

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DO POLIMORFISMO RS4646179 DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA
DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2) EM PORTADORES DE DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA (DAC).**

MATHEUS YOKOYAMA SOARES

Orientador(a): Elisangela Rosa Cordeiro (ICBIM)

Uberlândia - MG

Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DO POLIMORFISMO RS4646179 DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA
DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2) EM PORTADORES DE DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA (DAC).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito para
conclusão do curso e obtenção do grau
de Licenciatura da Universidade Federal de
Uberlândia.

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Profa. Dra. Celine de Melo

UBERLÂNDIA – MG
Dezembro - 2017

SUMÁRIO

1 - Introdução

.....05

2 - Objetivos

.....10

3 – Metodologia

.....11

3.1 – Obtenção de amostras.....11

3.2 – Grupos.....11

3.3 – Procedimentos.....12

3.4 – Amplificação do Polimorfismo rs4646179 do gene da Eca 2.....12

4 - Resultados

.....13

5 - Discussão

.....16

6 – Considerações Finais

.....17

7 - Referências Bibliográficas

.....18

8 - Anexos

.....23

RESUMO

Tanto os fatores ambientais quanto os genéticos estão muito ligados ao aparecimento das doenças cardiovasculares em nosso organismo. Tais doenças são a maior causa de morte e incapacitação no mundo segundo a Organização mundial de saúde. A doença arterial coronariana (DAC) é uma destas patologias, que acomete milhares de pessoas anualmente. O presente trabalho busca de forma sucinta relacionar o polimorfismo rs4646179, uma troca de C/T, da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) com a DAC, e definir seus possíveis efeitos para futuras pesquisas. Para isso foram utilizadas amostras de DNA, de pacientes portadores da doença arterial coronariana, amplificadas especificamente por meio da PCR. Os produtos amplificados foram restringidos com a enzima HpyCH4IV e em seguida foi feita uma eletroforese para identificação dos genótipos. Não foi encontrada nenhuma variação genotípica nos 90 indivíduos analisados, todos apresentaram o genótipo CC. Portanto, na amostra analisada não há relação entre o polimorfismo rs4646179 da ECA 2 e a DAC. Concluindo, o polimorfismo rs4646179 tem que ser analisado melhor conjuntamente com outros polimorfismos em pesquisas posteriores, e com um maior número de pacientes para obtermos resultados significativos.

ABSTRACT

Both environmental and genetic factors are closely linked to the onset of cardiovascular disease in our body. Such diseases are the largest cause of death and disability in the world according to the World Health Organization. Coronary artery disease (CAD) is one of these pathologies, which affects thousands of people annually. The present work summarizes the relationship between the polymorphism rs4646179, a C / T exchange, of the Angiotensin Converting Enzyme 2 (ECA2) with the ACD, and define its possible effects for future research. For this purpose, DNA samples from patients with coronary artery disease, specifically amplified by PCR, were used. The amplified products were restricted with the enzyme HpyCH4IV and then an electrophoresis was performed to identify the genotypes. No genotypic variation was found in the 90 individuals analyzed, all of them presented the CC genotype. Therefore, in the analyzed sample there is no relationship between the rs4646179 polymorphism of ACE 2 and CAD. In conclusion, the rs4646179 polymorphism has to be better analyzed in conjunction with other polymorphisms in subsequent research, and with a greater number of patients to obtain significant results.

Palavras-Chave: Enzima Conversora de Angiotensina 2; Polimorfismo; Genes;

1-Introdução

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morte e incapacitação no mundo (Organização Mundial de Saúde 2011). Avanços na medicina, em métodos epidemiológicos, têm trazido a possibilidade de identificar os determinantes e os fatores de risco da doença arterial coronariana (DAC). Sabe-se que existe uma similaridade no mundo quando se trata dos fatores de risco, esses são: diabetes, hipertensão, obesidade, tabagismo, estilo de vida sedentário, entre outros (POLANCZYK & RIBEIRO, 2009).

Apesar da diminuição da mortalidade por DAC, essa doença ainda é responsável por cerca de 30% das mortes em pessoas com mais de 35 anos. Essa enfermidade se desenvolve a partir da interação de fatores ambientais e genéticos, como sedentarismo, hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e alterações em genes relacionados ao sistema renina-angiotensina (SRA) (ZHANG et al., 2012; WILSON; DOUGLAS, 2016).

A doença cardiovascular é precedida pela aterosclerose. A placa de aterosclerose desenvolve através de depósitos de ateroma dentro arteríolas e artérias. (LIMA; ROMALDINI; ROMADINI, 2015). Após ocorre o aparecimento de camadas de gordura na camada íntima; as estrias de gordura podem ser transformadas em placas fibrosas por acúmulo de gorduras no músculo liso e no tecido conjuntivo. As placas passam por: vascularização, hemorragia intraplaca, ruptura, ulceração e calcificação impedindo assim o fluxo de sangue arterial (ROSS; FUSTER, 1996).

Sistema Renina Angiotensina (SRA) é um sistema hormonal amplamente estudado, cuja cascata de formação inclui interações enzima substratos que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos (MOURA, 2007), influenciando o sistema cardiovascular tanto de forma direta, alterando a morfologia, função cardíaca e vascular,

como indiretamente, modificando o ganho dos reflexos cardiovasculares, o volume sanguíneo, o nível circulante e tecidual de hormônios, autacóides como: vasopressina, glicocorticóides, mineralocorticóides, endotelinas, prostaglandinas, cininas e óxido nítrico (SANTOS, 2000).

A renina é uma glicoproteína ácida, com cerca de 42000 dáltons de peso molecular, sintetizada pelas células justaglomerulares do rim a partir de um precursor, a pro-renina, forma inativa circulante da mesma, secretada a partir de estímulos pressóricos, iônicos, nervosos e hormonais. Os estímulos para a secreção da renina decorrem da diminuição do volume intravascular e da pressão sanguínea, com menor estiramento da arteríola aferente; depleção de sal, com menor oferta de cloreto de sódio no nível de túbulo distal e mácula densa; alterações de decúbito, hemorragias e situações de estresse, onde haveria uma ativação através de receptores beta-adrenérgicos renais (GUYTON & HALL, 2006).

Uma vez liberada, a renina age sobre o angiotensinogênio liberando o decapeptídeo angiotensina I (AngioI) da extremidade N-terminal da molécula de angiotensinogênio. O AngioI é um pro-hormônio inativo que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma glicoproteína encontrada principalmente no pulmão, se transformará, através da retirada de 2 aminoácidos de sua extremidade C-terminal, no octapeptídeo angiotensina II (AngioII) que é um potente, multifuncional hormônio primariamente envolvido na manutenção do tônus vascular e na reabsorção do sódio pelos rins (INOUE, et al., 1995).

A Angiotensina II estimula várias citocinas, promove a migração das células para dentro do endotélio, transformação dos macrófagos em células espumosas e resposta inflamatória dentro da parede vascular e desenvolvimento da placa aterosclerótica. Está implicada na disfunção endotelial e liberação de substâncias como endotelina e norepinefrina, vasoconstrição local e predisposição à ruptura da placa. Estimula a liberação do inibidor do

ativador do plasminogênio, predispõe à trombose completa, pela inibição da fibrinólise intrínseca. Importante estimulador do fator de crescimento, hipertrofia do miocárdio e hiperplasia endotelial. (DZAU, *et al* , 1988; KRIEGER, 1998; PAUL,*et al* , 2006).

A AngioII atua em seus receptores específicos em órgãos alvos regulando a pressão arterial, a homeostase cardiovascular e o equilíbrio hidroeletrolítico, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (DZAU, *et al* , 1988; KRIEGER, 1998; PAUL,*et al* , 2006).

Dois tipos principais de receptores são bem caracterizados (AT1 e AT2), ambos com distribuição heterogênea em tecidos periféricos e cerebrais. Os dois receptores diferem em seus mecanismos de sinalização e atividades biológicas (ARDAILLOU, *et al* , 1999; UNGER, *et al* , 2002).

A AngioII é o principal produto ativo do SRA, essa substância pode ser sintetizada em vários locais do organismo, com destaque aos rins, ao endotélio vascular e à glândula supra-renal porém, na última década muito se descobriu a respeito dos fragmentos de angiotensinas que podem ser gerados no sistema, uma “família” de peptídeos com atividade biológica (NADU, 2006). Esses fragmentos incluem Ang (1-12), Ang (1-9), Ang (1-7), Ang III, Ang IV e Ang A, os quais podem ser elaborados, a partir dos mesmos precursores da Ang II ou por meio da própria molécula de Ang II. A Angiotensina (1-12), molécula cujo substrato é o angiotensinogênio (AGT), é convertida em Ang II por uma quimase no coração humano, configurando-se em uma via alternativa para a produção de Ang II, independente da atuação da ECA (SMITH; MORGAN, 2015; BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014 , DELL'ITALIA; FERRARIO, 2013).

Recentemente, estudos evidenciaram que a Ang I também é substrato para a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), a qual é homóloga a ECA e está presente em tecidos renais e cardiovasculares, predominantemente. Sua função ainda não está bem definida,

porém estudos sugerem que essa enzima esteja relacionada a respostas de doenças isquêmicas cardíacas e atue equilibrando a atividade de ECA. Esta nova enzima foi descoberta em humanos e roedores e é análoga a ECA, com alta especificidade para clivar angiotensinas. A ECA2, como foi denominada, possui 805 aminoácidos em sua estrutura, inclui uma sequência N-terminal e um único sítio catalítico, apresentando 42% de homologia com a ECA somática, possuindo diferenças no que diz respeito à especificidade de substrato e sua atividade não ser alterada pelos inibidores clássicos da ECA. No sistema cardiovascular, a expressão da ECA2 ocorre predominantemente nas células endoteliais das artérias, arteríolas e vênulas no coração e no rim. Em humanos, a ECA2 foi também descrita no trato gastrointestinal e em camundongos tem sido descrita também no pulmão (GEMBARDT et al., 2005)

No sistema cardiovascular a ECA2 cliva a AngioI gerando o peptídeo até o momento considerado inativo Angio-(1-9), que pode posteriormente ser convertido a Angio-(1-7) e essa por sua vez pode ser inativada pela ECA somática ou outras peptidases, o resíduo inativo Angio-(1-5). A ECA2 pode também metabolizar diretamente a AngioII para gerar Angio-(1-7). Nem a Ang-(1-9) nem a Ang-(1-7) podem ser hidrolisadas pela ECA2. Essas ações sugerem ser a ECA2 a principal via de formação da Angio-(1-7) juntamente com a AngioII, além de serem considerados os principais efetores do SRA (DONOUGHE *et al* , 2000, VICKERS *et al* , 2002). A atuação da Ang (1-7), a qual é mediada pelo receptor Mas (Mas R), está relacionada à vasodilatação, o que indica que a ECA e a ECA2 apresentam ações que se equilibram no organismo (BALAKUMAR; JAGADEESH, et al., 2014)

Em 2000, Tipnis et al. descreveram pela primeira vez uma protease clonada de uma livraria de cDNA de células obtidas de um paciente com linfoma. Devido à sequência genômica ter várias semelhanças estruturais com o gene da ECA humana, denominaram-na ACEH (do inglês, *angiotensin converting enzyme homolog*) ou ECA2. Esse gene contém 18

éxons, com organização e similaridade ao tamanho dos éxons da ECA, apresentando aproximadamente 40Kb de DNA genômico.

O gene da ECA2 foi mapeado no cromossomo X p22.2 humano onde previamente se encontrava em um locus de traço quantitativo (QTL, do inglês quantitative trait locus) e havia sido caracterizado em vários modelos de hipertensão arterial em ratos sem, até então, um gene candidato conhecido. Esta foi uma das descobertas mais relevantes da história recente do SRA, sabendo-se que a maior parte das doenças cardiovasculares corresponde a traços quantitativos multifatoriais controlados por fatores genéticos e ambientais (FRANCISCETTI, *et al.*2005).

Observações experimentais têm sustentado a hipótese de que o gene da ECA2 estaria envolvido no controle sistêmico da pressão arterial e em parâmetros relacionados à função contrátil do coração (FRANCISCETTI, *et al.*2005).

Crackwover *et al.*(2002), utilizando quatro abordagens experimentais diferentes, comprovaram o papel de regulador crítico que a ECA2 tem sobre ambas as funções. Primeiramente constataram que modelos de ratos hipertensos sódio-sensíveis (SBH/y) tinham níveis de RNAm da ECA2 diminuídos em comparação aos animais normotensos e sódio resistentes (SBN/y). Em segundo lugar, demonstraram que a expressão da ECA2 permanecia constantemente reduzida em outros modelos experimentais de hipertensão, como nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e nos ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidentes vasculo-encefálicos (SHR/SP) (FRANCISCETTI, *et al.*,2005).

O polimorfismo da ECA2 caracteriza um aumento da pressão sanguínea decorrente de uma predisposição genética ligada ao cromossomo X, em que existe uma troca de bases de C por T na região cromossômica15566297 (Figura 1).

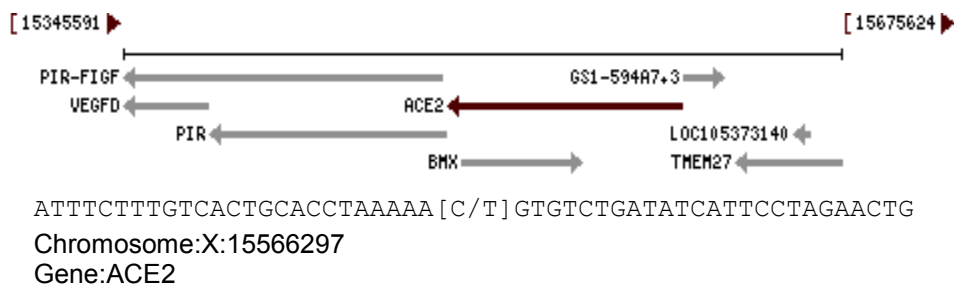


Figura 1: Modificada- www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4646179

Postula-se, atualmente, que o comportamento dual do SRA configurando um sistema dentro de um outro sistema, permitiria que estímulos e inibições atuassem em um mesmo órgão efector (YAGIL & YAGIL, 2003). Seria um modelo com inúmeras alças de retroalimentação que se ajustariam para manter em equilíbrio relativamente estável os dois braços do sistema. Eventuais desequilíbrios resultariam em hipertensão ou hipotensão (FRANCISCHETTI, *et al*, 2005).

Fatores ambientais e genéticos contribuem para o risco de DAC, e polimorfismos comuns em vários genes foram já descritos como fatores de risco genéticos para DAC. O AT1R, eos polimorfismos da ECA II, tem sido associado à hipertensão em várias famílias e os polimorfismos neste gene têm sido associados a um risco aumentado de hipertensão. Uma característica importante dos polimorfismos é que eles são um risco genético de fatores, normalmente ele indica que o portador de polimorfismos pode apresentar precocemente uma doença em relação aos demais portadores do genótipo o que confere susceptibilidade aos afetados por esse polimorfismo (ÁLVAREZ, *et al*, 1998).

2 – Objetivo

Avaliar o efeito do polimorfismo rs4646179 do gene da ECA2, por meio da Reação em Cadeia da polimerase, em pacientes portadores de DAC comprovada angiograficamente.

3 - Metodologia:

3.1 - Obtenção das amostras:

600 Amostras de sangue periférico foram obtidas no Setor de Cardiologia (Dor Torácica / Laboratório de Hemodinâmica) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

A coleta foi realizada em tubo vacutainer de 3 ml com EDTA, mediante termo de consentimento (anexo I) assinado pelos pacientes e autorização da Comissão de Ética Humana da UFU parecer 189.679 (anexo II).

Também foram coletados 3 ml de sangue para determinação dos níveis de angiotensinas e em tubo de polietileno mantido em gelo contendo coquetel de inibidores de proteases (tabela 1). Cada tubo contém 420 µl do coquetel (140 µl para 1 ml de sangue). O sangue foi centrifugado por 10 min a 2.500 rpm à 4°C e o plasma separado e congelado a -20° C para posterior dosagem dos peptídeos.

3.2-Grupos:

A: 600 Pacientes: Foram elegíveis os indivíduos com o diagnóstico de síndrome coronariana aguda (Angina Instável, IAM) baseado em dados clínicos, eletrocardiográficos, enzimáticos e com a DAC comprovada pela angiografia coronária.

B: Controles: Indivíduos submetidos à angiografia coronária e que não apresentem lesões coronárias.

-Critérios de exclusão:

Doenças malignas sistêmicas.

Enfermidades crônicas terminais.

3.3 – Procedimentos

Foram realizados em todos os indivíduos os seguintes procedimentos:

1. História clínica
2. Fatores de risco coronário convencionais: antecedente familiar de coronariopatia (primeiro grau), colesterol total, frações HDL e LDL, triglicérides, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidade (Índice de Massa Corpóreo - IMC).
3. Angiografia coronária.

3.3.1 - Extração de DNA:

A extração do DNA foi feita com o reagente Brazol segundo especificações do fabricante (LGC Biotecnologia Ltda) e protocolo de Chomczynski (1993).

3.4 –Amplificação do polimorfismo rs4646179 do gene da ECA2:

As sequências iniciadoras (*primers*) abaixo foram utilizadas para a amplificação da região do polimorfismo rs4646179 de acordo com Merwe et al., 2008:

Sense: - 5' TAC AGG GAG GAG GAT GTG CG 3' e

Anti-sense: - 5' TGA TGG CAA TAC CTG TCC ACG 3' (MERWE, et. al, 2008).

As reações foram feitas com aproximadamente, 100 ng de DNA genômico, 10 pMoles de cada *primer*, 200 µMolar de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, uma unidade de Taq DNA polimerase por microlitro e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume final de 30µL. A PCR ocorreu em um termociclador MJ. Research, Inc.

O programa utilizado para amplificação do fragmento consistiu de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida por de 34 ciclos compostos por desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 59° C por um minuto e extensão a

72° C por 35 segundos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

O produto de amplificação gerou um fragmento de 680 bp, que foi submetido a restrição enzimática com a enzima HpyCH4IV concentração de 10x, do laboratório *Thermo Fisher Cientific*, à temperatura de 65°C , incubado por 20 horas em termociclador MJ. Research, Inc. ; esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:

5'- A ↓ CGT -3'

3'- TGC ↑ A -5'

Portadores do polimorfismo rs4646179 apresentaram fragmentos de 328, 152, 123 e 77 bp enquanto que indivíduos não afetados apresentaram fragmentos de 328, 229 e 123 bp.

3.5-Eletroforese

As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose, com concentrações 1%, 2% e 3,5% com o intuito de visualizar, respectivamente: a integridade do DNA, os produtos amplificados e a restrição enzimática dos mesmos. Todos os géis foram confeccionados em aparato específico, corados com brometo de etídeo e submetidos a uma voltagem de aproximadamente 120 volts, por 30 minutos. Após a corrida de eletroforese os resultados obtidos foram capturados por meio de luz ultravioleta em um fotodocumentador.

4 – Resultados

Após a extração de DNA, a integridade das amostras obtidas foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o procedimento padrão. E os fragmentos foram amplificados, com iniciadores específicos, para sequência de 680 pb do gene da ECA2 na qual localiza-se o polimorfismo rs4646179. Foram selecionadas 90

amostras amplificadas a partir desse processo. Após, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose (Figura 2) para comprovar que as amostras realmente foram amplificadas e estavam ideais para o uso.

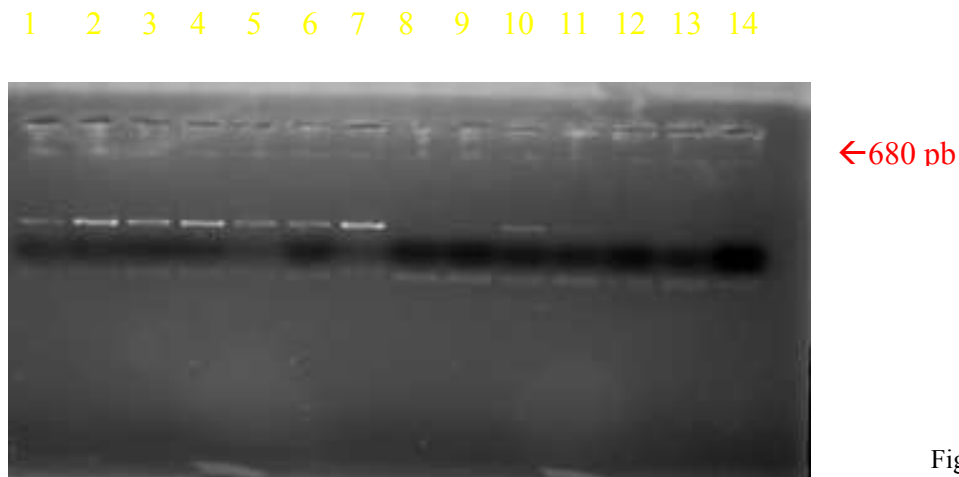


Figura2-

Gel de amplificação do fragmento de 680pb, onde do poço 1 ao 7 e o poço 10 contém amostras, os demais poços não sofreram amplificação. Foi utilizada o gel de agarose 2%, a 120V por 30 min.

As amostras foram submetidas ao processo de restrição e posteriormente à eletroforese. Todos os indivíduos genotipados apresentaram o mesmo perfilCC,com fragmentos de 328, 229 e 123 pb (Figura 3), ou seja, não foi detectado nessas amostras a presença do alelo mutante.

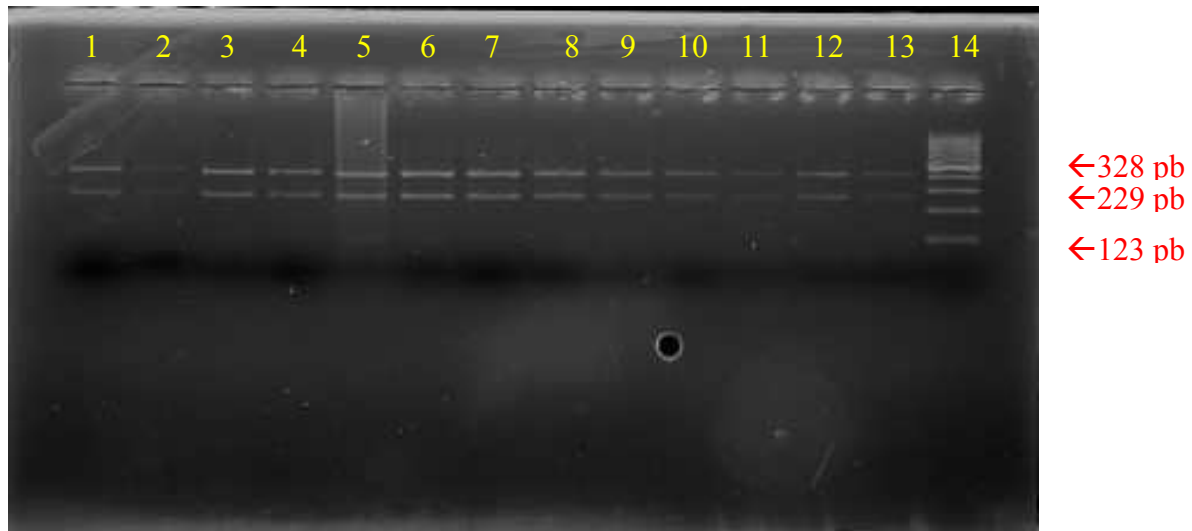


Figura 3: Gel de agarose 3,5% corrido por 30min a 120V de restrição, mostrando as amostras com o mesmo genótipo, evidenciando a baixa presença de polimorfismo. Em vermelho temos o peso das bandas, e em amarelo a numeração dos poços utilizados, em que o poço de número 14 se encontra o marcador molecular com o peso de 100 pb.

Colunas 1 a 13- Indivíduos portadores do genótipo CC

Coluna 14- Marcador de peso molecular de 100pb

O polimorfismo não foi detectado em nenhum dos indivíduos analisados conforme a tabela 1.

Tabela 1- Genótipos de pacientes e controles

	Genótipos da ECA2		
	CC	CT	TT
Paciente	52	0	0
Controle	38	0	0

5 - Discussão:

Este resultado não nos permite afirmar que não exista essa mutação, mas apenas que ela não foi encontrada no n amostral estudado. Em futuros projetos buscaremos pesquisar um maior número de pacientes, e estudar os demais polimorfismos da ECA2, com o intuito de entender o papel do diversos haplótipos.

A análise estatística de correlação entre doença arterial coronariana e os fatores clássicos, como hipertensão, colesterol, diabetes, tabaco e sedentarismo, não foi feita pois classicamente essa correlação já foi provada e é um dos pilares do seu diagnóstico clínico.

A análise comparativa com outros autores demonstrou que há uma grande escassez de projetos destinados especificamente ao polimorfismo r4646179. Os estudos do gene da ECA2 analisam haplótipos que possivelmente possam estar exercendo alguma tipo de modificação nos níveis de AngII e ou/ da própria enzima. Segundo CRACKOWER, 2002 a enzima conversora de angiotensina 2 mapeia para um locus de traços quantitativos (QTL) localizados no cromossomo X em três diferentes modelos de hipertensão de ratos. Em todas as cepas de ratos hipertensos, o RNA mensageiro da ECA2 e a expressão da proteína foram marcadamente reduzidos, sugerindo que a ECA2 é seja um gene candidato para este QTL.

MERWE, 2008 estudando a interferência do gene da ECA2 na hipertrofia cardíaca, demonstrou que não houve evidência de associação entre traços de hipertrofia e os polimorfismos rs1978124, rs2285666 e rs4646179, somente na sequência polimórfica rs879922:,a troca do alelo C por G teve uma contribuição significativa nos três traços hipertróficos investigados

Em contraste com a rápida acumulação de achados no importante papel do gene ACE2 em doenças cardiovasculares baseados em modelo animal, poucos estudos específicos para o

polimorfismo rs4646179 juntamente com a enzima ECA2 foram realizados para investigar o gene nas populações humanas, dificultado assim a comparação de resultados.

O estudo das DAC, são um assunto de suma importância, principalmente nacionalmente, estima-se que a prevalência da DAC no Brasil, é de 5% a 8% em média em presente em adultos com idade acima de 40 anos (PINHO *et al*, 2010), sendo que 140 mil evoluem com óbito (RAMOS, 2010).

Pelo fato de a DAC ser uma doença multifatorial, seu prognóstico depende da terapêutica farmacológica e aspectos não farmacológicos, que são fundamentais para o tratamento. Após um evento cardíaco, a terapêutica envolve medidas de modificação no estilo de vida, uso de medicamentos como anti-agregantes plaquetários, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e beta-bloqueadores, objetivando reduzir a recorrência de eventos coronarianos, com isso vemos a importância de conhecer o sistema renina angiotensina, para que possamos entender como tratar de forma adequada doenças que estão relacionadas a ECA e ao SRA (LUNELLI, 2009).

6 – Considerações Finais:

Portanto, devemos dar continuidade ao projeto, aumentando o n amostral e posteriormente relacionando as várias sequências polimórficas da ECA2 e seus possíveis haplótipos com a DAC.

7 - Referências:

ÁLVAREZ, R.; REGUERO, J.; BATALLA, A.; IGLESIAS, C.; CORTINA, A.;
 ÁLVAREZ, V.; COTO, E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin ii receptor 1
 polymorphisms: association with early coronary disease, *Cardiovascular Research* 40, 375–
 379, 1998

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, 10(11): 30-39, 1999.

BALAKUMAR, Pitchai; JAGADEESH, Gowraganahalli. A century old renin–angiotensin
 system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in
 cardiovascular physiopathology. **Cellular Signalling**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.2147-2160,
 Elsevier BV. Out, 2014

BALAKUMAR, Pitchai.; JAGADEESH, Gowraganahalli. Structural determinants for
 binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. **Journal Of
 Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.R71-R92, BioScientifica. 10 Jul. 2014

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and
 proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. (3):532-4, 536-7. 1993 Sep;15

CRACKWOVER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G.Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.;
 SCANGA, S. E.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J.; COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.;
 SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P.
 H.; YAGIL, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential
 regulator of heart function. **Nature**, [s.l.], v. 417, n. 6891, p.822-828. Nature Publishing
 Group. 20 Jun, 2002

DELL'ITALIA, Louis J; FERRARIO, Carlos M. The Never-ending Story of Angiotensin
 Peptides: Beyond Angiotensin I and II. **Circulation Research**, [s.l.], v. 112, n. 8, p.1086-
 1087, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). 11 abr, 2013

DONOGHUE, M. et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*, [s.l.], v. 87, n. 5, p.e1-e9, Ovid Technologies (Wolters Kluwer). 1 Set, 2000

DZAU, V. J.; BURT, D. W.; PRATT, R. E. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *AM J Physiol*, 255(4):563-73, 1988.

FERREIRA, AJ; SANTOS, RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.499-507 ,FapUNIFESP (SciELO). Abr, 2005

FRANCISCHETTI, E. A.; FRANCISCHETTI, A.; ABREU, V. G. - The Emergence of a New Cardiovascular Modulator 2nd Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Universidade do Estado do Rio de Janeiro -Revista da SOCERJ - Jan/Fev, 2005.

GEMBARDT, F.; STERNER-KOCK, A.; IMBODEN, H.; SPALTEHOLZ, M.; REIBITZ, F.; SCHULTHEISS, H. P.; SIEMS, W. E.; WALTHER, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides*, 26(7): 1270-7, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Gestação e Lactação: Respostas do corpo materno à gestação. In_ . *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1034-1035, 2006

INOUE SB, et al. Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur J Biochem* 231(3):845-54, 1995

KRIEGER, E. M. Angiotensinas - aspectos fisiológicos Hipertensão,1: 1-10, 1998.

LIMA, M.C.C.; ROMALDINI, C.C.; ROMADINI, J.H. Frequency of obesity and related risk factors among school children and adolescents in a low-income community. A cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.*, v. 133, n. 2, p. 125-130, 2015.

LUNELLI, R.P. Patients with coronary arterial disease adherence to pharmacological and non-pharmacological therapy. *Acta Paul. Enferm.*, v. 22, n. 4, p. 367-73, 2009.

MERWE, L. et al. Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Genetics*, vol. 124, pp. 57-61, 2008

MOURA, M. M. Reflexos cardiovasculares em camundongos com alteração na expressão do receptor da Angiotensina-(1-7), MAS. 2007. 213 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2007.

NADU, A. P. Avaliação da cardioproteção em ratos que expressam uma proteína de fusão produtora de Angiotensina-(1-7) [TGR(A1-7)3292]. 2006. 118 f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2006.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86(3): 747-803, 2006.

PINHO, R.A. *et al.* **Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress.** *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 94, n. 4, Apr. 2010.

POLANCZYK CA1, RIBEIRO JP - Coronary artery disease in Brazil: contemporary management and future perspectives *Heart*. 2009 Jun;95(11):870-6. doi: 10.1136/hrt.2008.155853. Epub March 3, 2009.

ROSS, R.; FUSTER, V. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherosclerosis and coronary artery disease. Lippincott-Raven, Philadelphia-New York, v. 1, p. 441-462, 1996.

SANTOS R. A, CAMPAGNOLE-SANTOS M. J, ANDRADE S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 28;91(1-3):45-62, 2000.

SMITH, Timothy W; MORGAN, James P. Actions of angiotensin II on the heart. **UpToDate**. 2016. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/actions-of-angiotensin-ii-on-the->

[heart?source=search_result&search=Actions+of+angiotensin+II+on+the+heart&selectedTitle=1~150>](#). Acesso em: 21/09/2016.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275: 33238-33243, 2000.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 89(2): 3A-9A; discussion 10A., 2002.

VICKERS C, HALES P, KAUSHIK V, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277 (17): 14838–43, 2002.

WANG, Shu-xia. FU, Chan; ZOU, Yu-bao; WANG, Hu; SHI, Yi; XU, xi-qi; CHEN, Jing-zhou; SONG, Xiao-dong; HUAN, tu-jun; HUI, Rui-tai. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene associated with magnitude of left ventricular hypertrophy in male patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Chinese Medical Journal* 2008.

WILSON, Peter WF; DOUGLAS, Pamela S. Epidemiology of coronary heart disease. Up To Date. 2016. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-coronary-heart-disease?>>. Acesso em: 21/09/2016.

World Health Organization.. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Eds S. Mendis, P. Puska, and B. Norrving, (Geneva: World Health Organization), 2011

YAGIL, Y.; YAGIL, C. Hypothesis. ACE2 modulates blood pressure in mammalian organism. *Hypertension*, 41:871-73, 2003.

YANG, WEI.; et. al. Association study of ACE2 (angiotensinI-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population, 2006.

ZHANG, K; ZHOU, B; ZHANG, L. Association study of angiotensin II type 1 receptor: A1166C (rs5186) polymorphism with coronary heart disease using systematic meta-analysis. Journal Of The Renin-angiotensin-aldosterone System, [s.l.], v. 14, n. 2, p.181-188, SAGE Publications, may 29, 2012.

Anexo I

Termo de Consentimento Informado

Título do estudo: Polimorfismos de Genes do Sistema Renina-Angiotensina, do gene da eNOS e atividade das angiotensinas – II e 1,7 na Doença Arterial Coronariana.

Este estudo tem o objetivo de avaliar alguns polimorfismos gênicos do sistema renina-angiotensina, do gene da eNOS e a atividade das Angiotensinas II e 1,7, no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária.

Para esta investigação, é necessário a coleta de dois tubos de 3 ml de sangue periférico, empregando-se material descartável. Não há desconforto ou risco adicional nestes procedimentos, pois já fazem parte da rotina clínica e laboratorial.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames bioquímicos e de DNA.

É importante enfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não terapêutica.

Se você concordar em participar do estudo isto não vai implicar em nenhuma vantagem pessoal ou financeira para você ou para a sua família. Garantimos ainda que todos os seus dados são confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações que poderão ser usadas apenas para esta pesquisa e publicações científicas.

Você pode se recusar a participar do estudo ou mesmo retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isto altere o seu tratamento no Hospital das Clínicas.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o decorrer do estudo ou obter informações diretas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, situado na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Bloco A-Sala 224-Campus Santa Mônica Avenida João Naves de Ávila, 2121 Santa Mônica-Uberlândia-MG 38400-098. Além disso, você poderá obter com os pesquisadores, por meio do telefone : (34)- 3218 2200 ou email; os resultados conseguidos no estudo.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento e se quiser, antes de assiná-lo, poderá consultar alguém de sua confiança.

Os pesquisadores podem decidir sobre a sua saída do estudo por razões científicas, sobre as quais você será devidamente informado

Termo de consentimento

Eu, _____
voluntariamente, aceito participar desta pesquisa, realizada no Instituto de Ciências Biomédicas e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Pelo presente termo apresentado,

Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Paciente _____

Médico responsável _____

Local e Data: _____, _____ de _____ de 2016

Testemunhas: _____

Anexoll

Parecer do comitê de ética:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos Genéticos na Doença Coronariana

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Versão: 3

CAAE: 01736412.9.0000.5152

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 189.679

Data da Relatoria: 01/02/2013