
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - INTEGRAL

EMELINE PERES

**INTERAÇÃO ENTRE A ANGIOTENSINA II,
ANGIOTENSINA-(1-7) E ECA2 EM
MULHERES.**



Rio Claro
2010

EMELINE PERES

**INTERAÇÃO ENTRE A ANGIOTENSINA II,
ANGIOTENSINA-(1-7) E ECA2 EM MULHERES.**

Orientador: **Prof^a. Dr^a ANGELINA ZANESCO**

Co-orientador: Carlos Henrique Grossi Sponton

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

574.2 Peres, Emeline
P437i Interação entre a Angiotensina II, Angiotensina-(1-7) e ECA2 em
mulheres / Emeline Peres. - Rio Claro : [s.n.], 2010
39 f. : il., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Angelina Zanesco
Co-Orientador: Carlos Henrique Grossi Sponton

1. Patologia. 2. Hipertensão arterial. 3. Climatério. 4. Perfil lipídico. 5.
Glicemia. 6. Creatinina. 7. Hipertensão arterial. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Este Trabalho de Conclusão de Curso eu dedico, de coração, a meus pais, que apesar de todas as dificuldades, priorizaram meus estudos, e assim possibilitaram mais uma das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me deu constância para concluir, depois de tantas barreiras, a graduação. Gratidão a minha família, principalmente meu pai Nelson e minha mãe Eliana, que sempre me apoiaram, priorizaram meus estudos e suportaram meus momentos de estresse quando não os pude controlar. Agradeço também a Renan, meu namorado, por seu apoio, por ser maior incentivador a “seguir em frente” nos momentos críticos de estresse e angústia, que com muita paciência, sempre estava ao meu lado, me agradava e me dava o ombro quando não conseguia conter as lágrimas. Amo todos vocês.

Agradeço a minha orientadora, Angelina ZanESCO, por ter me aceitado como integrante da equipe do laboratório e por me propiciar a realização do meu trabalho na área de que mais gosto. Agradeço também meu co-orientador, Carlos H. G. Sponton pela paciência e ajuda na elaboração deste trabalho durante todo o procedimento. Um salve aos meus colegas de laboratório pela colaboração, companhia e risadas: Fernanda, Pamella, Rodrigo, Rômulo, Iane, Guilherme, Giselda e Valéria.

Agradeço aos amigos da turma de Ciências Biológicas – Integral 2007, pelo companheirismo, amizade e diversão, além da divisão de tarefas da graduação.

Agradeço também ao apoio financeiro da FAPESP, que me propiciou incentivo e maior dedicação à pesquisa, além de favorecer investimento no meu próprio conhecimento.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Henry Huxley

ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I- Angiotensina I

Ang II- Angiotensina II

Ang-(1-7)- Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9)- Angiotensina-(1-9)

CA- Circunferência Abdominal

CT- Colesterol Total

DAC- Doença Arterial Coronariana

DAG- Diacilglicerol

DCVs- Doenças Cardiovasculares

ECA 1- Enzima Conversora de Angiotensina1

ECA 2- Enzima Conversora de Angiotensina2.

HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica

IMC- Índice de Massa Corpórea

IP3- Trifosfato de Inositol

Leu- Aminoácido Leucina

NO- Óxido Nítrico

PAD- Pressão Arterial Diastólica

PAS- Pressão Arterial Sistólica

SRAA- SistemaRenina-Angiotensina-Aldosterona

TG - Triglicerídeos

RESUMO

Palavras - chave: Angiotensina II, Angiotensina-(1-7), Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), Mulheres no climatério.

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica degenerativa de etiologia multifatorial e poligênica, caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados, sendo considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Estudos demonstram que cerca de um bilhão de indivíduos apresentam HAS em todo mundo, sendo esta patologia responsável por 7,1 milhões de morte a cada ano. Diversos fatores estão associados ao aumento da incidência da hipertensão arterial, como obesidade, dislipidemias, dieta rica em sal, alterações nos níveis hormonais e sedentarismo. Após o período da menopausa, observa-se significativa elevação nos valores de pressão arterial dessa população, sendo estes similares ou até maiores aos dos homens para esse mesmo período. O sistema renina-angiotensina (SRAA) desempenha importante papel no controle dos sistemas cardiovascular e renal e a angiotensina II é um potente vasoconstritor desse sistema, formado a partir da ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Por outro lado, a recente descoberta da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), um homólogo da ECA, mudou todo o conceito do SRAA. A ECA 2 é responsável pela formação do peptídeo angiotensina-(1-7) a partir da clivagem do último aminoácido (fenilalanina) da angiotensina II. Recentes evidências têm demonstrado efeitos benéficos da angiotensina-(1-7) para as doenças cardiovasculares através da vasodilatação, efeito anti-arritmogênico, melhora na função contrátil pós-isquemia e inibição da proliferação celular do músculo liso vascular, sendo esses efeitos antagônicos àqueles observados pela angiotensina II. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi analisar a atividade da ECA2, concentrações plasmáticas da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7), o perfil lipídico e a glicemia em mulheres hipertensas e normotensas que se encontram na fase do climatério. Após aprovação do comitê de ética, as voluntárias normotensas e hipertensas foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão para participação desse estudo. Dezenove voluntárias normotensas e catorze voluntárias hipertensas (idade 52.7 ± 2 e 58.8 ± 2) anos respectivamente participaram deste estudo. Os parâmetros antropométricos (peso corporal, índice de massa corporal - IMC e circunferência abdominal - CA) cardiovasculares (pressão arterial sistólica - PAS, pressão arterial diastólica - PAD e frequência cardíaca de repouso - FCR) e bioquímicos (atividade da ECA2, perfil lipídico e glicemia) também foram analisados. Quanto aos parâmetros antropométricos, não foram observadas diferenças significativas tanto para o IMC (NT: 26.5 ± 0.6 ; HT: 27.0 ± 0.8) quanto para a CA (NT: 91.2 ± 1.4 ; HT: 93.8 ± 1.7). Em relação aos parâmetros cardiovasculares, foi observada diferença significativa para a PAS (NT: 113.3 ± 2.3 ; HT: 130.6 ± 2.9), porém, não foram observadas diferenças significativas tanto para a PAD (NT: 75.0 ± 1.5 ; HT: 75.3 ± 5.5) quanto para a FCR (NT: 80.8 ± 2.5 ; HT: 78.0 ± 4.3). Por fim, quanto aos parâmetros bioquímicos, não foram verificadas diferenças significativas para o CT (NT: 192.0 ± 10 ; HT: 197.1 ± 10) HDL-c (NT: 34.2 ± 1.4 ; HT: 31.2 ± 2.1), LDL-c (NT: 133.7 ± 9.7 ; HT: 145 ± 10.1), Glicemia (NT: 80.4 ± 3.2 ; HT:), creatinina (NT: 0.86 ± 0.02 ; HT: 0.97 ± 0.05) e para a atividade da ECA2 (NT: 23070 ± 932 ; HT: 2480 ± 123). Por outro lado, foi observada diferença significativa apenas para o TG (NT: 136.3 ± 13 ; HT: 198.8 ± 21.9). Em conclusão, nossos resultados demonstram que a atividade plasmática da ECA2 não diferiu entre as voluntárias normotensas e hipertensas, no entanto, as voluntárias hipertensas apresentam maiores níveis plasmáticos de triglicerídeos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
1.1Hipertensão Arterial.....	08
1.2 Climatério.....	09
1.3 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....	11
1.4 Enzima Conversora de Angiotensina 2, Angiotensina 1-7 e Receptor MAS.....	12
2. OBJETIVO	16
3. METODOLOGIA	17
3.1Participantes	17
3.2 Critérios de Inclusão.....	17
3.3 Grupos Experimentais	17
3.4 Antropometria	18
3.5 Medida da Pressão Arterial	18
3.6 Coleta Sanguínea	18
3.7 Análise Bioquímica.....	19
3.8 Análise Estatística	20
4.RESULTADOS	21
4.1 Antropometria	21
4.2 Pressão Arterial Sistêmica e Frequência Cardíaca de Repouso	22
4.3 Análise Bioquímica	24
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
8. ANEXO	39
8.1. Aprovação do Comitê de Ética	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica degenerativa de etiologia multifatorial e poligênica, caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados normalmente associados a alterações metabólicas, hormonais e fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular), sendo considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCVs). A HAS apresenta custos médios e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente de lesões em órgãos alvos tais como: coração, cérebro, vasos sanguíneos, rins e retina (NEGRÃO & BARRETO, 2006).

Segundo a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010) a classificação da pressão arterial para indivíduos maiores de 18 anos é dada conforme a tabela que segue abaixo (Tabela. 1).

Tabela 1. Classificação da Pressão Arterial (SBH, 2010).

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.

Estima-se que cerca de um bilhão de indivíduos apresentem HAS em todo mundo, sendo esta patologia responsável por aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano (CHOBANIAN et al., 2003). Desses hipertensos, cerca de 50% estão entre a faixa etária de 60 e 69 anos e $\frac{3}{4}$ destes, acima de 70 anos (DÓREA & LOTUFO, 2004) (Figura 1). Segundo dados do American Heart Association (2010) a HAS atinge cerca de 74 milhões de pessoas nos EUA, sendo que uma em cada três pessoas adultas apresenta esta patologia. A maior prevalência da HAS representa um fator de risco independente, linear e contínuo para as DCVs (LEWINGTON, 2002).

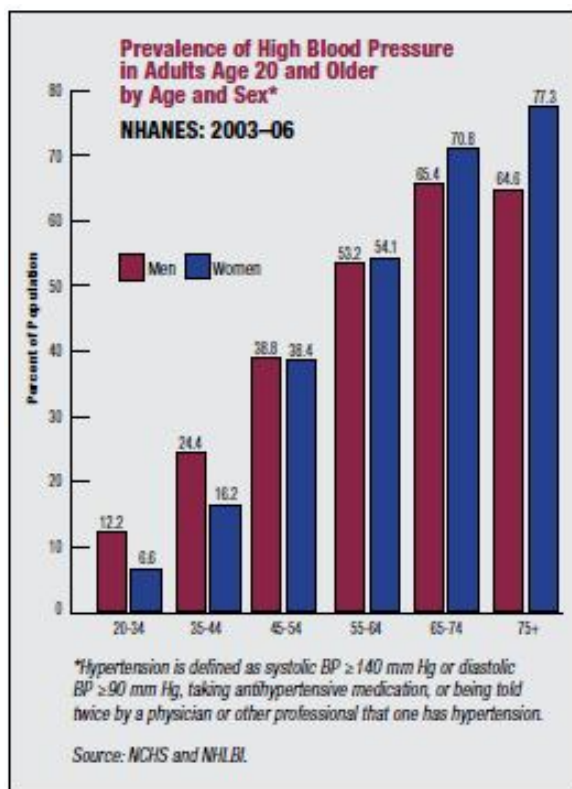


Figura 1. Prevalência da Hipertensão Arterial Sistêmica segundo o American Heart Association, 2010.

No Brasil, estudos realizados em algumas cidades mostram prevalência de HAS em torno de 22,3% a 43,9% da população, sendo esta considerada um dos principais fatores de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, representando alto custo social, uma vez que é responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e absenteísmo no trabalho (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da HAS sendo os principais: obesidade, dislipidemias, dieta rica em sal, alterações nos níveis hormonais e sedentarismo, especialmente entre as mulheres após a menopausa (SIMKIN-SILVERMAN et al., 1995, 2003; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2004; BLOCH et al., 2006).

1.2 Climatério

O climatério compreende o período entre o fim da fase reprodutiva até o início da senescência da mulher. Este período encontra-se entre os 40 aos 65 anos de

idade. Dentro desse período, a fase de maior importância é a menopausa, considerada essa uma etapa normal do processo de envelhecimento da mulher. É definida como sendo a falência total da função ovariana em produzir hormônios esteróides e ovulação, acarretando em amenorréia permanente (GALLO et al., 2001; FREITAS et al., 2002).

Previamente à menopausa, os valores de pressão arterial são, em geral, menores em mulheres quando comparados aos homens da mesma idade. Entretanto, após a menopausa, observa-se significativa elevação nos valores de pressão arterial (WASSTHEIL-SMOLLER et al., 2000; REXRODE et al., 2003; RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004; SARTORI-VALINOTTI et al., 2007; PHILLIPS, JING & HEYMSFIELD, 2008). Entretanto, os reais mecanismos celulares e/ou moleculares pelos quais ocorre maior incidência de hipertensão arterial em mulheres após a menopausa ainda não são claros. Uma variedade de fatores parece contribuir para a elevação de pressão arterial na menopausa, entre eles destacam-se a deficiência de estrogênio, o aumento do estresse oxidativo, a disfunção endotelial, a elevação da atividade do sistema renina-angiotensina, a elevação nos níveis plasmáticos de testosterona, as alterações no perfil lipídico e o aumento no ganho de peso (FURTADO & MARTIN, 1995; REIS et al., 2000; FORJAZ et al., 2007).

Existem fortes evidências que relacionam as reduções nas concentrações séricas de estrogênio com a elevação na pressão arterial (WASSTHEIL-SMOLLER et al., 2000; GALLO et al., 2001; FREITAS et al., 2002; FORJAZ et al., 2007; COYLEWRIGHT et al., 2008). Sabe-se que o estradiol (um dos tipos de estrogênio) pode promover proteção cardiovascular através do controle do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), incluindo redução da expressão dos receptores AT1 em vasos e rins e reduzir a atividade da ECA (HARRISON-BERNARD et al., 2003). O efeito do estrogênio sobre o tônus vascular foi estudado, em modelos animais em diferentes artérias, como a coronária, a aorta, a mesentérica e as artérias cerebrais. Foi verificado que o endotélio vascular possui receptores para o estrogênio, e que este pode aumentar a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o NO, bem como aumentar sua biodisponibilidade para as células musculares lisas (TOSTES et al., 2003). No entanto a gênese da HAS em mulheres após a menopausa é mais complexa do que àquela observada em modelo experimental de menopausa em animais de

laboratório. Além disso, a reposição hormonal em mulheres após a menopausa mostrou-se de baixa eficácia na redução dos valores de pressão arterial, como também na prevenção de eventos cardiovasculares, confirmando que os mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial em mulheres após a menopausa são diferentes daqueles encontrados em modelos experimentais (ESHRE Capri Workshop Group, 2006). Assim, mudanças no estilo de vida, como educação alimentar e a prática de atividade física regular, associadas à terapêutica efetiva no controle da hipertensão arterial, da hiperglicemia e da dislipidemia, parecem trazer melhores resultados na qualidade de vida de mulheres após a menopausa.

1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O SRAA é um dos mais importantes sistemas de controle da pressão arterial. A renina é uma enzima glicoproteolítica liberada pelos rins quando a pressão arterial cai a níveis muito baixos. Sua resposta consiste em elevar a pressão arterial de diversas maneiras (GUYTON & HALL, 2006). Essa enzima é sintetizada e armazenada de forma inativa, denominada pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins, situadas nas paredes das arteríolas aferentes próximas aos glomérulos. Quando se observa reduções da pressão arterial, reações fazem com que essas moléculas da pró-renina sejam clivadas e liberam a renina na corrente sanguínea. Esta, por sua vez, catalisa o angiotensinogênio (proteína da família das serpinas produzido no fígado), liberando um peptídeo formado por 10 aminoácidos chamado Angiotensina I (Ang I), também conhecida como Angiotensina-(1-10), produzida na circulação (GUYTON & HALL, 2006).

A Ang I, por sua vez é convertida em angiotensina II (Ang II). Esta conversão ocorre quase que totalmente nos pequenos vasos dos pulmões, catalisada pela enzima conversora de angiotensina 1 (ECA 1) presente no endotélio dos vasos pulmonares. Os efeitos da Ang II são mediados por dois tipos distintos de receptores: AT1 e AT2, sendo que a maior interação desse peptídeo dá-se pela via AT1, o qual estimula a ação vasoconstritora, efeito arritmogênico, proliferação celular, trombose, coagulação, inflamação e hipertrofia do músculo liso vascular. (ALLEN et al., 2000; SIRAGY et al, 2007; SANTOS & FERREIRA, 2007). Esta interação com o receptor AT₁, principalmente na musculatura lisa, ativa a proteína G com conseqüente ativação de fosfolipase C- β e formação de 1,4,5-trifosfato e

diacilglicerol. O aumento da concentração intracelular de cálcio e ativação da proteína C quinase leva a vasoconstrição acarretando assim a elevação da pressão arterial. Além destes efeitos, a Ang II promove hipertrofia ventricular esquerda, vasoconstrição renal, contração de células mesangiais, aumento da atividade do trocador Na^+/H^+ proximal e distal, inibição da secreção de renina e liberação de aldosterona (GUYTON & HALL, 2006).

Por outro lado, a interação com o receptor AT₂, até o presente momento menos estudado, apresenta efeito antagônico à ação do eixo Ang II – receptor AT₁, resultando na formação de Óxido Nítrico (NO) e conseqüente vasodilatação (RUSH & AULTMAN, 2008) além da inibição e proliferação do crescimento celular e mediar os efeitos neurotróficos no sistema nervoso central (GUYTON & HALL, 2006).

1.4 Enzima Conversora de Angiotensina 2, Angiotensina 1-7 e Receptor MAS

Recentemente, a descoberta da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), um homólogo da ECA1, mudou todo o conceito do SRAA no controle cardiovascular (RAIZADA & FERREIRA, 2007). A ECA2 foi originalmente caracterizada como um homólogo à ECA1, compartilhando aproximadamente 42% da sequência de nucleotídeos com conservação dos resíduos dos sítios ativos. Ambas as enzimas possuem dois domínios funcionais, contudo, a ECA contém dois sítios catalíticos enquanto a ECA2 possui apenas um (GALLAGHER et al., 2006; WYSOCKI et al., 2009). A ECA2 é altamente expressa no coração, no fígado e nos testículos, apresentando essa função regulatória tanto para o sistema cardiovascular quanto para o ciclo reprodutivo. (FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008).

A ECA2 é responsável pela formação do heptapeptídeo Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) a partir da clivagem do último aminoácido fenilalanina da extremidade carboxílica da Ang II, proporcionando assim, redução dos efeitos vasoconstritores da Ang II por utilizá-lo como substrato (SCHINDLER et al., 2007; CASTRO et al., 2005). O esquema abaixo (Figura 1) mostra a formação da Ang-(1-7) a partir do angiotensinogênio.

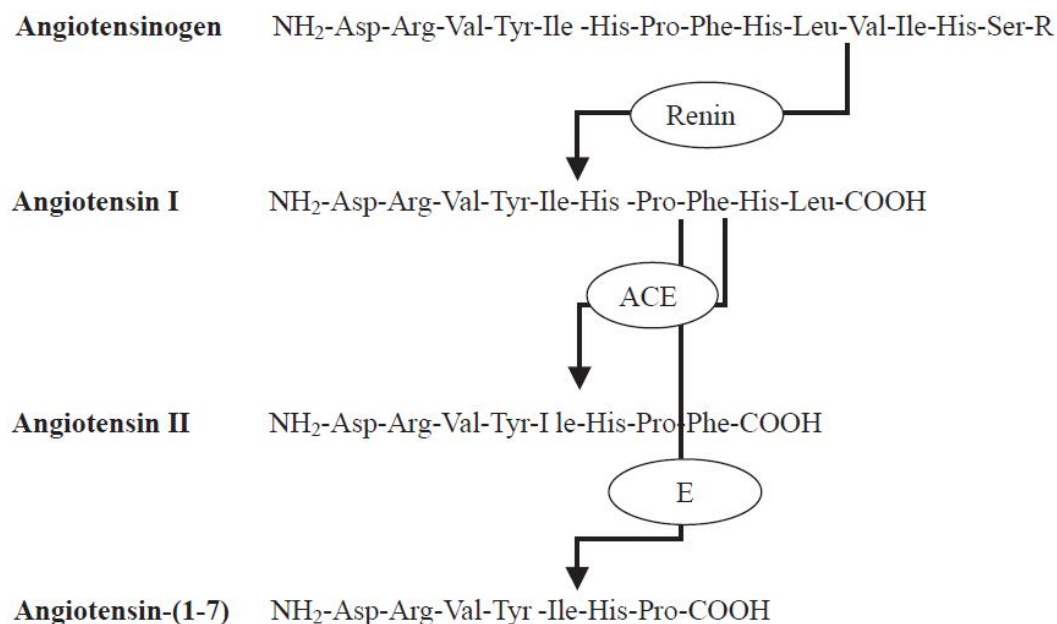


Figura 1. Conversão do angiotensinogênio em Ang-(1-7). Adaptado de Schindler et al., 2007.

Além disso, a Ang-(1-7) pode ser formada indiretamente a partir da ECA2, através da remoção de um aminoácido do substrato protéico na extremidade carboxílica da Ang I, resultando na formação da Angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)), um peptídeo biologicamente inativo, que é posteriormente convertido em Ang-(1-7) pela ação da ECA e endopeptidases, considerada esta uma via menos eficiente de formação de Ang-(1-7) (Figura 2) (RICE, *et al.*, 2004; SCHINDLER *et al.*, 2007; FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2004).

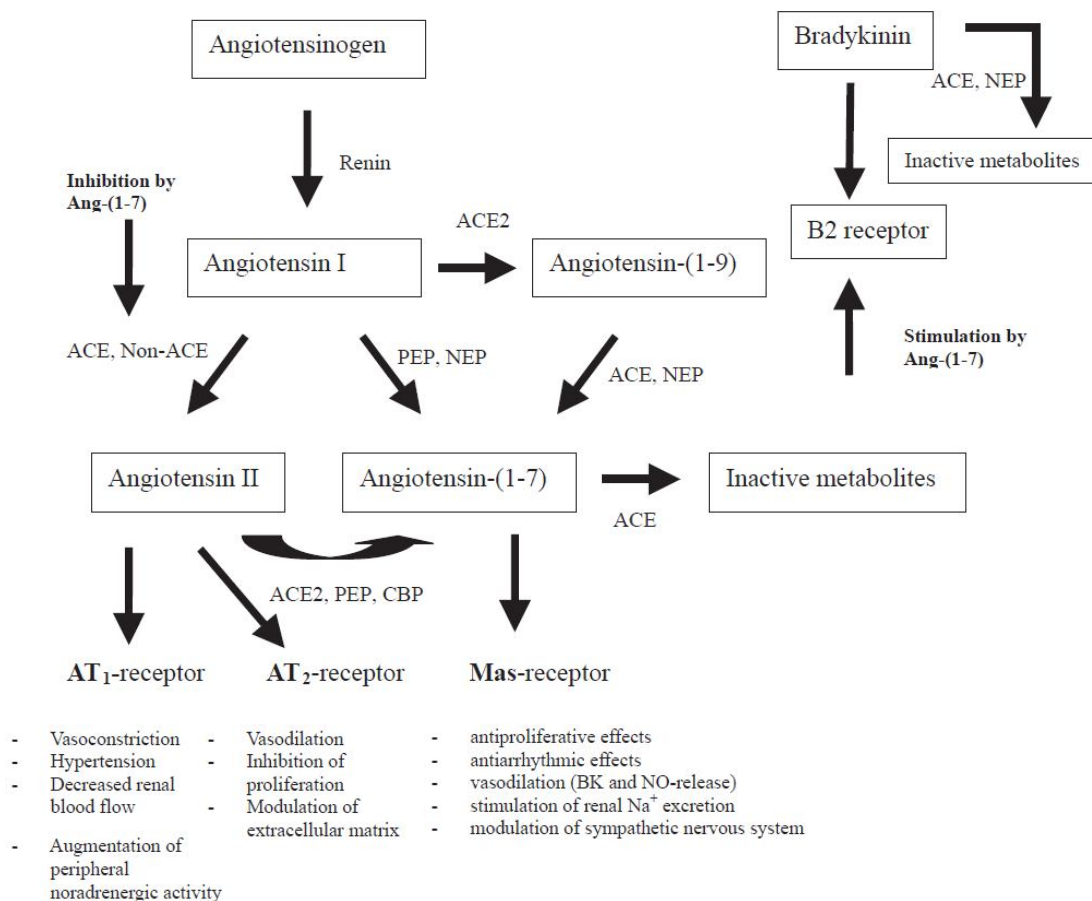


Figura 2: Formação da Ang-(1-7) pela via direta e indireta pela ECA. Adaptado de Schindler et al., 2007.

Evidências mostram que a formação de Ang-(1-7) promove efeitos benéficos para as doenças cardiovasculares, tais como vasodilatação, efeito antiarritmogênico, melhora na função contrátil pós-isquemia (FERREIRA et al., 2001), e inibição da proliferação celular do músculo liso (FREEMAN., et al., 1996; TALLANT& CLARK, 2003), potencializa o efeito vasodilatador da bradicinina, reduz o crescimento dos cardiomiócitos, inibe os efeitos da síntese de colágeno, previne a fibrose cardíaca e demonstra redução dos níveis de Ang II no coração (GOMES FILHO et al. 2008). Seus efeitos apresentam-se antagônicos àqueles observados pela Ang II tanto em culturas de células (CRACKOWER et al., 2002; RICE et al., 2004; KUBA et al., 2005) como em tecidos vasculares (HARMER et al., 2002; Llet al., 2003; RICE., 2004).

Particularmente, as células endoteliais são consideradas importante sítio de formação e metabolismo da Ang-(1-7), onde muitos estudos mostraram que suas ações vasculares envolvem aumento na produção de vasodilatadores como o NO

(FERREIRA & SANTOS, 2005). Diversos estudos mostram que os efeitos biológicos da Ang-(1-7) são mediados pela estimulação específica do receptor MAS caracterizando assim uma nova via de regulação do sistema cardiovascular a partir do SRA, denominado eixo ECA2-Ang (1-7)-Mas (SANTOS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004; TALLANT, FERRARIO, GALLAGHER, 2005). Tem sido sugerido que o eixo ECA2 – Ang-(1-7) – receptor MAS desempenha papel contra regulatório para o SRAA, induzindo a liberação de NO através da fosforilação/desfosforilação dos sítios estimulatórios e inibitórios da serina e do sítio estimulatório da treonina (SANTOS et al., 2008), sendo esses efeitos opostos aos clássicos efeitos do eixo ECA – Ang II – receptor AT1 (FERREIRA & SANTOS, 2005).

O receptor MAS, também conhecido como MAS proto-oncogene, é responsável pela codificação de uma proteína com 7 domínios transmembrânicos ligados a proteína G (GPCRs) (JACKSON et al., 1988). Sua expressão dá-se predominantemente no testículo e em distintas áreas do cérebro, como o hipocampo e a amígdala, sendo menos evidente nos rins e no coração (BUNNEMANN, et al., 1990; ALENINA, BADER, WALTHER, 2002).

Observou-se tanto em cultura de células (CHEN, et al., 2002) como na região das amídalas de ratos (CHEN, et al. 1996) que a interação entre o receptor AT1 e o receptor MAS promovia resposta alterada da Ang II. Castro et al. (2005) demonstraram que o bloqueio dos receptores AT1 proporciona vasodilatação mediada pelo receptor MAS em concentrações muito menores de Ang-(1-7), (0.22 pmol/L), confirmando assim os efeitos antagônicos entre o receptor AT1 e o receptor MAS. Um dos mecanismos proposto para essa interação receptor-receptor, especificamente para os receptores GPCRs, é o fenômeno da dimerização/oligomerização (ROCHEVILLE et al., 2000; GALVEZ et al., 2001). Em alguns casos, a oligomerização é considerada um pré-requisito para uma eficiente ligação e sinalização dos agonistas com seus receptores, já em outros casos, esse fenômeno não acarreta consequências biológicas (ROCHEVILLE et al., 2000; GALVEZ et al., 2001; MILLIGAN 2001). Entretanto, os reais mecanismos da interação entre o receptor MAS e receptor AT1 ainda não foram totalmente elucidados.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi analisar a atividade plasmática da ECA2, concentrações plasmáticas da Angiotensina II e da Angiotensina-(1-7), o perfil lipídico e a glicemia em mulheres hipertensas e normotensas que se encontram na fase do climatério.

3. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (protocolo: 6334/2009) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filhos- UNESP Rio Claro (Anexo 1).

3.1 Participantes

As participantes desse estudo foram convidadas através de panfletos e anúncios dentro da comunidade universitária e de áreas circunvizinhas à Universidade Estadual Paulista – UNESP (Bela Vista), e recrutadas seguindo-se os critérios de inclusão.

3.2 Critérios de Inclusão

Para serem incluídas no estudo as participantes deveriam apresentar idade acima de 40 anos, não ser fumante, não ser diabética (nível de glicose em jejum < 100 mg/dl), ter função renal normal (creatinina sérica < 135 mmol/L), apresentar IMC < 30 kg/m² e não realizarem terapia medicamentosa anti-hipertensiva utilizando medicamentos atuantes sobre o SRA (inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor AT1).

As participantes qualificadas foram convidadas a comparecerem novamente ao Laboratório de Atividade Física e Saúde Da Mulher (onde o estudo foi realizado) para um exame inicial e também para uma explicação completa do estudo pelo pesquisador responsável. De acordo com o Comitê de Ética, um termo de consentimento livre e esclarecido escrito foi assinado por todas as participantes após terem sido fornecidas as informações de todos os procedimentos do estudo, de seus riscos e benefícios e após todas as dúvidas dos participantes terem sido respondidas

3.3 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram constituídos por 33 voluntárias, sendo estes divididos conforme organograma abaixo (Figura 3):

Grupo Normotenso(NT) - n=19 voluntárias

Grupo Hipertenso(HT)- n=14 voluntárias

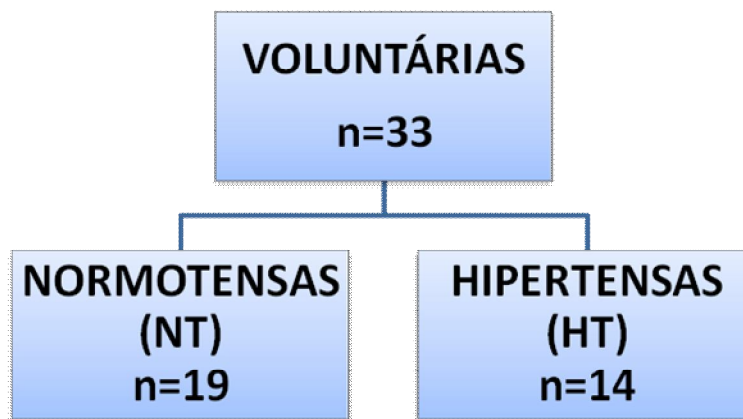


Figura 3: Organograma representando os grupos da pesquisa.

3.4 Antropometria

O peso corporal foi mensurado em uma balança da marca TOLEDO®, com a participante vestindo roupas leves e descalça. A altura foi mensurada através de estadiômetro da própria balança.

O índice de massa corporal (IMC) foi determinado pela razão peso corporal/ altura ao quadrado. A medida da circunferência abdominal foi feita com a voluntária de pé, ao final da expiração, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca ântero-superior, com fita métrica inelástica. O valor da circunferência abdominal (CA) foi adotado como indicador de excesso de tecido adiposo abdominal, sendo essas medidas tomadas em duplicata.

3.5 Medida da Pressão Arterial

A pressão arterial das voluntárias foi aferida em três dias distintos, calculando-se a média das três aferições conforme recomendação da sociedade brasileira de hipertensão (SBH, 2010). Nos dias determinados para aferição da pressão arterial, as voluntárias foram instruídas a não realizarem exercício físico. Pela manhã, as voluntárias compareceram ao laboratório e após 15 minutos de repouso a pressão arterial foi aferida com a voluntária na posição sentada utilizando um medidor de pressão arterial automático (Microlife, modelo BP3BT0-A®).

3.6 Coleta Sanguínea

As voluntárias foram instruídas a realizarem jejum de 12 horas e a não tomarem medicamentos que possam conter substâncias estimulantes.

Pela manhã, amostras de sangue venoso foram obtidas de veia periférica através de técnica asséptica com material de punção venosa apropriado para a população estudada. A coleta foi realizada por uma profissional competente.

3.7 Análise Bioquímica

Perfil lipídico, Glicemia e Creatinina

Foram coletados 10 mL de sangue com material descartável, que foi dividido em dois tubos, sendo que um deles de 4.0 ml contendo fluoreto para a análise da glicose plasmática, e outro com gel de separação, para sorologia e análise do perfil lipídico (colesterol total, LDL-colesterol (LDL-c), HDL-colesterol (HDL-c) e triglicerídeos (TG)) e da creatinina.

As metodologias para tais análises seguiram as instruções dos respectivos kits:

- Colesterol Total - método enzimático;
- HDL colesterol precipitante - método enzimático;
- LDL precipitante - método enzimático;
- Triglicerídeos – método enzimático;
- Glicose GodPap – método enzimático;
- Creatinina Fast – método cinético.

A leitura dos dados foi feita pela técnica de espectrofotometria no leitor de ELISA (BioTek®).

Atividade da ECA2

As amostras de sangue foram coletadas (5ml) em um tubo contendo EDTA. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3500 rpm. As reações foram realizadas num volume total de 100µl, contendo: 100mM Tris buffer, pH 7.5, 2µg BSA, 100µM substrato para ECA2 (Abz-Gly-Phe-Ser-Pro-Tyr(NO₂)-OH, *PeptidesInternational, USA*), 2 µl de plasma e 1% DMSO. As preparações foram incubadas a 37°C por 2 horas. Após isso, as reações foram interrompidas utilizando-se 100nM do inibidor específico para a ECA2 (DX600, *Phoenix PharmaceuticalsInc, California, USA*). As leituras foram realizadas em triplicata, utilizando-se o leitor de fluorescência (Fusion®) em um comprimento de onda de excitação = 360nm e emissão = 410nm.

Concentração plasmática da Angiotensina II e da Angiotensina-(1-7)

Para determinar as concentrações plasmáticas de AngII e Ang-(1-7), foram utilizados kits específicos EIA (*extraction-free absorbance assays* – EIAS, *BACHEM*[®], USA) seguindo-se o protocolo do fabricante.

3.8 Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinação da normalidade do conjunto de dados analisados. Posteriormente, utilizou-se uma análise descritiva (média e erro-padrão) seguida pelo teste t de Student não pareado para comparação entre os grupos normotenso e hipertenso. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Antropometria

Os dados antropométricos sumarizados na Tabela 2 demonstram que ambos os grupos, hipertenso e normotenso, apresentam como característica uma população de meia idade com sobrepeso e valores de circunferência abdominal acima do ideal. Não observamos diferenças significativas entre si (Figuras 4 e 5) .

Tabela 2: Idade e valores antropométricos para os grupos de normotensas e hipertensas.

Parâmetros	NORMOTENSAS n=19	HIPERTENSAS n=14	Significância $p \leq 0,05$
Idade (anos)	52.74 ± 2.04	58.86 ± 2.55	0,0679
IMC (Kg/m^2)	26.55 ± 0.6245	27.03 ± 0.83	0,6395
CA (cm)	91.24 ± 1.41	93.83 ± 1.78	0,2597

Valores descritos em média $\pm$ erro-padrão da média.

IMC: Índice de Massa Corpórea; CA: Circunferência Abdominal.

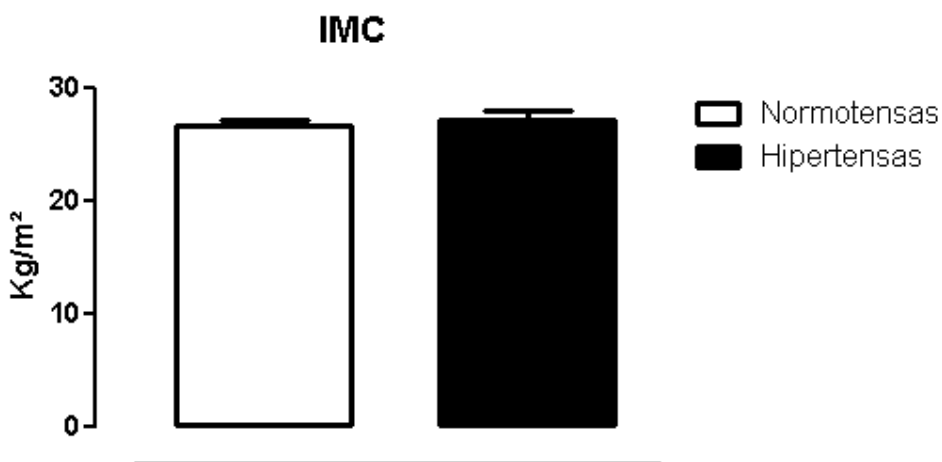


Figura 4. Valores médios representativos de IMC dos grupos de voluntárias normotensas (n=19) e hipertensas (n=14). Os valores estão representados em média $\pm$ erro-padrão da média.

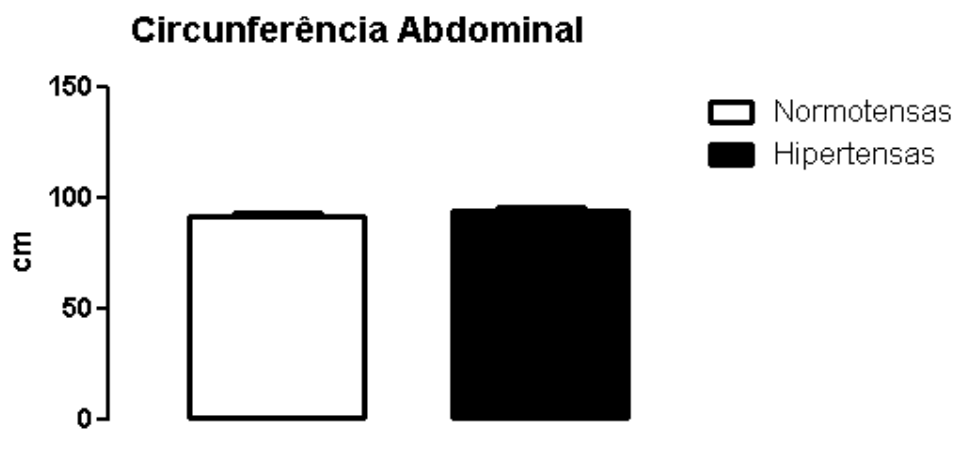


Figura 5. Valores médios obtidos da circunferência abdominal (CA) dos grupos de voluntárias normotensas (n=19) e hipertensas (n=14). Os valores estão representados em média $\pm$ erro-padrão da média.

4.2 Pressão Arterial Sistêmica e Frequência Cardíaca de Repouso (FCR)

Como esperado, o valor da pressão arterial sistólica (PAS) das hipertensas foi significativamente maior quando comparado ao grupo das voluntárias normotensas (Figura 6). O mesmo não ocorreu com relação à pressão arterial diastólica (PAD) e à frequência cardíaca de repouso (Figuras 7 e 8). A tabela 3 sumariza os valores médios da PAS e da PAD, além dos valores médios da FCR entre os grupos do estudo.

Tabela 3: Valores de PAS, PAD e FCR dos grupos de hipertensas e normotensas.

Parâmetros	Normotensas n=19	Hipertensas n=14	Significância $p \leq 0,05$
PAS (mmHg)	113.3 $\pm$ 2.30	130.6 $\pm$ 2.96*	<0.0001
PAD (mmHg)	75.04 $\pm$ 1.53	75.34 $\pm$ 5.53	0,9542
FCR (bpm)	80.80 $\pm$ 2.53	78.00 $\pm$ 4.32	0,5554

Valores descritos em média $\pm$ erro-padrão da média.

PAS: Pressão Arterial Sistólica*; PAD: Pressão Arterial Diastólica; FCR: Frequência Cardíaca de Repouso.

*, Estatisticamente diferente entre os grupos de hipertensas e normotensas.

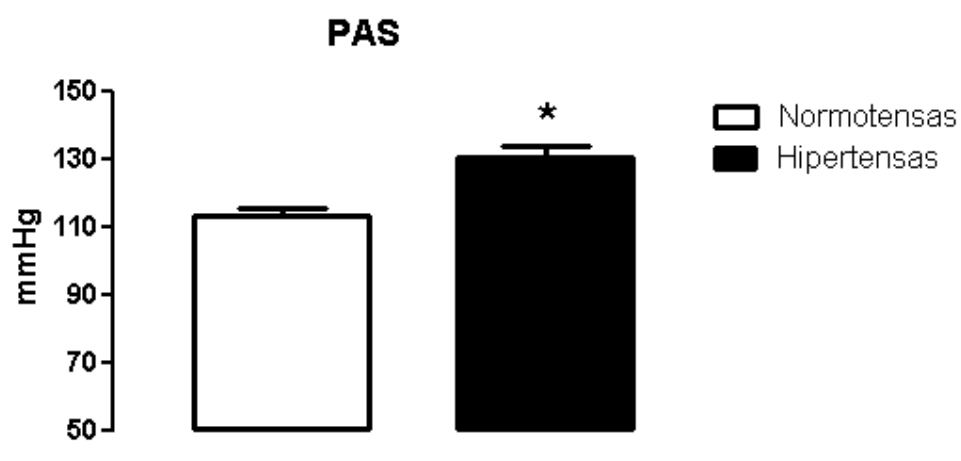


Figura 6: Valores médios de pressão arterial sistólica dos grupos de voluntárias normotensas (n=19) e hipertensas (n=14). Os valores estão representados em média $\pm$ erro-padrão da média.

*, Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo normotenso .

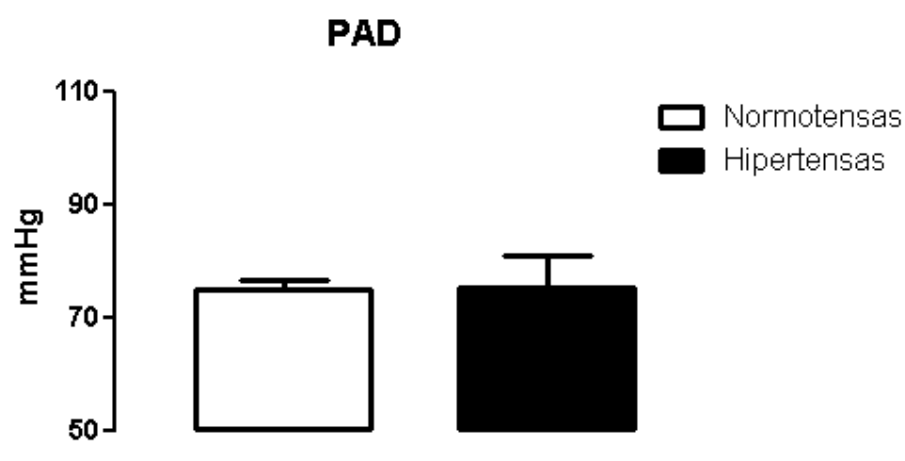


Figura 7: Valores médios de pressão arterial diastólica dos grupos de voluntárias normotensas (n=19) e hipertensas (n=14). Os valores estão representados em média $\pm$ erro-padrão da média.

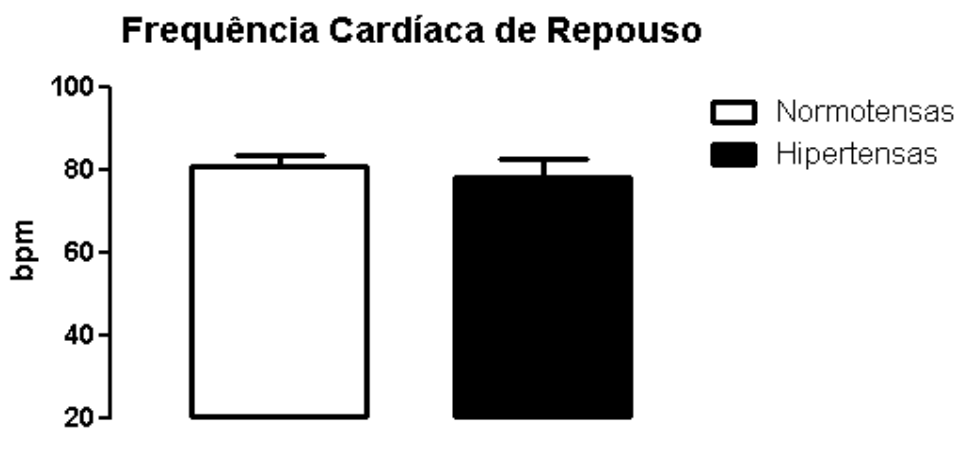


Figura 8: Valores médios das frequências cardíacas de repouso dos grupos de voluntárias normotensas (n=19) e hipertensas (n=14). Os valores estão representados em média $\pm$ erro-padrão da média.

Dentre as 14 voluntárias hipertensas, três não faziam uso de medicamentos (21,4%), enquanto que as demais faziam uso de monoterapia. A tabela 4 mostra os tipos de medicamentos, o número e porcentagem das voluntárias que faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos.

Tabela 4: número e porcentagem de mulheres hipertensas e seu referente tipo de medicação, em relação ao total de hipertensas.

Medicação	nº de voluntárias e porcentagem
Betabloqueador	n=9 (64,28%)
Inibidores dos canais de Ca^{+}	n=1 (7,14%)
Diurético	n=1 (7,14%)

4.3 Análise Bioquímica

A tabela 5 sumariza os valores da média do perfil lipídico, glicemia e creatinina dos grupos de normotensas e hipertensas.

Nota-se que os valores do colesterol total (Figura 9), HDL-c (Figura 10), LDL-c (Figura 11), glicemia (Figura 13) e creatinina (Figura 14), não se observou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Por outro lado, em relação ao TG,

verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos de normotensas e hipertensas (Figura 12), mesmo sob o uso de medicamentos.

Tabela 5: Valores da média do perfil lipídico, glicemia e creatinina entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

Parâmetros	Normotensas	Hipertensas	Significância $p \leq 0,05$
CT	192.0 $\pm$ 10.50	197.1 $\pm$ 10.35	0,737
HDL-c	34.21 $\pm$ 1.49	31.26 $\pm$ 2.168	0,254
LDL-c	133.7 $\pm$ 9.75	145.2 $\pm$ 10.13	0,429
TG	136.3 $\pm$ 13.16	198.8 $\pm$ 21.96*	0,015
Glicemia	80.40 $\pm$ 3.20	82.00 $\pm$ 2.478	0,711
Creatinina	0.86 $\pm$ 0.029	0.97 $\pm$ 0.053	0,079

Valores descritos em média $\pm$ erro-padrão da média.

CL: Colesterol Total; TG: Triglicerídeos*.

*, Estatisticamente diferente entre os grupos de hipertensas e normotensas.

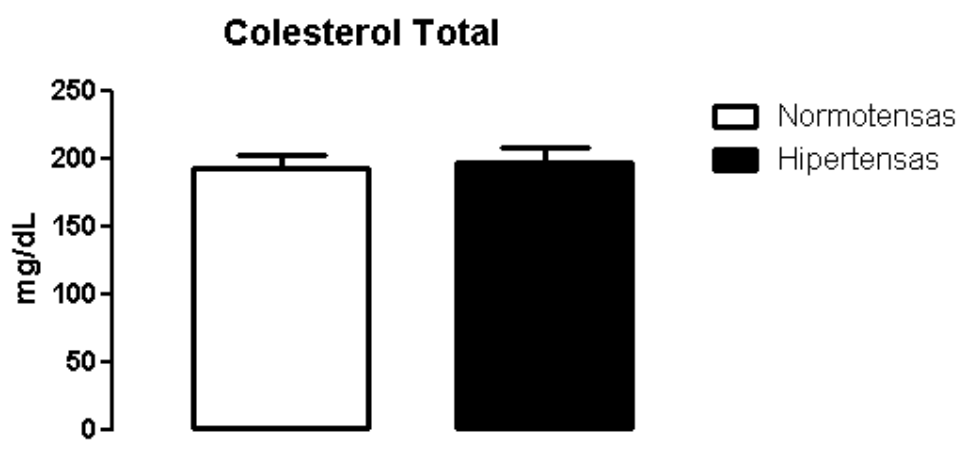


Figura 9: Comparação da média dos valores de colesterol total entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

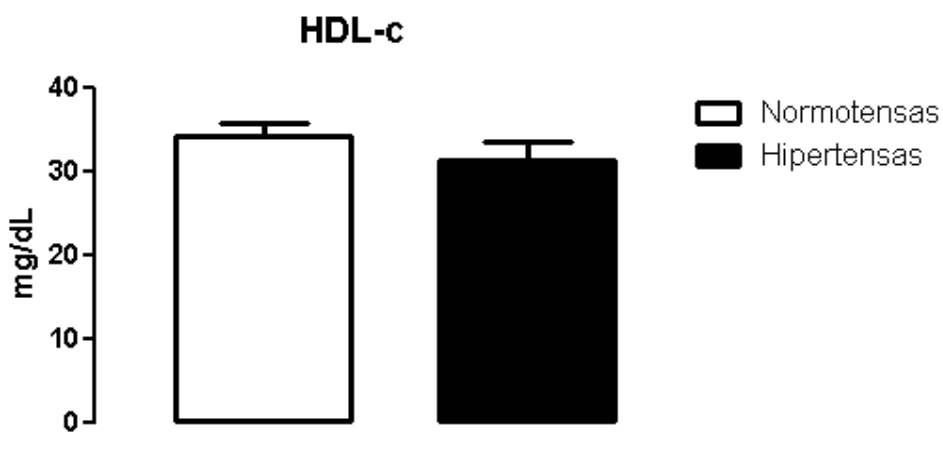


Figura 10: Comparação dos valores médios de HDL-colesterol entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

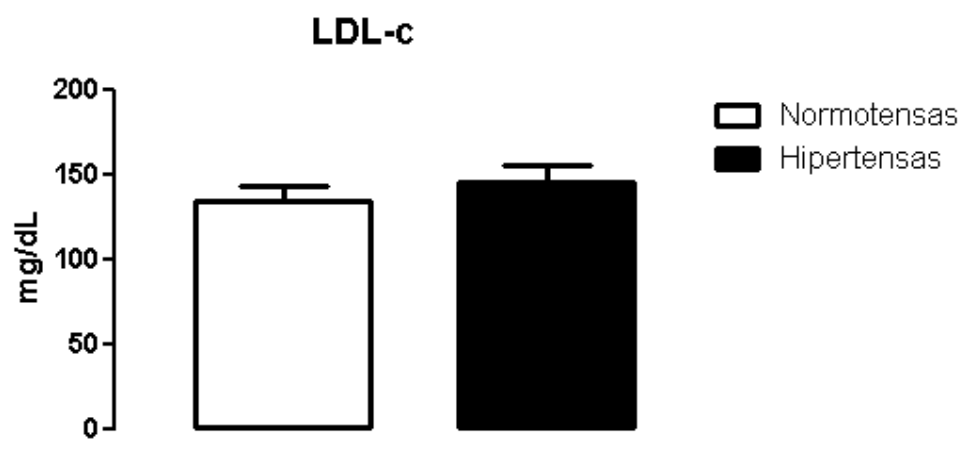


Figura 11: Comparação dos valores médios de LDL-colesterol entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

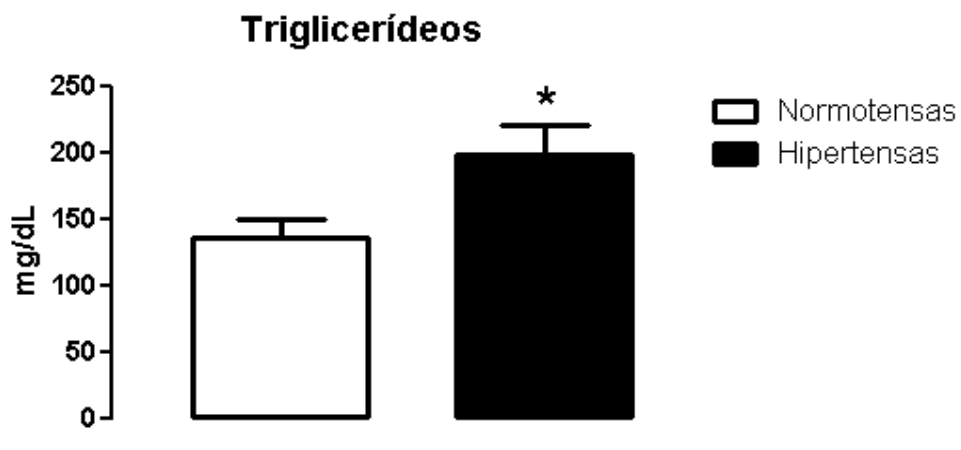


Figura 12: Comparação dos valores médios de triglicerídeos entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

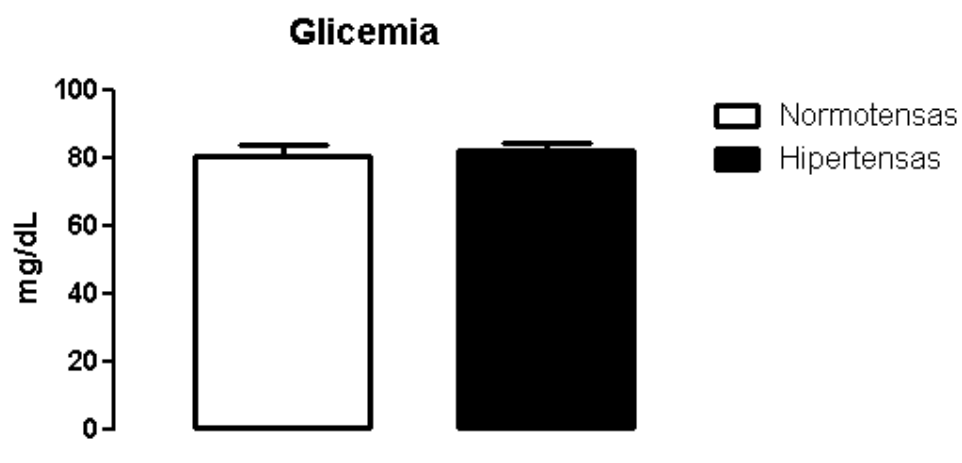


Figura 13: Comparação dos valores médios de glicemia entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

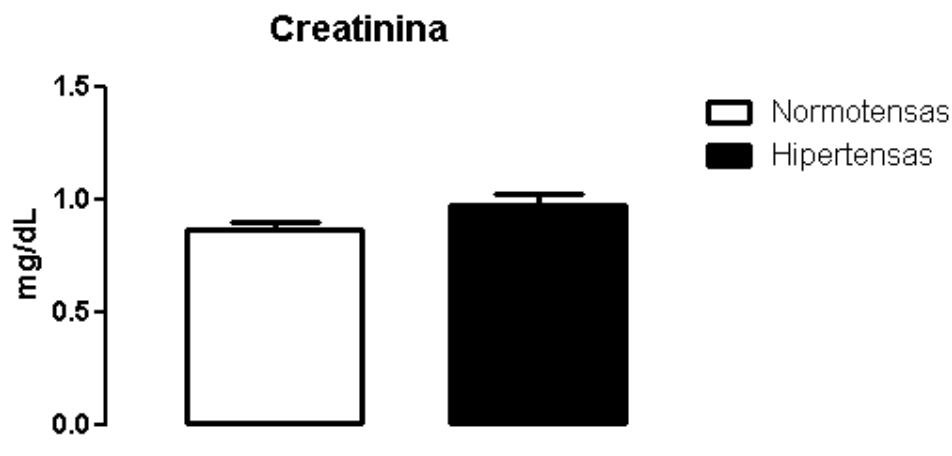


Figura 14: Comparação dos valores médios de creatinina entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

Atividade da ECA2

Quanto à análise da atividade enzimática da ECA2, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos das voluntárias (Figura 15).

Tabela 6: Valores da média da atividade enzimática da ECA2. Comparação entre o grupo de voluntárias hipertensas e normotensas.

	Normotensas	Hipertensas	Significância $p \leq 0,05$
Atividade da ECA2 (UF/μg)	23070 ± 932.2	24780 ± 123	0,268

Valores descritos em média $\pm$ erro-padrão da média.

UF/ μ g: Unidade de Fluorescência para cada micrograma de proteínas totais.

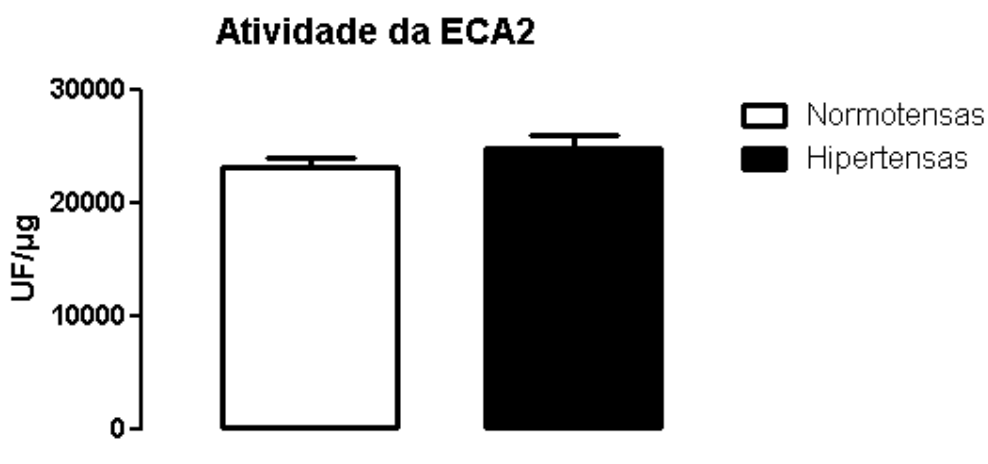


Figura 15: Comparação dos valores médios da atividade enzimática da ECA entre os grupos de voluntárias normotensas e hipertensas.

Concentração Plasmática da Ang II e da Ang-(1-7)

Apesar da tentativa de se avaliar a concentração plasmática de ANGII e da ANG-(1-7), problemas técnicos impediram sua avaliação, e assim não pudemos avaliar estes parâmetros, neste momento.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram os níveis plasmáticos da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em mulheres no climatério não são diferentes entre normotensas e hipertensas. Por outro lado, os níveis tensionais de pressão arterial sistólica e níveis plasmáticos de triglicérides foram significativamente elevados em mulheres hipertensas quando comparadas àquelas normotensas.

A incidência de doenças cardiovasculares aumenta dramaticamente com o envelhecimento populacional, e tem se constituído na maior causa de morbimortalidade em todo mundo, especialmente acima dos 50 anos de idade. Apesar das mulheres compartilharem com os homens os diversos fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, como obesidade, diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia, dentre outros, estudos epidemiológicos mostram que as mesmas, antes da menopausa, apresentam menor risco cardiovascular quando comparadas aos homens de mesma idade (RECKELHOFF, 2001; VAN EICKELS et al., 2005). Entretanto, após o período da menopausa há um aumento significativo na incidência de hipertensão arterial e suas complicações (AHA, 2010). Este fato parece estar relacionado a uma possível ação protetora exercida pelos hormônios sexuais femininos, sobretudo os estrogênios que apresenta queda abrupta no período da menopausa (GENAZZANI, 2001; NISKANEN et al, 2002).

O sistema renina-angiotensina desempenha importante papel no sistema cardiovascular, participando na regulação do fluxo sanguíneo, no remodelamento do diâmetro do vaso e do coração (GUYTON & HALL, 2006). Em estados patológicos como hipertensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva, os efeitos deletérios do sistema renina-angiotensina tem sido extensamente estudados. Assim, o sistema renina angiotensina e seus componentes tem sido foco de várias pesquisas na tentativa de avaliar a incidência de doenças cardiovasculares e as possíveis ferramentas para intervir neste sistema na tentativa de melhorar os efeitos no sistema cardiovascular como hipertrofia cardíaca, remodelamento vascular e aumento da pré-carga (SANTOS & FERREIRA, 2007).

Recentemente, a descoberta da ECA2 transformou os conceitos do sistema renina-angiotensina, pois se observou que a ECA2, contrapõe os efeitos da ANGII, reduzindo seus efeitos vasoconstritores e cardíacos (GOMES FILHO et al. 2008). Os resultados existentes na literatura ainda são controversos com relação ao papel da

ECA2 no sistema cardiovascular. Em modelos de animais, os resultados são consistentes mostrando que a atividade da ECA2, promovem efeitos benéficos no sistema cardiovascular (Santos ET al., 2006; Sampaio ET al., 2007; Silveira ET al., 2010). No entanto, estudos envolvendo seres humanos mostram que os níveis plasmáticos de ECA2 estão elevados e assim a atividade desta enzima foi associada com piora do quadro patológico e/ou sua gênese (epelman ET al., 2009; Lew ET al., 2008). Em nosso trabalho, não observamos diferenças entre os níveis plasmáticos da enzima conversora de angiotensina 2, quando comparamos mulheres normotensas e hipertensas. Portanto, a concentração plasmática de ECA2 em mulheres hipertensas não se associa ao quadro patológico estudado. Mas deve-se salientar que o número amostral ainda é pequeno.

Por outro lado, nossos resultados mostram que as mulheres hipertensas apresentam elevados níveis de triglicérides quando comparadas às mulheres normotensas e apesar de não atingir significância estatística, os níveis plasmáticos de LDL colesterol, molécula precursora na gênese da aterosclerose, apresentaram-se maiores e fora da taxa de normalidade (> 130 mg/ml).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a atividade plasmática da Enzima Conversora de Angiotensina 2 não se associara a patologia hipertensão arterial em mulheres no climatério. No entanto, ao se analisar o perfil lipídico, as mulheres hipertensas apresentaram maiores níveis plasmáticos de triglicerídeos apenas. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação à glicemia ou creatinina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE PREVENÇÃO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM MULHERES CLIMATÉRICAS E A INFLUÊNCIA DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC) E DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO CLIMATÉRIO (SOBRAC). *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*; 2008. v.91, n.1, p. 11-23.

IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Volume 88, Suplemento I, Abril 2007

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL (SBH). *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 2010. v.95, n. 1, p. 1-51.

ALLENINA, N.; BADER, M.; WALTHER, T. Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA. *Biochem. Biophys Res Commun*, 2002. v.290, p. 1072-1072.

ALLEN, A. M.; ZHUO, J.; & MENDELSON, F. A. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens*, 2000. v.13, p. 31-38.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position Stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exercise*, 2004. v.36, n.3, p. 533-553.

BLOCH, K.V.; RODRIGUES, C.S.; FISZMAN, R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. *Bras. Hipertens*, 2006. v.13, n. 2, p.134-143.

BUNNEMANN, B. *et al.* Autoradiographic localization of Mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience Letters*, 1990. v.114, p. 147-153.

CAMPBELL, D. J.; ZEITZ, C. J.; ESLER, M. D.; HOROWITZ, J. D. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *Journal of Hypertension*, 2004. v.22, p.1971-1976.

CASTRO, C. H.; SANTOS, R.A.S.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALLENINA, N.; ALMEIDA, A.P. Evidence for a functional interaction of the Angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*, 2005. p.937-942.

CHEN, C.Y.; DICARLO, S.E. Daily exercise and gender influence arterial baroreflex regulation of heart rate and nerve activity. *Am J Physiol*. 1996. v.271, n.5, p. 1840-1848.

CHEN, C. Y.; MUNCH, P.A.; QUAIL, A.W. BONHAM, A.C.. Postexercise hypotension in conscious SHR is attenuated by blockade of substance P receptors in NTS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 2002. v. 283, p. 1856–1862.

CHOBANIAN A.V.; BAKRIS G.L.; BLACK H.R.; CUSHMAN W.C.; GREEN L.A.; IZZO J.L. Jr.; JONES D.W.; MATERSON B.J.; OPARIL S.; WRIGHT J.T JR.; ROCCELLA E.J.; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 2003.v.42, n. 6, p. 1206-1252.

COYLEWRIGHT, M.; RECKELHOFF, J.F.; OUYANG, P. Menopause and hypertension: an age-old debate. *Hypertension*, 2008. v. 51, n.4, p. 952-959.

CRACKOWER, M.A.; SARAO, R.; OUDIT, G.Y. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002. v.417,p. 822–828.

DÓREA, E. L.; LOTUFO, P. A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. *Hipertensão*. 2004. v.7, p. 86-89.

EPELMAN,S.; SHRESTHA, K; TROUGHTON, R.W.; FRANCIS, G.S.; SEN, S.; KLEIN, A.L.; TANG, W.H.W. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Heart Failure: Relation With Myocardian Function and Clinical Outcomes. *Journal of Cardiac Failure*, 2009. v. 17, n. 7, p. 565-571.

ESHRE Capri Workshop Group. Hormones and cardiovascular health in women. *Hum Reprod Update*, 2006. v. 12, n.5, n. 483-97.

FERREIRA, A.J., SANTOS, R.A.S.; ALMEIDA, A.P. Angiotensin-(1–7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 2001. v.38, p. 665–668.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S. Cardiovascular actions of angiotensin – (1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005. v.3, p. 449-507.

FORJAZ, C. L. M.; CARDOSO, C. G. JR.; ONEDA, B.; MORIYAMA, C. K.; TINUCCI, T.; FONSECA, A. M. Climatério, hipertensão arterial e qualidade de vida: efeitos do treinamento aeróbico e da terapia hormonal. *Hipertensão arterial*, 2007. v.10, n.4, p.144-151.

FREEMAN, E.J.; CHISOLM, G.M.; FERRARIO, C.M. et al. Angiotensin-(1–7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 1996. v.28, p.104–108.

FREITAS, E.V., PY, L.; NERI, A.L.; CANÇADO, F.A.X.; GORZONI, M. L.; ROCHA, S. M. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Guanabara Koogan, 2002.

FURTADO, M.R.; MARTINS, J.F. Hipertensão arterial na mulher: um caso especial. *Arq Bras Cardiol*, 1995. v.64, p.141-144.

FYHRQUIST, F. & SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, 2008. v.264, p. 224-236.

GALLAGHER, P. E.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, A. Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am. Journal of Physiol. Cell Physiol*, 2006. v.290, p. 420-426.

GALLO, J. J.; BUSBY-WHITEHEAD, J.; RABINS, P. V.; SILLIMAN, R. A.; MURPHY, J. B. Reichel. Assistência ao Idoso: *Aspectos Clínicos do Envelhecimento*, 2001 Guanabara Koogan, 5ª edição.

GALVEZ, T.; DUTHEY, B.; KNIAZEFF, J.; BLAHOS, J.; ROVELLI, G.; BETTLER, B.; PREZEAU, L.; PIN, J. P. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J*, 2001.v.20, p. 2152–2159.

GENAZZANI, A.R.; GADUCCI, A.; GAMBACCIANI, M. Controversial issues in climacteric medicine II. Hormone replacement therapy and cancer. *Maturitas*, 2001. v.40, n.2, p.117-130.

GOMES FILHO, A. FERREIRA, A. J., SANTOS, S. H. S., NEVES, S. R. S., CAMARGOS, E. R. S.; BECKER, L. K.; BELCHIOR, H. A.; PEIXOTO, M. F. D.; PINHEIRO, S. V. B.; SANTOS, R. A. S. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Experimental Physiology*. 2008. p.589-598.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E.. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. *Elsevier/ Medicina Nacionais*, 2006. p.344.

HARMER, D.; GILBERT, M.; BORMAN, R. et al. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*, 2002. v. 532, p.107–110.

HARRISON-BERNARD, L.M.; COOK, A.K.; OLIVERIO, M.I.; COFFMAN, T.M. Renal segmental microvascular responses to ANG II in AT1A receptor null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003. v.284, n.3, p. 538-545.

JACKSON, T. R.; BLAIR, L. A.; MARSALL, J.; GOEDERT, M.; HANLEY, M. R. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, 1988. v. 335, p. 437– 440.

KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Genética da hipertensão arterial. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F.; FUCHS, F. D. Hipertensão. Rio de Janeiro: *Elsevier*; 2006. p. 17-24.

KUBA, K.; IMAI, Y.; RAO, S. et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*, 2005 v.11, p. 875–879.

LEW, R.A.; WARNER, F.J.; HANCHAPOLA, I.; YARSKI, M.A.; MANOHAR, J.; BURRELL, L. M.; SMITH, A. I. Angiotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor. *Experimental Physiology*, 2008. v.93, n.5, p.685-693.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. For the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 2002. v.360, p. 1903–13.

LI, W.; MOORE, .M.J.; VASILIEVA, N. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003. v.426, p.450–454.

MILLIGAN, G. Oligomerisation of G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci*, 2001. v.114, p. 1265–1271.

NEGRÃO, C.E.; BARRETTO, A.C.P. Cardiologia do exercício do atleta ao cardiopata. *Manole*, 2006. São Paulo, 2ª edição.

NISKANEN, L.; LAITNEN, T.; TUPPURAINEN, M.; SAARIKOSKI, S.; KRÖGER, H.; ALHAVA, E.; HARTIKAINEN, J. Does postmenopausal hormone replacement therapy affect cardiac autonomic regulation in osteoporotic women? *Menopause*, 2002. v.9, n.1, p. 52-57.

PHILLIPS, G.B.; JING, T.; HEYMSFIELD, S.B. Does insulin resistance, visceral adiposity, or a sex hormone alteration underlie the metabolic syndrome? Studies in women. *Metabolism*, 2008. v.57, p. 838-844.

PINHEIRO, S.V.; SIMÕES E SILVA, A.C.; SAMPAIO, W.O. et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, 2004. v.44, p. 490–496.

RAIZADA, M.K; FERREIRA, A.J. ACE2: A New Target for Cardiovascular Disease Therapeutics. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 2007. v.50 n.2.

RECKELHOFF, J.F.; FORTEPIANI, L.A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension*, 2004. v.43, p. 918-923.

RECKELHOFF, J.F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 2001. v.37, n.5, p.1199-1208.

REIS, C. M. R.F.; MELO, N. R.; VEZZOZO, D. P.; MEIRELLES, E. S. e HALPEN, A. Composição Corpórea, Distribuição de Gordura e Metabolismo de Repouso em Mulheres Histerectomizadas no Climatério - Há Diferenças de Acordo com a Forma da Administração do Estrogênio.? *Arq Bras EndocrinolMetab*, 2000. v.44, n.2, p.178-185.

REXRODE, K.M.; MANSON, J.E.; LEE, I.M.; RIDKER, P.M.; SLUSS, P.M.; COOK, N.R.; BURING, J.E. Sex hormone levels and risk of cardiovascular events in postmenopausal women. *Circulation*. 2003. v. 108, n. 14, p.1688-93.

RICE, G.I; THOMAS, D.A.; GRANT, P.J. et al. Ice Evaluation of angiotensin converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.*, 2004. v.383, p. 45–51.

ROCHEVILLE, M.; LANGE, D. C., KIMAR, U. ; PASTEL, S. C.; PASTEL, R. C. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000. v.288, p.154 –157.

RUSH, J.W.E; AULTMAN, C. D. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, 2008. v.33, p. 162-172.

SAMPAIO, W.O.; SANTOS, R.A.S.; FARIA-SILVA, R.; MACHADO, L.T.M.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates

Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*, 2007. v. 49, p.185-192.

SANTOS, R.A.S.; CASTRO, C.H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S.V.B.; ALMEIDA, A.P.; de PAULA, R.D.; CRUZ, J.S.; RAMOS, A.S.; ROSA, K.T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A.J. Impairment of Vitro and In Vivo Heart Function in Angiotensin-(1-7) Receptor Mas Knockout Mice. *Hypertension*, 2006. v.47, p. 996-1002.

SANTOS, R. A.S. & FERREIRA, A.J. Angiotensin-(1-7) and the rennin-angiotensin system. A review. *Curr. Opin. Nephrol. Hyperte*, 2007.v.16, p. 122-128.

SANTOS, R. A.S.; FERREIRA, A.J.;SIMOES E SILVA, A. C. Recente advances in the angiotensina-converting enzyme2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol*, 2008. v.93, n.5, p. 519-527.

SANTOS, R. A. S.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D.; MACHADO, R.; de BUHR, I. HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO,S.; LOPES, M.; BADER, M.; MENDES, E.; LEMOS, V.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. *ProcNatlAcadSci USA*, 2003. v.100, p. 8258-8263.

SARTORI-VALINOTTI, J.C.; ILIESCU, R.; FORTEPIANI, L.A.; YANES, L.L.; RECKELHOFF, J.F.Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease.*ClinExpPharmacol Physiol*. 2007. v. 34, n.9, p. 938-45.

SCHINDLER C, BRAMLAGE P, KIRCH W, FERRARIO CM. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy.*Vasc Health Risk Manag*. 2007. v.3, n.1, p.125-137.

SILVEIRA, K.D.; BOSCO, K. S. P.; DINIZ, L.R.L.; CARMONA, A. K.; CASSALI, G. D.; BRUNA-ROMERO, O. ; SOUSA,L.P.; TEIXEIRA, M. M.; SANTOS, R.A.S.; SIMÕES e SILVA, A. C.; VIEIRA, M.A.R. Ace2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clinical Science*, 2010. v. 119, p. 385-394.

SIMIKIN-SILVERMAN, L.; WING, R.R., HANSEN, D.H.; KLEM, M.L.; PASAGIAN-MACULARY, A.P.; MEILAHN, E.N.; KULLER, L.H. Prevention of cardiovascular risk factor elevations in healthy premenopausal women. *Preventive Medicine*, 1995. v.24, p. 509-517.

SIRAGY, H. M.; GASPARO, M.; CAREY, R. M. Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hipertension in conscious rats. *Hypertension*, 2000. v. 35, p. 1074-1077.

TALLANT E.A; CLARK MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1–7). *Hypertension*. 2003. v.42, p. 574–579.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M. & GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits

growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. *Am J Physiol Heart CircPhysio*, 2005. v. 289, p. 1560–1566.

TOSTES, R. C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res*. 2003. v.36, n.9, p.1143-1158.

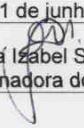
Van EICKLS, M.; SCHRECKENBERG, R.; DOEVENDANS, P.A.; MEYER, R.; GROHÉ, C.; SCHLÜTER, K.D. The influence of oestrogen-deficiency and ACE inhibition on the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur. Journal of Heart Failure*, 2005. v.7, n.7, p. 1079-1084.

WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; ANDERSON, G.; PSATY BM, BLACK HR, MANSON J, WONG N, FRANCIS J, GRIMM R, KOTCHEN T, LANGER R, LASSER N. Hypertension and its treatment in postmenopausal women: baseline data from the Women's Health Initiative. *Hypertension*, 2000. v.36, p. 780-789.

WYSOCKI, J.; YE, M.; RODRIGUEZ, E.; GONZÉLEZ-PACHECO, F. R.; BARRIOS, C.; EVORA, K.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M.; PENNINGER, J.M.; BATLLE, D. Targeting the degradation of Angiotensin II with recombinant Angiotensin-Converting Enzyme 2. Prevention of Angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 2010. v.55.

8. ANEXO

8.1.COMITÊ DE ÉTICA

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Rio Claro							
DECISÃO CEP Nº 042/2010								
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">Instituição: UNESP – IB – CRC</td> <td style="width: 50%;">Departamento: Educação Física</td> </tr> <tr> <td>Protocolo nº: 6334 de 08.10.2009</td> <td>Data de Registro CEP: 14.10.2009</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Projeto de Pesquisa: "Interação entre a Angiotensina II, Angiotensina-(1-7) e ECA2 em mulheres".</td> </tr> </table>			Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física	Protocolo nº: 6334 de 08.10.2009	Data de Registro CEP: 14.10.2009	Projeto de Pesquisa: "Interação entre a Angiotensina II, Angiotensina-(1-7) e ECA2 em mulheres".	
Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física							
Protocolo nº: 6334 de 08.10.2009	Data de Registro CEP: 14.10.2009							
Projeto de Pesquisa: "Interação entre a Angiotensina II, Angiotensina-(1-7) e ECA2 em mulheres".								
Pesquisa Individual	Pesquisador Responsável: -.-							
Pesquisa Alunos de Graduação	Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Angelina Zanesco Orientando(a): Emeline Peres							
Pesquisa Alunos de Pós-Graduação	Pesquisador Responsável: -.- Orientador(a): -.-							
Objetivo Acadêmico:	☒ TCC ☐ Mestrado ☐ Doutorado ☐ Outros (especificar)							
O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, após análise da justificativa encaminhada em 15.03.2010, pela pesquisadora, com solicitação de alteração da orientanda,								
☒	Aprovou o solicitado.							
☐	Não Aprovou.							
Rio Claro, 11 de junho de 2010.  Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo Coordenadora do CEP								
Instituto de Biociências – Seção Técnica Acadêmica Avenida 24-A nº 1515 - CEP 13506-900 – Rio Claro - S.P. - Brasil - tel 19 3526-4105 - fax 19 3534-0009 - http://www.rc.unesp.br								