

Thadeu Alves Máximo

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA
EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO PULMONAR**

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2014

Thadeu Alves Máximo

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA
EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO PULMONAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2014

Máximo, Thadeu Alves.

Avaliação do sistema renina angiotensina em pacientes portadores de hipertensão pulmonar [manuscrito] / Thadeu Alves Máximo. – 2014.

78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Robson Augusto Souza dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Hipertensão pulmonar - Teses. 2. Sistema renina angiotensina - Teses. 3. Peptídeos vasodilatadores. 4. Fisiologia - Teses. I. Santos, Robson Augusto Souza dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

REITOR

Prof. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA

Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

PRÓ-REITORA DE PESQUISA

Prof^a. Adelina Martha dos Reis

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB

DIRETORA

Prof^a. Andréa Mara Macedo

VICE-DIRETOR

Prof. Carlos Augusto Rosa

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

SUB-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Profa. Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

COORDENADOR

Prof. Christopher Kushmerick

SUBCOORDENADOR

Prof^a. Miriam Teresa Paz Lopes

COLEGIADO

Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Prof. Cândido Celso Coimbra

Prof. Christopher Kushmerick

Prof. Frédéric Jean Georges Frézard

Prof. Jorge Luiz Pesquero

Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes

Prof^a. Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Prof^a. Maria José Campagnole dos Santos

Prof. Miguel José Lopes

Prof^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Prof^a. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca

Prof. Steyner de França Côrtes

Prof^a. Virgínia Soares Lemos

Frederico Sander Mansur Machado (representante discente)

Marcelo Limborço Filho (representante discente)

RESUMO

INTRODUÇÃO: A hipertensão pulmonar (HP) é uma síndrome clínica que caracteriza-se pelo aumento pressórico sustentado no leito pulmonar e câmaras cardíacas direitas. Três mecanismos patogênicos estão envolvidos, sendo eles: alterações no equilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, disfunção endotelial e remodelamento dos vasos do leito pulmonar. Apresenta altas morbidade e mortalidade, não tem cura, e seu tratamento é na maioria das vezes pouco eficaz. O sistema renina angiotensina (SRA) foi recentemente revisto e ampliado, sua participação na homeostase vascular tem sido amplamente estudada e acredita-se que tenha papel importante na HP. **OBJETIVOS:** Medir a concentração e atividade transpulmonar de diversos peptídeos e enzimas que compõe o SRA em pacientes portadores de HP e controles. **MÉTODOS:** Foram recrutados 12 pacientes que se submeteram ao cateterismo e manometria cardíaca direita pela suspeição clínica de HP. Destes, nove apresentavam HP e três configuraram os controles. Amostras de sangue provenientes do tronco da artéria pulmonar e da raiz da aorta foram colhidas e peptídeos (AngI, AngII, Ang1-7, Ala) e atividades de enzimas (ECA, ECA2 e renina) foram medidas por espectrometria de massa e ensaio fluorimétricos. Utilizamos testes pareados (*t* e *Wilcoxon*) e não pareados de *Mann-Whitney* para as comparações estatísticas univariadas e o teste *ANOVA* para multivariadas. O valor de *p* para significância utilizado foi $<0,05$. **RESULTADOS:** Foram observadas diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas dos peptídeos Ang1-7 e Ala entre casos e controles no sangue colhido na artéria pulmonar, sendo maiores nos casos. A relação AngII/Ang1-7, também da artéria pulmonar, se mostrou maior nos controles. O sangue colhido na aorta mostrou maior concentração plasmática de Ang1-7 em pacientes portadores de HAP em relação aos controles. A razão transpulmonar do peptídeo Ala foi diferente de um ($\neq 2,27$), sugerindo sua menor concentração na aorta em relação à artéria pulmonar dos casos. Essa razão foi significativamente diferente de um nos controles para Ala e para a relação AngII/Ang1-7. Além disso, quando comparadas entre casos e controles, a média das razões transpulmonares obtiveram significância estatística para o peptídeo Ala. **CONCLUSÕES:** Estes resultados apontam para uma maior concentração plasmática de peptídeos vasodilatadores (Ang1-7 e Ala) na via de entrada na circulação pulmonar (tronco da artéria pulmonar) de portadores de HAP em relação a controles. Houve, por outro lado, significativa diminuição do peptídeo Ala na raiz da aorta em relação à medida da artéria pulmonar nos casos. Nos controles observou-se relação inversa no sentido de maior concentração de Ala na aorta.

ABSTRACT

BACKGROUND: The pulmonary hypertension (PH) is a clinical syndrome recognized by maintained increased pressure at the pulmonary vascular bed and right cardiac chambers. Three pathogenic mechanisms are involved: disbalance between vasoconstrictor and vasodilator factors, endothelial dysfunction and pulmonary vascular remodeling. It has high morbidity and mortality, besides not having cure and presents a little effective treatment. The renin-angiotensin system was recently revised and expanded. There are several studies about its participation in the vascular homeostasis, and is believed that it plays a crucial role in PH.

OBJECTIVE: measuring the transpulmonary concentration and activity of different peptides and enzymes of PAH patients and controls. **METHODS:** we selected 12 patients who underwent right cardiac catheterization and manometry for clinical suspicion of PAH. Nine of these were diagnosed with PH and three were categorized as controls. Blood samples were collected from all patients from pulmonary artery and aortic root. We used mass spectrometry and fluorimetric assays to measure the peptides (AngI, AngII, Ang1-7, Ala) and enzyme activity (ECA, ECA2 e renina). For the univariate analyses we used the *t*-test, Wilcoxon and Mann-Whitney test. For the multivariate analysis, we used the ANOVA test. The *p* value for significance was <0,05. **RESULTS:** we found differences in the plasmatic concentrations of the peptides Ang1-7 and Ala in the pulmonary artery between cases and controls. Both values were higher in cases. The pulmonary artery ratio AngII/Ang1-7 was higher in controls. The patients with PAH had higher aortic concentrations of Ang1-7 when compared to controls. The pulmonary-aortic ratio of Ala peptide was different than one ($\neq 2,27$). That suggests its lower concentration at aorta when compared to pulmonary artery in cases. This ratio was significantly different of one in the controls for Ala and for the AngII/Ang1-7 relation. Furthermore, when comparing cases and controls, the mean transpulmonary ratios obtained statistical significance for the Ala peptide. **CONCLUSION:** These results suggests higher plasmatic concentrations of vasodilator peptides (Ang1-7 e Ala) in the inflow of the pulmonary circulation of the PAH patients when compared to controls. There were, moreover, significant decrease of the Ala peptide at the aortic root when compared to pulmonary artery in patients with PH. Besides, in the control group we observed a higher concentration of Ala in the aortic root (inverse).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** SRA clássico (p7).
- Figura 2** Cascata de formação de alguns peptídeos angiotensinérgicos (p11).
- Figura 3** Distribuição de frequência pacientes da amostra quanto ao gênero separada por grupos (p40).
- Figura 4** Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto à idade separada por grupos (p41).
- Figura 5** Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto ao peso separada por grupos (p41).
- Figura 6** Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto à PAPm e classificação da HAP (p42).
- Figura 7** Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos na aorta e artéria pulmonar de pacientes portadores de HAP (p45).
- Figura 8** Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta e artéria pulmonar de pacientes portadores de HAP (p45).
- Figura 9** Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos na aorta e artéria pulmonar de pacientes controles (p46).
- Figura 10** Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta e artéria pulmonar de pacientes controles (p47).

- Figura 11** Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos artéria pulmonar de pacientes controles e portadores de HAP (p48).
- Figura 12** Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na artéria pulmonar de pacientes controles e portadores de HAP (p48).
- Figura 13** Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos aorta de pacientes controles e portadores de HAP (p50).
- Figura 14** Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta de pacientes controles e portadores de HAP (p50).
- Figura 15** Comparação entre as razões das concentrações dos peptídeos estudados (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes portadores de HAP (p52).
- Figura 16** Comparação entre as razões das atividades das enzimas estudadas (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes portadores de HAP (p52).
- Figura 17** Comparação entre as razões das concentrações dos peptídeos estudados (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes controles (p53).
- Figura 18** Comparação entre as razões das atividades das enzimas estudadas (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes controles (p54).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da HP (adaptada e traduzida) (p15).
Tabela 2	Artigos sobre HP e SRA em animais (p25).
Tabela 3	Artigos sobre HP e SRA em humanos (p27).
Tabela 4	Representação da análise estatística descritiva das variáveis estudadas na amostra e por grupos (p43).
Tabela 5	Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na aorta e artéria pulmonar entre os casos (p45).
Tabela 6	Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na aorta e artéria pulmonar entre os casos (p47).
Tabela 7	Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na artéria pulmonar entre casos e controles (p49).
Tabela 8	Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na artéria pulmonar entre casos e controles (p51).
Tabela 9	Comparação entre as médias das razões e da média teórica dos peptídeos e enzimas em pacientes portadores de HAP (p53).
Tabela 10	Comparação entre as médias das razões e da média teórica dos peptídeos e enzimas em controles (p54).
Tabela 11	Comparação entre as razões Pulmonar/Aorta entre casos e controles (p55).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alamandina
AngI	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
Ang1-7	Angiotensina 1-7
Ang1-9	<i>Angiotensina 1-9</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOGEN	Angiotensinogênio
AT1	Receptor de angiotensina do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina do tipo 2
BMPR2	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 2</i>
CI	<i>Confidence Interval</i> - Intervalo de Confiança
DIZE	<i>Diminazene</i> - Diminazeno
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECA2	Enzima conversora da angiotensina tipo 2
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HAPI	Hipertensão arterial pulmonar idiopática
HC-UFMG	Hospital das clínicas da UFMG
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HP	Hipertensão pulmonar
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
iECA	Inibidores da ECA
INCT N-BIOFAR	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica
IRAP	<i>Insulin-regulated amino peptidase</i>
m²	Metro quadrado

MCT	Monocrotalina
Mas	Receptor da angiotensina 1-7
Máx.	Máximo
Mín.	Mínimo
mmHg	Milímetros de mercúrio
<i>MrgD</i>	<i>Mas-related G protein-coupled receptor D</i> - Receptor de Ala
NaCl	Cloreto de sódio
<i>NEP</i>	<i>Neutral endopeptidase</i>
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAOP	Pressão de oclusão da Artéria Pulmonar
PAPm	Pressão média de artéria pulmonar
PCP	Prolil-Carboxipeptidase
PEP	Prolil-Endopeptidase
pH	Potencial hidrogeniônico
RVP	Resistência vascular Pulmonar
<i>SD</i>	<i>Standard deviation</i> - Desvio-padrão
SRA	Sistema renina angiotensina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VD	Ventrículo direito
XNT	1-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-4-(hidroximetil)-7- [[4metilfenil)sulfonil]oxi]-9H-xantona-9
ZnCl₂	Cloreto de zinco

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRCT	xi
LISTAS DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
SUMÁRIO	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	6
2.2- SRA - ATIVIDADE PARÁCRINA	12
2.3- HIPERTENSÃO PULMONAR (HP)	13
2.3.1- DEFINIÇÕES E CLASSIFICAÇÃO	13
2.3.2- FISIOLOGIA e FISIOPATOLOGIA	15
2.3.3- EPIDEMIOLOGIA	17
2.3.4- DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	18
2.4- SRA E HAP	21
3- OBJETIVOS	28
3.1- OBJETIVO GERAL	29
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4- MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1- SELEÇÃO DE PACIENTES	31
4.1.1- Considerações éticas	32
4.2- PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	32
4.3- COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
4.4- EXAME QUANTITATIVO DOS PEPTÍDEOS	34
4.4.1- Extração de proteínas das amostras	34
4.4.2- Espectrometria de massa	35
4.5- ENSAIO ENZIMÁTICO - ATIVIDADE DA RENINA	35
4.6- ATIVIDADE DA ECA E ECA2	36
4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5- RESULTADOS	38

5.1- ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA	40
5.1.1 - Gênero	40
5.1.2- Idade	41
5.1.3- Peso	41
5.1.4- PAPm e classificação da HAP	42
5.1.5- Peptídeos e enzimas do SRA	42
5.2- ANÁLISE UNIVARIADA	44
5.2.1- Comparação entre variáveis do SRA medidas no tronco da artéria pulmonar e na raiz da aorta dos casos	44
5.2.2- Comparação entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar e na raiz da aorta dos controles	46
5.2.3- Comparação entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar entre casos e controles	47
5.2.4- Comparação entre as variáveis medidas na raiz da aorta de casos e controles	49
5.3- ANÁLISE UNIVARIADA DA RAZÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PULMONAR E AÓRTICAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS	51
5.3.1- Comparação pareada entre as médias das razões pareadas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar raiz da aorta de casos	52
5.3.2- Comparação pareada entre as médias das razões pareadas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar e raiz da aorta de controles	53
5.3.3- Comparação não pareada entre as razões obtidas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar sobre a medida na raiz da aorta entre casos e controles	54
5.4- ANÁLISE MULTIVARIADA	55
6- DISCUSSÃO	56
7- CONCLUSÕES	63
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE 1 - MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	75
APÊNDICE 2 - MÉTODO PARA MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA ECA E ECA	76
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	78

Introdução

1- INTRODUÇÃO

A síndrome da hipertensão pulmonar (HP) compreende um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas, em conjunto, pelo aumento da pressão no leito arterial pulmonar. É definida como elevação sustentada da pressão média na artéria pulmonar, em repouso, para mais de 25mmHg (SIMONNEAU, GERALD *et al.*, 2013). Observações sugerem que três mecanismos patogênicos estão envolvidos, sendo eles: alterações no equilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores; disfunção endotelial e remodelamento dos vasos do leito pulmonar (FERREIRA *et al.*, 2009a, 2012).

Caracteriza-se histologicamente por proliferação e remodelamento vascular, havendo hipertrofia da camada média das arteríolas pulmonares, fibrose da íntima e microtromboses. Os sintomas usualmente aparecem quando a hipertensão pulmonar (HP) se torna grave, situação esta definida como pressão pulmonar média acima de 45mmHg. A partir do início dos sintomas e na ausência de tratamento para diminuir a pressão de artéria pulmonar (PAP), a expectativa média de vida é de três anos. A HAP não tem cura, é progressiva, e o paciente necessita de tratamento específico por toda a vida (HOETTE; JARDIM; SOUZA, 2010).

Recentemente revisto, o sistema renina angiotensina (SRA) consta de um eixo vasoconstritor, proliferativo, fibrótico e pró-inflamatório e outro eixo vasoprotetor contrarregulador. Trata-se do eixo ECA2/Ang1-7/Mas, ou seja, o eixo formado pela enzima

conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) que cliva tanto a angiotensina 1 (AngI) formando a angiotensina 1-9 (Ang1-9), quanto a angiotensina 2 (AngII) tendo como produto final a angiotensina 1-7 (Ang1-7) (BADER, 2013; SANTOS *et al.*, 2003, 2013; SANTOS; FERREIRA; SIMÕES E SILVA, 2008). Esta, por sua vez, através de sua atividade nos receptores Mas em diversos tecidos tem demonstrado efeito vasodilatador, anti-inflamatório, antiproliferativo e antitrombótico.

A atuação parácrina deste novo eixo já foi proposta e confirmada em diversos sistemas e órgãos específicos como coração, cérebro e rins. Sabe-se ainda que tanto o tecido pulmonar quanto o endotélio do leito vascular pulmonar são capazes de sintetizar todos os peptídeos e enzimas (HAMMING *et al.*, 2004, 2007) do SRA, e que provavelmente esse sistema esteja relacionado à fisiopatologia da HP.

A manipulação terapêutica deste novo eixo do SRA tem sido alvo de diversos estudos experimentais. Tanto a ECA2 e seus ativadores como o Ang1-7 vem sendo idealizados como terapias potencialmente eficazes para o tratamento de afecções de etiologia vascular ou com fisiopatologia que curse com importante remodelamento vascular. Elementos de ambos os eixos do SRA (vasoconstritor e vasoprotetor) já foram quantificados na circulação e no tecido pulmonar de indivíduos e animais normais e portadores de HP, porém isso ainda não foi realizado na circulação pulmonar, apenas na sistêmica. A importância da sua mensuração também na

circulação pulmonar seria a avaliação transpulmonar ou da diferença arteriovenosa destes componentes.

O cateterismo cardíaco direito com manometria e o teste de vasorreatividade pulmonar são exames propedêuticos necessários integrantes do protocolo para o diagnóstico definitivo da HP (RUBIN; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, 2004; SAGGAR; SITBON, 2012; SZOLAR *et al.*, 1995). Devem ser realizados preferencialmente antes do início do tratamento com o objetivo de orientar a melhor estratégia terapêutica. Durante estes exames amostras sanguíneas da circulação sistêmica e pulmonar puderam ser facilmente coletadas, visto que o estabelecimento de dois acessos, uma arterial e outra venoso central, é rotineiro. O gradiente transpulmonar pode ser medido então pela diferença das concentrações ou atividades de componentes dos diversos sistemas reguladores corporais.

Revisão Bibliográfica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O sistema renina angiotensina (SRA) é um sistema biológico peptidérgico com características endócrinas. A descoberta da renina em 1898 (TIGERSTEDT R BERGMAN P, 1898) deu início à caracterização de um sistema dito SRA clássico. Neste experimento, extratos de tecido renal de coelhos em salina, quando injetados, mostraram aumentar de forma gradual a pressão sanguínea sistêmica em coelhos. O princípio causador deste aumento pressórico, como se demonstrou, encontrava-se no córtex e não na medula renal e era inativado pelo calor. Os autores concluíram cunhando a proteína descoberta com o nome de renina. Especulou-se ainda que esta proteína podia estar relacionada diretamente com a hipertrofia cardíaca encontrada na doença renal hipertensiva.

Nos anos 70, os componentes principais do SRA clássico foram identificados e o seu papel na fisiologia e fisiopatologia do controle da pressão arterial e regulação do balanço hídrico foi aventado. Porém, foi apenas com o desenvolvimento de fármacos orais e efetivos inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) (ONDETTI; RUBIN; CUSHMAN, 1977), que o papel proeminente do SRA na homeostase cardiovascular e doenças do sistema cardiovascular ficou estabelecimento. A introdução dos inibidores do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) (TIMMERMANS *et al.*, 1993) reforçou esta teoria.

Na relativamente simples visão clássica do SRA temos como

substrato da renina o angiotensinogênio (AOGEN), uma α -glicoproteína liberada pelo fígado, para a formação do decapeptídeo angiotensina I, 1-10 ou AngI. A AngI é então novamente clivada para formar sua forma biologicamente ativa que é o octapeptídeo angiotensina II (AngII). Esta ativação se dá por meio da ECA principalmente no leito dos vasos da circulação pulmonar. A AngII interage diretamente através de seus receptores específicos (AT) ou via indireta estimulando a liberação de aldosterona pelo córtex adrenal para exercer suas ações biológicas.

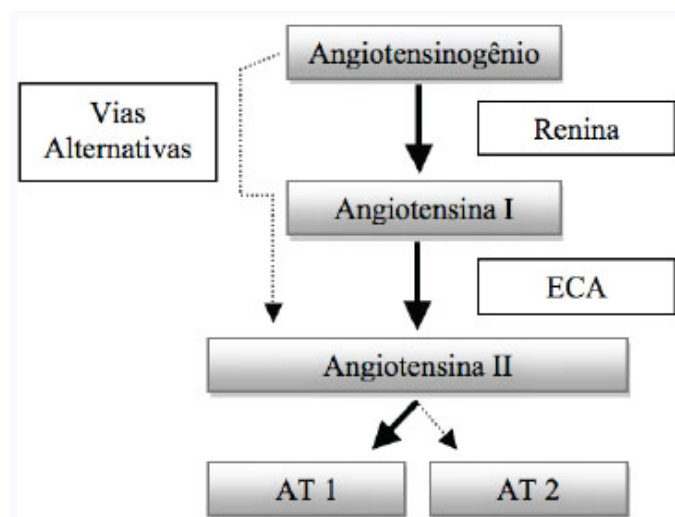


Figura 1 - SRA clássico.

Paralelamente a esta via clássica descrita, a AngII pode ser formada por vias alternativas, particularmente a via das serina endopeptidases que podem ter como substrato tanto a AngI quanto o AOGEN diretamente para a formação de Ang II. Como exemplo teríamos a quimase, a catepsina A, a tonina e a catepsina G.

A AngII exerce suas ações via receptores de membrana acoplados a proteína G, AT1 e AT2, que estão presentes em

diferentes órgãos. As ações fisiológicas e patológicas mais conhecidas da Ang II são mediadas via receptores AT1. Dentre elas pode-se destacar a vasoconstrição; retenção renal de sódio (direta ou via liberação de aldosterona); retenção renal hídrica via liberação central de vasopressina; aumento da sede, do apetite por sal e da absorção intestinal de sódio (aumentando o volume extracelular); supressão da renina por feedback negativo; hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos; e ativação do sistema nervoso simpático (SNS). O receptor AT2 é amplamente distribuído durante o desenvolvimento do feto, mas rapidamente declina ao nascimento. No adulto, o AT2 está presente no cérebro, coração, região medular da adrenal, rins e tecidos reprodutivos. Os principais efeitos de sua ativação são: antiproliferativo; vasodilatador; promotor da diferenciação celular, reparação tecidual e apoptose; desenvolvimento dos rins e trato urinário; e proteção contra isquemia cardíaca.

Recentemente o sistema renina-angiotensina foi revisto e ampliado desde sua forma clássica (AOPEN - renina - AngI - ECA - AngII). Este novo entendimento sobre o que é o SRA vem ganhando em complexidade com a descoberta de novas enzimas e peptídeos com atividade biológica relevantes. Apesar da Ang II ainda ser o principal produto ativo do SRA, sabe-se hoje que outros peptídeos biologicamente ativos podem ser formados, entre eles a angiotensina 2-8 (AngIII), a angiotensina 3-8 (AngIV), a angiotensina 1-7 (Ang1-7), a angiotensina 1-9 (Ang1-9) e a Alamandina (Ala)

(ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014; LAUTNER *et al.*, 2013; VILLELA, DANIEL *et al.*, 2015; VILLELA, DANIEL C.; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014a), confirmando um sistema de múltiplos mediadores e diversos eixos que podem atuar de maneira paralela, complementar ou contrarreguladora.

A AngIII, conhecida desde a década de 1970, causa vasoconstrição e liberação de aldosterona. É formada pela ação da aminopeptidase A, apresenta efeitos semelhante àqueles produzidos pela AngII, com maior afinidade pelo receptor de angiotensina tipo 1 (AT1). Enquanto a AngII é considerada o principal efector do RAS, AngIII pode ser igualmente ou até mais importante em algumas funções biológicas como por exemplo a liberação de vasopressina.

Sua metabolização pela aminopeptidase N forma a AngIV, um peptídeo biologicamente ativo com afinidade muito baixa por receptores AT1 e AT2, que exerce suas ações via receptor AT4, uma aminopeptidase insulina-regulada (IRAP). As ações de AngIV via IRAP incluem vasodilatação renal, hipertrofia e proliferação celular, ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B), além de ser importante para a função de memória.

O peptídeo Ang1-7 (Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7) é um importante componente, que por muito tempo foi considerado como biologicamente inativo. Trata-se de um heptapeptídeo que pode ser formado por diferentes vias, sendo a mais importante e eficiente, sob os pontos de vista fisiológico e catalítico, é por meio de uma

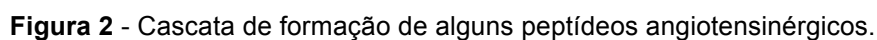
enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2). A Ang1-7 desempenha papel antagônico ao da Ang II, atuando como anti-hipertensiva, anti-hipertrófica, antifibrótica e antitrombótica. Estudos sugerem que existe importante interação entre a Ang1-7 e sistemas que envolvam a participação de prostaglandinas, bradicinina e óxido nítrico (NO). Além desta via indireta citada a Ang1-7 atua diretamente via ligação ao receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003). Trata-se de um receptor acoplado a proteína G, que apresenta sete domínios transmembrana e cuja expressão é maior no cérebro (hipocampo, córtex piriforme e bulbo olfatório) e testículos (células de Leydig e de Sertoli), estando em menor quantidade nos rins, coração e vasos sanguíneos.

Em 2000, a enzima conversora da angiotensina tipo 2 (ECA2) foi descoberta por dois grupos de pesquisa independentes que a clonaram a partir de um banco de DNA complementar oriundo de um ventrículo cardíaco esquerdo (DONOGHUE *et al.*, 2000) e de um linfoma humano (TIPNIS *et al.*, 2000). A ECA2 age como uma monocarboxipeptidase e remove um aminoácido C-terminal da AngI para formar a Ang1-9 ou, preferencialmente tem a AngII como substrato para formação da Ang1-7.

Após a descoberta destes novos componentes, novas pesquisas, alvos terapêuticos e possibilidades foram deflagrados. O SRA passou figurar como tendo pelo menos um eixo vasoconstritor ECA/AngII/AT1 e outro vasoprotetor ECA2/Ang1-7/Mas. Acredita-se que estas vias sejam contrarregulatórias e que isso ajude a definir

algumas questões ainda não compreendidas sobre a fisiologia do SRA e fisiopatologia das doenças vasculares, especialmente as cardiovasculares.

Muitos outros peptídeos com atividade biológica têm sido descobertos e incorporados ao SRA, como a Ala1-AngII (angiotensina A) e Ala1-Ang1-7 (Alamandina) (VILLELA, DANIEL C.; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014b). A Ala1-AngII (Des[Asp1]-[Ala1]-AngII), também conhecida como angiotensina A, é um novo peptídeo identificado que integra este sistema. Sua formação ocorre através de um processo enzimático, com a descarboxilação do resíduo de aspartato da porção N-terminal da AngII, apresentando ações similares às da Ang II via receptores AT1 e maiores efeitos sobre AT2. Outro novo importante componente do SRA é a Ala1-Ang1-7, também conhecido como Alamandina (LAUTNER *et al.*, 2013). Trata-se de um heptapeptídeo formado a partir da Ala1-AngII por ação da ECA2 ou por uma descarboxilação do primeiro resíduo da Ang1-7. Este peptídeo está presente no sangue humano e atua através da ligação ao receptor MRGD (BADER *et al.*, 2014), desempenhando ações no meio biológico que inclui efeito vasodilatador, antifibrótico e anti-hipertensivo. Segue esquema de organograma com os novos componentes do SRA revisto e ampliado (Figura 2).



Além da descobertas dos novos componentes do SRA descritas anteriormente, que ampliaram sobremaneira o entendimento do complexo SRA revisto e atual, houve outra mudança de paradigma importante. O SRA até então compreendido como um sistema endócrino peptidérgico com ações sistêmicas, foi ampliado para diversos sistemas parácrinos com atuação e regulação locais (FLEMING; KOHLSTEDT; BUSSE, 2006; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; KAPARIANOS; ARGYROPOULOU, 2011a; MARSHALL, 2003; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006).

Estes sistemas SRA locais tem sido identificados em diversos órgãos e sistemas estudados e revistos recentemente. Estes tecidos específicos dispõem de todos os requisitos necessários para a

produção das enzimas, dos outros peptídeos e seus respectivos receptores. Entretanto a maioria senão toda a renina que serve de substrato para estes sistemas é proveniente da produção renal pelas células justaglomerulares.

Evidências científicas crescentes apontam para uma participação importante da ECA2 e Ang1-7 na fisiologia cardiovascular e fisiopatologia das doenças cardiovasculares, através da modulação da atividade excessiva da via clássica do SRA.

A comprovação de diversos componentes do SRA em tecidos onde originalmente não seria esperado encontrá-los fez com que a teoria dos SRA locais ou teciduais se difundisse. Atualmente os SRA locais cerebral, vascular, reprodutivo, cutâneo, renal, intestinal e adiposo estão relativamente bem demonstrados e parcialmente compreendidos (WANG; QIAN; *et al.*, 2010).

Estes sistemas locais exercem ações em diversos órgãos, sendo que alguns deles operam mais independentemente do SRA sistêmico (glândulas adrenais, cérebro) e em outros existe próxima interação entre eles (coração e rins) (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). O SRA circulante ou sistêmico é visto como um regulador hidroeletrólítico e da pressão arterial enquanto que os SRA locais atuam em efeitos envolvendo proliferação, crescimento e síntese protéica, dentre outros.

2.3- HIPERTENSÃO PULMONAR (HP)

2.3.1 – DEFINIÇÕES E CLASSIFICAÇÃO

A Síndrome de Hipertensão Pulmonar (HP) é definida como um aumento na pressão arterial pulmonar média (PAPm) ≥ 25 mmHg em repouso medido pela cateterização cardíaca direita (manometria de câmaras cardíacas direitas). De acordo com análises correntes e com dados atualmente disponíveis a PAP média em repouso é 14 ± 3 mmHg, tendo um limite superior de normalidade de 20 mmHg. O significado da PAP média entre 21 e 24 mmHg ainda é incerto (SIMONNEAU, GÉRALD *et al.*, 2009; RUBIN; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, 2004; BARST, ROBYN J *et al.*, 2004). O antigo conceito de HP relacionado ao exercício, ou seja, >30 mmHg foi abandonado pois este limite pode ser alcançado e muitas vezes superado por indivíduos saudáveis (MCLAUGHLIN *et al.*, 2009; MCLAUGHLIN; MCGOON, 2006).

Atualmente a HP é classificada segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em cinco grupos de acordo com sua respectiva etiologia. Outras classificações são utilizadas o que facilita tanto o entendimento da fisiopatologia quanto da responsividade dos diversos grupos às terapias atualmente empregadas (SIMONNEAU, GERALD *et al.*, 2013). A HP pode também ser classificada em HP pós-capilar, quando apresenta POAP (pressão de oclusão de artéria pulmonar) > 15 mmHg, e pré-capilar, quando PAOP ≤ 15 mmHg. Na HP pós-capilar têm-se a dita HP reativa ou passiva dependendo do gradiente de pressão transpulmonar (PAP - POAP). Na HP reativa

esse gradiente é > 12 mmHg (“Hemodynamic evaluation of pulmonary hypertension”, 2005; SAGGAR; SITBON, 2012). Esta é a dita classificação hemodinâmica da HP.

A classificação da HP vem sendo modificada, desde a primeira versão sugerida na Primeira Conferência da Organização Mundial de Saúde (OMS) em HP, em 1973. A partir desta, mais três conferências foram realizadas. Uma segunda em 1998 em Evian (França), uma terceira em 2003, quarta em Dana Point, Califórnia (2008) e a mais recente conferência que se deu em Nice, França, em 2013. A partir desta última, a HP passou a ser classificada em cinco grupos, a saber: 1. HAP, destacando-se, neste grupo a hipertensão arterial pulmonar idiopática (HAPI), quando nenhum distúrbio primário causal é identificado; a HAP familiar, a HAP associada, a HAP associada com envolvimento significativo venoso ou capilar e a HP persistente do recém nascido; 2. a HP associada com doença cardíaca esquerda (atrial, ventricular ou valvular); 3. a HP associada com doenças pulmonares e/ou hipoxemia; 4. HP secundária a doença trombótica e/ou tromboembólica crônicas e 5. a HP do grupo V, associada a mecanismos e causas multifatoriais (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação da HP (adaptada e traduzida).

Classificação por grupos da Hipertensão Pulmonar - Nice, 2013.

1- Hipertensão arterial pulmonar (HAP)

1'- Doença pulmonar veno-oclusiva e/ou hemangiomatose pulmonar capilar

1''- Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

2- Hipertensão pulmonar devida a cardiopatia esquerda

3- Hipertensão pulmonar por pneumopatias e/ou hipóxia

4- Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica

5- Hipertensão pulmonar por mecanismos multifatoriais incertos

Assim sendo, a partir de agora neste texto utilizaremos o conceito de hipertensão arterial pulmonar (HAP) como sendo a síndrome de hipertensão pulmonar que se enquadra no grupo 1 da classificação da OMS, ou grupo pré-capilar da classificação hemodinâmica. A expressão hipertensão pulmonar (HP) define a síndrome que envolve todos os grupos.

2.3.2 - FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA

A área pulmonar endotelial (que mede aproximadamente 200m²) está estrategicamente localizada, visto que recebe todo o débito cardíaco, compreende o elo de ligação entre as duas circulações e ainda autorregula seu tônus vascular via produção de óxido nítrico. As células endoteliais são capazes de perceber o chamado estresse de cisalhamento ao fluxo sanguíneo e iniciar uma resposta a fim de

acomodar rápidas mudanças no fluxo sanguíneo.

É sabido que o balanço entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores está comprometido em situações onde ocorre um aumento de PAP. O aumento pressórico na HP está associado a um aumento da RVP o que resulta em uma progressiva inabilidade do ventrículo direito de sustentar seu débito; culminando em hipertrofia ventricular direita e insuficiência cardíaca direita. A prevalência de disfunção ventricular direita, definida como fração de ejeção de ventrículo direito menor que 45% é maior em indivíduos portadores de HP comparados com qualquer outro grupo de doença terminal pulmonar (SANDOVAL ZÁRATE, 2001).

HP crônica leva a alterações estruturais da vasculatura pulmonar e a um processo de alterações histológicas conhecido com remodelamento vascular. Sob condições fisiológicas, as arteríolas pulmonares são vasos de fina espessura com a camada média ocupando apenas 7% da espessura do vaso. O achado mais importante em vasos que sofreram remodelamento por estímulos crônicos como hipóxia é a chamada 'muscularização' de vasos anteriormente delgados ou não-musculares e o espessamento generalizado da camada média das arteríolas. O espessamento da camada adventícia é resultado da importante proliferação de fibroblastos. Após a resposta proliferativa, existe um aumento do tecido conjuntivo da adventícia principalmente devido à deposição de colágeno, o que seria um mecanismo protetor contra o aumento dos níveis tensionais a que os vasos estão sendo submetidos.

Adicionalmente, dano endotelial direto ou mesmo hiperplasia e fibrose da íntima (neo-íntima) pode também ser detectado (GALIÈ *et al.*, 2013; GALIÈ; PALAZZINI; MANES, 2010).

Avanços alcançados nos métodos propedêuticos, tais como o ecocardiograma (BOSSONE *et al.*, 2005), a tomografia computadorizada do tórax, abrangendo tanto o parênquima como quanto a circulação pulmonar, o estudo hemodinâmico, através do cateterismo cardíaco direito, estudos moleculares, com a identificação de mutações genéticas – como no *bone morphogenetic protein receptor 2* (BMPR2) – nos casos familiares da HAP, levaram ao melhor conhecimento das diferentes formas de HP.

Todas as formas de HP estão associadas com diminuição da sobrevida e da capacidade de exercício. A HAPI tem incidência aproximada de dois a cinco casos por milhão por ano, com relação mulher:homem 1.7:1 e idade média de 37 anos à época do diagnóstico (BARST, R J *et al.*, 1994; PEACOCK *et al.*, 2007).

2.3.3 - EPIDEMIOLOGIA

A média de sobrevida da HAPI foi descrita, inicialmente, pelo Registro Nacional dos Estados Unidos da América, publicado em 1987. Neste registro, que envolveu 194 pacientes de 32 centros, correspondendo ao período de 1981 a 1985, a sobrevida mediana encontrada foi de 2.8 anos e a taxa de mortalidade observada foi de 68, 48 e 34%, respectivamente em um, três e cinco anos. Nos grupos de HP associada a outras doenças, a sobrevida varia com a

doença em questão e sua gravidade (PEACOCK *et al.*, 2007).

Em registro francês, recentemente publicado, incluindo 674 pacientes com HAP, a incidência foi de 15 casos por milhão da população e a prevalência da HAPI foi de 5.9 por milhão da população, com ampla variação regional entre 5 – 25 casos por milhão. A sobrevida média em um ano foi de 88.4%, no grupo total, e 89.3% no grupo incidente de HAPI (HUMBERT *et al.*, 2006), superior àquela prevista pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. A distribuição dos pacientes de acordo com os grupos de HAP demonstrou predominância do grupo da HAPI sobre os casos de doença do tecido conjuntivo, doença cardíaca congênita, hipertensão portal, uso de anorexígenos, infecção pelo HIV e casos familiares (39.2% contra 15.3, 11.3, 10.4, 9.5, 6.2, 4.3 e 3.9%, respectivamente).

Em estudo brasileiro que se referiu a casos de HAP atendidos em dois Centros de Referência em São Paulo, verificou-se que, embora houvesse predominância do Grupo da HAPI (62 pacientes, 50.4%), um número significativo de pacientes era portador de HAP associada à esquistossomose (37 casos, 30.1%), realçando a importância de se conhecer a incidência e prevalência locais dos subgrupos da HAP (LAPA *et al.*, 2006).

2.3.4 - DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A doença se manifesta clinicamente com dispnéia de esforço em praticamente todos os pacientes. Esta geralmente é progressiva,

podendo evoluir para sua presença mesmo em repouso. Outros sintomas são fadiga, dor torácica opressiva, podendo ter caráter anginoso, tonteados, síncope ou pré-síncope, culminando, nos casos avançados, com as manifestações da disfunção ventricular direita: ingurgitamento jugular, hepatomegalia, ascite, edema de membros inferiores (BARST, ROBYN J *et al.*, 2004). O tempo médio decorrido entre o início de sintomas e o diagnóstico é variável. No estudo brasileiro citado anteriormente este período foi de 20 meses.

A HP é confirmada hemodinamicamente através do cateterismo cardíaco direito com manometria das cavidades direitas, artéria pulmonar e pressão de oclusão da artéria pulmonar. Ele deve ser realizado para confirmação do diagnóstico e exclusão de outras doenças especialmente nos pacientes do Grupo I e IV e constitui o método de escolha para definição final do caso e discriminador de medidas terapêuticas subsequentes.

O tratamento apropriado da HP depende da identificação correta dos fatores etiológicos e da doença de base. As medidas gerais e de suporte clínico como limitação da atividade física, vacinação para *influenza* e antipneumocócica, orientações sobre contracepção para pacientes do sexo feminino, oxigenoterapia suplementar e uso de diuréticos e anticoagulantes são fundamentadas em ensaios clínicos utilizando principalmente pacientes portadores de HAP devem ser particularizadas (HOETTE; JARDIM; SOUZA, 2010; “Treatment of pulmonary hypertension”, 2005).

O tratamento farmacológico específico inclui um elenco de drogas

recentemente incorporadas ao arsenal terapêutico e já amplamente testadas em diversos ensaios clínicos. Novamente, estes ensaios clínicos para terapia específica para HP foram realizados em pacientes portadores de HAP. Estão disponíveis quatro classes de medicamentos: os bloqueadores de canais de cálcio (MCLEOD; JEWITT, 1986; ZĂGREANU *et al.*, 1987; MATHEW; GUZOWSKI; GLOSTER, 1990); os análogos da prostaciclina (ALPERT *et al.*, 1994; SIMONNEAU, GÉRALD *et al.*, 2008; VALDES *et al.*, 2009); os antagonistas dos receptores da endotelina e os inibidores da fosfodiesterase 5 (PAUVERT *et al.*, 2004; RUIZ *et al.*, 2006; SERRES *et al.*, 2006; SIMONNEAU, GÉRALD *et al.*, 2008).

Os bloqueadores do canal de cálcio são utilizados em doses progressivas, porém, como podem apresentar resposta sistêmica significativa, estão restritos aos pacientes que obtiveram resposta positiva ao teste de vasorreatividade pulmonar (BARST, ROBYN J *et al.*, 2004; GALIÈ *et al.*, 2013). Quanto aos análogos da prostaciclina existem opções com apresentação intravenosa (epoprostenol), subcutânea (treprostinil), inalatória (iloprost) e oral (beraprost). Este foi o primeiro grupo de drogas aprovado para uso com comprovada vasodilatação pulmonar específica, contribuíram com significativa melhora da sobrevida dos pacientes. Os antagonistas dos receptores de endotelina apresentam bom impacto na melhora clínica e melhora da qualidade de vidas dos pacientes, reduzindo inclusive a taxa de mortalidade da doença. Compreendem os medicamentos disponíveis em formulação oral bosentan,

sitaxsentan e ambrisentan. Já os inibidores da fosfodiesterase-5 compreendem as drogas aprovadas sildenafil e tadalafil, são drogas relativamente seguras e bem toleradas.

2.4- SRA E HAP

A relação entre o SRA e a HAP embora evidente, ainda não foi estudada e abordada de forma ampla e definitiva em humanos, contemplando o SRA revisado e atual. Cabe ressaltar que modelos animais, principalmente aqueles que utilizam monocrotalina e bleomicina como indutores de HAP tem tido enorme sucesso em mostrar íntima relação entre SRA e HAP, inclusive com alguns estudos mostrando terapias efetivas. Como exemplo podemos citar o uso de ativadores da ECA2 como o XNT (FERREIRA *et al.*, 2009a), diminazeno (DIZE) (RIGATTO *et al.*, 2013; SHENOY *et al.*, 2013) e resorcinolnaftaleína (LI *et al.*, 2012a, 2013), assim como a terapia gênica (GROBE *et al.*, 2007a; SHENOY *et al.*, 2010a; YAMAZATO *et al.*, 2009) com superexpressão da ECA2 que apresentam em sua maioria resultados promissores com desfechos analisados (melhora da insuficiência cardíaca direita, melhora da pressão de artéria pulmonar e melhora do padrão anatomopatológicos dos vasos pulmonares) em animais.

A superexpressão de Ang1-7, um dos peptídeos principais que formam o eixo vasoprotetor do SRA, assim como da ECA2 também obtiveram sucesso no tratamento de modelos animais para HAP, com reversão do benefício através do bloqueio do receptor Mas

(GROBE *et al.*, 2007b).

Não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse a atividade e concentração transpulmonar de componentes do SRA assim como ele é conhecido hoje em humanos portadores de HAP, embora o método de avaliar os componentes na diferença arteriovenosa do sistema ou órgão estudado já tenha sido utilizada com sucesso nos rins (RAIZADA *et al.*, 2007) e circulação coronariana (CAMPBELL *et al.*, 2004; ZISMAN *et al.*, 2003).

Durante os últimos anos, a partir do reconhecimento dos novos integrantes do SRA, descrito anteriormente em detalhes, e principalmente da caracterização de um novo eixo (ECA2/Ang1-7/Mas e Alamandina), dito vasoprotetor, processos fisiológicos e a fisiopatologia de diversas doenças estão sendo amplamente revisados.

Inicialmente esta revisão se fez basicamente nos processos e doenças onde a participação do SRA já estava estabelecida, porém com a recente observação de que existem SRA que atuam de forma parácrina e até mesmo autócrina e que diversos tecidos e sistemas tem capacidade intrínseca para produção e modulação dos diversos componentes (tanto enzimas quanto peptídeos e receptores) do SRA revisado (MARSHALL, 2003), a gama de áreas para investigação ampliou-se enormemente.

Nesta linha de raciocínio, o pulmão e as doenças pulmonares, cuja participação estava limitada ao local de conversão do peptídeo AngI em AngII por ação da ECA, ganhou grande destaque nas

pesquisas.

Atualmente sabe-se que no pulmão temos todas as ferramentas necessárias para produção e regulação dos componentes do SRA. A partir deste novo conhecimento, a fisiopatologia das doenças pulmonares está sendo amplamente investigada. Notadamente a lesão pulmonar aguda (de etiologia hipóxica ou infecciosa), a síndrome respiratória aguda grave (SARS - *severe acute respiratory syndrome*) (HAMMING *et al.*, 2007; KUBA; IMAI; PENNINGER, 2006), a fibrose pulmonar, o câncer de pulmão e a HAP, objeto de estudo deste trabalho.

No que diz respeito à HAP, a hipótese que o desbalanço entre os eixos vasoconstritor e vasoprotetor do SRA já foi testada e confirmada em inúmeros modelos animais (notadamente aqueles geneticamente modificados e com HAP e fibrose pulmonar induzida por MCT e bleomicina). O desbalanço ficou caracterizado pelo aumento da expressão tecidual dos peptídeos vasoconstritores e diminuição dos vasodilatadores. A atividade e expressão da ECA que tardiamente encontra-se diminuída nos modelos animais de HAP aparentemente apresentam aumento inicial tido como efeito fisiológico compensatório (FERREIRA *et al.*, 2009b). No entanto a real proporção e tendência destes componentes no proposto sistema local tecidual ou plasmático do SRA pulmonar ainda não foi completamente estabelecido em humanos portadores de HAP. Existem inúmeras revisões bibliográficas que versam sobre o tema e que podem ser de interesse (BRADFORD; ELY; RAIZADA, 2010;

DE MAN *et al.*, 2012a; FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA; BADER; SANTOS, 2012; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013; KAPARIANOS; ARGYROPOULOU, 2011b; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; SHENOY *et al.*, 2011).

Foi realizada revisão bibliográfica a fim de estabelecer evidências científicas entre o SRA ampliado e a hipertensão arterial em trabalhos experimentais e clínicos em humanos e modelos experimentais até agosto de 2014. O resultado desta revisão retornou treze estudos em animais (principalmente ratos) e apenas quatro estudos em humanos. A seguir sob a forma de tabelas estão os principais resultados observados. Como legenda temos * quando a alteração no desfecho observado é significativa no grupo caso em relação ao controle (ou no modelo em relação ao controle) e # quando o grupo caso tratado tem o desfecho alterado significativamente. O símbolo † foi usado para demonstrar significância estatística entre o grupo caso tratado e o controle quando for o caso. NS descreve desfecho que não apresentou significância estatística e as iniciais P, C e Sg indicam abreviaturas da fonte dos materiais analisados, sendo P e C teciduais referentes a pulmão e coração, respectivamente, e Sg para sanguíneo.

Tabela 2 - Artigos sobre HP e SRA em animais.

AUTORES	ANO	MODELO	TRATAMENTO	DEFECHOS OBSERVADOS								
				Hemod.	Histopat.	mRNA	Fonte	Proteína	Fonte	Atividade	Fonte	
Keane PM et al.	1982	- MCT rato - Hipóxia rato		*	*						↓ ECA * NS	(P) (Sg)
Cassis LA et al.	1992	- MCT rato	- Losartana	* e NS	* e NS						↑ Renina # †	(Sg)
Kreutz R et al.	1996	- MCT rato	- Losartana	* e NS	* e NS						ECA ↑ #	(C)
Yamazato Y et al.	2009	- MCT rato	Transf. gênica - ECA2	**	**	Renina ↑ * AT2/AT1 ↑ # † † ECA NS ECA2 NS AT1 NS AT2 NS ECA2/ECA NS	(P) (P) (P) (P) (P) (P) (P)					
Ferreira AJ et al.	2009	- MCT rato	- XNT - A-779	**#	**#	Renina ↑ * ↓ # AOGEN ↑ * ↓ # AT1 ↑ * ↓ # ECA ↑ * ↓ # ECA2 ↑ † Mas ↑ # † † Mas/AT1 ↑ # ECA2/ECA NS	(P) (P) (P) (P) (P) (P) (P) (P)					
Falcão-Pires I et al.	2009	- MCT rato	- Apelina-13	**	**	AngII ↑ * ↓ # Mas ↑ # Ang1-7 ↑ * ↓ #	(C) (C) (Sg)					

Tabela 2 - Continuação.

Shenoy V et al.	2010	- MCT rato - BLEO rato	Transf. gênica - Ang1-7 - ECA2	###	###	ECA ↑* ↓# ECA2 ↑#	(P) (P)			
Han SX et al.	2010	- Exposição ao fumo (rato)		*		ECA ↑* ECA2 ↓* Angll ↑*	(P) (P) (P)			
Johnson JA et al.	2011	- Ligadura da AP camundongo	- rhECA2	*#	*#	Mas ↓* ↑#	(C)			
de Man FS et al.	2012	- MCT rato - Humanos	- Losartana	*#	*#					
Li G et al.	2012	- MCT + pneumectomia (rato)	- Rec	*#	*#	ECA2 ↓* ↑# ↑†	(P)	ECA2 ↓* ↑# ↑†	(P)	ECA2 ↓* ↑# ↑† (P)
Shenoy V et al.	2013	- MCT rato - Hipóxia rato - BLEO	- DIZE - C-16	####	####	ECA ↑* ↓# ECA2 ↑* ECA2/ECA ↑# AT1 ↑* ↓# Mas ↑* ↓# Mas/AT1 ↑#	(P) (P) (P) (P) (P) (P)	ECA2 ↑* ↓# AT1 ↑* ↓#	(P) (P)	
Li G et al.	2013	- MCT + pneumectomia (rato)	- Rec - A-779	###	###	ECA ↑* ↓# Angll ↑* ↓# ECA2 ↓* ↑# ↑† Ang1-7 ↑# ↑† ECA/ECA2 ↑* ↓# Angll/Ang1-7 ↑* ↓# ↓†	(P) (P) (P) (P) (P) (P)			

Tabela 3 - Artigos sobre HP e SRA em humanos.

AUTORES	ANO	DESENHO	Observação	DEFECHOS OBSERVADOS
Takahashi Y et al.	2010	- HAP-DTC (5) e - não-HAP (37)	Obs.: - Não foi comparado (HAP vs não-HAP) - Inibidor endógeno? - Diagnóstico HAP	Atividade ECA2 ↓ (vasculopatas vs DTC e controles) IgG anti-ECA2 no soro de vasculopatas
				Proteína AngII/Ang 1-7 ↑ *
Johnson JA et al.	2011	- HAP (11) - Controles (9)		
Dai H et al.	2013	- Cardiopatas (104): 55 não-HAP 25 HP leve-moderada 24 HP grave - Controles (33)	Obs.: - Atividade ECA2? HP grave > 50mmHg	- ECA2 ↓ * (dois controles) - ECA2 ↓ HP leve-moderada vs grave - Correlação negativa entre PAPm e ECA2
Dai H et al.	2014	-Cardiopatas (90): 27 não-HAP 42 HP leve-moderada 21 HP grave - Controles (30)	Obs.: - Sem uso de coquetel inibidor de protease	- Ang1-7 ↓ * (dois controles) - Ang1-7 ↓ HP leve-moderada vs grave - Correlação negativa entre PAPm e Ang 1-7

Objetivos

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

- Medir as concentrações séricas de peptídeos e atividade de enzimas do SRA na circulação pulmonar e sistêmica de pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar e pacientes controles.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir a relação entre os eixos vasoprotetor e vasoconstritor do sistema renina angiotensina através da mensuração dos peptídeos (AngI, AngII, Ang1-7 e Ala) e das atividades das enzimas (renina, ECA1 e ECA2).

- Quantificar estas relações na circulação pulmonar e sistêmica.

- Estabelecer o perfil destas relações nos pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar.

- Avaliar a possível atuação parácrina do sistema renina angiotensina no leito pulmonar.

- Estabelecer um padrão para posteriores comparações e um método objetivo para avaliação do sistema renina angiotensina em portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Materiais e Métodos

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- SELEÇÃO DE PACIENTES

De maio de 2013 a fevereiro de 2014 foram selecionados 12 pacientes que iriam se submeter a exames de cateterismo cardíaco direito e manometria no setor de Hemodinâmica localizado no andar térreo do Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Eles se enquadravam aos critérios de inclusão e exclusão do projeto de estudo proposto e apresentados a seguir. Foram entrevistados antes do procedimento onde o estudo, seus objetivos e seus métodos foram categoricamente explicados; foram dadas ainda explicações adicionais para as dúvidas existentes, feita a leitura e assinatura do Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) anexo a este texto (Anexo 1).

A seleção de pacientes foi feita por livre demanda do hospital no período mencionado.

Critérios de Inclusão:

- A - Ter idade entre 18 e 75 anos;
- B - Não apresentar déficit cognitivo;
- C - Ser portador de HAP, pré-capilar ou pós-capilar reativa;
- D - Ter indicação clínica para realização do cateterismo cardíaco direito e manometria;
- E - Concordância em participar do trabalho, assinatura do TCLE.

Critérios de Exclusão:

A - Instabilidade hemodinâmica, complicação das punções vasculares ou qualquer outra intercorrência que inviabilize a realização do teste;

B - Ser sabidamente portador de HP secundária a doença cardíaca esquerda, doença trombótica ou tromboembólica crônica;

C - Estar em uso de medicamentos inibidores da enzima de conversão da angiotensina.

Vale ressaltar que originalmente o desenho do estudo não contemplava o grupo controle e que portanto todos os pacientes selecionados para a realização do procedimento e participação no estudo respeitaram os mesmos critérios de inclusão e exclusão exceto pelo item C dos critérios de inclusão, visto que os pacientes obtidos para compor o grupo controle não apresentaram HAP ao cateterismo cardíaco.

4.1.1- Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa (COEP) da UFMG antes de ser implementado. CAAE - 0594.0.203.000-11.

4.2- PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

O levantamento bibliográfico compreendeu o período de janeiro 2000 a agosto de 2014 e foi realizado por meio das bases de dados

MEDLINE (via PubMed) , LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), IBECs (Índice Bibliográfico Espanhol de Ciências da Saúde) e Biblioteca Cochrane. Trabalhos anteriores a 2000, bem como artigos não indexados, foram obtidos por busca direta.

4.3- COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Durante o procedimento de cateterismo cardíaco direito e manometria, dois acessos centrais para servirem de coleta de amostras de sangue e vias de trabalho são necessários. Geralmente opta-se pela técnica de punção venosa e arterial dos vasos femorais direitos. A veia femoral direita serve então de acesso para introdução de cateter até o tronco da artéria pulmonar e posteriormente à artéria pulmonar propriamente dita. A artéria femoral direita serve de acesso ao cateterismo da raiz da aorta, e ventrículo esquerdo quando necessário.

Assim que as punções foram realizadas e os cateteres devidamente posicionados sob orientação de fluoroscopia, amostras de sangue são rotineiramente colhidas e as medições das pressões das diversas cavidades cardíacas e vasos sanguíneos via transdutor pressórico são realizadas. Neste momento uma amostra adicional de 16 mililitros de cada cateter foi colhida para a realização do estudo. O sangue colhido do cateter posicionado no tronco da artéria pulmonar é uma amostra recém chegada da circulação sistêmica, enquanto que aquele colhido pelo cateter posicionado na

raiz da aorta reflete a circulação pulmonar.

As duas amostras eram então acondicionadas em três tubos de ensaio (um contendo heparina, outro EDTA e outro um coquetel de inibidores de proteases) a fim de realizar o processamento das mesmas e congelamento para posterior análise.

No laboratório de endocrinologia da Faculdade de Medicina da UFMG as amostras puderam ser processadas e congeladas poucos minutos após sua coleta. O transporte das amostras entre o hospital e laboratório era realizado por meio de caixas de isopor isolante e gelo. As amostras foram então centrifugadas durante 21 minutos sob velocidade de 1500 rotações por minuto (rpm) e temperatura de 6^oC e o plasma posteriormente fracionado em duas alíquotas de aproximadamente 1,5mL. As amostras foram então devidamente identificadas e congeladas em freezer a -80^oC até a realização dos ensaios.

4.4- EXAME QUANTITATIVO DOS PEPTÍDEOS

Para quantificação dos peptídeos AngI, AngII, Ang1-7 e Ala foi utilizado método de espectrometria de massa. As amostras colhidas em tubos de ensaio contendo coquetel inibidor de proteases foram descongelados e homogenizadas. Etapa inicial consiste de extração protéica realizada no Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG para posterior envio ao laboratório do INCT N-BIOFAR para efetiva mensuração.

4.4.1- EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS

Para a realização da dosagem direta dos peptídeos e também para a dosagem de AngI para a mensuração da atividade de renina as amostras devem sofrer processo de extração de proteínas conforme descrito detalhadamente no apêndice 1. Após a extração de proteínas as amostras devidamente identificadas foram liofilizadas durante centrifugação por 24 horas e encaminhadas ao laboratório INCT N-BIOFAR para ressuspensão das amostras e análise em espectômetro de massa.

4.4.2- ESPECTROMETRIA DE MASSA

Ao chegarem ao laboratório INCT N-BIOFAR as amostras foram ressuspensas em 60µL e homogeneizadas para posterior análise de alíquotas de 5 ou 10µL. Para cada um dos peptídeos foram montadas curvas-padrão de concentração com relação a área detectada pelo teste, e a partir destas curvas as concentrações dos peptídeos puderam ser aferidas em pg/mL.

4.5- ENSAIO ENZIMÁTICO - ATIVIDADE DA RENINA

Para cada amostra, foram feitos dois ensaios compostos por alíquotas de plasma de 100µL, tampão de Ang I, 8-OH-quinoleína (48mM) e PMSF (16,1mM), que foram incubados durante 2h. Um ensaio foi incubado no gelo e o outro incubado a uma temperatura

de 37°C, simultaneamente. Depois, as reações foram interrompidas e uma alíquota desses ensaios foi incubada novamente com vários outros tampões, inclusive com o anticorpo para Angl. Foi realizado ensaio enzimático cronometrado das amostras em duplicatas. As amostras resultantes passaram por processo de extração de proteínas conforme protocolo descrito anteriormente para envio para quantificação dos peptídeos envolvidos pelo método de espectrometria de massa. A atividade enzimática é dada em pg/mL/h de Angl.

4.6- ATIVIDADE DA ECA E ECA2

A atividade das ECA e ECA2 foram mensuradas por meio de ensaios fluorimétricos. As amostras de plasma dos pacientes colhidas em heparina foram descongeladas e homogeneizadas.

O substrato Hip-His-Leu foi utilizado para determinação da atividade enzimática da ECA e sua atividade foi expressa em η moles/mL de plasma.

O substratos fluorogênicos da *R&D Systems* (Minneapolis, MN, EUA) (ECA2: ES007) foram utilizados para determinação da atividade enzimática da ECA2.

Os protocolos para medida das atividades das ECA e ECA2 constam do apêndice 2.

4.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram utilizados cálculos de análise

descritiva para todas as variáveis do estudo (demográficas, clínicas e mensuração da concentração de peptídeos e atividades enzimáticas). Além da análise descritiva foram utilizados os testes estatísticos de t para comparações pareadas ou não de variáveis paramétricas segundo observação da distribuição gaussiana pelos testes de normalidade *D'Agostino & Pearson omnibus*. Para variáveis não paramétricas foram utilizados os testes de *Wilcoxon* e *Mann-Whitney* para dados pareados e não pareados, respectivamente.

Significância estatística foi atribuída a valor de p menor que 0,05.

Resultados

5- RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo nove pacientes portadores de HAP e três pacientes controles com suspeição clínica de HP que não se confirmou durante a realização do cateterismo e manometria cardíacos direitos. Os procedimentos foram realizados no serviço de hemodinâmica do HC-UFMG de maio de 2013 e fevereiro de 2014. Todos os pacientes que participaram do estudo como casos pertenciam ao grupo 1 da classificação da HP: sendo portanto portadores de HAP; até a realização do exame nenhum deles apresentava nenhum estado clínico ou doença associada a HP, considerados como HAPI.

Durante a seleção de pacientes e coleta de amostras optou-se por excluir dados de dois pacientes, um caso e um controle, já que ambos não se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão do estudo, embora a coleta de material já houvesse sido realizada. Um destes pacientes era portador de drepanocitose (grupo 5 de classificação da HP) e tinha apenas 16 anos enquanto o outro tinha 82 anos.

Não foi possível obter os resultados de duas medições de AngII por falha do aparelho que faz as leituras. Por isso as comparações e análises estatísticas que utilizam a variável AngII contam com dois valores a menos dentre os casos quando se trata de amostras provenientes da aorta e um quando do tronco da artéria pulmonar.

Durante a leitura dos resultados do ensaio da atividade de renina

descrito na seção anterior, amostras provenientes de cinco pacientes, sendo quatro casos e um controle, resultaram em leitura indetectável e portanto adotou-se como atividade enzimática destas amostras como zero. Nas comparativas por diferença, o valor zero pode ser adotado. Porém, isto fez com que as comparações realizadas por razões (*ratios*) tivessem que ser desconsideradas, uma vez que a utilização de razões com um dos elementos tendo valor zero perde seu valor prático.

Os valores obtidos pelo ensaio para medição da ECA2 resultaram como indetectáveis e portanto não serão apresentados nesta seção.

5.1- Análise Estatística descritiva

5.1.1- Gênero

Dentre os casos, 6 foram mulheres (66,6%) e 3 homens (33,3%).

Dentre os controles, havia somente mulheres.

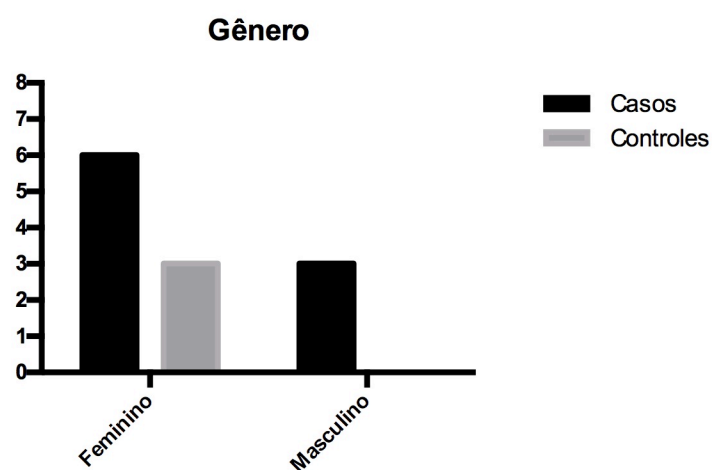


Figura 3: Distribuição de frequência pacientes da amostra quanto ao gênero separada por grupos.

Não houve pacientes masculinos no grupo controle.

5.1.2- Idade

A média de idade nos casos foi de 55,44 anos, variando de 29 a 75, enquanto nos controles a média de idade foi de 45,67 anos, variando de 27 a 64.

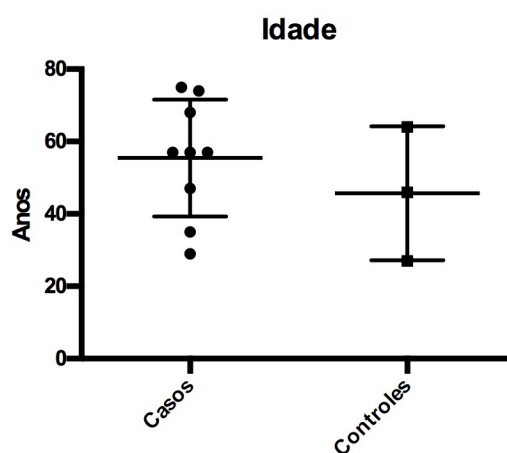


Figura 4: Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto à idade separada por grupos.

5.1.3- Peso

A média de peso entre os casos foi de 65,08Kg (44-96Kg) enquanto entre os controles foi de 50,63 (31,4-71,5Kg).

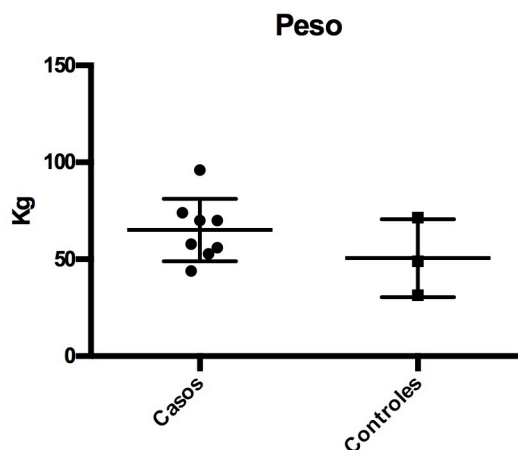


Figura 5: Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto ao peso separada por grupos.

5.1.4- PAPm e classificação da HAP

A HP leve foi considerada como PAPm de 25 a 35mmHg, HP moderada de 36 a 45mmHg e HP grave ≥ 46 mmHg.

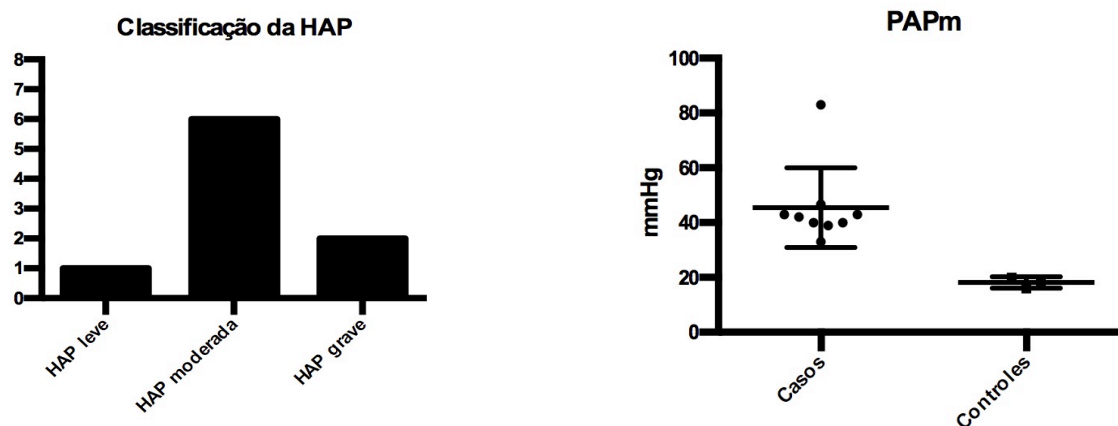


Figura 6: Representação da distribuição de frequência e cálculos da amostra quanto à PAPm e classificação da HAP.

5.1.5- Peptídeos e enzimas do SRA

Segue-se tabela composta dados e cálculos estatísticos: média, tamanho (N), desvio-padrão ou *standard deviation* (SD), valor mínimo (Mín.) e máximo (Máx.).

TABELA 4: Representação da análise estatística descritiva das variáveis estudadas na amostra e por grupos.

Variável	N	Média	SD	Mín.	Máx.	Grupo	N	Média	SD	Mín.	Máx.
Peptídeos											
Angl Aorta	12	3,05	2,48	0,41	7,64	Casos	9	2,92	2,7	0,41	7,65
						Controles	3	3,46	2,1	1,47	5,65
Angl Pulmonar	12	2,43	1,49	0,46	6,23	Casos	9	2,01	0,98	0,46	3,21
						Controles	3	3,70	2,249	1,93	6,23
AngII Aorta	10	223,9	187,2	4,09	490	Casos	7	235	213,4	4,087	490
						Controles	3	198,1	140,5	104,7	359,7
AngII Pulmonar	11	313,8	241,1	83,92	772,5	Casos	8	282,9	217,7	82,92	602,4
						Controles	3	395,9	332,9	140,5	772,5
Ang1-7 Aorta	12	121,3	163,7	26,14	598,1	Casos	9	149,4	182,4	38,5	598,1
						Controles	3	37,02	13,09	26,14	51,55
Ang1-7 Pulmonar	12	76,33	60,92	20,83	194,8	Casos	9	94,06	60,72	26,19	194,8
						Controles	3	23,15	2,76	20,83	26,21
Ala Aorta	12	2,25	2,12	0,36	8,15	Casos	9	2,53	2,37	0,68	8,15
						Controles	3	1,403	0,92	0,36	2,13
Ala Pulmonar	12	6,1	13,29	0,04	47,22	Casos	9	8,07	15,01	0,86	47,22
						Controles	3	0,19	0,22	0,04	0,45
AngII/Ang1-7 Aorta	10	3,97	3,89	0,048	10,78	Casos	7	3,14	3,67	0,05	8,59
						Controles	3	5,92	4,45	2,03	10,78
AngII/Ang1-7 Pulmonar	10	6,93	8,70	0,75	29,48	Casos	7	2,92	1,91	0,75	5,78
						Controles	3	2,83	0,23	2,66	3,09
Enzimas											
Renina Aorta	12	7,78	8,62	0,53	27,91	Casos	9	3,83	4,62	0	12,94
						Controles	3	11,84	14,43	0	27,91
Renina Pulmonar	12	12,36	15,78	0,36	54,43	Casos	9	7,15	6,36	0	18,79
						Controles	3	19,75	30,13	0	54,43
ECA Aorta	12	255,6	94,28	114,9	455,5	Casos	9	274,3	99,72	114,9	455,5
						Controles	3	199,8	53,58	137,9	232,2
ECA Pulmonar	12	249,9	94	116,2	439,4	Casos	9	267,5	102	116,2	439,4
						Controles	3	197,4	37,78	161,3	236,6

Os dados são expressos em pg/mL (peptídeos) ou ηmoles/ mL de plasma (enzimas)

Em seguida apresenta-se também comparação entre as variáveis sociodemográficas e clínicas da amostra e separadas por grupos. Além da representação por tabela, nas subseções a seguir encontram-se gráficos da distribuição das frequências das variáveis

sociodemográficas e clínicas, além da média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo.

5.2- ANÁLISE UNIVARIADA

5.2.1- Comparação entre variáveis do SRA medidas no tronco da artéria pulmonar e na raiz da aorta dos casos

A seguir apresentam-se gráficos com a representação das médias e do erro padrão da média ou *standard error of the mean* (SEM) de peptídeos e enzimas do SRA. Foi realizado teste t pareado e paramétrico visto que as variáveis obedeciam a uma distribuição gaussiana quando aplicado teste de normalidade *D'Agostino & Pearson omnibus*. Os cálculos estatísticos referentes a esta comparação estão disponíveis na tabela 5.

Não houve diferença significativa entre as concentrações dos peptídeos ou das enzimas do SRA entre os pacientes com HAP.

Os coeficientes de correlação da diferença transpulmonar do peptídeo Ala e das enzimas renina e ECA obtiveram significância estatística, embora não tenham alcançado esta mesma significância quando da realização do teste t pareado, fato este que motivou a análise entre as razões das medidas dos componentes do SRA em seção posterior, subseção 5.3.

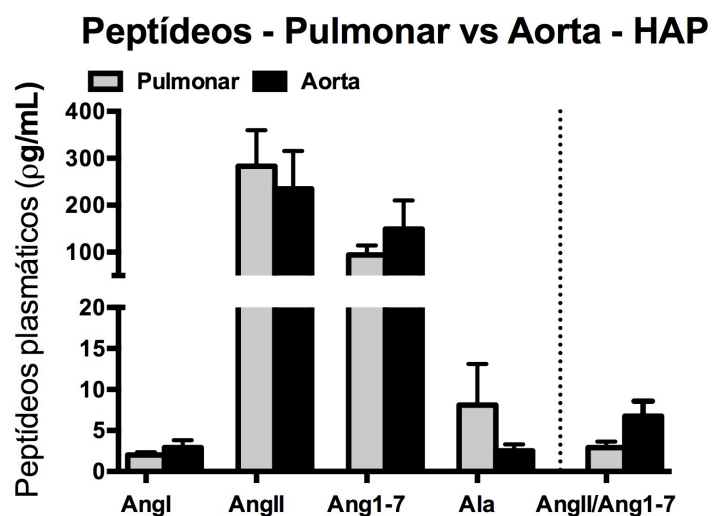


Figura 7 - Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos na aorta e artéria pulmonar de pacientes portadores de HAP.

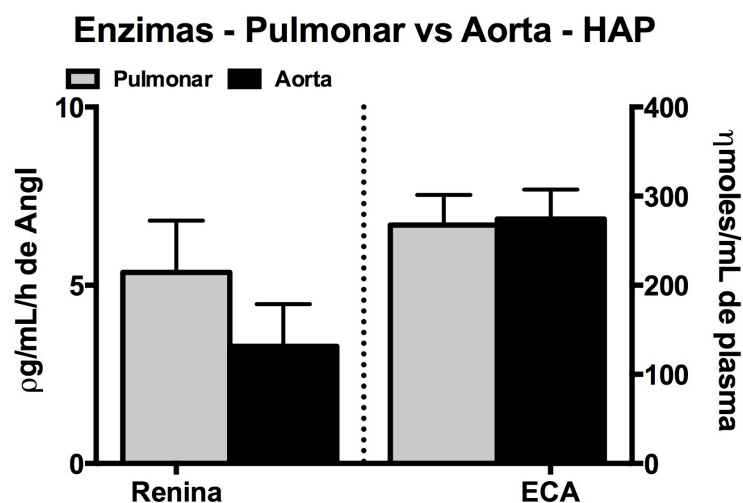


Figura 8 - Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta e artéria pulmonar de pacientes portadores de HAP.

Tabela 5: Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na aorta e artéria pulmonar entre os casos.

Variável	N	Valor de p	Média das diferenças	SD diff (standard deviation das diferenças)	95% IC (intervalo de confiança)	Coefficiente de correlação (r)
AngI	9	0,3645	0,9076	2,832	-1,269 a 3,084	0,04446
AngII	7	0,4874	-69,36	248,1	-298,8 a 160,1	0,3632
Ang1-7	9	0,3236	55,31	157,7	-65,94 a 176,6	0,5450
Ala	9	0,2311	-5,543	12,83	-15,41 a 4,321	0,9311** (p=0,0001)
AngII/Ang1-7	7	0,8769	0,2174	3,559	-3,074 a 3,509	0,3173
Renina	9	0,3469	-3,319	9,965	-10,98 a 4,34	-0,6382* (p=0,0322)
ECA	9	0,5404	6,8	31,9	-17,72 a 31,32	0,9503 (p<0,0001)***

5.2.2- Comparação entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar e na raiz da aorta dos controles

Foi aplicado teste pareado não paramétrico para a comparação entre os controles tendo em vista o número de pares existentes que sequer permitiu a aplicação de testes de normalidade. O teste de *Wilcoxon* foi realizado para comparação entre as medidas dos peptídeos e enzimas do SRA medidas no tronco da artéria pulmonar e raiz da aorta, e os cálculos estatísticos são apresentados na tabela 6.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações transpulmonares dos peptídeos e das enzimas do SRA medidas nos controles.

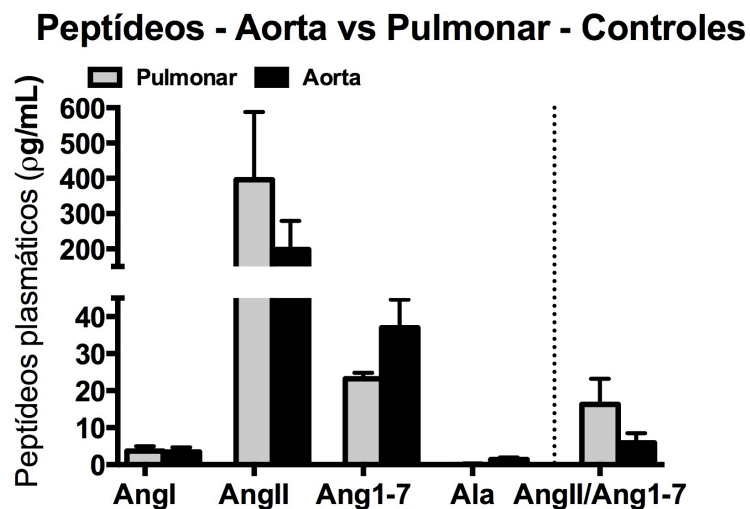


Figura 9 - Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos na aorta e artéria pulmonar de pacientes controles.

Enzimas - Aorta vs Pulmonar - Controles

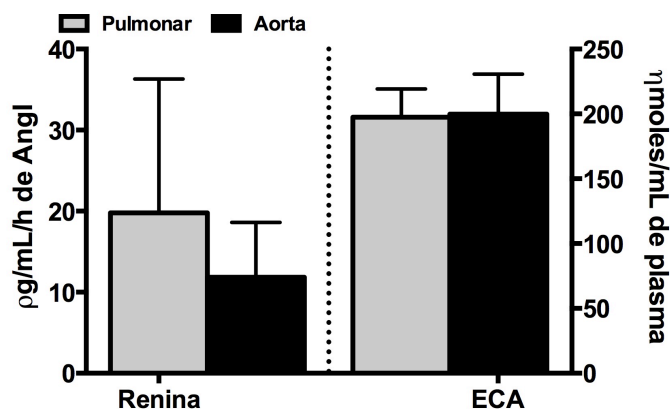


Figura 10 - Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta e artéria pulmonar de pacientes controles.

Tabela 6: Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na aorta e artéria pulmonar entre os casos.

Variável	N	Valor de p	Mediana das diferenças	95% IC	Coefficiente de correlação (rs) de Spearman
AngI	3	0,75	-0,5862	-1,473 a 1,331	0,5
AngII	3	0,25	-145,1	-412,8 a -35,76	1
Ang1-7	3	0,25	7,171	5,313 a 29,13	0,5
Ala	3	0,25	1,630	0,3169 a 1,675	1
AngII/Ang1-7	3	0,25	-8,233	-18,7 a -4,236	1
Renina	3	>0,9999	0,0	-46,82 a 23,08	0,5
ECA	3	>0,9999	-4,488	-23,36 a 34,88	1

5.2.3- Comparação entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar entre casos e controles

Para esta comparação não pareada e considerada não paramétrica (pelos mesmos motivos mencionados anteriormente) foi utilizado teste de *Mann-Whitney*.

Foram encontradas diferenças significativas nas concentrações medidas no tronco da artéria pulmonar dos peptídeos Ang1-7 ($p=0,0182$), Ala ($p=0,0091$) e da relação AngII/Ang1-7 ($p=0,0167$)

entre casos e controles.

As diferenças apontam para uma maior concentração dos peptídeos Ang1-7 e Ala nas artérias pulmonares de portadores de HAP quando comparada à dos controles. A relação entre os peptídeos AngII e Ang1-7 medidos na artéria pulmonar foi significativamente maior em controles quando comparada aos portadores de HAP.

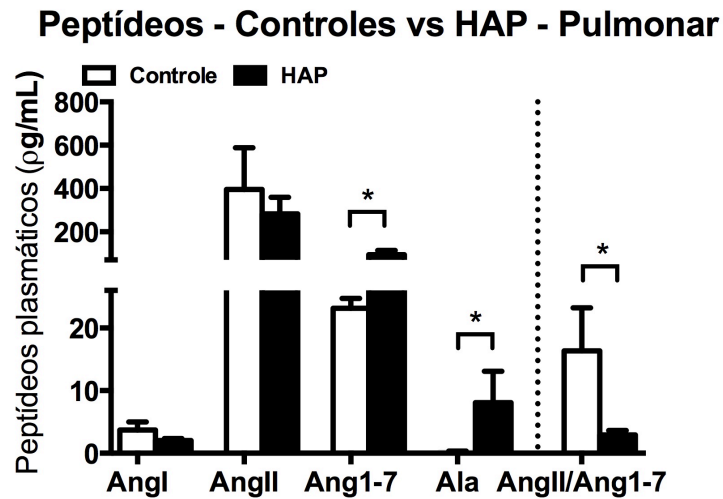


Figura 11 - Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos artéria pulmonar de pacientes controles e portadores de HAP.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Enzimas - Controles vs HAP - Pulmonar

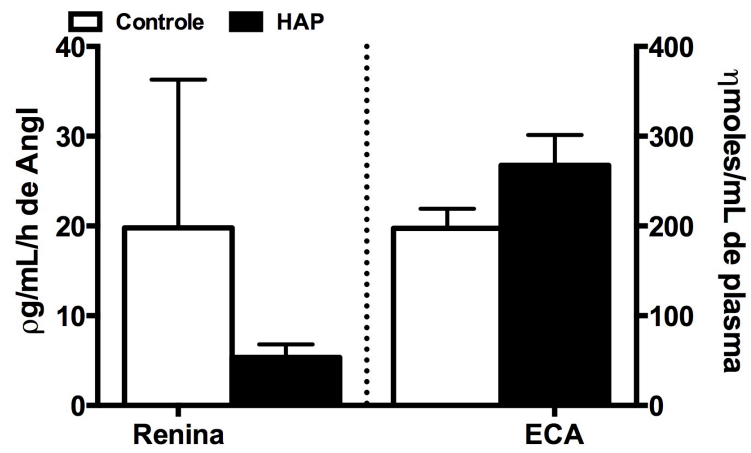


Figura 12 - Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na artéria pulmonar de pacientes controles e portadores de HAP.

TABELA 7: Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na artéria pulmonar entre casos e controles.

Variável	N	Valor de p	Diferença das Medianas	IC da diferença (%)
AngI	9 vs 3	0,28	-0,5421	-5,32 a 1,13 (96,36%)
AngII	8 vs 3	0,38	-126,2	-298,8 a 160,1 (95,15%)
Ang1-7	9 vs 3	0,02*	69,11	3,78 a 172,4 (96,36%)
Ala	9 vs 3	0,009**	1,901	0,77 a 47,13 (96,36%)
AngII/Ang1-7	7 vs 3	0,02*	-10,45	-28,72 a -0,49 (96,67%)
Renina	9 vs 3	>0,9999	0,7	-54,07 a 13,96 (96,36%)
ECA	9 vs 3	0,32	83,74	-78,13 a 245,1 (96,36%)

* p<0,05; ** p<0,01

5.2.4- Comparação entre as variáveis medidas na raiz da aorta de casos e controles

Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. A concentração na aorta do peptídeo Ang1-7 foi significativamente menor nos controles quando comparada aos portadores de HAP (p=0,0182). Não houve diferenças significativas observadas pelos teste na comparação entre as outras variáveis medidas na raiz da aorta entre os grupos.

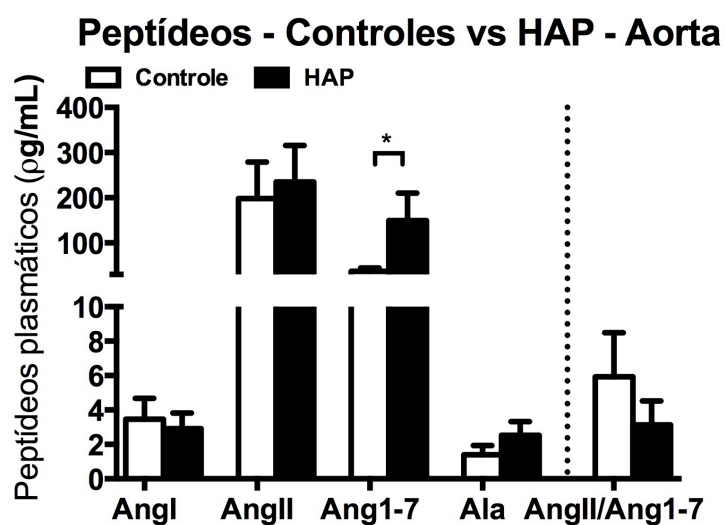


Figura 13 - Comparação entre as concentrações dos peptídeos estudados medidos aorta de pacientes controles e portadores de HAP.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

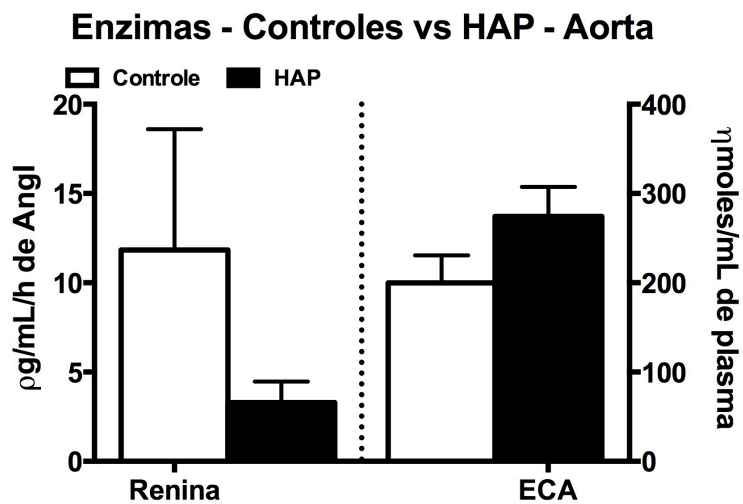


Figura 14 - Comparação entre as atividades das enzimas estudadas medidas na aorta de pacientes controles e portadores de HAP.

Tabela 8: Comparação das concentrações dos peptídeos e enzimas estudados na artéria pulmonar entre casos e controles.

Variável	N	Valor de p	Diferença das Medianas	IC da diferença (%)
AngI	9 vs 3	0,3727	-1,856	-4,515 a 5,763 (96,36%)
AngII	8 vs 3	0,8667	12,26	-355,6 a 385,2 (96,67%)
Ang1-7	9 vs 3	0,0182*	44,79	1,277 a 564,8 (96,36%)
Ala	9 vs 3	0,6273	-0,6139	-1,087 a 6,429 (96,36%)
AngII/Ang1-7	7 vs 3	0,3833	-4,444	-10,73 a 6,557 (96,67%)
Renina	9 vs 3	0,6	-6,006	-27,91 a 9,275 (96,36%)
ECA	9 vs 3	0,1273	17,34	-114,3 a 226,3 (96,36%)

* p<0,05; ** p<0,01

5.3- ANÁLISE UNIVARIADA DA RAZÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PULMONAR E AÓRTICAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Conforme explicitado anteriormente, o tamanho dos grupos, o grau de dispersão das variáveis e a existência de correlação entre algumas variáveis transpulmonares motivou a realização de uma comparação entre a razão pulmonar/aorta. A média destas razões foi então comparadas com uma média teórica de valor igual a um, que significaria ausência de diferença entre os dados comparados (hipótese nula). Médias significativamente diferentes de um e com valor compreendido entre zero e um apontam para uma diferença no sentido de maior concentração da variável estudada na raiz da aorta do que no tronco da artéria pulmonar. O inverso ocorre com médias maiores que um.

5.3.1- Comparação pareada entre as médias das razões pareadas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar e raiz da aorta de casos

Nesta comparação foi encontrada diferença significativa em favor de uma redução transpulmonar da concentração de Ala ($p=0,0481$ e média das razões de 2,27).

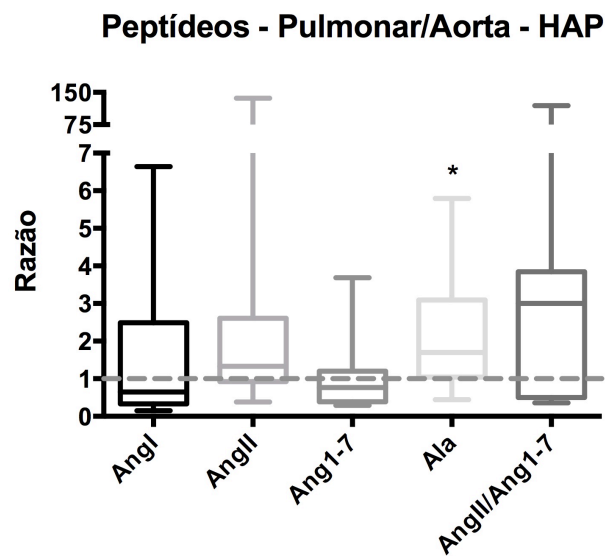


Figura 15 - Comparação entre as razões das concentrações dos peptídeos estudados (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes portadores de HAP.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$

Enzimas - Pulmonar/Aorta - HAP

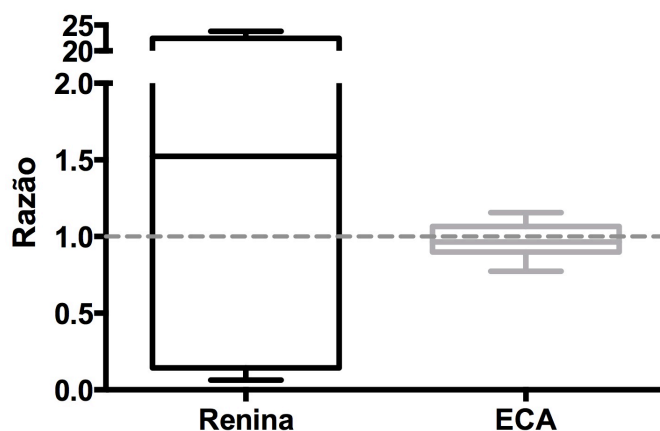


Figura 16 - Comparação entre as razões das atividades das enzimas estudadas (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes portadores de HAP.

Tabela 9: Comparação entre as médias das razões e da média teórica dos peptídeos e enzimas em pacientes portadores de HAP.

Variável	N	Valor de p	Média das razões	SD das razões	Discrepância	95% IC da discrepância
AngI	9	0,3645	1,650	2,08	-0,6504	-0,9481 a 2,249
AngII	7	0,35	20,56	51,07	-19,56	-27,67 a 66,80
Ang1-7	9	0,8703	1,059	1,043	-0,0586	-0,7433 a 0,8605
Ala	9	0,0481*	2,27	1,635	-1,27	0,0134 a 2,527
AngII/Ang1-7	7	0,3318	18,68	44,31	-17,68	-23,3 a 58,65
Renina	6	0,1331	9,124	11,11	-8,124	-3,53 a 19,78
ECA	9	0,5544	0,976	0,1169	0,024	-0,1139 a 0,0658

* p<0,05; ** p<0,01

5.3.2- Comparação pareada entre as médias das razões pareadas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar e raiz da aorta de controles

Foi observado aumento transpulmonar do peptídeo Ang1-7 e redução significativa da relação AngII/Ang1-7 significativos através diferença significativa entre as médias destas razões e a razão teórica de valor igual um (p=0,0028 e média das razões de 0,1301;

p=0,0051 e média das razões de 2,826 respectivamente).

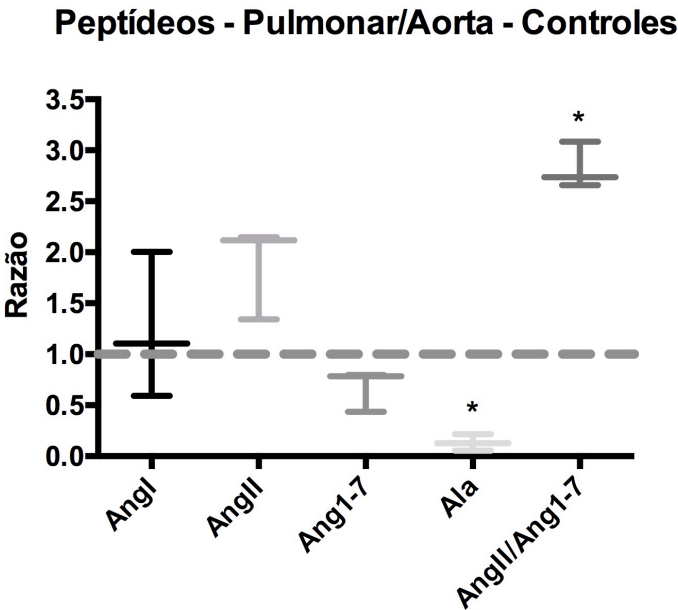


Figura 17 - Comparação entre as razões das concentrações dos peptídeos estudados (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes controles.

* p<0,05; ** p<0,01

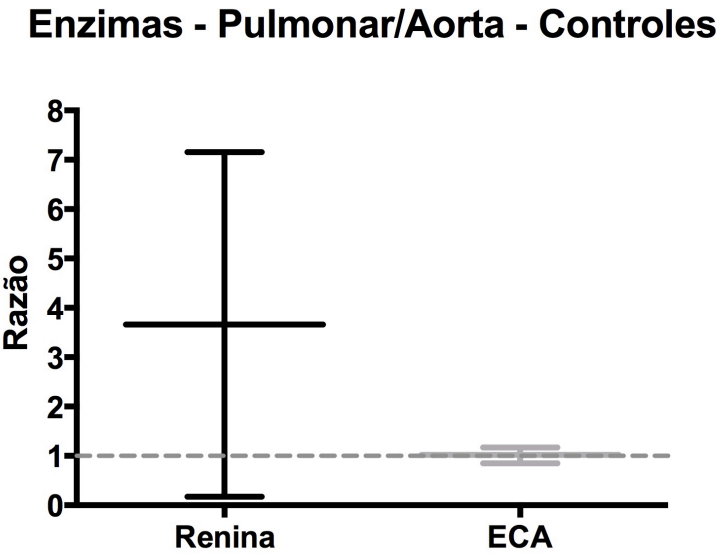


Figura 18 - Comparação entre as razões das atividades das enzimas estudadas (Pulmonar/Aorta) medidas em pacientes controles.

Tabela 10: Comparação entre as médias das razões e da média teórica dos peptídeos e enzimas em controles.

Variável	N	Valor de p	Média das razões	SD das razões	Discrepância	95% IC da discrepância
AngI	3	0,6288	1,233	0,7143	-0,2331	-1,541 a 2,008
AngII	3	0,0812	1,869	0,4572	-0,8691	-0,2666 a 2,005
Ang1-7	3	0,11	0,6722	0,2057	0,3278	-0,8387 a 0,1832
Ala	3	0,0028*	0,1301	0,0801	0,8699	-1,069 a -0,6707
AngII/Ang1-7	3	0,0051*	2,826	0,2274	-1,826	1,261 a 2,391
Renina	2	0,585	3,663	4,936	-2,663	-41,68 a 47,01
ECA	3	0,9078	1,012	0,1609	-0,0121	-0,3876 a 0,4119

* p<0,05; ** p<0,01

5.3.3- Comparação não pareada entre as razões obtidas entre as variáveis medidas no tronco da artéria pulmonar sobre a medida na raiz da aorta entre casos e controles

Para esta avaliação o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado. Os cálculos estatísticos encontram-se na tabela a seguir. Significância estatística entre as razões transpulmonares do peptídeo Ala (p=0,0091) sinaliza para diferenças nas tendências de concentração e diluição transpulmonar entre portadores de HAP e controles.

Tabela 11: Comparação entre as razões Pulmonar/Aorta entre casos e controles.

Variável	N	Valor de p	Diferença entre as medianas
AngI	9 vs 3	0,8636	-0,4566
AngII	7 vs 3	0,5167	-0,7904
Ang1-7	9 vs 3	0,7545	-0,0194
Ala	9 vs 3	0,0091*	1,571

AngII/Ang1-7	7 vs 3	0,8667	0,2674
Renina	6 vs 2	0,6429	0,469
ECA	9 vs 3	0,6	-0,0547

* p<0,05; ** p<0,01

5.4- ANÁLISE MULTIVARIADA

Utilizando teste para múltiplas comparações *ordinary one-way ANOVA*. Foi utilizado modelo com duas variáveis, sendo uma pareada (Pulmonar vs Aorta) e outra não pareada (HAP vs Controles). Nesta análise apenas a comparação entre a relação AngII/Ang1-7 medida na artéria pulmonar entre pacientes portadores de HAP e controles obteve significância estatística (p=0,0068; diferença entre as médias 13,39; CI 95% 3,408 a 23,38).

Discussão

6- DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou a avaliação do SRA revisto e ampliado tal como ele é entendido hoje através da mensuração plasmática de peptídeos e atividade das enzimas que o constituem. Durante a revisão da literatura apresentada em seção anterior ficou evidente que este novo SRA tem sido apontado como um dos principais sistemas homeostáticos do sistema cardiovascular.

Sua interação com as doenças pulmonares, principalmente a HAP, é evidente e é provável que o SRA atue nos três mecanismos principais fisiopatológicos da doença (disfunção endotelial, balanço entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e remodelamento vascular).

Neste estudo foi possível medir peptídeos e atividades enzimáticas de 9 pacientes portadores de HAP e três pacientes controles. Mediu-se os peptídeos AngI, AngII, Ang1-7 e Ala, além das atividades da renina e da ECA. Não foi possível medir a atividade da ECA2 pelo método fluorimétrico descrito. Muito possivelmente isso ocorreu pela presença de inibidor endógeno desta enzima descrito em diversos trabalhos. Um destes utilizou metodologia bastante interessante a fim de caracterizar esse provável inibidor endógeno (PEDERSEN *et al.*, 2011). A dosagem da atividade plasmática da ECA2 tem sido apontada como marcador biológico (EPELMAN *et al.*, 2009) para diversas doenças e sua

diminuição tem sido associada a diversos desfechos desfavoráveis. Na insuficiência cardíaca, de etiologia chagásica ou não, tem valor preditivo para desfechos clínicos comparável ao peptídeo natriurético cerebral BNP (WANG; MOREIRA; *et al.*, 2010). Artigo de revisão recentemente publicado aborda as evidências existentes, métodos de dosagem e elenca as associações já estabelecidas (PATEL; VELKOSKA; BURRELL, 2013).

Em modelos animais para HAP os níveis de RNAm de ECA2 estão diminuídos (SHENOY *et al.*, 2010b). A atividade da ECA2, caso tivesse sido estabelecida neste estudo, teria sido de extrema utilidade, pois há que se pesar que outro fenômeno importante na detecção plasmática desta enzima é o mecanismo conhecido como '*shedding*'. Sabe-se hoje que diversas enzimas transmembranas como a ECA 2 sofrem ação de outras enzimas também de localização transmembrana e perdem seu domínio catalítico para o plasma (podendo ser assim desta forma solúvel medidas no plasma). Parece que existem pelo menos dois tipos de fragmentos solúveis no plasma do domínio catalítico da ECA2, sendo um deles originário de '*shedding*' por enzimas induzidas por estresse inflamatório e oxidativo (PEDERSEN *et al.*, 2011). Uma futura mensuração da atividade desta enzima deve levar em conta estes aspectos.

A atividade de ECA no plasma de pacientes portadores de HAP e controles é controversa na literatura científica com estudos corroborando (HOEPER *et al.*, 2003) ou não os resultados aqui

apresentados (KEANE *et al.*, 1982).

Quanto aos peptídeos dosados, notou-se clara diferença da razão das concentrações de Ala entre amostras coletadas na raiz da aorta e artéria pulmonar tanto em pacientes portadores de HAP quanto em controles. Evidenciou-se, pela primeira vez, que a concentração periférica de Ala está aumentada nos paciente portadores de HAP e que no leito pulmonar, de alguma forma, há significativo *clearance* deste peptídeo. Efeito inverso ocorre nos pacientes controles, em cujos leitos pulmonares parece que há aumento da formação de Ala em relação a sua depuração.

O SRA desregulado é tema de artigo que realizou medições de peptídeos e enzimas em sangue periférico e também os fez no tecido pulmonar. Embora essa metodologia seja interessante (comparação entre concentrações plasmáticas e teciduais), o estudo não avaliou o SRA revisado e ampliado e nem fez medições transpulmonares, portanto não contemplou seus peptídeos vasodilatadores. Os resultados em relação ao SRA clássico foram semelhantes aos aqui apresentados (DE MAN *et al.*, 2012b).

Quanto ao peptídeo Ang1-7, houve diferença significativa entre as concentrações na artéria pulmonar entre casos e controles. O mesmo ocorre com a concentração deste peptídeo na aorta. Este resultado parece reflexo compensatório de contrarregulação do organismo numa tentativa de compensar o aumento da RVP observado durante a HAP.

Sobre os estudos correlatos já publicados não há nenhum que

apresente metodologia semelhante e que analise o leito vascular pulmonar em humanos. Há um trabalho científico medindo a relação entre os peptídeos AngII/Ang1-7 em sangue periférico de humanos portadores de HAP e controles. Este estudo evidenciou relação aumentada nos casos em relação aos controles. Estes resultados não foram observados no presente estudo (JENNIFER A. JOHNSON *et al.*, [S.d.]).

Estudos de metodologia semelhante porém lograram a comparação transcoronariana (CAMPBELL *et al.*, 2004) e transesplâncnica (VILAS-BOAS *et al.*, 2009) de componentes do SRA. Os mesmos apresentaram resultados semelhantes aos aqui expostos, sempre havendo um reforço do eixo vasodilatador ECA2/Ang1-7/Mas.

Outra linha de pesquisa, que correlaciona doenças reumatológicas sistêmicas que cursam com HP e alterações do SRA tem demonstrado descobertas relevantes. Como exemplos pode-se citar a constatação de baixos níveis de Ang1-7 e a presença de auto-anticorpos contra a ECA2 (TAKAHASHI *et al.*, 2010) que podem auxiliar no entendimento do mecanismo fisiopatológico da HP.

Há que se destacar como limitação deste estudo, seu número reduzido da amostra. O tempo limitado de duração da pós-graduação, a baixa prevalência da doença estudada (HAP) e a realização de reforma no Serviço de Hemodinâmica do HC-UFMG com paralisação temporária dos procedimentos eletivos

concomitante à realização desta pesquisa pesaram na escassa obtenção de amostras. Vale ressaltar que seguiremos com a coleta de amostras para uma melhor apreciação das observações aqui discutidas.

A relação entre o SRA e a produção de citocinas (HASSOUN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012b) ainda é obscura e embora venha sendo parcialmente analisada em alguns estudos também será objetivo de nossa linha de pesquisa na continuação deste estudo.

A importância deste estudo está em pela primeira vez, medir peptídeos ainda não incorporados ao arsenal terapêutico de uma doença de difícil controle. O desenho deste projeto, que contemplou medidas transpulmonares plasmáticas dos componentes do SRA é de certa forma inovador, pois ainda não havia sido realizado para o leito pulmonar. O fato de não correlacionarmos as medidas plasmáticas com teciduais se dá pelo difícil acesso que teríamos a material biológico tecidual pulmonar destes pacientes. Por outro lado, a coleta de amostras sanguíneas tanto da aorta quanto da artéria pulmonar de pacientes submetidos ao cateterismo cardíaco direito, exame que integra os passos para a propedêutica da HAP, é relativamente simples. Isso faz supor que uma possível análise dos componentes do SRA com objetivos de propor ou modular estratégias terapêuticas mais direcionadas seria de fácil realização.

Porém os estudos em humanos não conseguiram ainda caracterizar qual seria o perfil dos componentes em sua forma circulante, incluindo os recém-descobertos do SRA na HAP. Alguns

deles quantificam a expressão das enzimas sem mensurar sua atividade (DAI *et al.*, 2013), outros apenas contemplam o SRA clássico (HOEPER *et al.*, 2003), outros focam apenas nos peptídeos (JENNIFER A. JOHNSON *et al.*, [S.d.]). Há que se ressaltar estudos que mostram aumento da atividade da ECA2 em pacientes portadores de insuficiência cardíaca (EPELMAN *et al.*, 2009) e outro que mostra a relevância de auto-anticorpos anti-ECA2 na fisiopatologia de HAP secundária a afecções autoimunes (TAKAHASHI *et al.*, 2010).

Conclusões

7- CONCLUSÕES

Após detalhada análises dos resultados e discussão pode-se concluir que o SRA revisto e ampliado está alterado nos pacientes portadores de HAP em relação aos controles. Principalmente no que diz respeito aos peptídeos vasodilatadores e de sobremaneira para o peptídeo Alamandina. Comprovou-se aumento das concentrações do peptídeo Angiotensina 1-7 em relação dos pacientes hipertensos em relação aos controles. Esta diferença provavelmente reflete um aumento compensador do eixo vasodilatador do SRA. Porém, talvez o resultado mais surpreendente e interessante deste estudo seja a constatação de elevada concentração periférica de Ala em relação a sua concentração medida na raiz da aorta. Conclui-se que este novíssimo braço também vasodilatador do SRA apresenta depuração no leito pulmonar aumentada em relação a sua já significativamente aumentada produção periférica em pacientes com HAP. Tendência inversa foi observada nos indivíduos do grupo controle.

Referências Bibliográficas

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERT, M A *et al.* Pharmacotherapy of chronic pulmonary arterial hypertension: value and limitations. Part I: Primary pulmonary hypertension. *Angiology*, PMID: 7914075, v. 45, n. 8, p. 667–676, ago. 1994.

BADER, Michael. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, PMID: 23463883, v. 465, n. 1, p. 79–85, jan. 2013.

BADER, Michael *et al.* MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacological Reviews*, PMID: 25244929, v. 66, n. 4, p. 1080–1105, out. 2014.

BARST, R J *et al.* Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Annals of internal medicine*, PMID: 8053614, v. 121, n. 6, p. 409–415, 15 set. 1994.

BARST, Robyn J *et al.* Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, PMID: 15194177, v. 43, n. 12 Suppl S, p. 40S–47S, 16 jun. 2004.

BOSSONE, Eduardo *et al.* Pulmonary arterial hypertension: the key role of echocardiography. *Chest*, PMID: 15888866, v. 127, n. 5, p. 1836–1843, maio 2005.

BRADFORD, Chastity N; ELY, Debra R; RAIZADA, Mohan K. Targeting the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system: a novel strategic approach to pulmonary hypertensive therapy. *Current hypertension reports*, PMID: 20556668 PMCID: PMC2957877, v. 12, n. 4, p. 212–219, ago. 2010.

CAMPBELL, Duncan J. *et al.* Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *Journal of Hypertension*, PMID: 15361769, v. 22, n. 10, p. 1971–1976, out. 2004.

DAI, Hai-long *et al.* The changes of serum angiotensin-converting enzyme 2 in patients with pulmonary arterial hypertension due to congenital heart disease. *Cardiology*, PMID: 23548773, v. 124, n. 4, p. 208–212, 2013.

DE MAN, Frances S. *et al.* Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, PMID: 22859525, v. 186, n. 8, p. 780–789, 15 out. 2012a.

DE MAN, Frances S *et al.* Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, PMID: 22859525, v. 186, n. 8, p. 780–789, 15 out. 2012b.

DONOGHUE, M. *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*, PMID: 10969042, v. 87, n. 5, p. E1–9, 1 set. 2000.

EPELMAN, Slava *et al.* Soluble angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: relation with myocardial function and clinical outcomes. *Journal of Cardiac Failure*, PMID: 19700132 PMCID: PMC3179261, v. 15, n. 7, p. 565–571, set. 2009.

ETELVINO, Gisele Maia; PELUSO, Antônio Augusto Bastos; SANTOS, Robson Augusto Souza. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Current Hypertension Reports*, PMID: 24760442, v. 16, n. 6, p. 433, jun. 2014.

FERREIRA, Anderson J *et al.* Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, PMID: 19246717 PMCID: PMC2689912, v. 179, n. 11, p. 1048–1054, 1 jun. 2009a.

FERREIRA, Anderson J. *et al.* Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, PMID: 19246717 PMCID: PMC2689912, v. 179, n. 11, p. 1048–1054, 1 jun. 2009b.

FERREIRA, Anderson J. *et al.* New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *International Journal of Hypertension*, PMID: 22319643 PMCID: PMC3272817, v. 2012, p. 147825, 2012.

FERREIRA, Anderson J.; BADER, Michael; SANTOS, Robson A. S. Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the renin-angiotensin system: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, PMID: 22510001, v. 22, n. 5, p. 567–574, maio 2012.

FLEMING, Ingrid; KOHLSTEDT, Karin; BUSSE, Rudi. The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. *Current opinion in nephrology and hypertension*, PMID: 16340660, v. 15, n. 1, p. 8–13, jan. 2006.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, PMID: 18793332, v. 264, n. 3, p. 224–236, set. 2008.

GALIÈ, Nazzareno *et al.* Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, PMID: 24355643, v. 62, n. 25 Suppl, p. D60–72, 24 dez. 2013.

GALIÈ, Nazzareno; PALAZZINI, Massimiliano; MANES, Alessandra. Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. *European heart journal*, PMID: 20504865, v. 31, n. 17, p. 2080–2086, set. 2010.

GROBE, Justin L *et al.* Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, PMID: 17098828, v. 292, n. 2, p. H736–742, fev. 2007a.

GROBE, Justin L *et al.* Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, PMID: 17098828, v. 292, n. 2, p. H736–742, fev. 2007b.

HAMMING, I. *et al.* The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *The Journal of Pathology*, PMID: 17464936, v. 212, n. 1, p. 1–11, maio 2007.

HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology*, PMID: 15141377, v. 203, n. 2, p. 631–637, jun. 2004.

HASSOUN, Paul M *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, PMID: 19555853, v. 54, n. 1 Suppl, p. S10–19, 30 jun. 2009.

Hemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. S9–S12, ago. 2005. Acesso em: 11 ago. 2014.

HERICHOVA, I; SZANTOOVA, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocrine regulations*, PMID: 23363256, v. 47, n. 1, p. 39–52, jan. 2013.

HOEPER, M. M. *et al.* Lack of association between angiotensin converting enzyme (ACE) genotype, serum ACE activity, and haemodynamics in patients with primary pulmonary hypertension. *Heart (British Cardiac Society)*, PMID: 12639879 PMCID: PMC1769272, v. 89, n. 4, p. 445–446, abr. 2003.

HOETTE, Susana; JARDIM, Carlos; SOUZA, Rogério De. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: an update. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*. PMID: 21225184, v. 36, n. 6, p. 795–811, dez. 2010.

HUMBERT, Marc *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, PMID: 16456139, v. 173, n. 9, p. 1023–1030, 1 maio 2006.

JENNIFER A. JOHNSON *et al.* Increased Plasma Ang II/ Ang-(1-7) Ratio In Pulmonary Arterial Hypertension. A62. *PULMONARY HYPERTENSION: BIOMARKERS AND TRANSLATIONAL SCIENCE*. American Thoracic Society International Conference Abstracts. [S.l.]: American Thoracic Society, [S.d.]. p. A1983–A1983.

KAPARIANOS, A; ARGYROPOULOU, E. Local renin-angiotensin II systems, angiotensin-converting enzyme and its homologue ACE2: their potential role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary hypertension and acute respiratory distress syndrome. *Current medicinal chemistry*, PMID: 21756232, v. 18, n. 23, p. 3506–3515, 2011a.

KAPARIANOS, A; ARGYROPOULOU, E. Local renin-angiotensin II systems, angiotensin-converting enzyme and its homologue ACE2: their potential role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases, pulmonary hypertension and acute respiratory distress syndrome. *Current medicinal chemistry*, PMID: 21756232, v. 18, n. 23, p. 3506–3515, 2011b.

KEANE, P M *et al.* Lung angiotensin converting enzyme activity in rats with pulmonary hypertension. *Thorax*, PMID: 6285542, v. 37, n. 3, p. 198–204, mar. 1982.

KUBA, Keiji; IMAI, Yumiko; PENNINGER, Josef M. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Current opinion in pharmacology*, PMID: 16581295, v. 6, n. 3, p. 271–276, jun. 2006.

LAPA, Monica Silveira *et al.* [Clinical characteristics of pulmonary hypertension patients in two reference centers in the city of Sao Paulo]. *Revista Da Associação Médica Brasileira (1992)*, PMID: 16847518, v. 52, n. 3, p. 139–143, jun. 2006.

LAUTNER, Roberto Queiroga *et al.* Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*, PMID: 23446738, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 12 abr. 2013.

LI, Gang *et al.* ACE2 activation confers endothelial protection and attenuates neointimal lesions in prevention of severe pulmonary arterial hypertension in rats. *Lung*, PMID: 23652350, v. 191, n. 4, p. 327–336, ago. 2013.

LI, Gang *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against pulmonary arterial hypertension through improving early endothelial function and mediating cytokines levels. *Chinese medical journal*, PMID: 22613639, v. 125, n. 8, p. 1381–1388, abr. 2012a.

LI, Gang *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against pulmonary arterial hypertension through improving early endothelial function and mediating cytokines levels. *Chinese Medical Journal*, PMID: 22613639, v. 125, n. 8, p. 1381–1388, abr. 2012b.

MARSHALL, Richard P. The pulmonary renin-angiotensin system. *Current Pharmaceutical Design*, PMID: 12570789, v. 9, n. 9, p. 715–722, 2003.

MATHEW, R; GUZOWSKI, D E; GLOSTER, E S. Effect of verapamil on monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension and endothelial cell dysfunction in rats. *Experimental lung research*, PMID: 1964410, v. 16, n. 6, p. 627–644, dez. 1990.

MCLAUGHLIN, Vallerie V. *et al.* ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. *Circulation*, PMID: 19332472, v. 119, n. 16, p. 2250–

2294, 28 abr. 2009.

MCLAUGHLIN, Vallerie V.; MCGOON, Michael D. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, PMID: 17000921, v. 114, n. 13, p. 1417–1431, 26 set. 2006.

MCLEOD, A A; JEWITT, D E. Drug treatment of primary pulmonary hypertension. *Drugs*, PMID: 2868878, v. 31, n. 2, p. 177–184, fev. 1986.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science (New York, N.Y.)*, PMID: 191908, v. 196, n. 4288, p. 441–444, 22 abr. 1977.

PATEL, Sheila K.; VELKOSKA, Elena; BURRELL, Louise M. Emerging markers in cardiovascular disease: where does angiotensin-converting enzyme 2 fit in? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, PMID: 23432153, v. 40, n. 8, p. 551–559, ago. 2013.

PAUL, Martin; MEHR, Ali Poyan; KREUTZ, Reinhold. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. PMID: 16816138, v. 86, n. 3, p. 747–803, 1 jul. 2006.

PAUVERT, Olivier *et al.* Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, PMID: 15155272, v. 287, n. 3, p. L577–583, set. 2004.

PEACOCK, A. J. *et al.* An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *The European Respiratory Journal*, PMID: 17360728, v. 30, n. 1, p. 104–109, jul. 2007.

PEDERSEN, Kim Brint *et al.* Species-specific inhibitor sensitivity of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its implication for ACE2 activity assays. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, PMID: 21880865 PMCID: PMC3213941, v. 301, n. 5, p. R1293–1299, nov. 2011.

RAIZADA, Veena *et al.* Intracardiac and intrarenal renin-angiotensin systems: mechanisms of cardiovascular and renal effects. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, PMID: 18062896, v. 55, n. 7, p. 341–359, nov. 2007.

RIGATTO, Katya *et al.* Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *European journal of pharmacology*, PMID: 23665493 PMCID: PMC3712651, v. 713, n. 1-3, p. 89–93, 5 ago. 2013.

RUBIN, Lewis J.; AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, PMID: 15249491, v. 126, n. 1 Suppl, p. 7S–10S, jul. 2004.

RUIZ, Maria Jose *et al.* Efficacy of sildenafil as a rescue therapy for patients with severe pulmonary arterial hypertension and given long-term treatment with prostanoids: 2-year experience. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, PMID: 17097500, v. 25, n. 11, p. 1353–1357, nov. 2006.

SAGGAR, Rajan; SITBON, Olivier. Hemodynamics in pulmonary arterial hypertension: current and future perspectives. *The American Journal of Cardiology*, PMID: 22921033, v. 110, n. 6 Suppl, p. 9S–15S, 15 set. 2012.

SANDOVAL ZÁRATE, J. [Right ventricle insufficiency in pulmonary arterial hypertension. Physiopathologic considerations]. *Archivos de cardiología de México*, PMID: 11565326, v. 71 Suppl 1, p. S164–167, mar. 2001.

SANTOS, Robson A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, PMID: 12829792 PMCID: PMC166216, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003.

SANTOS, Robson A. S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of Endocrinology*, PMID: 23092879, v. 216, n. 2, p. R1–R17, fev. 2013.

SANTOS, Robson A. S.; FERREIRA, Anderson J.; SIMÕES E SILVA, Ana Cristina. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology*, PMID: 18310257, v. 93, n. 5, p. 519–527, maio 2008.

SERRES, F *et al.* Efficacy of oral tadalafil, a new long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor, for the short-term treatment of pulmonary arterial hypertension in a dog. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, PMID: 16533328, v. 53, n. 3, p. 129–133, abr. 2006.

SHENOY, Vinayak *et al.* ACE2, a promising therapeutic target for pulmonary hypertension. *Current opinion in pharmacology*, PMID: 21215698 PMCID: PMC3075309, v. 11, n. 2, p. 150–155, abr. 2011.

SHENOY, Vinayak *et al.* Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *American journal of respiratory and critical care medicine*, PMID: 23370913 PMCID: PMC3733435, v. 187, n. 6, p. 648–657, 15 mar. 2013.

SHENOY, Vinayak *et al.* The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, PMID: 20581171 PMCID: PMC2970847, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 15 out. 2010a.

SHENOY, Vinayak *et al.* The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and

pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, PMID: 20581171 PMCID: PMC2970847, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 15 out. 2010b.

SIMONNEAU, Gérald *et al.* Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, PMID: 18936500, v. 149, n. 8, p. 521–530, 21 out. 2008.

SIMONNEAU, Gérald *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, PMID: 19555858, v. 54, n. 1 Suppl, p. S43–54, 30 jun. 2009.

SIMONNEAU, Gerald *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, PMID: 24355639, v. 62, n. 25 Suppl, p. D34–41, 24 dez. 2013.

SZOLAR, D H *et al.* Pulmonary hypertension. Response of vasoactive peptides to a nonionic contrast medium in patients undergoing pulmonary angiography. *Investigative radiology*, PMID: 8537207, v. 30, n. 9, p. 511–516, set. 1995.

TAKAHASHI, Yuko *et al.* Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis research & therapy*, PMID: 20470389 PMCID: PMC2911869, v. 12, n. 3, p. R85, 2010.

TIGERSTEDT R BERGMAN P. Niere und Kreislauf. v. 8, p. 223–71, 1898.

TIMMERMANS, P. B. *et al.* Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, PMID: 8372104, v. 45, n. 2, p. 205–251, jun. 1993.

TIPNIS, S. R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, PMID: 10924499, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 27 out. 2000.

Treatment of pulmonary hypertension. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. S17–S23, ago. 2005. Acesso em: 10 nov. 2014.

VALDES, Gloria *et al.* Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, PMID: 19646248 PMCID: PMC2739214, v. 7, p. 79, 2009.

VICKERS, Chad *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, PMID: 11815627, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 26 abr. 2002.

VILAS-BOAS, Walkíria Wingester *et al.* Relationship between angiotensin-(1-7) and angiotensin II correlates with hemodynamic changes in human liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, PMID: 19469002 PMCID: PMC2686910,

v. 15, n. 20, p. 2512–2519, 28 maio 2009.

VILLELA, Daniel *et al.* Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clinical Science (London, England: 1979)*, PMID: 25328009, v. 128, n. 4, p. 227–234, 1 fev. 2015.

VILLELA, Daniel C.; PASSOS-SILVA, Danielle G.; SANTOS, Robson A. S. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, PMID: 24389733, v. 23, n. 2, p. 130–134, mar. 2014a.

VILLELA, Daniel C.; PASSOS-SILVA, Danielle G.; SANTOS, Robson A. S. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, PMID: 24389733, v. 23, n. 2, p. 130–134, mar. 2014b.

WANG, Yong; QIAN, Cheng; *et al.* Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction. *Circulation. Heart failure*, PMID: 20103774, v. 3, n. 2, p. 286–293, mar. 2010.

WANG, Yong; MOREIRA, Maria da Consolação V.; *et al.* Plasma ACE2 activity is an independent prognostic marker in Chagas' disease and equally potent as BNP. *Journal of Cardiac Failure*, PMID: 20142028, v. 16, n. 2, p. 157–163, fev. 2010.

YAMAZATO, Yoriko *et al.* Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension*, PMID: 19564552 PMCID: PMC2732127, v. 54, n. 2, p. 365–371, ago. 2009.

ZĂGREANU, I *et al.* [Vasodilator treatment in pulmonary hypertension]. *Revista de medicină internă, neurologie, psihiatrie, neurochirurgie, dermato-venerologie. Medicină internă*, PMID: 2894052, v. 39, n. 4, p. 333–339, ago. 1987.

ZISMAN, Lawrence S *et al.* Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation*, PMID: 14504186, v. 108, n. 14, p. 1707–1712, 7 out. 2003.

APÊNDICE 1 - MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Extração de angiotensinas do plasma em colunas BondElut - C18.

Para obter as angiotensinas do plasma utilizou-se a extração em colunas Bond Elut. As colunas foram pré-ativadas com 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% e 10 ml de HFBA 0,1%. Com uma seringa aplicou-se pressão na coluna para que o líquido passasse por ela. As colunas foram ativadas usando-se: 10 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1%, 10 ml de HFBA 0,1%, 3 ml de BSA 0,1%/HFBA 0,1%, 10 ml de ACN 10%/HFBA 0,1%, 3 ml de HFBA 0,1%. Após ativação da coluna as amostras foram aplicadas, seguindo-se de lavagem sequencial com 20 ml de HFBA 0,1% e 3 ml de ACN 20%/HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3 ml de ACN 99,9%/HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1%. As amostras foram secas em centrífuga evaporadora por 10-12 horas e após, foram congeladas até sua ressuspensão e utilização.

APÊNDICE 2 - MÉTODO PARA MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMÁTICA

ECA

Incubação de 30µL do plasma em 470µL de 5mM do substrato Hip-His-Leu preparado em tampão de sódio borato 0.4 M, NaCl 0,9 M, pH 8.3, durante 30 minutos, a 37 °C.

A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de NaOH 0,34 M; foram adicionados 100µL de ortoftaldeído (20 mg/mL em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente, 200µL de HCl 3 N.

Centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foi realizada a leitura do ensaio em leitor de Elisa (BioTek Synergy™ 2; BioTek, VT, EUA) utilizando os seguintes comprimentos de onda (365nm de excitação e 495nm de emissão).

Após a leitura das amostras, os valores obtidos foram normalizados pela concentração de proteína nas respectivas amostras.

A atividade da enzima foi expressa em ηmoles/mL de plasma.

ECA2

A atividade da ECA2 foi realizada de acordo com o método previamente descrito (VICKERS *et al.*, 2002). O ensaio cinético foi realizado usando substratos fluorogênicos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

Amostras plasma de foram homogenizadas em tampão composto por Tris-HCl 75mM, pH 7.5; NaCl 1M e ZnCl₂ 0,5mM. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em pH 7.4 com um volume final de 100µL. A solução de reação continha: plasma, 50µM de substrato, NaCl 5 M, Tris-HCl 75mM, ZnCl₂ 0,5µM, inibidor específico da ECA2 (DX 600) 10µm e um inibidor específico da ECA (Captopril) 10µm. Imediatamente após a adição do substrato fluorogênico, o ensaio foi realizado em um leitor de Elisa (*BioTek SynergyTM 2*; *BioTek*, VT, EUA) durante 1h, a 37°C, foi realizada a cinética de atividade da enzima com leitura de fluorescência a cada minuto. O controle de fluorescência foi realizado com reações sem a presença de amostra.

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Thadeu Alves Máximo e junto com o Dr. Robson Augusto Souza dos Santos estou desenvolvendo o estudo **"Avaliação do sistema renina angiotensina em pacientes portadores de hipertensão pulmonar"**. Você está sendo convidado a participar do estudo por ter uma indicação clínica ao teste de cateterismo e manometria cardíacos devido a hipertensão arterial pulmonar.

Pessoas que tem hipertensão pulmonar grave tem grande quantidade de sintomas como falta de ar e inchaço do corpo que são muitas vezes considerados incapacitantes. A doença é de difícil controle e não tem cura, apresenta altas taxas de mortalidade e de número de internações hospitalares. Para confirmar o diagnóstico e medir o grau de hipertensão pulmonar é indicado o teste de cateterismo e manometria do coração. Durante este teste amostras de sangue são rotineiramente colhidas.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar um novo e promissor alvo para novas terapias medicamentosas para a hipertensão pulmonar denominado sistema renina angiotensina que é um sistema que regula a contração e o relaxamento dos vasos sanguíneos do corpo, inclusive os da circulação pulmonar. Recentemente revisto, novos componentes (angiotensina 1-7, enzima de conversão da angiotensina tipo II) foram descobertos e ainda são desconhecidas as concentrações destes componentes em várias partes do corpo. Este estudo visa quantificá-los em amostras de sangue colhidas durante a realização do exame ao qual você será submetido (cateterismo cardíaco).

Ao concordar com a participação na pesquisa, serão coletadas 02 (duas) amostras de sangue (16 mL; aproximadamente uma colher de sopa ao todo) durante o exame. Vale lembrar que não será necessário nenhum procedimento adicional (doloroso ou não) para realização deste trabalho e que o mesmo não resulta em nenhum custo para você ou sua família.

Os dados resultantes das amostras de sangue serão então analisados e submetidos para publicação em revistas e encontros científicos da área médica e se você desejar é só procurar os pesquisadores que os mesmos lhe serão entregues. Todas as avaliações e publicações científicas serão feitas sem que você possa ser identificado por nome ou qualquer característica.

Você não receberá remuneração (pagamento) por participar do estudo. Você continuará a ser atendido neste serviço, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário.

A sua participação é muito importante, pois poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos e uma melhor compreensão dos mecanismos que levam a hipertensão pulmonar.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo **"Avaliação do sistema renina angiotensina em pacientes portadores de hipertensão pulmonar"** e concordo voluntariamente com a minha participação.

Assinatura do paciente

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido destes paciente para a sua participação no estudo.

Assinatura do Pesquisador Orientador
Responsáveis pela pesquisa:

Assinatura do Pesquisador Orientando

____/____/____

Dr. Thadeu Alves Máximo tel.: (31) 8851-1553 / Dr. Robson Augusto Souza dos Santos: (31)8776-2956

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2o andar – sala 2005 – Campus Pampulha – BH/MG CEP

31270-901

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Telefax: (31) 3409-4592