribuição das isoformas da ECA entre os grupos.	35
Tabela 13: Distribuição de normotensos e hipertensos nos diferentes grupos de estudo da fase 2...	38
Tabela 14: Pressão arterial sistólica dos indivíduos que permaneceram normotensos nas duas fases do estudo.	39
Tabela 15: Pressão arterial diastólica dos indivíduos que permaneceram normotensos nas duas fases do estudo.	39
Tabela 16: Pressão arterial sistólica dos indivíduos hipertensos somente na segunda fase do estudo.	40

Tabela 17: Pressão arterial diastólica dos indivíduos hipertensos somente na segunda fase do estudo.	40
Tabela 18: Comparação de parâmetros antropométricos e bioquímicos dos hipertensos na segunda fase do estudo.....	41
Tabela 19: Fatores de risco associados à hipertensão.....	42

Lista de Abreviaturas

Ang 1-12	Angiotensina 1-12
AGT	Angitensinogênio
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
BK	Bradicinina
DM	Diabetes Mellitus
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina I
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IMC	Índice de Massa Corpórea
NaCl	Cloreto de sódio
NEP	Endopeptidase Neutra - Nephilisina
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RCQ	Relação Cintura Quadril
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema Renina Angiotensina
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

Resumo

Resumo

A hipertensão arterial é considerada um problema de saúde pública mundial e é o fator de risco de maior impacto para os índices de morbidade e mortalidade cardiovascular. Com o propósito de identificar os componentes envolvidos no surgimento de hipertensão e a participação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) neste problema, o SRA tem sido objeto de muitos estudos. A ECA apresenta grande importância fisiológica por converter a angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstritor. Alguns trabalhos sugerem associação das isoformas da ECA, em especial a isoforma com 90 kDa, com a hipertensão. Este trabalho teve como objetivo geral investigar a associação entre as isoformas da ECA e a presença de hipertensão arterial na segunda fase de estudo prospectivo (Projeto MONICA) na população de Vitória - ES, Brasil. Foram avaliados os parâmetros demográficos, clínicos e bioquímicos de 220 indivíduos. As amostras de urinas foram concentradas e as isoformas da ECA em urina foram identificadas pela técnica de *Western Blotting*. Os grupos foram classificados como Grupo 1 (presença das isoformas com 65, 90 e 190 kDa); Grupo 2 (presença das isoformas com 65 e 90 kDa) e Grupo 3 (presença das isoformas com 65 e 190 kDa). Os resultados mostraram uma alta prevalência da isoforma com 90 kDa com uma incidência de hipertensão (maior no grupo 2), após 5 anos de seguimento, os grupos apresentando a isoforma com 90 kDa mostraram perfis de pressão sistólica e diastólica mais elevados na segunda fase e a frequência de normotensos expressando as isoformas com 65 e 190 kDa foi maior em relação à de hipertensos. A perda da expressão da isoforma com 190 kDa, aumenta as chances no desenvolvimento de hipertensão assim como o histórico familiar de hipertensão. Os resultados encontrados sugerem a isoforma N-domínio com 90 kDa como um possível marcador biológico de hipertensão confirmando os dados da primeira fase do estudo.

Palavras Chave: Hipertensão, Enzima Conversora de Angiotensina, Isoformas da ECA, Marcador Genético.

Abstract

Abstract

Hypertension is considered a worldwide public health problem and is identified as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. The Renin Angiotensin System (RAS) has been a focus of interest of researchers in the area of hypertension both for the identification of its etiopathogenesis and for its treatment. In order to identify the components involved in the onset of hypertension and the role of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) in this problem, the RAS has been the object of many studies. ACE has a great physiological importance for converting angiotensin I (Ang I) to angiotensin II (Ang II), a potent vasoconstrictor. Some studies suggest the association of ACE isoforms, especially the 90 kDa isoform, with hypertension. The aim of this study was to investigate the association between ACE isoforms and the presence of arterial hypertension in the second phase of the prospective study (MONICA Project) in the population of Vitória - ES, Brazil. The demographic, clinical and biochemical parameters of 220 individuals were evaluated. Urine samples were concentrated and ACE isoforms were identified by the Western Blotting. The groups were classified as Group 1 (presence of isoforms with 65, 90 and 190 kDa); Group 2 (presence of 65 and 90 kDa isoforms) and Group 3 (presence of 65 and 190 kDa isoforms). The results showed a high prevalence of the 90 kDa isoform with a higher incidence of hypertension (higher in group 2) after five years of segment. The groups containing 90 kDa isoform showed higher systolic and diastolic pressure profiles in the second phase and the frequency of normotensives expressing the isoforms with 65 and 190 kDa was higher than that the hypertensive ones. Loss of isoform expression at 190 kDa increases the chances of developing hypertension as well as family history of hypertension. The results suggest the 90-kDa N-domain isoform as a possible biological marker of hypertension, which confirms the results obtained in the first phase of the study.

Introdução

1. Introdução

1.1. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública mundial, devido à sua alta prevalência e associação com as doenças cardiovasculares e renais. A HAS constitui o principal fator de risco para a mortalidade cardiovascular estando ainda relacionada ao aumento da morbidade (Kearney *et al.*, 2005). Distúrbios metabólicos e algumas alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos alvo estão associados à hipertensão, podendo apresentar complicações na presença de fatores de risco, como por exemplo, as dislipidemias, diabetes melito, obesidade, entre outros (Collaboration, 2002; Weber *et al.*, 2014).

Estudos evidenciam que o número de adultos com pressão arterial (PA) elevada passou de 594 milhões em 1975 para 1.13 bilhão em 2015, e esse aumento se deu em grande parte em países de média e baixa renda (Collaboration, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a HAS supera até mesmo o tabagismo como um fator de risco cardiovascular. Estima-se que em 2025, 25% da população mundial adulta apresentará hipertensão, sendo responsável por aproximadamente 13% da mortalidade global (WHO, 2012). A Figura 1 mostra as faixas de prevalência de hipertensão em diferentes países.

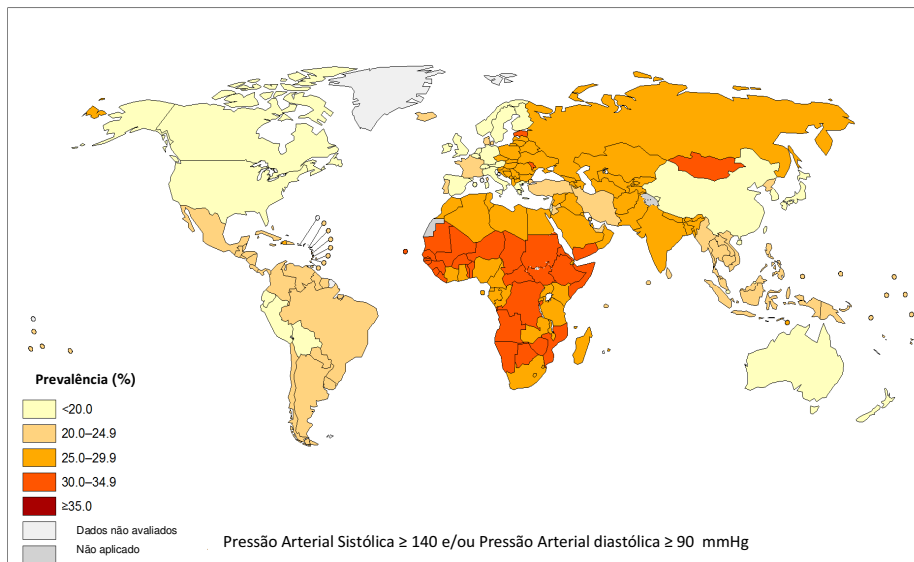


Figura 1: Prevalência mundial de pressão arterial elevada, em indivíduos acima de 18 anos de ambos os sexos, estimativas referentes a 2014. Adaptado de WHO, 2016. (<http://www.who.int/beat-ncds/take-action/policy-brief-reduce-high-blood-pressure.pdf>).

Cerca de 32,5% (36 milhões) de brasileiros adultos, sendo a sua maioria idosos (60%) são portadores de HAS, contribuindo para 50% das mortes por doença cardiovascular, causando ainda, um grande impacto na produtividade do trabalho e da renda familiar quando a mesma está associada ao diabetes e suas complicações (Scala, Magalhães & Machado, 2015). A prevalência de HAS varia de acordo com a população e com o método de avaliação aplicado. Apesar dos avanços alcançados, os estudos de prevalência de hipertensão ainda são insuficientes e não representativos da população brasileira como um todo (Scala, 2014). Segundo dados do VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), a prevalência de HAS autorreferida em indivíduos com 18 ou mais anos, situa-se na faixa de 23 a 25% (Vigitel Brasil, 2014). Entretanto, o número de afetados é maior tendo em vista que uma parcela de hipertensos desconhece ser portador da doença.

A hipertensão pode ser classificada como primária ou secundária. Diversos fatores têm sido implicados na gênese da hipertensão essencial, na qual não é encontrada uma causa primária clara para a presença da doença. Esta forma de hipertensão acomete cerca

de 95% dos hipertensos (Oparil *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2014). A hipertensão secundária é determinada por uma causa específica, sendo as mais comuns a presença de doença renal, renovascular, endócrina, adrenal, gestacional, entre outras (Kallistratos *et al.*, 2010; Rimoldi *et al.*, 2013).

Segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2016), a hipertensão é uma condição clínica multifatorial caracterizada pelo aumento dos níveis pressóricos, onde são hipertensos os adultos apresentando pressão arterial sistólica (PAS) com valores iguais ou superiores a 140 mmHg, e/ou pressão arterial diastólica (PAD) com valores iguais ou superiores a 90 mmHg (Malachias *et al.*, 2016).

A interação entre fatores genéticos e ambientais, gera fenótipos intermediários, como a resistência à insulina e a obesidade. Desta forma, a hipertensão pode ser entendida como um fenótipo final, resultando de fenótipos intermediários (Carretero e Oparil, 2000). A hipertensão é conceituada como uma patologia complexa, poligênica, multifatorial, onde cada paciente apresenta diferentes fatores causais (ambientais e/ou genéticos) (Lima *et al.*, 2007).

O controle da pressão arterial está fortemente associado ao equilíbrio do Sistema Renina Angiotensina (SRA), um complexo sistema hormonal. Este sistema é responsável pela homeostasia hidroeletrólítica do organismo, o qual sintetiza diversos peptídeos bioativos (Menard, 1993), dentre eles, possíveis marcadores da hipertensão no SRA, como exemplo a ECA e suas isoformas, que vem sendo extensivamente investigada nos últimos anos (Watanabe e Casarini, 2015).

Um dos componentes do SRA com ação pressora no organismo é a angiotensina II (Ang II), responsável por grande parte dos efeitos fisiológicos envolvidos no controle da pressão arterial, a qual exerce ações em vários órgãos-alvo, distantes do local de sua produção (Dzau e Pratt, 1986).

1.2. Sistema Renina Angiotensina

Existem dois conceitos na descrição e investigação do SRA, o sistema circulante, onde aparece ativo na circulação sanguínea, e o tecidual, com regulação e funções específicas, expressas em diversos tecidos (coração, rins, vasos sanguíneos, cérebro) (Danser, 2003; Paul *et al.*, 2006). Sendo assim, caracteriza-se por ser um sistema regulador fisiológico importante atuando tanto por meio de vias endócrinas, como também por mecanismos autócrinos, parácrinos e intrácrinos (Carey e Siragy, 2003).

O SRA, classicamente, é descrito como um sistema endócrino constituído de uma cascata coordenada de processos enzimáticos. O angiotensinogênio (AGT), produzido no fígado, é o principal precursor necessário para o início da cascata. O AGT é convertido em angiotensina I (Ang I), após clivagem na ligação Leu10-Val11, pela renina, uma aspartil protease produzida pelas células justaglomerulares no rim (Skeggs *et al.*, 1980). A Ang I geralmente é considerada um peptídeo biologicamente inativo, sendo clivado pela enzima conversora de angiotensina I (ECA), produzindo a angiotensina II (Ang II), um hormônio biologicamente ativo (Tamura *et al.*, 1995). A Ang II é a substância ativa mais importante do SRA, porém, outras angiotensinas produzidas têm ações específicas e, entre elas estão as angiotensinas III (Ang III) e IV (Ang IV) e angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (Santos *et al.*, 2000). A Figura 2 demonstra os componentes do SRA.

Sistema Renina Angiotensina

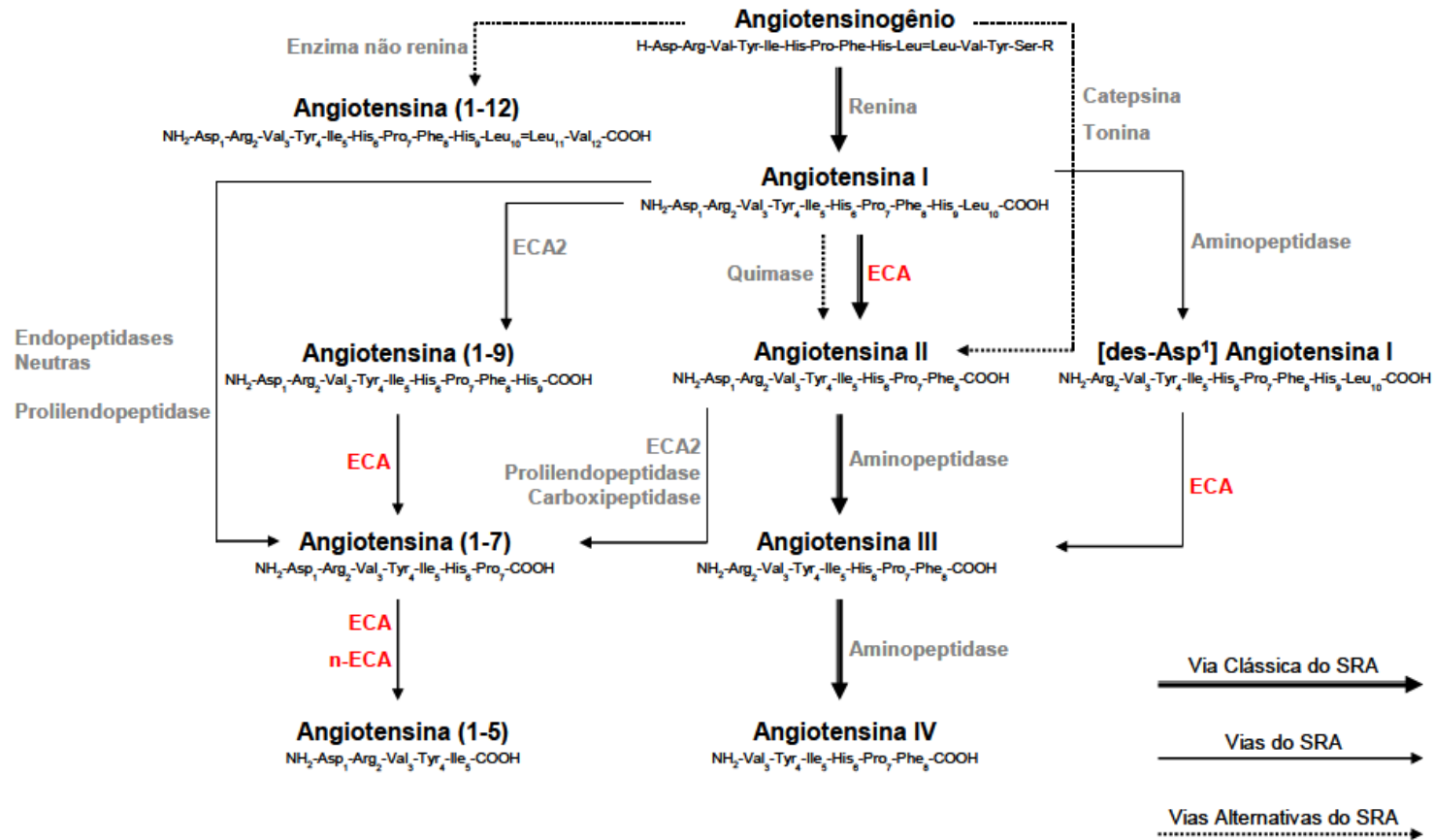


Figura 2: Sistema Renina Angiotensina e vias alternativas de síntese das angiotensinas. Adaptado de Peres, 2015. (Peres 2015).

A Ang II é o peptídeo mais efetivo do SRA e age através de dois tipos de receptores de membrana: tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) (De Gasparo *et al.*, 2000). Esses receptores mostram afinidades análogas em escala nanomolar e também concentrações circulantes similares de Ang II. Porém os efeitos gerados pela ligação da Ang II a esses receptores são, em geral, antagônicos (Keidar *et al.*, 2007).

O receptor AT1 é altamente expresso em adultos e apresenta papel importante nas doenças cardiovasculares. A ligação da Ang II ao receptor AT1, resulta em vasoconstrição (Touyz *et al.*, 2003), proliferação celular (Schelling *et al.*, 1991), inflamação (Touyz *et al.*, 2003), coagulação e remodelação da matriz extracelular (Lijnen *et al.*, 2001; Vaughan, 2001). Já a ligação da Ang II ao receptor AT2 determina ações opostas a curto e longo prazo (Masaki *et al.*, 1998; Horiuchi *et al.*, 1999; Lijnen *et al.*, 2001) promovendo efeito protetor (Keidar *et al.*, 2007).

O grande interesse de pesquisadores para a descoberta de vias alternativas para a formação de Ang II mostrou que a mesma pode ser produzida por uma via não dependente de renina. O dodecapeptídeo, angiotensina 1-12 (Ang 1-12) serve como substrato endógeno para a formação de Ang II e pode ser encontrado em miócitos de ratos Wistar e SHR (Ahmad *et al.*, 2011).

Outros peptídeos, tais como angiotensina III (Ang III ou Ang 2-8) e angiotensina IV (Ang IV ou Ang 3-8), são gerados por aminopeptidases A e N, respectivamente. Em especial a Ang III tem ações semelhantes às da Ang II, enquanto que a Ang IV, ao se ligar ao seu receptor próprio AT4, aumenta o fluxo sanguíneo cortical renal, decresce o transporte tubular de sódio e tem influência na memória (Bernier *et al.*, 1994; Riva e Galzin, 1996).

A Ang II pode sofrer a ação da ECA 2, enzima homóloga à ECA, gerando um peptídeo vasodilatador, angiotensina 1-7 (Ang 1-7). Esse peptídeo também pode ser formado a partir da Ang I pela ação de diversas peptidases, como a prolil endopeptidase nas células endoteliais vasculares (Santos *et al.*, 1992; Ferrario *et al.*, 2010) e pela endopeptidase neutra (NEP) na circulação ou nos rins (Shaltout *et al.*, 2007). O heptapeptídeo Ang 1-7 é um vasodilatador, que estimula a liberação de vasopressina, neurotransmissores, óxido nítrico (NO) e a biossíntese de

[D1] Comentário: Aqui podia citar também Ferrario CM, Ahmad S, Joyner J, Varagic J. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin converting enzyme 2 and angiotensin (1-7). Adv Pharmacol 2010; 59:197-233. Assim é uma referencia atual

prostaglandinas, além de exercer ação natriurética nos rins e inibir a proliferação de células vasculares de músculo liso (Santos e Ferreira, 2007). Em geral, as ações da Ang II e da Ang 1-7 são opostas gerando um efeito de equilíbrio no SRA, prevenindo as consequências deletérias da super ativação do SRA clássico.

1.3. Enzima Conversora de Angiotensina I

Em 1956, Skeggs e colaboradores descreveram pela primeira vez a ECA (EC 3.4.15.1, cininase II) como uma zinco-metalodipeptidase no plasma de cavalos. Esta tem como principal função converter a Ang I em Ang II através da remoção do dipeptídeo His-Leu da extremidade C-terminal da Ang I (Skeggs *et al.*, 1956). A ECA é capaz de clivar dipeptídeos da extremidade C-terminal de diversos substratos, sendo considerada desta forma, uma peptidil-dipeptidase (Yang *et al.*, 1970).

Outro papel importante da ECA é a inativação do peptídeo vasodilatador bradicinina (BK) e da Lys-BK, removendo o dipeptídeo C-terminal interligando, assim, o SRA e sistema caliceína cininas (Skeggs *et al.*, 1956; Yang *et al.*, 1970). Angiotensinas, BK e Lys-BK são importantes reguladores da resposta inflamatória e pressão arterial.

A ECA é uma ectoenzima ancorada à membrana plasmática através de um domínio transmembrana hidrofóbico localizado na sua extremidade C-terminal possuindo dois domínios homólogos C e N-terminal, cada um contendo um sítio ativo funcional, porém, com especificidades e sensibilidades a fatores regulatórios diferentes (Soubrier *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 1991; Jaspard *et al.*, 1993). A Figura 3 ilustra a estrutura da ECA.

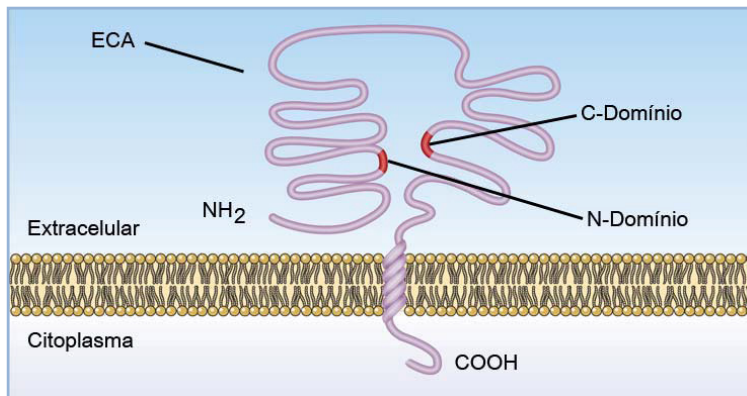


Figura 3: Esquema da ECA somática ancorada à membrana plasmática. A porção N-domínio está localizada no meio extracelular e porção C-terminal ancorada na membrana da célula. Adaptado de Fleming e colaboradores (Fleming *et al.*, 2005).

A literatura descreve em humanos, duas formas da ECA transcritas de um único gene através de dois promotores diferentes: a ECA somática, expressa em células somáticas e a ECA testicular, encontrada em células germinativas dos testículos (Howard *et al.*, 1990). A forma somática da ECA com massa molecular variando entre 130 e 180 kDa, pode ser encontrada em células epiteliais (túbulo proximal e ducto coletor), mesangiais e neuronais (Defending *et al.*, 1983; De Andrade *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015) e no endotélio vascular de alguns órgãos como intestino, rins, placenta, coração, fígado, pulmões, átrio e pâncreas (Cushman e Cheung, 1971; Chappell *et al.*, 2001; Ronchi *et al.*, 2005). A transcrição do gene da ECA no endotélio gera uma proteína com 1306 resíduos com um peptídeo sinal de 29 resíduos de aminoácidos (Ehlers *et al.*, 1989). Por sua vez, a forma testicular apresenta 732 resíduos com um peptídeo sinal de 31 resíduos de aminoácidos (Lanzillo *et al.*, 1985;

Ehlers *et al.*, 1992), e possui somente um domínio catalítico sendo expressa exclusivamente nos testículos, com massa molecular de aproximadamente 110 kDa (Ehlers *et al.*, 1989).

A ECA é uma enzima organizada em dois domínios homólogos, N e C-domínio, como já citado antes, cada um possuindo seu sítio catalítico (Soubrier *et al.*, 1988). A isoforma testicular C-domínio, é idêntica à metade C-terminal da ECA endotelial humana (Bernstein *et al.*, 2011) como demonstrado na Figura 4. Os dois sítios da ECA são capazes de converter Ang I em Ang II (Wei *et al.*, 1991), e ambos possuem uma região de ligação com íons Zinco que se encontra no sítio catalítico de cada um dos domínios da ECA somática (De Andrade *et al.*, 2010). São capazes ainda de hidrolisar BK, porém, apenas a isoforma N-domínio da ECA cliva dois substratos fisiológicos, como a Ang 1-7 e o *N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline* (AcSDKP), um peptídeo hemorregulatório (Rousseau *et al.*, 1995).

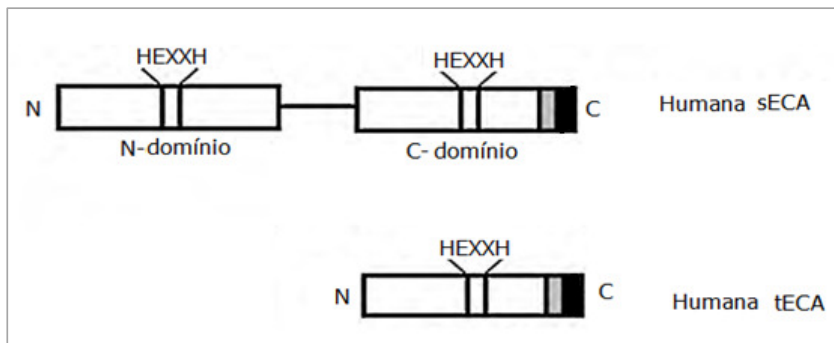


Figura 4: Esquema da ECA somática e ECA testicular com as regiões N e C-domínios, região de ligação com íons zinco e região de ligação com a membrana em preto. (Modificado de Andrade e colaboradores, 2010).

A ECA N-domínio é expressa em diversos tecidos, sugerindo que esta enzima influencia a produção local de Ang II e modula os níveis de Ang 1-7, contribuindo para a regulação órgão-específica (Ronchi *et al.*, 2005; Ronchi *et al.*, 2007).

Como já descrito anteriormente, apesar da ECA ser expressa como uma proteína integral de membrana, algumas isoformas solúveis são descritas no plasma e em outros fluídos (Hooper, 1991). No plasma há a forma solúvel e no fluído ileal a forma constituída apenas pela porção N-domínio apresentando aproximadamente 108 kDa (68 kDa na sua forma deglicosilada) (Deddish *et al.*, 1994), enquanto que em amostras de urina humana e de ratos, assim como em células mesangiais e tecidos de ratos Wistar e SHR, foram descritas duas formas N-domínio com 90/80 e 65 kDa (Andrade *et al.*, 2001; Casarini *et al.*, 2001; Ronchi *et al.*, 2005; De Andrade *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Aragão *et al.*, 2011). Essas formas são derivadas da enzima somática ancorada à membrana pela ação de secretases capazes de clivá-la (Oppong e Hooper, 1993; Lander *et al.*, 2001; Aragão *et al.*, 2015).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos na solubilização da ECA ancorada à membrana celular. Soubrier e colaboradores descreveram a estrutura primária da ECA e a presença de uma sequência hidrofóbica na região C-terminal que constitui a âncora na membrana plasmática (Soubrier *et al.*, 1988). Alguns estudos enfatizam a solubilização da enzima por uma clivagem proteolítica (Hooper *et al.*, 1987; Wei *et al.*, 1991; Beldent *et al.*, 1995; Woodman *et al.*, 2000) enquanto outros sugerem a existência de um RNAm específico para a ECA solúvel, produzida por um processamento alternativo (Rogers *et al.*, 1980; Sugimura *et al.*, 1998). Aragão e colaboradores em 2015 descreveram que duas serino-proteases denominadas SH1 e STH2, podem ser consideradas possíveis secretases capazes de clivar a ECA somática, gerando isoformas livres com massas moleculares com 65 e 90 kDa (Aragão *et al.*, 2015).

Trabalhos de Casarini e colaboradores, (2001); Ronchi e colaboradores, (2005) e Marques e colaboradores, (2003) descreveram a presença das isoformas N-domínio da ECA com 65 kDa na urina de indivíduos e de ratos normotensos e hipertensos, enquanto que a isoforma com 90 kDa foi encontrada apenas na urina de pacientes e ratos hipertensos (Casarini *et al.*, 1991; Casarini *et al.*, 1992; Casarini *et al.*, 1995; Casarini *et al.*, 2001); (Ronchi *et al.*, 2005); (Marques *et al.*, 2003). A ocorrência natural do fragmento N-domínio da ECA em fluído de íleo humano, com massa molecular de

108 kDa também foi descrita (Deddish *et al.*, 1994). Tais enzimas descritas como N-domínio são isoformas homólogas à porção N-terminal da ECA somática (Casarini *et al.*, 2001).

Marques e colaboradores mostraram urinas de ratos espontaneamente hipertensos contendo as isoformas com 65 e 80 kDa, sendo que a isoforma com 80 kDa não foi detectada na urina de ratos normotensos e nos modelos experimentais de ratos tornados hipertensos (Marques *et al.*, 2003). Nos animais que passaram a ser hipertensos através de modelo experimental DOCA-sal e 1R-1C, somente as isoformas com 65 e 190 kDa estavam expressas na urina repetindo o perfil encontrado por Casarini e colaboradores em trabalhos anteriores.

Estudos publicados na literatura ainda descrevem as isoformas com 65 e 190 kDa presentes na urina de indivíduos normotensos sem histórico familiar de hipertensão, enquanto que, indivíduos normotensos com histórico familiar de hipertensão possuíam as isoformas com 65, 90 e 190 kDa (Fernandes *et al.*, 2008).

Recentemente, um estudo populacional com voluntários da cidade de Vitória – ES – Brasil, mostrou que grupos de indivíduos apresentando na urina as isoformas com 65 e 190 kDa eram normotensos; grupos de voluntários que apresentavam as duas isoformas com 65 e 90 kDa eram hipertensos e que o grupo expressando as isoformas com 65, 90 e 190 kDa era constituído de indivíduos normotensos e hipertensos. Nesse trabalho foi evidenciado que a presença da isoforma de 90 kDa esteve positivamente associada à presença de hipertensão, e assim sendo, o grupo de indivíduos normotensos com a presença das três isoformas merecia atenção especial no aspecto de prevenção da hipertensão (Maluf-Meiken *et al.*, 2012).

Baseado nessas informações, o presente estudo visou avaliar como os novos casos de hipertensão diagnosticados na segunda fase do projeto MONICA se associaram à distribuição das isoformas urinárias da ECA, em especial a ECA com 90 kDa, possível marcador biológico de hipertensão.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Investigar a associação entre as isoformas da ECA e a presença de hipertensão arterial na segunda fase do estudo prospectivo (Projeto MONICA) na população de Vitória - ES, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros demográficos, clínicos e bioquímicos da população;
- Identificar e analisar a distribuição de normotensos e hipertensos da população estudada;
- Avaliar os fatores de risco que podem estar associados ao desenvolvimento da hipertensão.
- Verificar a distribuição das isoformas da ECA nos grupos normotensos e hipertensos;
- Comparar as duas fases do projeto MONICA e investigar as alterações na pressão sanguínea e expressão das isoformas da ECA dos indivíduos normotensos da primeira fase durante a fase 2 após cinco anos da fase 1.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM 0220/04. A aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo segue anexa. Anexos 1 e 2.

Fizeram parte desta pesquisa, voluntários que participaram do estudo denominado “Monitoramento das Tendências de Mortalidade e Morbidade Cardiovascular em Vitória – Projeto MONICA”, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O projeto, atuando em conjunto com a Secretaria da Saúde de Vitória, mapeou a prevalência e severidade dos principais fatores de risco cardiovascular em uma amostra aleatória da população adulta da capital capixaba. Os procedimentos adotados nas fases de preparação do estudo, amostragem e coleta de dados seguiram a mesma sistemática do projeto MONICA-WHO (Richard, 1988).

Na primeira fase da pesquisa, realizada de 1999 a 2001, uma amostra de 2.268 indivíduos de uma população de 143.539 (FIBGE, 2001), de ambos os sexos e idades entre 25 a 64 anos, foi convidada a participar do estudo. Os indivíduos foram escolhidos após uma seleção aleatória dos domicílios. Desta amostra domiciliar, 1.663 indivíduos (73,3%) compareceram à Clínica de Investigação Cardiovascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES para realização de exames para cálculo do risco cardiovascular.

Após cinco anos, a mesma amostra que havia participado da primeira fase do estudo foi convidada a participar da segunda fase da pesquisa. O convite foi feito por meio de contato telefônico ou envio de carta. Compareceram para os exames nessa segunda etapa 682 indivíduos (41% da amostra inicial). A diminuição do número de participantes deu-se pela ocorrência de falecimento ($n = 11$), mudança de cidade ($n = 32$) e recusa de participação ($n = 34$). Em outros 904 casos ocorreram perda total de contato. Cabe destacar que no período indicado (1999 a 2005) ocorreram muitas mudanças de número de telefone e de endereços, o que dificultou o contato com os participantes da etapa inicial do projeto, segundo dados fornecidos pela equipe responsável pelo Projeto MONICA.

Para a avaliação dos resultados da segunda fase, foram processadas 430 amostras de urina do total de 682 participantes. Destas 430 amostras, não foi possível analisar os resultados obtidos pelo método de *Western Blotting* das urinas em 80 amostras de urina. Ao acessar o banco de dados da primeira fase, notou-se que não havia informações referentes às isoformas da ECA de 130 indivíduos, com as quais seriam feitas comparações entre as duas fases. Assim sendo, foram analisados os dados completos de 220 indivíduos nas fases 1 e 2 do estudo.

3.1. Dados Demográficos

A indicação de etnia foi feita na fase 1 do projeto. Durante a visita clínica, todos os indivíduos foram classificados quanto à etnia em função da apresentação de traços fenotípicos e de informação sobre a origem de ascendentes. Os indivíduos foram classificados como de ascendência europeia (brancos), africana (pardos e negros), asiática ou ameríndia. A classificação foi feita por um único aferidor que verificava a cor da pele, a textura do cabelo, o formato do nariz e o aspecto do lábio. Dada a pequena proporção de ameríndios e asiáticos, eles foram englobados dentro da categoria de "outros".

A classificação socioeconômica foi feita durante visita domiciliar na fase 1, por meio de aplicação de questionário padronizado que levou em consideração o nível de escolaridade do responsável pelo domicílio e o número e a diversidade de bens de consumo duráveis disponíveis no domicílio. De acordo com o número de pontos atingidos, os indivíduos eram enquadrados nas classes A+B (estrato mais alto), C (estrato médio) e D+E (estrato baixo).

3.2. Parâmetros Antropométricos

Como havia sido feito na primeira fase, todos os participantes repetiram as mesmas medidas e exames na fase 2 do estudo (cinco anos após) obtendo-se as medidas de peso, altura, circunferência da cintura e circunferência do quadril pela mesma técnica e usando-se os mesmos instrumentos. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado e de acordo com a Organização Mundial da Saúde e foram consideradas eutróficas pessoas com $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$; sobrepeso - IMC entre 25 a 29,9 kg/m^2 e obesos - $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$. (WHO, 2000).

A pressão arterial foi medida por auxiliares de enfermagem utilizando um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio de mesa da marca Esotec no braço esquerdo. Os indivíduos permaneceram em repouso de 5 minutos, depois de serem convidados a esvaziar a bexiga, sem consumir alimentos, álcool, café ou cigarros nos últimos 30 minutos. Foram obtidas duas medidas de pressão por dois aferidores independentes e cegos um em relação à medida do outro. A pressão arterial casual foi calculada pela média aritmética das duas medidas. As medidas foram obtidas com um intervalo mínimo de 10 minutos, e uma terceira média era obtida sempre que a diferença das duas primeiras fosse superior a 4 mmHg. A hipertensão foi definida como a média da pressão sistólica $\geq 140 \text{ mmHg}$ e/ou a média da pressão diastólica $\geq 90 \text{ mmHg}$ segundo à 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2016). Foram também classificados como hipertensos indivíduos que relataram estar em uso de medicamentos anti-hipertensivo, incluindo diurético.

Uma amostra de sangue coletado em jejum foi obtida de cada participante. Também foi feita coleta urinária de 12 h no período noturno na véspera dos exames. No sangue foram realizadas as determinações de creatinina, ureia, glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicérides e ácido úrico. Da urina coletada à noite (19 h até 7 h da manhã) foi separada alíquota em tubo Falcon contendo inibidores de proteases (Complete Mini, Roche) a qual foi estocada na temperatura de $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento em que foi processada para identificação das isoformas da ECA. Vale ressaltar que um formulário de instruções para a coleta no

domicílio da urina noturna de 12 horas foi elaborado e entregue aos participantes, a fim de garantir sua qualidade.

As coletas de dados, sangue e urina dos voluntários foram realizadas nos anos de 2004 e 2005.

A coleta de sangue foi realizada por um técnico de laboratório. As amostras de sangue eram previamente processadas na Clínica de Investigação Cardiovascular e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da UFES para avaliação bioquímica de rotina, e ao Laboratório de Análises Clínicas do Serviço Social da Indústria (SESI), onde foram realizadas as quantificações de colesterol total e frações e triglicerídeos. A quantificação de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foi estimada pela equação de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972).

Através da análise dos parâmetros bioquímicos, a glicemia de jejum foi classificada como normal (<99 mg/dL) ou aumentada (≥ 100 mg/dL), segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (Milech *et al.*, 2016).

A colesterolemia foi classificada como desejável (<200 mg/dL), limítrofe (200 a 239 mg/dL) e alta (240 mg/dL). O nível de triglicérides sérico foi classificado como desejável (<150mg/dL), limítrofe (150 a 200 mg/dL) ou alto (>200 mg/dL), segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (Xavier *et al.*, 2013).

3.5. Preparo das urinas para detecção das isoformas da ECA

O pH da urina foi ajustado para 8,0 através da adição de tampão TRIS na concentração de 1 M. A urina foi então centrifugada a 3000 rotações por minuto durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi concentrado 10 vezes em frasco Amicon (Millipore®) com membrana de exclusão de 30 kDa e, em seguida, a amostra foi dialisada contra tampão TRIS 0,05 M e NaCl 0,15 M pH 8,0.

3.6. Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas nas amostras das urinas concentradas foi determinada pelo método descrito por Bradford (Bradford, 1976) (Kit Bio-Rad, USA), utilizando albumina sérica como padrão através da leitura de absorvância de 495 nm em espectrofotômetro *Infinity F200* (TECAN, EUA).

3.7. Western Blotting

Um volume da urina de cada indivíduo com o equivalente a 100µg de proteínas, após o preparo descrito acima, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (*SDS-page*) (gel 7,5% acrilamida) após redução da amostra com β-mercaptoetanol e aquecimento a 95°C por 5 minutos. As proteínas foram eletroforicamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi incubada em uma solução bloqueadora (5% de leite desnatado em tampão TBS-T). Posteriormente foi feita uma incubação com anticorpo primário Y4 (1:1000) contra ECA (gentilmente cedido por Prof. Dr. François Alhenc-Gelas, Faculdade de Medicina, Paris, França). Na etapa seguinte o anticorpo ligado foi detectado por um anticorpo secundário *Anti-rabbit HRP* (Sigma) com uma diluição de 1:250000 em TBS-T (2% de albumina). A detecção foi feita pelo método de quimioluminescência usando o revelador *ECL Prime Western Blotting Detection Reagente* (GE Helthcare). O aparelho usado para a captura de imagem foi um fotodocumentador *Amersham Imager 600* (GE Helthcare).

3.8. Classificação dos grupos de acordo com a presença das Isoformas da ECA

Através do método de *Western Blotting*, as isoformas urinárias da ECA foram identificadas e a classificação dos grupos se deu da seguinte forma:

- **Grupo 1:** presença das isoformas com 65, 90 e 190 kDa;
- **Grupo 2:** presença das isoformas com 65 e 90 kDa;
- **Grupo 3:** presença das isoformas com 65 e 190 kDa.

3.9. Análise estatística

Duas formas de análise foram usadas neste trabalho. Inicialmente foi realizada uma avaliação dos resultados encontrados em 220 indivíduos que participaram da fase 2 do estudo, com descrição das variáveis demográficas, antropométricas e clínicas desta sub-amostra. A segunda análise foi feita num subgrupo de 128 indivíduos que na primeira fase do estudo foram classificados como 'normotensos'. Nesta análise procurou-se associar a incidência de hipertensão com a presença das isoformas de ECA na urina.

Os cálculos estatísticos foram realizados no programa SPSS versão 19.0. Os resultados para as variáveis contínuas com distribuição normal foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

A análise das diferenças das proporções provenientes de classificação dos indivíduos quanto às variáveis demográficas, antropométricas e clínicas foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado.

As variáveis hemodinâmicas, antropométricas e bioquímicas foram comparadas segundo o grupo das isoformas da ECA presentes na urina de cada indivíduo (1,2 e 3) através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Tukey* para verificar diferenças entre os grupos. A análise de covariância (ANCOVA) foi usada para comparar os valores médios dos níveis de pressão sanguínea entre os grupos da ECA ajustados por variáveis antropométricas, bioquímicas e demográficas. O teste de *t*-

Student pareado foi usado na comparação de variáveis contínuas da primeira e segunda fase do estudo.

A comparação das variáveis contínuas de amostras independentes foi realizada através do teste *t- Student* e a comparação das variáveis contínuas entre as duas fases do estudo se fez pelo teste *t- Student* pareado.

A análise de regressão logística ajustada por parâmetros demográficos, antropométricos e bioquímicos e ainda pelo histórico familiar de hipertensão e presença das isoformas da ECA foi realizada para verificar uma possível associação com a incidência de hipertensão.

A análise de regressão linear simples foi realizada para avaliar a associação de possíveis fatores associados ao aumento da pressão sistólica e diastólica, assim como a regressão múltipla, ajustada por condições demográficas, antropométricas, bioquímicas e hemodinâmicas. Os dados que apresentaram um valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

4. Resultados

A segunda fase do projeto MONICA desenvolvido na Universidade Federal do Espírito Santo nos anos 2004-2005, teve o retorno de 682 voluntários que já haviam participado da fase inicial do estudo entre 1999-2001. Os resultados deste trabalho são referentes à avaliação dos dados de 220 voluntários durante a fase 2, assim como a comparação dos dados de 128 indivíduos entre a fase 1 e 2 do estudo, como descrito na seção 3 - Material e Métodos.

4.1. Distribuição das características demográficas e clínicas da amostra estudada.

Diferentes características da amostra foram investigadas. A análise descritiva da população estudada reportou maior porcentagem de mulheres em relação aos homens (59,1% e 40,9%), respectivamente. A idade variou entre 30 a 70 anos, com maior número de participantes entre a faixa etária de 51 a 60 anos (37,7%) e uma frequência maior de negros ou mulatos, com uma distribuição relativamente equilibrada entre os estratos socioeconômicos (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das características demográficas estudadas na amostra. Valores expressos como número (n) e porcentagem (%).

Características	Frequência (n)	%
Gênero (n= 220)		
Masculino	90	40,9%
Feminino	130	59,1%
Etnia (n=218)		
Brancos	77	35,0%
Pardos ou Negros	125	56,8%
Outros	16	7,3%
Faixa Etária (n=220)		
30 a 40 anos	37	16,8%
41 a 50 anos	55	25,0%
51 a 60 anos	83	37,7%
Maior de 60 anos	45	20,5%
Estrato Socioeconômico (n=220)		
A+B (alto)	84	38,2%
C (médio)	81	36,8%
D+E (baixo)	55	25,0%

Avaliando descritivamente as variáveis clínicas e laboratoriais da população, notou-se maior frequência de indivíduos dentro da normalidade, porém podemos observar uma porcentagem importante em relação ao sobrepeso para todas as variáveis analisadas, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição das características clínicas e bioquímicas estudadas na amostra, média \pm EPM, frequência n (%).

Características	Média	Frequência n (%)
IMC (kg/m²)		
Eutrófico	22,5 \pm 0,19	92 (42,2%)
Sobrepeso	27,3 \pm 0,25	86 (39,4%)
Obeso	34,5 \pm 0,64	40 (18,3%)
Nível Glicêmico (mg/dL)		
Normal	86,2 \pm 0,60	176 (80,7%)
Alto	126,3 \pm 5,97	42 (19,3%)
Nível Colesterol (mg/dL)		
Desejável	172,5 \pm 2,07	103 (47,2%)
Limítrofe	220,1 \pm 2,15	68 (31,2%)
Alto	267,9 \pm 3,77	47 (21,6%)
Nível Triglicérides (mg/dL)		
Desejável	101,9 \pm 2,59	128 (58,4%)
Limítrofe	177,2 \pm 2,56	41 (18,7%)
Alto	339,1 \pm 31,63	50 (22,8%)

De acordo com os níveis pressóricos e uso de medicamentos anti-hipertensivos, os indivíduos foram classificados como normotensos ou hipertensos, como já descrito em métodos. A frequência de hipertensos foi maior do que de normotensos (50,9% e 49,1%, respectivamente). A Tabela 3 apresenta a comparação entre os grupos sem diferença estatística com relação ao sexo e etnia, mesmo sendo notável uma maior porcentagem de negros e mulatos hipertensos. As porcentagens de hipertensos ($p < 0,05$) se mostraram mais altas entre as faixas etárias de 51 a 60 anos e acima de 60 anos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação de hipertensos e normotensos nos diferentes estratos sociais.

Tabela 3: Parâmetros demográficos nos grupos normotenso e hipertenso. Os valores estão expressos como frequência (n) e porcentagem (%).

	Normotensos (n;%)	Hipertensos (n;%)	Valor de <i>p</i>
Gênero (n= 220)			
Masculino	44 (48,9%)	46 (51,1%)	$p = 0,960$
Feminino	64 (49,2%)	66 (50,8%)	
Raça (n=218)			
Branco	45 (58,4%)	32 (41,6%)	$p = 0,137$
Pardos ou Negros	55 (44,0%)	70 (56,0%)	
Outros	8 (50,0%)	8 (50,8%)	
Faixa Etária (n=220)			
31 a 40 anos	25 (67,6%)	12 (32,4%)	$p = 0,002$
41 a 50 anos	34 (61,8%)	21 (38,2%)	
51 a 60 anos	34 (41,0%)	49 (59,0%)	
Maior de 60 anos	15 (33,3%)	30 (66,7%)	
Estrato Socioeconômico (n=220)			
A+B (Alto)	48 (57,1%)	36 (42,9%)	$p = 0,171$
C (Médio)	36 (44,4%)	45 (55,6%)	
D+E (Baixo)	24 (43,6%)	31 (56,4%)	

As diferenças entre as proporções das variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado.

A Tabela 4 descreve a variável IMC com mais obesos hipertensos em comparação aos normotensos e o nível glicêmico com porcentagem maior de hipertensos hiperglicêmicos em relação aos normotensos hiperglicêmicos. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada na avaliação do perfil lipídico, com maior número de indivíduos hipertensos possuindo níveis altos de colesterol e triglicérides em relação aos normotensos que também apresentavam níveis altos de colesterol e triglicérides.

Tabela 4: Parâmetros clínicos e laboratoriais dos grupos normotenso e hipertenso. Valores estão expressos como frequência (n) e porcentagem (%).

	Normotensos (n;%)	Hipertensos (n;%)	Valor de <i>p</i>
IMC (n=218)			
Eutrófico	59 (64,1%)	33 (35,9%)	<i>p</i> < 0,001
Sobrepeso	41 (47,7%)	45 (52,3%)	
Obeso	7 (17,5%)	33 (82,5%)	
Nível Glicêmico (n=218)			
Normal	91 (51,7%)	85 (48,3%)	<i>p</i> = 0,113
Alto	16 (38,1%)	26 (61,9%)	
Nível Colesterol (n=218)			
Desejável	62 (60,2%)	41 (39,8%)	<i>p</i> = 0,002
Limítrofe	31 (45,6%)	37 (54,4%)	
Alto	14 (29,8%)	33 (70,2%)	
Nível Triglicérides (n=219)			
Desejável	80 (62,5%)	48 (37,5%)	<i>p</i> < 0,001
Limítrofe	18 (43,9%)	23 (56,1%)	
Alto	9 (18,0%)	41 (82,0%)	

As diferenças entre as porcentagens das variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado.

4.2. Fatores associados ao aumento da pressão arterial.

Com a finalidade de observar quais seriam as alterações presentes no grupo de hipertensos, as médias de algumas variáveis foram avaliadas e comparadas entre os grupos. Os resultados demonstraram o grupo hipertenso com valores de parâmetros clínicos e bioquímicos mais elevados em relação aos normotensos, com exceção do HDL, porém não são significantes clinicamente.

Tabela 5: Dados clínicos e dosagens séricas avaliadas nos grupos normotensos e hipertensos.

	Normotensos (n=108)	Hipertensos (n=112)
Idade (anos)	49,02±0,95	54,20±0,91*
Massa Corpórea (kg)	65,17±1,19	74,24±1,41*
IMC (kg/m ²)	24,73±0,36	28,43±0,51*
Circunferência abdominal (cm)	82,70±1,03	92,93±1,21*
Relação Cirunferência Quadril (RCQ)	0,83±0,01	0,89±0,01*
Porcentagem de Gordura	18,50±0,48	22,16±0,58*
Glicemia (mg/dL)	89,56±1,81	98,23±2,64*
Colesterol Total (mg/dL)	196,66±3,94	218,64±4,04*
LDL (mg/dL)	121,75±3,32	135,68±3,53*
VLDL (mg/dL)	24,50±0,96	35,70±1,59*
HDL (mg/dL)	48,45±0,98	45,36±1,09*
Triglicérides (mg/dL)	129,93±7,83	208,63±16,92*
Creatinina (mg/dL)	0,98±0,17	1,07±0,02*
Ácido úrico (mg/dL)	4,89±0,11	5,25±0,08*
Ureia (mg/dL)	27,82±0,72	30,64±0,87*

* p<0,05 - normotensos *versus* hipertensos, usando teste *t-Student* como análise. Os dados são fornecidos como média ±EPM.

Diante dos resultados encontrados, foi realizado um modelo de análise de regressão linear simples, com o propósito de investigar quais os fatores de risco poderiam apresentar uma relação positiva ao aumento dos níveis pressóricos. Nas Tabelas 6 e 7, pode-se observar as variáveis que se correlacionaram significativamente com para o aumento da PAS e PAD.

Tabela 6: Variáveis associadas a alterações da pressão sistólica.

Variável	Coeficiente		Valor de <i>p</i>
	<i>B</i>	Erro Padrão	
Idade (anos)	0,635	0,118	<0,001
Etnia	5,055	2,701	0,019
Massa Corpórea (Kg)	0,354	0,085	<0,001
IMC (Kg/m ²)	1,135	0,242	<0,001
Circunferência Abdominal (cm)	0,398	0,091	<0,001
RCQ	67,65	11,720	<0,001
Colesterol (mg/dL)	0,098	0,029	0,001
Triglicérides (mg/dL)	0,025	0,009	0,004
LDL (mg/dL)	0,084	0,036	0,021
VLDL (mg/dL)	0,446	0,084	<0,001
Glicose (mg/dL)	0,227	0,051	<0,001
Ureia (mg/dL)	0,361	0,148	0,015
Creatinina sérica (mg/dL)	18,264	5,060	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,341	1,176	0,004

Tabela 7: Variáveis associadas a alterações da pressão diastólica.

Variável	Coeficiente		Valor de <i>p</i>
	<i>B</i>	Erro Padrão	
Etnia	4,607	1,730	0,008
Massa Corpórea (kg)	0,317	0,053	<0,001
IMC (Kg/m ²)	0,797	0,154	<0,001
RCQ	33,94	7,748	<0,001
Circunferência Abdominal (cm)	0,379	0,059	<0,001
Porcentagem de gordura	0,420	0,135	0,002
Colesterol (mg/dL)	0,068	0,018	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	0,025	0,005	<0,001
LDL (mg/dL)	0,061	0,023	0,008
VLDL (mg/dL)	0,328	0,052	<0,001
Glicose (mg/dL)	0,105	0,033	0,002
Creatinina sérica (mg/dL)	9,682	3,277	0,003
Ácido úrico (mg/dL)	2,352	0,752	0,002

A análise de regressão múltipla com os devidos ajustes para os parâmetros antropométricos, clínicos e demográficos, mostraram fatores associados às mudanças nas pressões sistólica e diastólica como descrito nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Associação multivariada entre fatores de risco e pressão arterial sistólica da população de Vitória – ES.

Variável	Coeficiente		
	B	Erro Padrão	Valor de p
Idade (anos)	0,534	0,111	< 0,001
Etnia	4,529	2,164	0,038
IMC (kg/m ²)	0,503	0,251	0,046
Colesterol (mg/dL)	0,077	0,025	0,002
Glicose (mg/dL)	0,144	0,048	0,003

Tabela 9: Associação multivariada entre fatores de risco e pressão arterial diastólica da população de Vitória – ES.

Variável	Coeficiente		
	B	Erro Padrão	Valor de p
Idade (anos)	0,194	0,071	0,006
Etnia	3,373	1,460	0,022
Massa Corpórea (kg)	0,292	0,051	< 0001
Colesterol (mg/dL)	0,044	0,017	0,011
Triglicérides (mg/dL)	0,017	0,005	0,002

4.3. Análise da expressão da ECA

A presença das isoformas da ECA foi detectada pela técnica de *Western Blotting* conforme descrito em Material e Métodos. A Figura 5 ilustra as bandas encontradas em amostras de urina de três voluntários, demarcando os três perfis das isoformas neste trabalho: grupo 1 (65,90 e 190 kDa), grupo 2 (65 e 90 kDa) e grupo 3 (65 e 190 kDa).

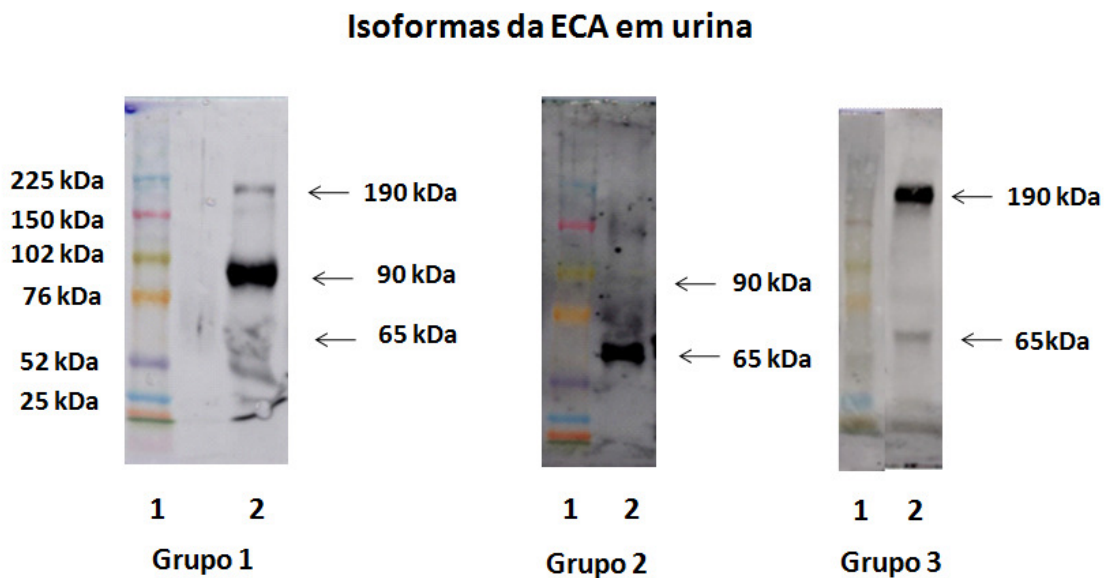


Figura 5: Análise da expressão urinária das isoformas da ECA por *Western Blotting*. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa. Foi utilizado o anticorpo policlonal Y4 anti-ECA (1:1000). O padrão usado no experimento (Rainbow - Amersham Biosciences, Suécia) está representado de forma colorida como coluna 1 e as amostras de urina estão representadas como coluna 2.

Segundo a classificação dos grupos de acordo com a presença das isoformas, uma frequência maior (67,3% da amostra) foi encontrada no grupo 1; 24,5% no grupo 2 e 8,2% no grupo 3. A Figura 6 mostra a distribuição em número absoluto e porcentagens das isoformas na população estudada.

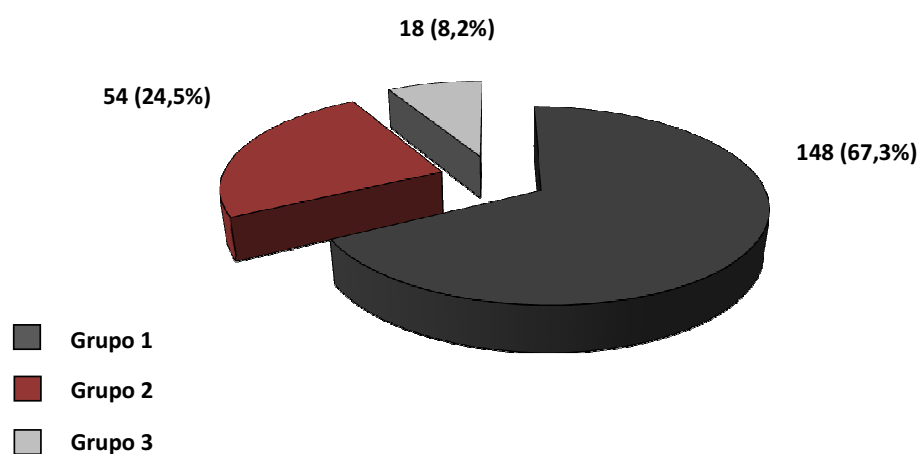


Figura 6: Distribuição das isoformas da ECA nos grupos de estudo. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

A expressão das isoformas da ECA foi investigada nos grupos normotensos e hipertensos. Os grupos 1 e 3 apresentaram maior proporção de indivíduos normotensos em comparação aos hipertensos. Entretanto, no grupo 3 a grande maioria foi constituída por normotensos. Já o grupo 2 teve a presença majoritária (83,3%) de hipertensos (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição das isoformas da ECA urinária entre os grupos normotensos e hipertensos dentro dos 3 grupos de estudo.

Isoformas da ECA	Normotensos	Hipertensos	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Grupo 1	84 (56,8%)	64 (43,2%)	148 (100%)
Grupo 2	9 (16,7%)	45 (83,3%)	54 (100%)
Grupo 3	15 (83,3%)	3 (16,7%)	18 (100%)

$p < 0,05$ pelo teste de qui-quadrado. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

4.4. Avaliação dos níveis pressóricos de acordo com a presença das isoformas da ECA

A pressão arterial foi avaliada nos três grupos, com os devidos ajustes para parâmetros demográficos, antropométricos e metabólicos. Níveis de pressão sistólica e diastólica significativamente aumentados foram observados no grupo 2, conforme mostra a Tabela 11.

Tabela 11: Pressão sistólica e diastólica ajustada por fatores demográficos, antropométricos e metabólicos nos diferentes grupos de estudo.

Isoformas da ECA	Pressão Sanguínea	
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Grupo 1 n=148	129,4 (126,9 a 133,0)	84,9 (83,3 a 86,6)
Grupo 2 n=54	137,0 (132,7 a 141,3)*	91,2 (88,3 a 94,0)#
Grupo 3 n=18	119,3 (111,8 a 126,9)	81,2(76,2 a 86,3)

PAS e PAD foram ajustadas por sexo, idade, raça, IMC, RCQ, histórico familiar de hipertensão, perfil lipídico, glicemia, creatinina sérica e ácido úrico. * $p < 0,05$ na comparação do grupo 2 *versus* grupo 1 e grupo 2 *versus* grupo 3; # $p < 0,05$ na comparação do grupo 2 *versus* grupo 1 e grupo 2 *versus* grupo 3. Valores expressos como média (intervalo de confiança de 95%), o teste usado foi de ANCOVA. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

4.5. Avaliação das características antropométricas e metabólicas de acordo com a presença das isoformas da ECA

Para avaliar quais grupos das isoformas da ECA apresentariam mais alterações antropométricas e bioquímicas, o teste ANOVA seguido por *Tukey* foi realizado. Na Tabela 12 é possível observar o grupo 2 com uma média mais elevada para as variáveis IMC, RCQ, colesterol, triglicérides, ácido úrico e creatinina em comparação aos outros grupos, porém não significantes. Valor estatisticamente significativo foi encontrado apenas para o IMC.

Tabela 12: Variáveis antropométricas e bioquímicas da população de acordo com a distribuição das isoformas da ECA entre os grupos.

Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	(65,90 e 190 kDa) N = 148	(69 e 90 kDa) N= 54	(65 e 190 kDa) N = 18
IMC (kg/m ²)	26,47±0,4	27,8±0,6*	24,1±0,8
RCQ	0,86±0,01	0,88±0,01	0,86±0,02
Colesterol (mg/dL)	205,2±3,56	214,7±5,5	209,8±11,9
LDL (mg/dL)	126,6±3,0	132,9±4,6	132,0±10,2
HDL (mg/dL)	46,0±0,8	48,0±1,7	50,12±2,7
Triglicérides (mg/dL)	166,7±11,8	192,8±22,1	128,2±14,0
Glicose (mg/dL)	95,4±2,3	92,2±1,6	84,4±1,9
Ácido úrico (mg/dL)	5,0±0,08	5,30±0,1	4,9±0,2
Creatinina (mg/dL)	1,02±0,02	1,04±0,03	1,02±0,04

* $p < 0,05$ - grupo 2 versus grupo 3. Valores expressos como média \pm EPM (ANOVA+Tukey).

Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

4.6. Novos casos de hipertensão e isoformas da ECA

Com interesse de investigar se ocorreu associação entre as isoformas da ECA e a elevação da pressão em aproximadamente cinco anos de seguimento, os resultados obtidos nos mesmos indivíduos nas duas fases do estudo foram comparados. Como o foco foi determinar se surgiram novos casos de hipertensão, apenas os dados dos 128 indivíduos que eram normotensos na primeira fase do estudo foram analisados na comparação entre as fases. Verificou-se que 35 (27,3%) destes indivíduos da primeira fase tornaram-se hipertensos na fase 2 e, conseqüentemente, 93 (72,7%) continuaram normotensos (Figura 7), correspondendo a uma taxa de incidência de 5,4 casos novos/100 indivíduos-ano.

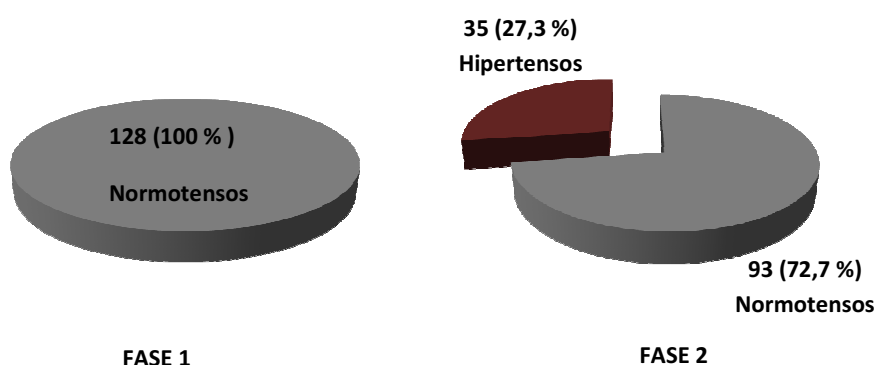


Figura 7: Frequência de normotensos e hipertensos na comparação entre as duas fases do Projeto MONICA.

4.7. Expressão das isoformas da ECA associadas à pressão arterial

A avaliação dos resultados do banco de dados obtidos na fase 1 do estudo (1999-2001), mostrou que dos 128 indivíduos normotensos também avaliados da segunda fase, 110 deles expressaram em amostras de urina as isoformas com 65, 90 e 190 kDa, e 18 indivíduos expressaram as isoformas com 65 e 190 kDa . Vale ressaltar que na fase 1 nenhum normotenso expressou apenas as isoformas com 65 e 90 kDa.

A comparação da expressão das isoformas da ECA revelou que após cinco anos, dentro da amostragem dos 128 indivíduos normotensos da primeira fase, 97 continuaram a expressar a isoforma com 190 kDa. Dentre estes, 23 (23,7%) tornaram-se hipertensos e 74 (76,3%) permaneceram normotensos na segunda fase. Um número de 13 indivíduos deixou de expressar a isoforma com 190 kDa na segunda fase expressando somente as isoformas com 65 e 90 kDa, onde 9 (69,2%) desenvolveram hipertensão e 4 (30,8%) continuaram normotensos. Um total de 18 indivíduos continuou a expressar as isoformas de 65 e 190 kDa, com 3 (16,7%) desenvolvendo hipertensão e 15 (83,3%) mantendo-se em normotensos. A Tabela 13 mostra a porcentagem de normotensos e hipertensos dentro de cada grupo de isoformas na segunda fase do estudo. A incidência de hipertensão em cinco anos foi de, aproximadamente, 16% no grupo 3, 24% no grupo 1 e quase 70% no grupo 2.

Tabela 13: Distribuição de normotensos e hipertensos nos diferentes grupos de estudo da fase 2.

Isoformas da ECA	Normotensos	Hipertensos	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Grupo 1	74 (73,6%)	23 (23,7%)	97 (100%)
Grupo 2	4 (30,8%)	9 (69,2%)	13 (100%)
Grupo 3	15 (83,3%)	3 (16,7%)	18 (100%)
Total	93 (72,7%)	35 (27,3%)	128 (100%)

A diferença entre as porcentagens das variáveis qualitativas apresentou um valor de $p < 0,05$ pelo teste de qui-quadrado. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

4.8. Comparação dos níveis pressóricos entre as duas fases da pesquisa de acordo com a presença das isoformas da ECA

Os níveis pressóricos dos normotensos das duas fases da pesquisa foram analisados com a intenção de comparar a variação da pressão no período de aproximadamente cinco anos. Os grupos 1 e 3 mostraram níveis médios significativamente mais elevados de PAS na fase 2. O grupo 2 apesar de ter apresentado uma média sistólica maior na segunda fase, não diferiu estatisticamente da fase inicial (Tabela 14). Com relação à PAD, o grupo 1 apresentou índices pressóricos mais altos na segunda fase (Tabela 15).

Tabela 14: Pressão arterial sistólica dos indivíduos que permaneceram normotensos nas duas fases do estudo.

Isoformas da ECA	Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	
	Fase 1	Fase 2
Grupo 1 n= 74	113,1±1,24	116,8±1,20*
Grupo 2 n = 4	109,50±5,12	120,25±6,51
Grupo 3 n= 15	110,60±2,27	117,4±2,13 [#]

* $p < 0,05$ – fase 1 *versus* fase 2; # $p < 0,05$ – fase 1 *versus* fase 2. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t-student* pareado). Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

Tabela 15: Pressão arterial diastólica dos indivíduos que permaneceram normotensos nas duas fases do estudo.

Isoformas da ECA	Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	
	Fase 1	Fase 2
Grupo 1 n= 74	74,78±0,9	77,2±0,85*
Grupo 2 n = 4	70,5±0,8	75,7±3,06
Grupo 3 n= 15	74,9±1,77	77,8±1,36

* $p < 0,05$ – fase 1 *versus* fase 2. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t-student* pareado). Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

Como já descrito acima, dos 128 normotensos da primeira fase, 35 indivíduos desenvolveram hipertensão na transição entre a fase 1 e 2. A comparação dos níveis pressóricos entre as duas fases destes indivíduos que se tornaram hipertensos, mostrou que os grupos 1 e 2 tiveram índices elevados tanto da PAS como PAD. Não observamos diferença estatística significativa para o grupo 3 na comparação entre as duas fases, conforme mostrado nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Pressão arterial sistólica dos indivíduos hipertensos somente na segunda fase do estudo.

Isoformas da ECA	Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	
	Fase 1	Fase 2
Grupo 1 n= 23	124,7±1,76	138,6±2,20*
Grupo 2 n = 9	123,2±2,60	141,1±4,03 [#]
Grupo 3 n= 3	120,3±7,53	124,6±4,37

* $p < 0,05$ – fase 1 versus fase 2; # $p < 0,05$ – fase 1 versus fase 2. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t-Student* pareado). Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

Tabela 17: Pressão arterial diastólica dos indivíduos hipertensos somente na segunda fase do estudo.

Isoformas da ECA	Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	
	Fase 1	Fase 2
Grupo 1 n= 23	81,9±0,73	92,5±1,73*
Grupo 2 n = 9	83,6±1,77	93,8±1,44 [#]
Grupo 3 n= 3	81,3±4,09	90,6±0,33

* $p < 0,05$ – fase 1 versus fase 2; # $p < 0,05$ – fase 1 versus fase 2. Valores expressos como média \pm EPM (Teste *t-student* pareado). Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

A comparação dos parâmetros antropométricos e bioquímicos entre as duas fases do estudo, somente dos novos casos de hipertensão, mostrou um aumento significativo dos níveis de VLDL, triglicérides e creatinina sérica durante a fase 2 no grupo 1. Já o grupo 2 mostrou uma média glicêmica mais baixa e nível de LDL mais elevado durante a segunda fase e não foram observadas diferenças significantes no grupo 3 (Tabela 18). Os resultados são expressos como média \pm EPM, usando teste *t-Student* pareado para a análise dos dados estatísticos.

Tabela 18: Comparação de parâmetros antropométricos e bioquímicos dos hipertensos na segunda fase do estudo.

	Fase 1			Fase 2		
	Grupo1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	n=23	N=9	N=3	n=23	N=9	N=3
Idade (anos)	43,2±2,06	45,6±2,43	48,0	48,9±2,18	50,7±2,39	53,0
Peso (Kg)	73,8±4,28	74,5±2,72	59,7±8,80	76,88±4,28	75,08±3,08	60,3±7,72
IMC (Kg/m ²)	28,9±1,40	26,6±1,09	25,0±3,42	30,3±1,75	27,2±1,23	25,4±3,14
RCQ	0,83±0,01	0,86±0,22	0,89±0,85	0,87±0,03	0,86±0,25	0,91±0,95
Glicemia (mg/dL)	99,6±2,41	108,3±7,88	95,3±5,69	96,1±6,41	92,2±3,63 ^Δ	85,0±1,52
Colesterol Total (mg/dL)	214,5±8,07	220,0±12,18	252,0±25,69	224,3±9,09	217,0±12,98	274,3±30,60
LDL (mg/dL)	145,9±7,75	144,6±12,86	169,4±21,6	139,1±10,24	133,0±12,66 ^Δ	177,9±2,96
VLDL (mg/dL)	25,4±2,55	26,9±3,92	15,1±4,10	39,47±3,70*	33,2±4,16	12,1±3,10
HDL (mg/dL)	44,2±2,26	48,4±5,66	54,0±8,0	45,9±2,02	50,6±3,85	45,0±4,00
Triglicérides (mg/dL)	134,1±13,86	134,7±19,61	148,3±73,78	213,63±24,00*	166,3±20,8	201,3±141,1
Creatinina (mg/dL)	0,92±0,03	0,96±0,07	1,06±0,26	1,06±0,04*	1,03±0,09	1,1±0,57
Ácido úrico (mg/dL)	4,5±0,24	5,3±0,32	4,3±0,57	4,9±0,17	5,6±0,24	4,7±0,41

*p<0,05 - grupo 1 da fase 1 *versus* grupo 1 da fase 2. Δ< 0,05 - grupo 2 da fase 1 *versus* grupo 2 da fase 2. Grupo 1, isoformas com 190, 90 e 65 kDa; Grupo 2, isoformas com 90 e 65 kDa e Grupo 3, isoformas com 190 e 65 kDa.

4.9. Fatores de risco associados à hipertensão

De acordo com os resultados encontrados, mudanças na expressão das isoformas da ECA foram detectadas em alguns indivíduos e para investigar se houve relação com o aparecimento de hipertensão, foi realizada uma análise de regressão logística múltipla, considerando como variável dependente, a condição da pressão arterial (normotensos ou hipertensos) na fase 2. Nesta análise, a perda da expressão da isoforma com 190 kDa e o histórico familiar de hipertensão em parente de primeiro grau apresentaram associação positiva em relação ao desenvolvimento de hipertensão arterial (Tabela 19).

Tabela 19: Fatores de risco associados à hipertensão.

Variáveis	Razão de Risco	95% de intervalo de confiança		Valor de <i>p</i>
		Inferior	Superior	
Perda da expressão da isoforma com 190 kDa	7,7	2,1	27,0	0,001
Histórico familiar de hipertensão	3,2	1,2	8,7	0,019

Discussão

5. Discussão

Estudos anteriores do nosso grupo encontraram perfis diferentes da expressão das isoformas da ECA. O perfil encontrado foi de hipertensos apresentando as isoformas com 65 e 90 kDa, normotensos apresentando as isoformas com 65 e 190 kDa e alguns normotensos e hipertensos com as três isoformas em suas amostras de urina (Casarini *et al.*, 1991, 1992, 1995 e 2001). Os resultados de Ronchi *et al.*, 2005 e 2007, assim como Marques em 2003, também demonstraram que a urina de ratos espontaneamente hipertensos apresentava as isoformas com 65 e 80 kDa, não sendo detectada a isoforma com 80 kDa na urina de ratos normotensos e nos modelos de ratos tornados hipertensos experimentalmente (Marques *et al.*, 2003). Os mesmos perfis foram encontrados em 2012 por Maluff-Meiken em um trabalho populacional, confirmando assim, suspeitas anteriores de que a isoforma com 90 kDa poderia estar associada à hipertensão arterial (Maluff-Meiken *et al.*, 2012).

Considerando estudos prévios de nosso grupo, a proposta do presente estudo foi avaliar a expressão das isoformas urinárias da ECA num estudo prospectivo de uma sub-amostra de indivíduos já previamente estudados em fase anterior, com intuito de verificar se ocorreram mudanças na expressão dessas isoformas e se a presença da isoforma com 90 kDa poderia estar associada à incidência de hipertensão arterial.

A amostra estudada foi composta de 220 indivíduos, sendo 90 (40,9%) do sexo masculino e 130 (59,1%) do sexo feminino, valores próximos aos da amostra na primeira fase do estudo 45,8% e 54,2% respectivamente (Maluff-Meiken *et al.*, 2012). Segundo dados do IBGE de 2016, a distribuição por sexo da população de Vitória atualmente é por volta de 46,9% para o sexo masculino e 53,0% para o sexo feminino. Sendo assim, a distribuição da amostragem da população estudada neste trabalho se aproximou da distribuição real em relação ao sexo. A análise descritiva ainda mostrou maior porcentagem de mulatos e negros, indivíduos entre 50 e 60 anos, assim como, maior porcentagem de indivíduos pertencentes ao estrato sócio econômico A+B (alto).

A distribuição das características clínicas e bioquímicas da amostra evidenciou de um modo geral, os índices de IMC, glicemia, colesterolemia e trigliceridemia com maior frequência de casos dentro dos limites desejáveis.

Mediante aferição da pressão arterial e com a informação do uso corrente de medicamentos anti- hipertensivos, os indivíduos foram classificados como normotensos e hipertensos, sendo que os hipertensos se apresentaram em maior proporção 50,9% vs 49,1%.

O número de hipertensos foi similar ($p>0.05$) por sexo e raça, apesar de existirem mais negros e mulatos hipertensos. A VI Diretriz Brasileira de Hipertensão demonstrou uma prevalência global de hipertensão semelhante entre homens e mulheres, embora mais elevada nos homens até os 50 anos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010) e os resultados descritos no presente estudo, mostraram esta semelhança. Alguns estudos na literatura descrevem as mulheres com níveis de pressão arterial mais controlados, talvez por terem uma percepção mais acurada de sua condição de saúde, procurando assim os serviços de saúde, seguindo adequadamente os tratamentos propostos (Da Silva *et al.*, 2016).

Embora os resultados obtidos no presente trabalho não mostrarem diferenças significantes para a etnia, a literatura descreve a raça como um fator de risco para a hipertensão. A origem africana e as condições históricas da colonização das Américas têm servido de substrato para o surgimento de hipóteses genéticas que expliquem a maior prevalência da hipertensão entre as populações negras (Laguardia, 2005). Uma pesquisa mostrou que a prevalência de hipertensão em negros dos EUA está entre as mais altas do mundo e que os negros desenvolvem hipertensão mais cedo na vida apresentando sua pressão média bem maior em comparação aos brancos (Hertz *et al.*, 2005). Um estudo populacional no sudeste dos EUA revelou que os negros eram mais propensos a transição de pré-hipertensão para hipertensão que os brancos (Selassie *et al.*, 2011).

Uma relação direta e linear da PA com a idade é descrita pela literatura, onde a faixa etária acima dos 65 anos tem uma prevalência superior a 60% de acordo com a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão (Sociedade *et al.*, 2010). Resultados parecidos foram demonstrados na Tabela 3, com maior porcentagem de hipertensos acima de 60 anos (66,7%). O estudo de Framingham relata que 90% dos indivíduos com PA normal até os 55

anos irão desenvolver HAS ao longo da vida (Aronow *et al.*, 2011), corroborando com os resultados encontrados novamente, onde foi possível observar mais casos de hipertensão na faixa etária entre 50 e 60 anos (59,0%) em comparação aos indivíduos mais jovens. O principal aspecto relacionado ao aumento da PA é o envelhecimento vascular, caracterizado por alterações da parede dos vasos, seguido de enrijecimento arterial. Isso faz com que os grandes vasos percam sua distendibilidade promovendo mudanças estruturais na camada média dos vasos, como por exemplo, fratura por fadiga da elastina, depósito de colágeno e calcificação (Collaboration, 2002).

A condição socioeconômica foi outro fator avaliado, e a mesma pode causar impactos nas condições de saúde da população, influenciando diretamente no acesso ao sistema de saúde, grau de informação, compreensão e adesão ao tratamento da hipertensão (Kanjilal *et al.*, 2006). Os resultados mostraram que as classes sociais mais baixas C (55,6%) e D+E (56,4%), tiveram uma porcentagem maior de hipertensos em comparação aos normotensos da mesma classe. O contrário também foi observado, com maior porcentagem de normotensos pertencendo à classe socioeconômica A+B (57,1%). Apesar de existir uma tendência à maior prevalência de hipertensão nas classes C e D+E, não observamos diferença significativa entre as classes, porém, alguns trabalhos descrevem as classes socioeconômicas mais baixas com risco maior de desenvolver doenças cardiovasculares (Mill *et al.*, 2004; Unger *et al.*, 2015). Adultos com menor nível de escolaridade apresentam maior prevalência de hipertensão auto referida (31,1%) e a proporção diminui à medida que o nível de escolaridade é mais qualificado (Scala Lc, 2015).

Outra justificativa para a prevalência de hipertensão ser maior em estratos socioeconômicos mais baixos seria a influência do fator étnico-racial. É visível na sociedade, que ao avançar em direção às classes C, D e E, cresce a participação relativa de negros e mulatos, em relação aos estratos socioeconômicos mais altos (Mill *et al.*, 2004).

A avaliação do IMC mostrou claramente que a obesidade influencia no aumento da PA. Os resultados mostraram o grupo de hipertensos obesos com proporções bem mais elevadas em relação aos normotensos obesos (82,5% vs 17,5%), o contrário se deu para os hipertensos eutróficos, onde a porcentagem foi menor em relação aos normotensos eutróficos. A obesidade pode estar relacionada à hipertensão em mais de 30% dos

hipertensos, segundo o Consenso Latino Americano sobre Hipertensão (Zanchetti, 2001). O estudo de Souza e colaboradores (2006) mostrou que na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 58,6% dos indivíduos com obesidade eram hipertensos, 45,6% dos que estavam com sobrepeso também tinham níveis pressóricos mais elevados, ao passo que apenas 27,9% dos indivíduos com peso normal eram hipertensos (De Souza *et al.*, 2007). Perfil parecido foi encontrado neste estudo, onde a hipertensão foi detectada em 82,5% dos obesos, 52,3% dos portadores de sobrepeso e 35,9% dos eutróficos.

O nível glicêmico foi investigado no presente estudo, pois a literatura descreve uma forte associação entre diabetes e hipertensão. Os resultados encontrados foram: hiperglicêmicos hipertensos (61,9%) e hiperglicêmicos normotensos (38,1%). A porcentagem de normoglicêmicos normotensos foi mais alta em relação à de normoglicêmicos hipertensos, 51,7% vs 48,3%. Apesar não serem significantes, os resultados obtidos merecem atenção, pois a concomitância de HAS e DM potencializa o dano micro e macrovascular, acarretando alta morbidade cardiocerebrovascular (Ministério da Saúde, 2001).

Alterações do perfil lipídico são consideradas fatores de risco importantes para a hipertensão. Em nossos resultados, observamos uma maior porcentagem de normotensos com limites de colesterol dentro dos valores desejáveis em relação aos hipertensos; 60,2% e 39,8%, respectivamente. O contrário foi observado nos indivíduos com nível colesterol de alto, com 29,8% normotensos e 70,2% hipertensos. O mesmo perfil foi encontrado na avaliação dos níveis de triglicérides, com 62,5% dos indivíduos com nível desejável de triglicérides sendo normotensos e 37,5% hipertensos. Notou-se ainda uma porcentagem maior de hipertensos com triglicérides alto (82,0%), em comparação aos normotensos também com triglicérides alto (18,0%). A literatura descreve associação positiva entre níveis de colesterol total e pressão arterial em pacientes hipertensos (Neaton e Wentworth, 1992). Mecanismos fisiopatológicos relacionados na gênese da hipertensão e da dislipidemia possuem anormalidades metabólicas comuns, podendo agir sinergicamente ou acelerando o processo da aterogênese. A hipercolesterolemia pode ter efeito primário nos vasos e tônus vascular, o que poderia levar a disfunção endotelial, também presente de forma incipiente na HAS (Sposito, 2004).

Sabe-se que a hipertensão é uma doença multifatorial, sendo muito difícil fechar um diagnóstico para a mesma, identificando uma causa isolada. Diversos fatores de risco podem estar associados à presença da HAS e neste trabalho foram avaliados diversos fatores de risco. As médias das variáveis demográficas (idade), antropométricas (peso, IMC, cintura abdominal, porcentagem de gordura) e bioquímicas (glicemia, colesterol e suas frações, triglicérides, creatinina, ácido úrico e ureia) apresentaram-se mais elevadas no grupo hipertenso, com exceção dos níveis de HDL, no qual se mostrou mais baixo em relação aos normotensos, porém, vale ressaltar que níveis baixos de HDL não são indicativos de parâmetros saudáveis.

Em análise univariada, uma correlação positiva foi observada entre a PAS e idade, raça, peso, IMC, circunferência abdominal, RCQ, porcentagem de gordura, colesterol, triglicérides, LDL, VLDL, glicose, ureia, creatinina sérica e ácido úrico. Para a PAD, foi observada correlação positiva entre todas as variáveis já citadas, com exceção da idade e ureia. A análise de regressão múltipla mostrou que existe uma associação da PAS com idade, raça, IMC, colesterol e glicose. Os fatores de risco como idade, raça, peso, colesterol e triglicérides se correlacionaram com a PAD, mostrando que mesmo com os devidos ajustes essas variáveis são consideradas importantes fatores de risco.

Como mencionado, diversos fatores relacionados à hipertensão são amplamente estudados por pesquisadores do mundo inteiro e a expressão das isoformas da ECA também merece atenção especial nesse aspecto.

A análise por *Western Blotting* para detecção das isoformas da ECA evidenciou o grupo 1 (65, 90 e 190 kDa) com 56,8% normotensos e 43,2% hipertensos; grupo 2 (65 e 90 kDa) com 16,7% normotensos e 83,3% hipertensos e por fim, o grupo 3 (65 e 190 kDa), apresentando 83,3% normotensos e 16,7% hipertensos. Pode-se afirmar, portanto, que a expressão da isoforma de 90 kDa está presente na maioria dos indivíduos hipertensos.

Os níveis pressóricos foram investigados nos diferentes grupos de acordo com presença de isoformas da ECA e a avaliação da pressão com os devidos ajustes para variáveis sociodemográficas, antropométricas e clínicas dos indivíduos mostrou o grupo 2 mantendo níveis médios mais elevados ($p < 0,05$) de pressão sistólica (137,0 mmHg) e diastólica (91,2 mmHg) em comparação aos outros grupos. O perfil do grupo 2 apresentando níveis

pressóricos mais altos no presente estudo, repetiu o mesmo encontrado por Malluf-Meiken e colaboradores em 2012.

Os parâmetros clínicos e bioquímicos avaliados nos diferentes grupos mostraram o grupo 2 com índices mais elevados de colesterol ($214,7 \pm 5,5$ mg/dL) e triglicérides ($192,8 \pm 22,1$ mg/dL) em comparação aos grupos 1 ($205,2 \pm 3,56$ mg/dL e $166,7 \pm 11,8$ mg/dL, respectivamente) e 3 ($209,8 \pm 11,9$ mg/dL e $128,2 \pm 14,0$ mg/dL, respectivamente). Os grupos contendo a isoforma com 90 kDa apresentaram índices mais baixos de HDL ($46,0 \pm 0,8$ mg/dL) para o grupo 1 e ($48,0 \pm 1,7$ mg/dL) para o grupo 2. A glicemia nos grupos contendo a isoforma com 90 kDa, esteve mais alta ($95,4 \pm 2,3$ mg/dL - grupo 1; $92,2 \pm 1,6$ mg/dL - grupo 2) em comparação ao grupo 3 ($84,4 \pm 1,9$ mg/dL). Teixeira e colaboradores identificou indivíduos normotensos com histórico familiar de hipertensão e com a presença da isoforma com 90 kDa apresentando níveis mais elevados de triglicérides em comparação ao grupo que não apresentava essa isoforma, e ainda, níveis mais baixos de HDL em relação aos que não possuíam esta mesma enzima (Teixeira *et al.*, 2008). Os resultados encontrados são similares ao de Teixeira *et al.*, e apesar de não serem estatisticamente significantes pode-se dizer que o grupo contendo somente as isoformas com 90 e 65 kDa apresenta mais fatores de riscos associados à elevação da pressão arterial. Os índices de IMC ($p < 0,05$) mostraram mais uma vez, a isoforma com 90 kDa relacionada à fatores de risco para o aumento de pressão arterial, pois como já mencionado, o aumento de peso favorece as alterações de níveis pressóricos.

Após avaliar os resultados demográficos, clínicos e bioquímicos dos 220 indivíduos da segunda fase do Projeto MONICA, comparamos os resultados obtidos entre a fase 1 e 2. Nesta comparação, foram usados como objeto de estudo somente os dados dos indivíduos normotensos na primeira fase com o intuito de verificar se neste subgrupo ocorreram alterações na expressão das isoformas da ECA e dos níveis pressóricos, surgindo desta maneira, novos casos de hipertensão.

Na análise de dados de 128 indivíduos que preenchiem essa condição, verificou-se que, após cinco anos em média, 93 indivíduos (72,7%) permaneceram normotensos e 35 (27,3%) tornaram-se hipertensos.

Avaliando os resultados do banco de dados da fase 1 do Projeto MONICA, foi possível observar entre os 128 indivíduos normotensos, também avaliados na segunda fase, 110 deles expressando em suas amostras de urina as isoformas com 65, 90 e 190 kDa, e 18 indivíduos possuindo as isoformas com 65 e 190 kDa sendo que, nenhum normotenso expressou as isoformas com 65 e 90 kDa.

Ao comparar a expressão das isoformas da ECA entre as duas fases do estudo, foi possível notar durante a fase 2, uma parte dos indivíduos expressando as três isoformas e permanecendo normotensa (73,6%), e outra tornando-se hipertensa (23,7%); alguns indivíduos que expressavam a isoforma com 190 kDa na fase 1, com o passar dos anos deixaram de expressá-la, sendo que, a maioria ficou hipertensa (69,2%) na segunda fase apenas com as isoformas com 65 e 90 kDa. Não foram observadas mudanças da expressão das isoformas no grupo 3 (65 e 190 kDa) de uma fase para outra (os 18 indivíduos que expressavam as isoformas de 65 e 190 kDa na primeira fase, continuaram a expressá-las na segunda fase), porém, alguns indivíduos deste grupo tornaram-se hipertensos (16,7%) na fase 2. Assim sendo, resultados indicam que a incidência de hipertensão foi maior no grupo 2. Como vários fatores podem levar à hipertensão, podemos talvez associar mudanças na qualidade de vida dos hipertensos e até mesmo o nível de estresse a que foram submetidos os indivíduos do grupo 3, como sendo importantes para essa mudança.

Na literatura, não existem muitos trabalhos tentando quantificar o estresse, pelo fato de ser uma análise difícil a ser realizada. Entretanto, pode-se especular que o nível de estresse a que as pessoas são submetidas podem inferir em alterações da PA, principalmente se forem pertencentes a uma classe socioeconômica mais baixa (Mill e cols., 2004).

Os níveis pressóricos destes normotensos e hipertensos da segunda fase foram investigados, na intenção de verificar quais grupos com as diferentes isoformas da ECA apresentavam aumento da PA, e se o aumento foi significativo após cinco anos.

A comparação dos níveis pressóricos entre as fases 1 e 2 dos indivíduos que se mantiveram normotensos, mostrou um aumento significativo de PAS nos grupos 1 ($113,1 \pm 1,24$ vs $116,8 \pm 1,19$ mmHg) e 3 ($110,6 \pm 2,27$ vs $117,0 \pm 2,45$ mmHg). Não houve aumento significativo no grupo 2 na comparação entre as duas fases. Talvez a diferença não

tenha sido detectada pelo fato do N ser baixo nesse grupo. Entre os grupos das isoformas também não foi observada diferença estatisticamente na mesma fase da pesquisa. Um aumento considerável ($p < 0,05$) foi observado na comparação da pressão diastólica no grupo 1 ($74,7 \pm 0,90$ vs $77,2 \pm 0,85$ mmHg).

Como já descrito, trabalhos indicam a isoforma com 90 kDa como um possível marcador biológico de hipertensão arterial. Desta forma, os indivíduos normotensos do grupo 1 que apresentaram alterações de PA sistólica e diastólica merecem cuidados especiais quanto a prevenção no desenvolvimento de hipertensão arterial.

Um aumento significativo da PA foi observado nos grupos contendo a isoforma com 90 kDa nos indivíduos que mostraram-se hipertensos na segunda fase. Na primeira fase o grupo apresentava uma PAS média de $124,7 \pm 1,76$ mmHg e PAD de $81,9 \pm 0,73$ mmHg aumentado para $138,6 \pm 2,20$ mmHg e $92,5 \pm 1,73$ mmHg. O grupo 2 tinha níveis médios de PAS em torno de $123,2 \pm 2,60$ mmHg e PAD $83,6 \pm 1,77$ mmHg, nos quais se elevaram para $141,1 \pm 4,03$ mmHg e $93,8 \pm 1,44$ mmHg. O grupo com a ECA com 90 kDa ausente não teve alteração significativa da pressão arterial de uma fase para outra, apesar da PAS e PAD terem apresentado níveis mais elevados na fase 2. Com estes achados, pode-se especular que a presença da isoforma de 90 kDa na urina poderia estar envolvida em mecanismos relacionados ao aumento da pressão arterial com o aumento da idade.

Outros parâmetros também foram investigados nos diferentes grupos das isoformas da ECA, fazendo uma comparação entre as duas fases. Notou-se que, após cinco anos os níveis de VLDL, triglicérides e creatinina sérica aumentaram ($p < 0,05$) no grupo 1; o grupo 2 mostrou níveis mais baixos de glicemia e LDL na segunda fase ($p < 0,05$) e o grupo 3 não evidenciou diferenças estatísticas das variáveis entre as duas fases, contudo, a média de idade foi maior em relação aos outros grupos e apresentou níveis mais elevados de colesterol total, triglicérides, creatinina sérica e ácido úrico durante a fase 2. A literatura descreve o DM como um importante fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão (Martinez, 2014) e no presente estudo é interessante observar através da Tabela 18, uma diminuição significativa da média glicêmica de $108,3 \pm 7,88$ mg/dL para $92,2 \pm 3,63$ mg/dL após cinco anos, no grupo 2, justamente o grupo que apresentou somente as isoformas com 65 e 90 kDa com níveis mais elevados de pressão tanto sistólica como diastólica. Pode-se sugerir

mediante ao resultado encontrado, que o diabetes não foi um preditor da hipertensão neste caso e que a presença da isoforma N-domínio poderia estar relacionada ao aumento da pressão arterial.

No estudo exposto, não foi possível investigar a atividade da ECA, mas interessante seria, avaliar se a atividade da isoforma N-domínio neste grupo específico estaria aumentada em relação aos outros, evidenciando assim mais um dado de que a isoforma com 90 kDa poderia ser um importante marcador biológico para a hipertensão arterial. O trabalho publicado por Fernandes e colaboradores em 2008, revelou maior atividade da ECA no grupo possuindo a isoforma com 90 kDa e ainda o grupo com a mesma isoforma associada ao histórico familiar de hipertensão (Fernandes *et al.*, 2008).

Estudos prévios em nosso laboratório detectaram também uma associação direta da isoforma N-domínio com 90 kDa, histórico familiar de hipertensão e função endotelial. A vasodilatação endotélio dependente encontra-se diminuída na hipertensão essencial, porém, a relação entre esse efeito e a concentração plasmática de NO ainda não está bem elucidada (Panza *et al.*, 1993). De acordo com o grau de responsividade endotelial: se o indivíduo dilata menos, é porque a síntese de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais está diminuída ou quando sintetizado, é mais suscetível à degradação (McCallister *et al.*, 1999). Na literatura existem relatos de que indivíduos apresentando a ECA N-domínio com 90 kDa tinham uma excreção mais baixa de óxido nítrico urinário, sendo um indicativo de que a presença dessa isoforma poderia estar relacionada com a concentração de NO urinária. Esses dados sugerem que a presença desta isoforma por si própria, tenha um impacto negativo na dilatação mediada por fluxo estimulada pela hiperemia reativa (Fernandes *et al.*, 2008).

Como descrito, alguns indivíduos deixaram de expressar a isoforma com 190 kDa tornando-se hipertensos. Para avaliar se a perda da isoforma de 190 kDa seria um fator de risco para a hipertensão uma análise de regressão logística foi realizada e esta, demonstrou que a perda da expressão da isoforma de 190 kDa, pode aumentar em 7,7% as chances de ter pressão alta. Como mencionado, existem muitos estudos tentando desvendar os mecanismos de solubilização da ECA ancorada à membrana celular. A ECA somática é uma proteína que pode ser proteoliticamente processada próxima à membrana plasmática, na

porção extracelular por um grupo de proteases denominado secretases. Nesse processo, o domínio extracelular é liberado para o meio de cultura ou para a circulação, convertendo a proteína ancorada a membrana em uma forma solúvel (Ehlers *et al.*, 1991; Hooper *et al.*, 1997). Aragão e colaboradores em 2015, descreveram serino proteases SH1 e STH2, como secretases capazes de clivar a ECA somática na sua porção central, gerando as isoformas N-domínio com 65 e 90 kDa (Aragão *et al.*, 2015).

Na literatura ainda não existem trabalhos com humanos evidenciando que a solubilização da ECA poderia estar associada ao aparecimento de alguma patologia, porém, com base em nossos achados, pode-se inferir que alguma alteração, talvez genética, possa regular de maneira diferente nos organismos normotensos e hipertensos, essas enzimas responsáveis pela clivagem da isoforma com 190 kDa induzindo assim o aumento da atividade destas secretases gerando as isoformas N- domínio.

Uma possível justificativa do envolvimento da isoforma N-domínio com a hipertensão, seria uma maior produção destas isoformas em organismos pré-dispostos à hipertensão, assim como hipertensos, através do aumento da atividade destas secretases, o que levaria uma diminuição da concentração de Ang 1-7, pelo fato da mesma sofrer as ações da isoforma N-domínio. Seria interessante, futuramente, investigar em humanos a concentração das angiotensinas plasmáticas e associá-las à presença desta isoforma, na tentativa de desvendar os mecanismos envolvidos, visto que, no presente estudo não foi possível realizar tais análises.

Cabe ressaltar que a identificação dessas proteases capazes de liberar as isoformas com 65 e 90 kDa descrito por Aragão e colaboradores possam levar à descoberta de outros mecanismos moduladores da atividade enzimática em condições fisiológicas ou patológicas.

Os dados sugerem que a isoforma de 90 kDa pode estar associada à presença de hipertensão, já que a maioria dos pacientes hipertensos apresentam esta isoforma na urina. Dos pacientes que deixaram de apresentar a ECA com 190 kDa, ficando somente as isoformas com 65 e 90 kDa, 69,2% deles se tornaram hipertensos e somente 30,8% continuaram normotensos. O fato desses indivíduos não desenvolverem hipertensão, talvez seja explicado pelo fato dos mesmos manterem hábitos alimentares adequados e boa qualidade de vida a supor prática de esportes, baixa ingestão de sal e açúcar, dieta

balanceada, etc. (tais informações não foram investigadas no presente estudo). Vale ressaltar que esses indivíduos merecem atenção especial ao longo de suas vidas com relação à pressão arterial. Surgiram 3 (16,7%) casos de hipertensão no grupo que não expressava a isoforma com 90 kDa e eram normotensos na primeira fase. Uma possível explicação para este acontecimento, pode se dar pelo fato da HAS ser uma patologia multifatorial, com outros possíveis mecanismos envolvidos do aparecimento desta patologia como já referimos acima.

O histórico familiar de hipertensão teve relação positiva com a hipertensão na análise de regressão logística. O histórico familiar associado a fatores ambientais, como o consumo de sal e estresse psicossocial, pode ser preditor para o desenvolvimento dessa patologia (Harshfield *et al.*, 2009). A exposição a fatores ambientais pode resultar na ativação dos sistemas nervoso simpático e renina angiotensina, provocando desordens estruturais e funcionais dos vasos aumentando a resistência vascular sistêmica (Lopes *et al.*, 2001).

No presente estudo, diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da hipertensão foram estudados, dentre eles, as isoformas da ECA, em especial a isoforma com 90 kDa, no qual sugere-se ser um marcador biológico de hipertensão, pois se correlacionou na maioria dos casos com o quadro de hipertensão arterial. A isoforma N-domínio de 90 kDa tem como substrato específico a Ang 1-7, um peptídeo vasodilatador do SRA, inativando-o, contribuindo para a manutenção do quadro hipertensivo. Pode-se inferir que a presença da isoforma N-domínio com 90 kDa seja mais um fator a ser estudado com mais cautela, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção e tratamento desta doença diretamente relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Indivíduos que possuam a isoforma da ECA com 90 kDa precisam ser acompanhados estimulando-os a terem qualidade de vida.

Conclusão

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a incidência é maior da isoforma com 90 kDa, estando ela associada à presença de hipertensão arterial na população estudada. A proporção de hipertensos foi maior, com o surgimento de novos casos de hipertensão, após cinco anos, correspondendo a uma taxa de incidência de 5,4 casos novos/100 indivíduos-ano, sendo que esta incidência foi maior no grupo 2. Os grupos apresentando as isoformas com 90 kDa mostraram perfis de pressão sistólica e diastólica mais elevados na fase 2. A porcentagem de indivíduos normotensos que apresentaram as isoformas com 65 e 190 kDa foi maior em relação à de hipertensos. Dos indivíduos (3) que apresentavam somente as duas isoformas N-dominio com 190 e 65 kDa e que se tornaram hipertensos, pode-se sugerir que causas diversas acarretaram o aparecimento da hipertensão, lembrando que esta é uma doença multifatorial. Indivíduos normotensos, pertencentes ao grupo 1, merecem atenção especial no âmbito da prevenção, uma vez que as análises mostraram que a presença da já mencionada isoforma com 90 kDa está positivamente associada à hipertensão arterial. Ainda foi possível verificar que o histórico familiar de hipertensão está fortemente relacionado ao desenvolvimento de hipertensão, assim como fatores ambientais e metabólicos, e que a perda da expressão da isoforma com 190 kDa gerando a isoforma N-domínio aumenta as chances no desenvolvimento da doença, enfatizando a importância dessa isoforma como um marcador biológico de hipertensão.

*Referências
Bibliográficas*

7. Referências Bibliográficas

AHMAD, S. et al. Uptake and metabolism of the novel peptide angiotensin-(1-12) by neonatal cardiac myocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15759, 2011. ISSN 1932-6203.

ANDRADE, M. et al. Angiotensin I-converting enzymes from mesangial cells (MC) in culture from Wistar and spontaneous hypertensive rats (SHR). *Hypertension*, 2001, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS 530 WALNUT ST, PHILADELPHIA, PA 19106-3621 USA. p.987-987.

ARAGÃO, D. S. et al. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) from murine model of mesangial cell in culture. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 79-84, 2011. ISSN 0141-8130.

ARAGÃO, D. S. et al. Serine proteases as candidates for proteolytic processing of angiotensin-I converting enzyme. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 673-679, 2015. ISSN 0141-8130.

ARITA, D. Y. **Associação das isoformas N-domínio da enzima conversora de angiotensina I, com disfunções do sistema renal, no modelo de insuficiência renal crônica (IRC), em ratos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR)**. 2006. (Doutorado). Departamento de Medicina - Disciplina de Nefrologia, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

ARONOW, W. S. et al. ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents developed in collaboration with the American Academy of Neurology, American Geriatrics Society, American Society for Preventive Cardiology, American Society of Hypertension, American Society of Nephrology, Association of Black Cardiologists, and European Society of Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 20, p. 2037-2114, 2011. ISSN 0735-1097.

BELDENT, V. et al. Cell Surface Localization of Proteolysis of Human Endothelial Angiotensin I-converting Enzyme EFFECT OF THE AMINO-TERMINAL DOMAIN IN THE SOLUBILIZATION PROCESS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28962-28969, 1995. ISSN 0021-9258.

BERNIER, S. G.; FOURNIER, A.; GUILLEMETTE, G. A specific binding site recognizing a fragment of angiotensin II in bovine adrenal cortex membranes. **European journal of pharmacology**, v. 271, n. 1, p. 55-63, 1994. ISSN 0014-2999.

BERNSTEIN, K. E. et al. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 2011. ISSN 1471-4892.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 3, p. 261-271, 2003. ISSN 0163-769X.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 329-335, 2000. ISSN 0009-7322.

CASARINE, D. et al. EFFECT OF DIURETIC UPON URINARY LEVELS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) OF ESSENTIAL MILD HYPERTENSIVE PATIENTS (EHP). Hypertension, 1991, AMER HEART ASSOC 7272 GREENVILLE AVENUE, DALLAS, TX 75231-4596. p.463-463.

CASARINI, D. et al. Endopeptidase and carboxypeptidase activities in human urine which hydrolyze bradykinin. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 25, n. 3, p. 219-229, 1992. ISSN 0100-879X.

CASARINI, D. et al. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 1, p. 75-85, 2001. ISSN 1357-2725.

CASARINI, D. E. et al. Calcium Channel Blockers as Inhibitors of Angiotensin I-Converting Enzyme. **Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 1145-1148, 1995. ISSN 0194-911X.

CHAPPELL, M. C.; DIZ, D. I.; GALLAGHER, P. E. The renin-angiotensin system and the exocrine pancreas. **Jop**, v. 2, n. 1, p. 33-39, 2001.

COLLABORATION, N. R. F. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19· 1 million participants. **The lancet**, v. 389, n. 10064, p. 37-55, 2017. ISSN 0140-6736.

COLLABORATION, P. S. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **The lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1903-1913, 2002. ISSN 0140-6736.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 250, n. 1, p. 261-265, 1971. ISSN 0005-2744.

DA SILVA, S. S. B. E.; DA SILVA BARBOSA, S. D. F.; PIERIN, A. M. G. O controle da hipertensão arterial em mulheres e homens: uma análise comparativa. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 1, p. 50-58, 2016. ISSN 1980-220X.

DANSER, A. J. Local renin–angiotensin systems: the unanswered questions. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 6, p. 759-768, 2003. ISSN 1357-2725.

DE ANDRADE, M. C. et al. Spectroscopic and structural analysis of somatic and N-domain angiotensin I-converting enzyme isoforms from mesangial cells from Wistar and spontaneously hypertensive rats. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 238-243, 2010. ISSN 0141-8130.

DE ANDRADE, M. C. C. et al. Expression and localization of N-domain ANG I-converting enzymes in mesangial cells in culture from spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 2, p. F364-F375, 2006. ISSN 1931-857X.

DE GASPARO, M. et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 415-472, 2000. ISSN 0031-6997.

DE SOUZA, A. et al. Um estudo sobre hipertensão arterial sistêmica na cidade de Campo Grande, MS. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 4, p. 441-6, 2007.

DEDDISH, P. A. et al. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7807-7811, 1994. ISSN 0027-8424.

DEFENDING, R. et al. Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. **Neuroendocrinology**, v. 37, n. 1, p. 32-40, 1983. ISSN 0028-3835.

DZAU, V.; PRATT, R. Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. **The heart and cardiovascular system**, v. 2, p. 1631-1662, 1986.

EHLERS, M.; CHEN, Y.; RIORDAN, J. F. Spontaneous solubilization of membrane-bound human testis angiotensin-converting enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 3, p. 1009-1013, 1991. ISSN 0027-8424.

EHLERS, M. et al. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 20, p. 7741-7745, 1989. ISSN 0027-8424.

EHLERS, M. R.; CHEN, Y.-N. P.; RIORDAN, J. F. The unique N-terminal sequence of testis angiotensin-converting enzyme is heavily O-glycosylated and unessential for activity or stability. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 183, n. 1, p. 199-205, 1992. ISSN 0006-291X.

FERNANDES, F. B. et al. Association of urinary N-domain angiotensin I-converting enzyme with plasma inflammatory markers and endothelial function. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7-8, p. 429, 2008.

FERRARIO, C. M. et al. Advances in the renin angiotensin system: focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). **Advances in pharmacology**, v. 59, p. 197-233, 2010. ISSN 1054-3589.

FLEMING, I.; KOHLSTEDT, K.; BUSSE, R. New fACEs to the renin-angiotensin system. **Physiology**, v. 20, n. 2, p. 91-95, 2005. ISSN 1548-9213.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972. ISSN 0009-9147.

HARSHFIELD, G. A. et al. Stress-induced sodium retention and hypertension: a review and hypothesis. **Current hypertension reports**, v. 11, n. 1, p. 29, 2009. ISSN 1522-6417.

HERTZ, R. P. et al. Racial disparities in hypertension prevalence, awareness, and management. **Archives of internal medicine**, v. 165, n. 18, p. 2098-2104, 2005. ISSN 0003-9926.

HOOPER, N. M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. **International journal of biochemistry**, v. 23, n. 7-8, p. 641-647, 1991. ISSN 0020-711X.

HOOPER, N. M.; KARRAN, E. H.; TURNER, A. J. Membrane protein secretases. **Biochemical Journal**, v. 321, n. 2, p. 265-279, 1997. ISSN 0264-6021.

HOOPER, N. M. et al. Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. **Biochemical Journal**, v. 247, n. 1, p. 85-93, 1987. ISSN 0264-6021.

HORIUCHI, M.; AKISHITA, M.; DZAU, V. J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. **Hypertension**, v. 33, n. 2, p. 613-621, 1999. ISSN 0194-911X.

HOWARD, T. et al. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 8, p. 4294-4302, 1990. ISSN 0270-7306.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9496-9503, 1993. ISSN 0021-9258.

KALLISTRATOS, M. S. et al. Diagnostic modalities of the most common forms of secondary hypertension. **Hellenic J Cardiol**, v. 51, n. 6, p. 518-29, 2010.

KANJILAL, S. et al. Socioeconomic status and trends in disparities in 4 major risk factors for cardiovascular disease among US adults, 1971-2002. **Archives of internal medicine**, v. 166, n. 21, p. 2348-2355, 2006. ISSN 0003-9926.

KEARNEY, P. M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005. ISSN 0140-6736.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; GAMLIEL-LAZAROVICH, A. ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovascular research**, v. 73, n. 3, p. 463-469, 2007. ISSN 1755-3245.

LAGUARDIA, J. Raça, genética & hipertensão: nova genética ou velha eugenia? **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 12, n. 2, 2005. ISSN 0104-5970.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409(6822), p. 860-921, 2001. ISSN 0028-0836.

LANZILLO, J. J. et al. Angiotensin-converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic, and immunological properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 28, p. 14938-14944, 1985. ISSN 0021-9258.

LIJNEN, P. J.; PETROV, V. V.; FAGARD, R. H. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system**, v. 2, n. 2, p. 117-122, 2001. ISSN 1470-3203.

LIMA, S.; HATAGIMA, A.; SILVA, N. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, n. 6, p. 427-33, 2007.

LOPES, H. F. et al. Hemodynamic and metabolic profile in offspring of malignant hypertensive parents. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 616-620, 2001. ISSN 0194-911X.

MALACHIAS, M. V. B. et al. Capítulo 3-Avaliação Clínica e Complementar. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 14-17, 2016. ISSN 0066-782X.

MALUF-MEIKEN, L. C. et al. N-domain isoform of Angiotensin I converting enzyme as a marker of hypertension: populational study. **International journal of hypertension**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0384.

MARQUES, G. D. et al. N-domain angiotensin I-converting enzyme with 80 kDa as a possible genetic marker of hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 693-701, 2003. ISSN 0194-911X.

MARTINEZ, L. M. N. Hipertensão, diabetes e dislipidemia - mecanismos envolvidos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 21 (2), n. 1519 - 7522, p. 92 - 07, 2014.

MASAKI, H. et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 3, p. 527, 1998.

MCALLISTER, A. et al. Basal nitric oxide production is impaired in offspring of patients with essential hypertension. **Clinical science**, v. 97, n. 2, p. 141-147, 1999. ISSN 0143-5221.

MENARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 11, n. 3, p. S3-11, 1993. ISSN 0952-1178.

MILECH, A. et al. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes (2015-2016). **São Paulo**, 2016.

MILL, J. et al. Epidemiologia da hipertensão arterial na cidade de Vitória, Espírito Santo. **Hipertensão**, v. 7, n. 3, p. 109-16, 2004.

NEATON, J. D.; WENTWORTH, D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease overall findings and differences by age for 316099 white men. **Archives of internal medicine**, v. 152, n. 1, p. 56-64, 1992. ISSN 0003-9926.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A.; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of hypertension. **Annals of internal medicine**, v. 139, n. 9, p. 761-776, 2003. ISSN 0003-4819.

OPPONG, S. Y.; HOOPER, N. M. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. **Biochemical Journal**, v. 292, n. 2, p. 597-603, 1993. ISSN 0264-6021.

PANZA, J. A. et al. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 21, n. 5, p. 1145-1151, 1993. ISSN 0735-1097.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological reviews**, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006. ISSN 0031-9333.

RICHARD, J. The MONICA project. A WHO research project in cardiovascular diseases. **Revue d'épidémiologie et de sante publique**, v. 36, n. 4-5, p. 325-334, 1988. ISSN 0398-7620.

RIMOLDI, S. F.; SCHERRER, U.; MESSERLI, F. H. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? **European heart journal**, v. 35, n. 19, p. 1245-1254, 2013. ISSN 1522-9645.

RIVA, L.; GALZIN, A.-M. Pharmacological characterization of a specific binding site for angiotensin IV in cultured porcine aortic endothelial cells. **European journal of pharmacology**, v. 305, n. 1, p. 193-199, 1996. ISSN 0014-2999.

ROGERS, J. et al. Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain. **Cell**, v. 20, n. 2, p. 303-312, 1980. ISSN 0092-8674.

RONCHI, F. A. et al. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 10, p. 1869-1878, 2005. ISSN 0263-6352.

RONCHI, F. A.; IRIGOYEN, M.-C.; CASARINI, D. E. Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system**, v. 8, n. 1, p. 34-41, 2007. ISSN 1470-3203.

ROUSSEAU, A. et al. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3656-3661, 1995. ISSN 0021-9258.

SANTOS, R. A. et al. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. **Hypertension**, v. 19, n. 2 Suppl, p. II56, 1992. ISSN 0194-911X.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. L. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory peptides**, v. 91, n. 1, p. 45-62, 2000. ISSN 0167-0115.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 16, n. 2, p. 122-128, 2007. ISSN 1062-4821.

SCALA, L. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil: prevalência. **Revista Hipertensão**, v. 17, n. 3, p. 138-155, 2014. ISSN 1809-4260.

SCALA LC, B. F. J., CASSANELLI T, BORGES LM, WEISSHEIMER FL. Hipertensão Arterial e atividade física em uma capital brasileira. **Arq Bras Cardiol**, v. 105, 2015.

SHELLING, P.; FISCHER, H.; GANTEN, D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? **Journal of hypertension**, v. 9, n. 1, p. 3-16, 1991. ISSN 0263-6352.

SELASSIE, A. et al. Progression is accelerated from prehypertension to hypertension in blacks. **Hypertension**, v. 58, n. 4, p. 579-587, 2011. ISSN 0194-911X.

SHALTOUT, H. A. et al. Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine, and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. F82-F91, 2007. ISSN 1931-857X.

SKEGGS, L. et al. The biochemistry of the renin-angiotensin system. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 130, p. 1-27, 1980. ISSN 0065-2598.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 3, p. 295-299, 1956. ISSN 0022-1007.

SOCIEDADE, B. D. H.; CARDIOLOGIA, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D. VI Brazilian guidelines on hypertension. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 95, n. 1 Suppl, p. 1, 2010. ISSN 1678-4170.

SOUBRIER, F. et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9386-9390, 1988. ISSN 0027-8424.

SPOSITO, A. Emerging insights into hypertension and dyslipidaemia synergies. **European Heart Journal Supplements**, v. 6, n. suppl_G, p. G8-G12, 2004. ISSN 1554-2815.

SUGIMURA, K. et al. Alternative splicing of the mRNA coding for the human endothelial angiotensin-converting enzyme: a new mechanism for solubilization. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 247, n. 2, p. 466-472, 1998. ISSN 0006-291X.

TAMURA, K. et al. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. **Hypertension Research**, v. 18, n. 1, p. 7-18, 1995. ISSN 0916-9636.

TEIXEIRA, A. et al. Association of urinary 90 kDa angiotensin-converting enzyme with family history of hypertension and endothelial function in normotensive individuals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 5, p. 351-356, 2008. ISSN 0100-879X.

TOUYZ, R. M.; TABET, F.; SCHIFFRIN, E. L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 11, p. 860-866, 2003. ISSN 1440-1681.

UNGER, A. et al. Hypertension in a Brazilian urban slum population. **Journal of Urban Health**, v. 92, n. 3, p. 446-459, 2015. ISSN 1099-3460.

VAUGHAN, D. E. Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis. **The American journal of cardiology**, v. 87, n. 8, p. 18-24, 2001. ISSN 0002-9149.

WANG, P. H. M. et al. N-domain angiotensin-I converting enzyme is expressed in immortalized mesangial, proximal tubule and collecting duct cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 380-390, 2015. ISSN 0141-8130.

WATANABE, I. K. M.; CASARINI, D. E. Sistema renina angiotensina, novas evidências na fisiopatologia da hipertensão: importância para a prática clínica. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 14-18, 2015. ISSN 0103-8559.

WEBER, M. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community. **The journal of clinical hypertension**, v. 16, n. 1, p. 14-26, 2014. ISSN 1751-7176.

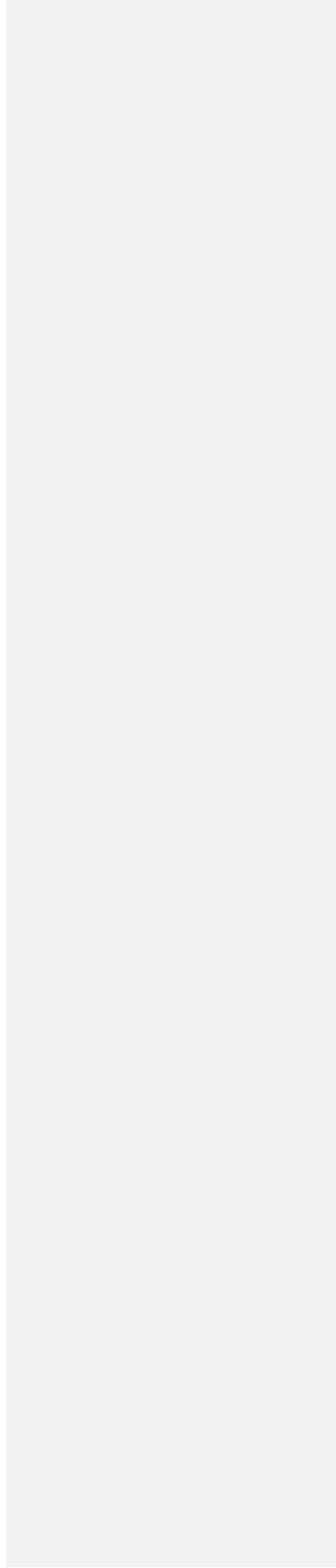
WEI, L. et al. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002-9008, 1991. ISSN 0021-9258.

WOODMAN, Z. L. et al. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. **Biochemical Journal**, v. 347, n. 3, p. 711-718, 2000. ISSN 0264-6021.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013. ISSN 0066-782X.

YANG, H.; ERDÖS, E.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 214, n. 2, p. 374-376, 1970. ISSN 0005-2795.

ZANCHETTI, A. Consenso Latinoamericano sobre hipertensión arterial. **J. Hypertens**, v. 6, n. 2, p. 1-27, 2001.



Anexos

8. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 23 de abril de 2004
CEP 0220/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANDREIA CRISTINA DA SILVA FEBBA
Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Estudo prospectivo para verificar os índices de prevalência do marcador genético de hipertensão".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em 23/abril/2005.
5. Apresentar segundo relatório parcial em 23/abril/2006.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória-ES, 14 de maio de 2003

Do: Prof. Dr. Paulo Roberto Merçon de Vargas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico

Para: Prof. José Geraldo Mill
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:
"Monitoramento das Tendências de Mortalidade e Morbidade
Cardiovascular no Município de Vitória – Projeto MÔNICA – Vitória/OMS
– Fase II".

Prezado Prof. J.G. Mill,

Através deste informe à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: "Monitoramento das Tendências de Mortalidade e Morbidade Cardiovascular no Município de Vitória – Projeto MÔNICA – Vitória/OMS – Fase II", cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, em reunião ordinária realizada em 14 de maio de 2003.


Prof. Dr. PAULO ROBERTO MERÇON DE VARGAS
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do
Centro Biomédico