Cléber Rene Alves

**Reatividade vascular e atividade da ECA em resposta ao
treinamento físico são moduladas pelo polimorfismo +9/-9
do gene do receptor B₂ de bradicinina**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
mestre em Ciências**

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira**

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Cléber Rene

Reatividade vascular e atividade da ECA em resposta ao treinamento físico são moduladas pelo polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina / Cléber Rene Alves. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Receptores da bradicinina 3.Exercício 4.Vasodilatação 5.Peptidil dipeptidase A

USP/FM/SBD-310/09

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Oswaldo e Maria Aparecida, pelo modelo de força e perseverança de uma vida inteira, e por fazer de mim tudo que sou.

Ao amigo, Henrique Ricardo Mariano, pela incansável motivação e inteligência, despertando em mim novos ideais.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Edilamar Menezes de Oliveira, minha orientadora, por seu brilhantismo acadêmico, doçura e equilíbrio.

Ao Prof^o. Dr^o. Guilherme Barretto Alves, o grande iniciador e incentivador desse trabalho. Impossível seria sem ele.

Ao Prof^o. Dr^o. Alexandre Pereira da Costa, pela paciência, ensinamentos e contribuições para meu crescimento acadêmico.

Ao Prof^o. Dr^o. Rodrigo Gonçalves Dias, por me ensinar como se faz um trabalho científico.

Ao Prof^o. Dr^o. Carlos Eduardo Negrão, pela confiança empregada no meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ivani Credídio Trombetta, por sua gentileza e disponibilidade a qualquer hora.

Aos amigos e colegas Heron Rached, Maria Urbana, Tiago Fernandes, Denise Silva, Glória, Luciene Azevedo, Ana Braga, Noelly, Fabíola, Raffael, Amanda e Alessandro, pela ajuda e apoio a mim dispensados.

Às secretárias, Sônia, Tânia, Mônica, Sandra, Isabel, Silvana, Maúde, e Shirley, pela paciência e ajuda necessária.

À Polícia Militar do Estado de São Paulo, que sempre nos receberam com cordialidade e confiança, dispensando às vezes, grande parte de seu tempo em favor desse trabalho científico. Faço um agradecimento especial, à Sargento Marina, que hoje já posso chamá-la de Sub Tenente. Por sua incansável dedicação e boa vontade no que fosse inimaginável para levar este trabalho ao fim.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1- Genética e performance física.....	5
3.2-Sistema Caliceína Cinina.....	6
3.3-Caliceínas.....	7
3.4-Cininogênios.....	9
3.5-Cininas.....	9
3.6-Cininases.....	10
3.7-Receptores cininas.....	11
3.8-Vias de sinalização dos receptores cininas.....	12
3.9-Genes e receptores cininas.....	14
3.10-Polimorfismo -9/+9 do receptor B ₂ de bradicinina.....	15
3.11-Treinamento físico e o polimorfismo -9/+9 BDKRB2.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1-Amostragem.....	17
4.2-Critérios de inclusão.....	18
4.3-Método de avaliação.....	19
4.3.1-Avaliação da capacidade cardiopulmonar ao exercício.....	19
4.3.2-Avaliação do fluxo sanguíneo muscular.....	21
4.3.3-Avaliação da condutância vascular no antebraço.....	23
4.3.4-Avaliação da pressão arterial.....	23
4.3.5-Avaliação da frequência cardíaca.....	23
4.4-Genotipagem.....	24
4.5-Atividade da ECA no soro.....	26
4.6-Cultura primária de SVSMC e MASMC.....	27

4.7-Análise da expressão gênica por RT-PCR.....	27
4.8-Replicação da Amostra.....	28
4.9-Protocolo de Treinamento Físico.....	29
4.10- Análises Estatísticas.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1-Distribuição dos alelos.....	31
5.2-Pré-treinamento físico.....	31
5.3-Efeitos do treinamento físico.....	36
5.4-Associação dos genótipos BDKRB2 e a expressão do gene BDKRB2 em células do músculo liso vascular humano.....	41
5.5- Atividade da ECA no soro.....	42
6. DISCUSSÃO.....	44
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	47
8. CONCLUSÕES.....	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	49
10. ANEXOS.....	65
11. LEGENDAS.....	71

RESUMO

Reatividade vascular e atividade da ECA em resposta ao treinamento físico são moduladas pelo polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina.

São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A ausência (-9) e não a presença (+9) de um segmento de nove pares de base do gene codificador do receptor B₂ de bradicinina (BDKRB2), está associada com a maior transcrição do gene, com fenótipos cardiovasculares e performance física. Entretanto, os efeitos dessas variantes na reatividade vascular são desconhecidos. Hipotetizamos que, 1) a vasodilatação reflexa em resposta ao exercício de *handgrip* poderia estar aumentada em sujeitos portadores do genótipo -9/-9, 2) O treinamento físico potencializaria essa resposta, e 3) a atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) estaria diminuída. Foram 133 homens genotipados para o BDKRB2 (-9/-9 n=30; -9/+9 n=68; +9/+9 n=35). Frequência cardíaca (FC, ECG) pressão arterial média (PAM, *cuff* automático oscilométrico), e fluxo sanguíneo no antebraço (FSA, pletismografia) foram avaliados 3 minutos no repouso e 3 minutos durante o exercício de *handgrip* (30%CVM). A capacidade funcional foi mensurada por teste cardiopulmonar. E a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA), foi analisada em soro. As avaliações foram realizadas antes e depois do treinamento físico aeróbio (18 semanas, 90 minutos, 3 vezes semanais). No pré-treinamento físico o FSA e a condutância vascular no antebraço (CVA) em resposta ao exercício foram similares entre os genótipos -9/-9, -9/+9 e

+9/+9 (FSA: 630±26; 626±22; 585±22 ASC, $P=0.71$; CVA: 584±21; 592±27; 559±16 UAC, $P=0.79$, respectivamente). No pós-treinamento físico somente 58 indivíduos mostraram ganho acima ou igual a 10% no $VO_{2\text{pico}}$ e, portanto, foram incluídos no estudo. O aumento no FSA e CVA do genótipo -9/-9 foi significativamente maior do que nos genótipos -9/+9 e +9/+9 (FSA: 514±65 vs. 635±44; 672 ±56 vs. 632 ±37; 569±41 vs. 549±45 ASC, $P=0.05$, respectivamente) (CVA: 512±63 vs. 639±56; 657±101 vs. 622 ±45; 578±49 vs. 549±62 ASC, $P=0.05$, respectivamente). Ademais a atividade da enzima conversora de angiotensina-I, demonstrou uma redução de 23% em sua atividade no genótipo -9/-9 em comparação aos genótipos -9/+9 e +9/+9 ($p<0.008$), respectivamente. Finalmente fomos capazes de confirmar em cultura de células musculares lisas vasculares, que o genótipo -9/-9 está associado com aumentos na atividade transcricional do gene BDKRB2 ($p=0.03$). Esses resultados sugerem que o polimorfismo -9/+9 do gene do receptor B₂ de bradicinina, influencia a vasodilatação muscular reflexa durante o exercício em indivíduos treinados. Além disso, a vasodilatação poderia estar aumentada no genótipo -9/-9, pela menor atividade da enzima conversora de angiotensina-I, e maior biodisponibilidade do substrato bradicinina.

Descritores: Bradicinina, polimorfismo, reatividade vascular, treinamento físico, ECA.

SUMMARY

Vascular reactivity and ACE activity response to exercise are Modulated by the +9/-9 bradykinin B₂ receptor gene functional polymorphism.

São Paulo, 2009. Thesis (Master's degree) – Medical School, University of São Paulo.

Absence (-9), rather than the presence (+9), of a 9 base pair repeat in the bradykinin type 2 receptor gene (BDKRB2) was associated with higher gene transcriptional activity, cardiovascular phenotypes and physical performance. However, their effects on vascular reactivity are unknown. We hypothesized that vasodilatation response to physical training is modulated by BDKRB2 genotype. hundred and thirty-three healthy volunteers were genotyped for the +9/-9 BDKRB2 polymorphism. Heart rate (HR), mean blood pressure (MBP), and forearm blood flow (FBF) were evaluated at baseline. Functional capacity was measured by cardiopulmonary exercise testing. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity was measured. Aerobic training was performed for 18 weeks, following a standardized protocol. All baseline variables were re-assessed following completion of the training period. Baseline HR, MBP, and forearm vascular conductance (FVC) were not different among -9/+9 genotypes. During handgrip exercise, FBF and FVC increased significantly and similarly among -9/-9, -9/-9 and +9/+9 genotypes. Resting HR, MBP, FBF, and FVC change following, aerobic training completion was not different between genotypes. However, FBF and FVC response to

aerobic training were higher in -9/-9 carriers ($p=0.05$, and $p=0.05$, respectively). In addition, ACE activity decrease following aerobic training was higher in the -9/-9 group ($p<0.008$). Finally, we were able to confirm, in primary culture of human vascular smooth muscle cells, that the -9/-9 genotype was associated with increased transcriptional activity of the BDKRB2 gene ($p=0.03$). These results suggest that reflex muscle vasodilatation response to physical training is modulated by, the +9/-9 bradykinin B₂ receptor gene polymorphism in healthy individuals.

Descriptors: bradykinin, polymorphism, vascular reactivity, physical exercise, ACE.

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico aeróbio é responsável por diversas modificações estruturais e funcionais no sistema cardiovascular. Embora as adaptações ao treinamento possam diferir de indivíduo para indivíduo, algumas características genéticas podem interferir nestas respostas. Uma estratégia que vem sendo amplamente utilizada para identificar no genoma traços genéticos que possam interagir com as adaptações induzidas pelo treinamento é o estudo de "genes candidatos". Esta estratégia, hoje, está mais focada em genes envolvidos em vias metabólicas e sistemas fisiológicos que sabidamente interagem com as características relacionadas ao treinamento físico. Estudos de associação de variantes em um ou múltiplos genes têm possibilitado identificar genes que parecem influenciar fenótipos relacionados ao treinamento físico. No entanto, é improvável que, em fenótipos poligênicos a influência genética sobre as adaptações provocadas pelo treinamento físico seja explicada pela variação na sequência de DNA de um único gene. É mais provável que vários genes, cada um com pequenas, mas significantes contribuições, sejam responsáveis pela influência genética na performance e não apenas alguns genes isoladamente.

Um dos sistemas que vêm sendo explorados nos últimos anos, e parece exercer influência sobre a performance é o sistema renina angiotensina (SRA) e, mais recentemente, o sistema calicreína cinina (SCC). O SCC envolve um grupo de peptídeos biologicamente ativos, as cininas, que são liberadas pela enzima calicreína a partir do substrato cininogênio, ademais, esses peptídeos agem em dois subtipos de receptores cininas, B₁ e B₂, localizados na superfície celular mediando grande número de processos biológicos. (Lung, 1996). O receptor B₂ está distribuído em todos os tecidos de mamíferos, e media a maioria das ações das cininas (Ma, 1994).

As propriedades vasodilatadoras das cininas são cada vez mais investigadas devido à sua relevância clínica na isquemia cardíaca, cerebral e renal. Concentrações aumentadas de bradicinina no músculo cardíaco, posteriormente ao infarto agudo do miocárdio, produzem efeitos benéficos por redução ou limitação do tamanho do infarto miocárdico. Infusões de bradicinina nas coronárias causam melhora na função cardíaca e metabólica, reduzindo danos da reperfusão, e prevenindo arritmias em modelos experimentais de isquemia induzida em corações isolados. A hipótese de que as cininas podem representar um mecanismo protetor na isquemia por melhorar a perfusão, oxigenação, e o transporte de glicose para o tecido afetado foi proposta por Jauch e Bhoola, na década de 70 (Leeb-Lundberg, 2005).

Em 1992, o cDNA do receptor B₂ de bradicinina humano foi clonado por alguns investigadores (Eggerickx, 1992 e Hess, 1992). Estudos subsequentes mostraram três polimorfismos localizados em cada um dos 3 exons e um polimorfismo localizado na região promotora (Kammerer, 1995; Braun, 1996). O polimorfismo no exon 1 do gene do receptor B₂ de bradicinina humano (BDKRB₂) é caracterizado pela inserção (+) ou deleção (-) de 9 pares de bases. O alelo deleção (-9) está associado com maior expressão no mRNA do gene do receptor B₂. Estudos envolvendo o polimorfismo do gene do receptor B₂ de bradicinina e o polimorfismo da enzima conversora de angiotensina (ECA) sugerem que, indivíduos com alelos (-9 e I), apresentam menor hipertrofia do ventrículo esquerdo em resposta ao treinamento físico, aumento da perfusão tecidual, e maior captação de glicose miocárdica (Zuraw, 2001). Nesse sentido, outro estudo demonstrou que indivíduos com esses mesmos alelos apresentavam maior eficiência metabólica muscular esquelética e maior desempenho físico em endurance (Williams, 2004).

No entanto, a influência do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina na vasodilatação muscular reflexa e na atividade da ECA, em resposta ao treinamento físico, não estão estabelecidos.

2. OBJETIVOS

Testar as hipóteses de que:

2.1 – A resposta vasodilatadora reflexa ao exercício de *handgrip* estaria aumentada em indivíduos portadores do genótipo -9/-9;

2.2 - O treinamento físico potencializaria essa resposta nesses indivíduos; e

2.3 – Atividade da ECA estaria diminuída nesses indivíduos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1– Genética e Performance Física

As variações na performance física humana e na habilidade atlética têm sido longamente examinadas como tendo um forte componente hereditário. No entanto, é sabido que fatores ambientais tais como o treinamento e nutrição são essenciais para desenvolvimento de um atleta (Myburgh, 2003). Entretanto, esses fatores isoladamente não são suficientes. A predisposição genética representa um papel importante na determinação de certas suscetibilidades físicas. (Daniel, 2005).

A primeira evidência da influência genética sobre a performance física, veio de estudos que comparavam indivíduos com vínculos familiares (pares de gêmeos, núcleos familiares) com sujeitos não relacionados, para estimar a herdabilidade, (uma medida composta de genética e associado a fatores ambientais) na variação do desempenho aeróbico e características relacionadas as adaptações cardíacas (Bouchard, 1986; Bouchard, 1995).

Em 1997, Bouchard e colaboradores identificaram associações entre: variação na captação máxima de oxigênio, força máxima, adaptação cardíaca e pressão arterial, em sujeitos no repouso e no exercício, (Bouchard, 2000; Rico-Sanz, 2004). Outros estudos têm identificado associações entre: a composição corporal, distribuição de gorduras, e o metabolismo de insulina e glicose (Chagnon, 2001; Rice, 2002a; Na, 2003b).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para detectar genes envolvidos em fenótipos cujo efeito pode ser alterado pelo exercício. Muitos estudos têm investigado o efeito do exercício sob doenças crônicas tais como hipertensão, obesidade, e doenças

cardiovasculares. Embora os efeitos positivos do exercício sobre a redução da hiperlipidemia, obesidade e hipertensão arterial estejam bem documentados (Hagberg, 1990; Braith, 1994), existe tipicamente uma importante soma de heterogeneidade na compreensão da intervenção do exercício (Bray, 2000).

Uma das formas para identificar características ou doenças que podem interagir com o exercício é o estudo dos “genes candidatos”, ou seja, um gene que acreditasse influenciar fenótipos complexos. Com o uso dessa estratégia, estudos de associações de um ou múltiplos genes têm identificado um número limitado de genes que parecem influenciar fenótipos exercício-relacionado (Pearson e Manolio, 2008). Por exemplo, o sistema renina angiotensina (SRA) é uma chave reguladora do volume de plasma e pressão arterial, e desempenha grande função no sistema cardíaco e na performance física (Montgomery, 1998). O gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) é um dos principais componentes do sistema renina angiotensina, e tem sido um dos muitos genes candidatos estudados (Bray, 2000).

3.2– Sistema Calicreína-Cinina

Outro sistema muito estudado e envolvido em processos fisiopatológicos como: regulação da pressão arterial, homeostasia do sódio, processos inflamatórios, efeitos cardioprotetores e desempenho físico, é o sistema calicreína-cinina (SCC) (Campbell, 2000).

A descoberta do SCC há quase um século, se deu através de injeções intravenosas de urina humana em cachorros, que causavam uma transiente redução na pressão arterial (Abelous e Bardier, 1909). Duas décadas depois, Frey e Kraut isolaram com sucesso essa substância hipotensiva na urina de humanos, como uma molécula não

dializável, termo lábil e com alto peso molecular, essa substância foi chamada de caliceína, advinda de *Kallikreas* da nomenclatura grega, pâncreas, onde originalmente foi encontrada (Kraut, 1930). Em 1937, Werle e colaboradores, detectaram uma substância que causava uma lenta contração do músculo liso. Essa nova substância foi sete vezes mais notável do que a histamina e a acetilcolina. Usando nomenclatura grega, os autores chamaram-na de bradicinina, (cinina significando movimento e bradi significando lentamente), um pequeno peptídeo com 9-10 aminoácidos liberado da clivagem do substrato cininogênio, pela ação da enzima caliceína (Schachter, 1956; Werle, 1960; Bhoola, 1992; Chao, 2006).

Por um longo período, o sistema caliceína-cinina vem sendo considerado um dos principais mecanismos controladores hemodinâmicos, local e sistêmico (Madeddu, 2007). Este complexo sistema multi-protéico é formado por: 1-caliceínas - serinas proteases teciduais e plasmáticas (enzimas formadoras de cininas); 2-cininogênios de alto e baixo peso molecular (substratos); 3-cininas - peptídeos vasoativos; 4-cininases - enzimas que degradam cininas, por ex. ECA, carboxipeptidases, dentre outras; e 5-receptores cininas - B₁ e B₂ (Moreau, 2005 e Madeddu, 2007).

3.3– Caliceínas

Caliceínas é um grupo de serinas proteases que são encontradas em células glandulares, neutrófilos, e fluídos biológicos (Shariat-Madar, 2003). Estão divididas em dois principais grupos: tecidual e plasmática. Os dois tipos se diferem em seus pesos moleculares, substratos específicos, características imunológicas, tipo de cininas liberadas e importância funcional (Bhoola, 1992).

A calicreína plasmática (CP) são serinas proteases encontradas no plasma de mamíferos. CP está envolvida na ativação da coagulação do sangue, fibrinólise, geração de cininas, regulação do tônus vascular e inflamação (Mahabeer e Bhoola, 2000). Uma série de pró-enzimas contribui para ativação da cascata de sua formação, são elas: fator Hageman (fator XII), H-cininogênio (HC), pré-calicreína plasmática (PCP), fator-XI e o cininogênio de alto peso molecular (CA) (Chung, 1986). A PCP, uma glicoproteína precursora da CP, é sintetizada e secretada por hepatócitos (Herdenson, 1992), que forma um complexo com (CA) e circula no plasma conectado a superfície da membrana externa dos neutrófilos (Herdenson, 1994). Quando ativado, o fator Hageman (fator XII) interage com neutrófilos, membranas endoteliais e superfícies teciduais, convertendo enzimaticamente PCP para CP (Chung, 1986; Bhoola, 1992b; Hermann, 1999).

A calicreína tecidual (CT), conhecida também como calicreína glandular são ácidos glicoprotéicos, sua principal função é ser altamente seletiva na clivagem do cininogênio plasmático em duas ligações peptídicas, assim liberando a cinina-calidina (Lys-bradicinina). A CT tem sido isolada e identificada em vários tecidos como; glândulas submandibulares, pâncreas, músculos esqueléticos, rim, baço, glândula pituitária, placenta, glândulas salivares, hipotálamo, neutrófilos e cérebro (MacDonald, 1988; Mahabeer e Bhoola, 2000). Enzimas que possuem a capacidade para liberar cininas a partir do cininogênio são chamadas de cininogenases. Este nome inclui enzimas como: calicreínas plasmáticas e teciduais, tripsina, plasminogênios, e proteases veneno de cobra. Por meio de ação enzimática, as calicreínas (CP e CT) liberam peptídeos vaso- ativos, as cininas a partir do substrato cininogênio (Bhoola, 1992).

3.4– Cininogênios

Os cininogênios são glicoproteínas cadeia-única, possui um amino-terminal cadeia pesada, e um COOH-terminal cadeia leve, com uma cinina entre os dois polipeptídeos (Kerllermann, 1987). Cininogênios são sintetizados por hepatócitos e como proteínas secretoras típicas submetem-se a modificações pós-translacionais, tais como, prévia glicosilação para segregar dentro da circulação (Bhoola, 1992; Madar e Schmaier, 2004). Cininogênios de alto e baixo peso molecular (CA) e (CB) são substratos precursores das cininas. Na realidade, ambas as proteínas cininogênios são produzidas como uma única cadeia polipeptídica, e as nomenclaturas de cadeias pesadas e cadeias leves refere-se à estrutura acoplada depois da ativação por clivagem da enzima calicreína. (Moreau, 2005). No homem a calicreína plasmática forma bradicinina [BK-(1-9)], exclusivamente através do cininogênio de alto peso molecular, enquanto a calicreína tecidual forma calidina, [Lys⁰-BK-(1-10),KD-(1-10)] através do cininogênio de baixo peso molecular e alto peso molecular (CA) (Campbell, 2000). Algumas conversões da calidina (Lys-bradicinina) em bradicinina podem ocorrer através da remoção do NH₂-terminal lisina por aminopeptidases (Bhoola, 1992; Madar e Schmaier, 2004).

3.5– Cininas

Em humanos e na maioria dos mamíferos, o termo cininas refere-se ao nonapeptídeo, bradicinina (BK: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), e ao decapeptídeo calidina (KD: Lys-BK) (Moreau, 2005). Por virtudes de terem a habilidade de ativar células endoteliais, células musculares lisas, transporte de glicose e proliferação celular; suas ações celulares são essenciais para ativação de plaquetas,

vasodilatação e liberar o ativador tecidual plasminogênio (t-PA) (Staszewska-Barczak e Vane, 1967; Bhoola, 1992 & Moreau, 2005).

3.6– Cininases

A quantidade de cininas é dependente de sua formação e destruição. Os efeitos das cininas na circulação são freqüentemente de curta duração, entre 15 a 30 segundos por serem rapidamente metabolizadas pelas cininases, enzimas que degradam cininas. (Erdos, 1989, 1990; Bhoola, 1992; Madeddu, 2007). Em contrapartida, as cininas são preservadas por um longo período nas adjacências extracelulares, dando tempo suficiente para exercer suas ações biológicas (Madeddu, 2007).

A atividade cininase é um determinante fundamental, pois modula níveis de peptídeos cininas *in vivo* (Campbell, 2000). A dipeptidase enzima conversora de angiotensina I – (ECA), (também conhecida como cininase II) e a endopeptidase neutra (NEP), são as mais importantes enzimas degradantes de cininas no sistema cardiovascular e renal. (Ura, 1994; Campbell, 2001).

Por um longo período, toda ação terapêutica dos inibidores da enzima conversora de angiotensina I consistia na diminuição na formação de Angiotensina II. Entretanto, a demora na destruição das cininas representa o papel de sua eficácia. Tais dados sugerem que cininas produzidas localmente, pelo menos no tecido cardíaco, contribui para efeitos benéficos dos inibidores da enzima conversora de angiotensina I (Margolius, 1995).

Ademais, existem outras enzimas que metabolizam os peptídeos cininas, como: aminopeptidases P, prolilendopeptidases, carboxipeptidases N (cininases I), carboxipeptidases M, e enzima conversora de endotelina (Campbell, 2000). A relativa

importância de cada peptidase no controle dos níveis de cininas é variável a cada espécie, tipos de fluídos biológicos e local tecidual de formação do peptídeo (Campbell, 2000 e Madeddu, 2007).

3.7– Receptores Cininas

Bradicinina (BK), Calidina (Lys-BK) e seus fragmentos BK1-5, BK1-7 e [des-Arg⁹], exercem uma variedade de efeitos biológicos sobre o endotélio e circulação periférica; induzindo vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo, principalmente por reduzirem o tônus da musculatura lisa arterial. (Regoli e Barabé, 1980). Ademais, agem em estados inflamatórios, após traumas e lesões as cininas promovem a migração de células do sangue para o tecido ativando vários componentes, tais como: células máster, fibroblastos, macrófagos, células do sistema imunológico (Dray e Perkins, 1993; Bhoola, 1992). Estes efeitos resultam da ativação de dois tipos de receptores cininas, receptores B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980; Regoli, 1998).

BK e Lys-BK são mais potentes quando atuam via o receptor constitutivo B₂, enquanto que, fragmentos de bradicinina advinda de sua quebra, BK1-7, BK1-5 e [des-Arg⁹], exercem efeitos máximos através do receptor induzível B₁ (Moreau, 2005; Madeddu, 2007).

Nos anos 70, Regoli e colaboradores determinaram com precocidade um modelo na caracterização molecular dos receptores cininas, apontando para a existência de dois tipos de receptores cininas, receptores B₁ e B₂, no qual se diferenciam em perfis farmacológicos, bem como nos padrões de expressão. O desenvolvimento de específicos agonistas e antagonistas para o receptor B₁ foi um importante instrumento no estabelecimento do dualismo dos receptores cininas em mamíferos. Ao mesmo

tempo, a solubilização e purificação dos receptores foram feitas por Goodfriend e colaboradores em 1979 (Ody e Goodfriend, 1979).

Nos anos 80, houve um grande avanço com o desenvolvimento do primeiro análogo com atividades antagonistas do receptor B_2 . A identificação do receptor B_2 e suas vias de sinalização foi outro marco na descoberta de caminhos para a identificação de muitas vias sinalizadoras extracelulares ligadas aos receptores cininas (Higashida, 1986). No mesmo período, o papel da bradicinina como um potente estimulador do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via o receptor B_2 , foi reconhecida. (Palmer, 1987; Leeb-Lundberg, 2005).

O receptor B_2 encontra-se na maioria dos tecidos, particularmente presente nas células endoteliais, células musculares lisas vasculares, fibroblastos, células mesenquimais, alguns neurônios, astrócitos, e neutrófilos polinucleares e células musculares esqueléticas (Figueroa, 1996; Fredrik, 2005). É constitutivamente expresso e media a maioria das ações das cininas. Em contrapartida, o receptor B_1 é expresso em baixa quantidade nos tecidos saudáveis, mais é induzível mediante lesão por citosinas pró-inflamatórias como interleucina 1β (IL- 1β) (Bhoola, 1992; Margolius, 1995; Fredrik, 2005; Moreau, 2005).

3.8– Vias de sinalização dos receptores cininas

Os receptores B_1 e B_2 têm característica transmembrânica e de estarem acoplados a proteínas-G (Regoli, 1998; Madeddu, 2007). São três alças extracelulares (AE-1-3) com domínio N-terminal, e três alças intracelulares (AI-1-3) com domínio C-terminal (Bhoola, 1992; Moreau, 2005; Leeb-Lundberg, 2005).

O receptor B_2 é conhecido por acoplar e sinalizar através da proteína $G\alpha_q$ (Gutowski, 1991) mais também interage com diversas outras proteínas G incluindo, $G\alpha_i$

(Linder, 1990), $G\alpha_s$ (Liebmann, 1996) e $G\alpha_{12/13}$ (Gohla, 1999). A proteína $G\alpha_q$ regula mecanismos que estão implicados na fosforilação da fosfolipase citosólica C_γ (PLC- γ) (Bascands, 1993; Smith, 1995). Ao acoplar-se no receptor B_2 , BK ou Lys-BK induz uma mudança conformacional dissociando a proteína G trimérica em subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Essa dissociação induz fosforilação da tirosina e ativa PLC- γ , catalisando a produção de trifosfato de inositol (IP_3), eficaz estimulador na liberação de cálcio de estoques intracelulares e diacilglicerol (DAG) essencial mensageiro na ativação da proteína quinase C (PKC) (Leeb-Lundberg, 2005; Madeddu, 2007).

A ativação dos receptores cininas também é alvo do influxo de Ca^{2+} , por seus específicos canais, o qual amplifica a sinalização da fosfolipase A_2 (PLA $_2$) (Bhoola, 1992; Moreau, 2005).

Em células endoteliais, a BK estimula a eNOS através de mecanismos mediados pelo Ca^{2+} , permitindo a produção aumentada de óxido nítrico (NO), resultando em vaso relaxamento (Busse e Fleming, 1995; Vanhoutte, 1995). Cininas podem também estimular a liberação de NO através de *upregulation* da transcrição do gene da eNOS (Emanuelli, 2004) e por facilitar a liberação da eNOS da caveola (Feron, 2006).

Um mecanismo adicional usado pelas cininas para induzir vasodilatação, é a estimulação da formação de prostaglandina I_2 (prostaciclina) através da ativação do Ca^{2+} citosólico – isoforma sensível a PLA $_2$ (Ignarro, 1987). Prostaciclina, em consequência, estimula produção de AMP cíclico, promovendo vasodilatação nas células musculares lisas vasculares. (Nishizuka, 1992; Leeb-Lundberg, 2005).

O receptor B_1 induzível por traumas, inflamação e injúrias teciduais, também interage diretamente com proteínas G – $G\alpha_q$ e $G\alpha_i$, ativando vias de sinalização similares aquelas *downstream* do receptor B_2 , incluindo, elevação intracelular de Ca^{2+} ,

ativação da eNOS e produção de NO (Margolius, 1995; Madeddu, 2007). Embora os receptores B₁ e B₂ pareçam sinalizar por vias similares, os padrões de sinalização são diferentes em termos de variação na concentração de Ca²⁺ (em duração e em intensidade) (Marceau, 1998). Além disso, receptores B₁ e B₂ exibem importantes diferenças em suas susceptibilidades para desensibilização. Quando ativado por agonista, o receptor B₂ submete-se a uma rápida desensibilização (Fausser, 1998), envolvendo fosforilação/desfosforilação de específicos resíduos de Ser e Tyr no amplo domínio C-terminal do receptor (Leeb-Lundberg, 2005). A ativação permite desensibilização funcional do receptor o qual está associado a uma internalização agonista-induzível (Blaukat, 1996). Entretanto, o receptor B₁ somente se desensibiliza em raros momentos, e também não é fosforilado em nenhum grau significativo na ausência ou presença do agonista, pois carece de resíduos Ser e Tyr na cauda C terminal (Moreau, 2005).

O possível papel dos receptores cininas na fisiopatologia humana é derivado de estudos que avaliam polimorfismos de genes que codificam receptores cininas, suas diferenças em expressão e detecção de alterações em suas funções (Moreau, 2005).

3.9– Genes e receptores cininas

Genes distintos dos receptores cininas coexistem no genoma humano e, muito provavelmente, no genoma da maioria dos mamíferos (Leeb-Lundberg, 2005). Além disso, o Projeto Genoma Humano revelou que os genes dos receptores cinina, estão agrupados em *tandem* no mesmo *locus* do cromossomo 14 (B₁- 14q32. 11 – B₂-14q32. 12) com menos de 20kb de DNA genômico os separando. Isto tem profundas implicações para o estudo de polimorfismos genéticos, onde, um marcador genético de

um dos dois genes dos receptores poderia apontar uma alteração funcional do outro (Moreau, 2005).

O receptor B₁ tem 36% de homologia com o receptor B₂ nas sequências de aminoácidos. O produto do gene humano *BDKRB1* consiste de 353 aminoácidos e aproximadamente 70% de toda sua sequência genômica é homologa aos genes *BDKRB1* de ratos e camundongos (Menke, 1994). Enquanto que, o produto do gene humano *BDKRB2* consiste de 391 aminoácidos e aproximadamente 80% de toda sua sequência genômica é homologa aos genes *BDKRB2* de ratos e camundongos (Cayla, 2002). O RNA mensageiro que codifica o receptor B₂ é maior, quando comparado ao receptor B₁ 4 para 1.4 Kb, respectivamente (Kammerer, 1995; Braun, 1996). A ampla região 3'-*untranslated* do receptor B₂, é considerada a maior diferença entre os receptores cininas (Moreau, 2005; Leeb-Lundberg, 2005).

3.10– Polimorfismo -9/+9 do gene do receptor B₂ de bradicinina

Em 1992, o cDNA do receptor B₂ de bradicinina humano foi clonado por alguns investigadores (Hess, 1992; Eggerickx, 1992). Estudos subsequentes mostraram quatro polimorfismos localizados em cada um dos 3 éxons e um localizado na região promotora (Kammerer, 1995; Braun, 1996). Ademais, estudos revelaram um polimorfismo de repetição em *tandem* detectado no exon 1 localizado a 12 pb *downstream* ao sítio de início da transcrição. O sequenciamento do DNA revelou dois diferentes tamanhos ao exon 1 do gene *BDKRB2*. A sequência com 9 pb foi referido como alelo (+9) enquanto que, a sequência sem 9 pb foi denominado alelo (-9) (Braun, 1995; Braun, 1996).

Outro estudo determinou se o polimorfismo no exon 1 estava associado com alguma diferença na expressão do gene *BDKRB2*. Foram mensuradas quantidades nos

níveis de RNAs mensageiros (mRNAs) dos alelos. Ademais se demonstrou quantidades predominantes de mRNA no alelo (-9) o que não foi visto no alelo (+9). Este estudo não determinou se as diferenças dos níveis de mRNAs refletiam efeitos transcricionais ou pós-transcricionais (Lung,1996). Entretanto, outro estudo demonstrou uma diminuição na atividade transcricional na sequência (+9) comparado com a sequência (-9) (Braun, 1996). Esses resultados sugerem que o alelo -9 do exon 1 poderia afetar a expressão do gene BDKRB2 (Lung, 1996; Braun, 1996).

3.11– Treinamento físico e o polimorfismo -9/+9 do gene BDKRB2

Estudos voltados ao polimorfismo do gene do receptor B₂ de bradicinina (BDKRB2) e treinamento físico são recentes e poucos. Zuraw e colaboradores sugeriram que a bradicinina modula o efeito da ECA na hipertrofia do ventrículo esquerdo, em resposta ao treinamento físico, além de aumentar da perfusão vascular e elevar a captação de glicose miocárdica (Zuraw, 2001). Ademais, Brull e colaboradores demonstraram que militares com alelos (-9 para BDKRB2 e I para ECA) apresentavam menor hipertrofia do ventrículo esquerdo após 10 semanas de treinamento físico (Brull, 2001). Nesse sentido, outro estudo demonstrou que indivíduos saudáveis que expressavam referidos alelos, apresentavam maior eficiência metabólica muscular esquelética e maior desempenho físico em endurance (Williams, 2004). Entretanto, a influência do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina na vasodilatação muscular reflexa e na atividade da ECA, em resposta ao treinamento físico, não estão estabelecidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão Científica e Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo-FMUSP (anexo I). Os indivíduos foram informados detalhadamente sobre o estudo e, a seguir, solicitado o termo de consentimento por escrito do responsável legal (Anexo II).

Foram selecionados 211 policiais da Guarda Civil Metropolitana de São Paulo e da Polícia Militar do Estado de São Paulo, na faixa etária de 20 a 35 anos. Desses, 165 fizeram testes pré-treinamento físico. Todavia, somente 133 concluíram o estudo. As desistências deveram-se a lesões musculares (n=4), má aderência ao treinamento físico (n=21) e não comparecimento para realização dos exames finais (n=7).

Os indivíduos que participaram do estudo foram submetidos à ergoespirometria e pletismografia de oclusão venosa na fase pré e pós-treinamento físico e realizou-se uma coleta de amostra de sangue para extração de DNA genômico, atividades da ECA e dosagens lipídicas.

Estes indivíduos foram treinados sob supervisão direta de um professor de Educação Física, que seguia um protocolo padronizado de duração do treinamento, frequência semanal das seções e progressão do treino (Figura 1).

Figura 1. Seqüência do estudo

4.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos que não apresentassem hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e valvulopatias moderadas e severas ou uso regular de medicações cardioativas. Foram excluídos também aqueles com IMC (Índice de Massa Corporal) maior ou igual a 30.

4.3- Métodos de Avaliação

4.3.1 Avaliação da Capacidade Cardiorespiratória ao Exercício

A avaliação da capacidade cardiorespiratória foi realizada no início e após quatro meses e meio de intervenção do treinamento físico.

Todos os voluntários foram submetidos a teste ergoespirométrico, com um protocolo de rampa, em esteira ergométrica (Quinton Instruments Company, Seattle, Washington). A avaliação foi realizada em um sistema computadorizado (Sensor Medics, modelo Vmax 229, Buena Vista, CA, USA), para medida direta do consumo de oxigênio (VO_2) pico, antes de iniciar o protocolo de treinamento e ao final deste período.

Após posicionamento na esteira, os examinados eram acoplados a uma válvula com transdutor de volume, ao mesmo tempo em que era realizada preensão nasal por meio de prendedor apropriado, para que os gases expirados fossem coletados continuamente por intermédio da referida válvula. A ventilação (VE), fração de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) foram medidos a cada ciclo respiratório através de sensores. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados, foram calculados o VO_2 e a produção de dióxido de carbono.

O VO_2 pico foi considerado o VO_2 obtido no pico do exercício, quando o paciente se encontrava em exaustão e não mais conseguia manter o ritmo da corrida imposto pela esteira.

Determinação do limiar anaeróbio e ponto de compensação respiratória

Além da determinação da capacidade funcional máxima, foram determinados o limiar anaeróbio (LA) e o ponto de compensação respiratória (PCR) que foram utilizados para a prescrição individualizada da intensidade de treinamento físico.

O LA foi considerado no minuto em que o paciente apresentou valores de equivalente ventilatório de oxigênio (VE/VO_2) e pressão parcial de oxigênio no final da expiração ($PetO_2$) mais baixos, antes de iniciarem um aumento progressivo e incremento do valor de razão de troca respiratória (RER) não linear.

O PCR será considerado no minuto em que o paciente apresentar valores de equivalente ventilatório de gás carbônico (VE/VCO_2) mais baixos antes de iniciarem um aumento progressivo e pressão parcial de gás carbônico no final da expiração ($PetCO_2$) mais alto antes de começar a diminuir (Skinner, 1980).

Todos eram encorajados a realizar o exercício progressivo máximo até que sintomas como dispnéia, fadiga intensa ou dor muscular os tornassem inábeis para continuação do teste. O esforço também era interrompido na presença de arritmias complexas ou sinais de isquemia miocárdica. O período de recuperação foi de quatro minutos, numa velocidade de duas milhas por hora, com a esteira a zero grau de inclinação.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitorizadas durante todo o teste ergoespirométrico. A pressão arterial foi aferida pelo método auscultatório, utilizando-se um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. As aferições foram realizadas no repouso e a cada dois minutos de exercício e no primeiro, segundo e quarto minutos da recuperação. A frequência cardíaca foi continuamente monitorizada

pelo sinal eletrocardiográfico e registrada ao final de cada minuto do exercício e recuperação.

O teste ergoespiométrico era precedido de um eletrocardiograma de repouso, com o registro de doze derivações simultâneas e realizado em ambiente com ar condicionado em temperatura controlada (21°C) pelo menos duas horas após uma refeição leve.

4.3.2 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Muscular

O fluxo sanguíneo muscular foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa. O braço contralateral (aquele que não estará realizando o exercício isométrico) será elevado acima do nível do átrio direito para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo, foi colocado ao redor do antebraço, a 5 cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e outro na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível supra-sistólico 1 minuto antes de se iniciar as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período de 7 a 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico refletirá o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação. O sinal da onda de fluxo muscular foi registrado em tempo real em um computador através do programa AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz. A condutância vascular no antebraço será calculada pela divisão da pressão arterial média (mmHg) pelo fluxo sanguíneo no antebraço.

Teste de Exercício Isométrico

O protocolo de exercício isométrico foi realizado no início e após quatro meses e meio de intervenção do treinamento físico.

Neste protocolo, foram realizadas manobras (exercício isométrico) (Figura 2). Antes do início do protocolo, o indivíduo foi colocado na posição deitada, e a seguir foi determinada sua contração voluntária máxima após três tentativas de contração máxima (no braço dominante) em um dinamômetro de preensão de mão. A seguir, calculou-se 30% da contração voluntária máxima. Após três minutos de repouso (registros basais), o indivíduo realizou três minutos de exercício isométrico moderado de preensão de mão, a 30% da contração voluntária máxima. Após este período, foram realizados três minutos de recuperação.

Durante todo o protocolo de exercício isométrico foram feitos os registros simultâneos do fluxo sanguíneo muscular, da pressão arterial, e da frequência cardíaca.

Figura 2. Teste de exercício isométrico a 30% da contração voluntária máxima (CVM).

CVM = contração voluntária máxima.

4.3.3 Avaliação da condutância vascular no antebraço

A condutância vascular do antebraço foi calculada pela divisão do fluxo sanguíneo muscular no antebraço (ml de sangue/min/100 ml de tecido) pela pressão arterial média (mmHg), multiplicado por 100, e foi expressa em área sobre a curva (ASC).

4.3.4 Avaliação da pressão arterial

Durante o protocolo de exercício isométrico, a pressão arterial foi medida a cada minuto, no membro inferior esquerdo pelo método oscilométrico (monitor automático de pressão arterial - Dixtal, modelo DX 2710).

4.3.5 Avaliação da frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi obtida através do registro eletrocardiográfico. Foram colocados três eletrodos no tórax do indivíduo, na posição bipolar, para registro da derivação MC5. Após este sinal ser pré-amplificado (General Purpose Amplifier/Stemtech, Inc., GPA-4, modelo 2), ele foi convertido de analógico para digital, e em seguida analisado em um programa de computador AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz.

4.4. Genotipagem

Extração do DNA

Feito através da coleta de 8 ml de sangue periférico coletado em tubo contendo EDTA. Posteriormente o sangue é transferido para um tubo de 50 ml, onde é adicionado 10 ml de tampão A (1mM NH_4HCO_3 , 144mM NH_4Cl), agitado (Vortex), deixado a 4°C durante 10 min e centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4°C.

O sistema de lavagem consiste em se descartar o sobrenadante, adicionar 20 ml de tampão A, ressuspender o sedimento leucocitário através da agitação (Vortex), deixar a 4°C durante 10 min e centrifugar a 4 °C por 10 min a 3000 rpm.

Para a lise, é descartado mais uma vez o sobrenadante, ressuspendido o sedimento leucocitário em: 3 ml de tampão B (10mM Tris-HCl pH 8.0, 400mM NaCl, 2mM Na_2EDTA pH 8.0) + 200 microlitros de SDS 10% + 500 microlitros de tampão C com proteinase K (2 microlitros de proteinase K 20 mg/ml diluída em 5ml) de tampão C (50 microlitros de SDS 10%, 2 microlitros de Na_2EDTA 0,5M pH 8.0, 488 ml de água destilada) e deixar a 37°C por aproximadamente 12 – 18 hs.

Para a precipitação é adicionado 1 ml de solução D (NaCl 6M), misturar vigorosamente durante 1min (Vortex), centrifugar a 3000 rpm por 20 min a 4° C e transferir o sobrenadante para um tubo de 15 ml.

Esse procedimento é feito dentro de um isopor contendo gelo seco. É adicionado 1 volume de etanol a 100% (mantido a -20°C), o DNA é “pescado”, precipitado e transferido para um tubo de 1,5 ml de etanol 70% (mantido a -20°C). Posteriormente é centrifugado a 13500 rpm por 15min a 4°C, descartado o sobrenadante e deixado secar o tubo a temperatura ambiente. Finalizando, o sedimento (DNA), é

ressuspendido em 1 ml de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Após completa dissolução, diluir o DNA 50X em TE 1X e ler a densidade óptica a 260 nm.

Determinação do Genótipo do Receptor B₂ de Bradicinina.

Inicia-se este procedimento com a amplificação do DNA genômico dos indivíduos utilizando-se *primers* específicos para a região genômica de interesse (no gene do receptor B₂ da bradicinina). As amostras serão amplificadas com um par de *primers* que reconheça uma sequência específica do gene, 5'-TCTGGGCTTCTGGGCTCCGAG-3'; 5'-AGCGGCATGGGCACTTCAGT-3'. O produto final deste genótipo será resolvido em gel de agarose a 1.5%, em eletroforese e armazenado em formato digital para posterior análise.

Os alelos +9 e -9 serão identificados através do PCR dos respectivos fragmentos provenientes no exon 1 do gene do receptor B₂ de bradicinina e visualizados por eletroforese.

Após extração do DNA, uma solução contendo 1μM de *primers*, 200μM desoxinucleotideo trifosfato, 1.3 mM cloreto de magnésio, 50 mM cloreto de potássio, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4 a 25 °C), 0.1 % Triton X-100, e 0.35 unid de *Thermus aquaticus* DNA polymerase. É usado um par de *primers* para amplificar os alelos +9 e -9, resultando em 319-bp e 597-bp *amplicons*, respectivamente (hace3s-5'GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT3':hace3as5'GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC3'). O procedimento termo cíclico consiste na desnaturação a 94°C por 30 segs, anelamento a 56°C por 45 segs e extensão a 72°C por 7 min. Após a adição de 5 μl de

glicerol- *based loading* tampão, 7 µl da mistura será adicionado a gel de agarose 1.5%, contendo 40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA e 1µg de brometo de etídeo/ ml de solução. O produto da amplificação dos alelos +9 e -9 serão identificados por 300-nm de transiluminação ultravioleta. Devido o alelo +9 em amostras heterozigotas, ser preferencialmente amplificado, cada amostra inicialmente genotipada como +9/+9 é comumente submetida a uma segunda e independente amplificação com um par de *primers* que reconheça uma seqüência específica de inserção (hace 5a, 5'TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC3';hace5c,5'TCGCCAGCCCTCCCATGCC CATAA 3'), com idênticas condições de PCR, exceto para temperatura de anelamento, 67°C.

4.5 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no soro.

A atividade da ECA foi determinada no soro. Para o ensaio foram utilizados 5µl de soro mantidos sob incubação com uma solução de Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz = ácido ortho-aminobenzóico; Dnp = dinitrophenil) 10µM em tampão Tris-HCL 1 mM, NaCl 50 mM e ZnCl₂ 10 µM em um volume final de 200µl. Em uma segunda etapa, a atividade enzimática foi determinada de forma contínua em fluorímetro ($\lambda_{em} = 420$ nm) e ($\lambda_{ex} = 320$ nm), isto é, medindo-se a fluorescência por 60 minutos (uma leitura por minuto) a 37°C. Este método se baseia na utilização de um substrato fluorescente (Abz-FRK(Dnp)P-OH) que é clivado com alta afinidade pela ECA ($K_{cat}/K_m = 45,4 \cdot 10^3 s^{-1}$) (Alves et al., 2005). Como controle negativo, a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH foi abolida no soro por 0,5µM de Captopril, um específico inibidor da ECA. A partir da leitura das amostras foi obtida uma curva de fluorescência por unidade de tempo e a

inclinação desta curva resultou na atividade da ECA, que foi convertida em μmol de substrato hidrolisado por minuto, expressa em $\text{uF} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.6 Cultura primária de células de músculo liso de veia safena (SVSMC) e artéria mamária (MASMC) humanas.

Pequenos fragmentos de veia safena ou de artéria mamária, após a retirada a camada endotelial por atrito mecânico, foram colocados em placas de cultura de 6 poços contendo 3% gelatina e cultivados em meio DMEM high glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{L/mL}$ de estreptomicina em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO_2 . Após aproximadamente 1 semana, de crescimento das células musculares lisas, elas foram ampliadas e caracterizadas com anticorpo anti- α -SMA. Estas células foram mantidas na placa até a confluência de aproximadamente 80% e os repiques foram realizados por exposição à solução de tripsina/EDTA (250mg% - 1:250) por 5 minutos, e a manutenção da cultura em garrafas de 75 cm^2 até a oitava passagem.

A cultura apresenta morfologia característica de células musculares lisas de “hill and valey” e presença de marcador específico para α -SMA.

4.7 Análise da expressão gênica por real time RT-PCR.

Foram desenhado primers específicos para o mRNA para sequência do gene humano BDKRB2. Os iniciadores para BDKRB2 (com base na sequência de humanos)

foram: 5_ CGA CAT CAA TGT TGC CAC CT 3_ (forward) e 5_ CTG GAT GGT GTT GAG CCA G 3_ (reverso). Antes da realização dos experimentos qRT-PCR, a amplificação e a especificidade foram verificadas por PCR convencional. O RNA total foi extraído a partir de cultura primária de células musculares lisas vasculares e o cDNA foi sintetizado. O RNA total foi isolado com Trizol Reagent (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante e o cDNA foi sintetizado com Super Script™ III Transcriptase Reversa (Invitrogen). Duzentos nanogramas de cDNA foram utilizadas para as reações PCR em tempo real (SYBRw Green PCR Master Mix-PE Applied Biosystems) em um ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Todas as amostras foram analisadas em triplicato. Os genes controle RNA ribossomal 28S e ciclofina foram usados para normalizar os resultados. O método comparativo limiar (CL) de ciclos foi utilizado para análises de dados. CL indica o número fracionário de ciclos em que a quantidade do amplificado atinge um determinado limiar, e Δ CL é a diferença do ciclo limiar do alvo e referência (28S ou ciclofina).

4.8 Replicação da Amostra

Foi também utilizada uma segunda e independente amostra para replicar a associação do polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2 e atividade da ECA. Esta amostra foi constituída de indivíduos da população geral, homens e mulheres que foram doadores de sangue do Instituto do Coração - HC (InCor). Os detalhes desta amostra foram descritos anteriormente (Pereira, 2003). Para a presente análise, usamos os dados disponíveis sobre a atividade da ECA em 193 indivíduos. Todos estes indivíduos foram genotipados para o polimorfismo -9/+9 do gene BDKRB2.

4.9 Protocolo de Treinamento Físico

No decorrer do período de março de 2001 a outubro de 2008, oito grupos de 30 voluntários foram formados para a realização de 18 semanas de treinamento físico. Os três primeiros grupos foram de voluntários da Guarda Civil Metropolitana de São Paulo e os restantes formados por recrutas da Polícia Militar do Estado de São Paulo.

O treinamento físico foi realizado no Parque D. Pedro, Parque do Ibirapuera e Parque do Carmo, para primeiros, segundos e terceiros grupos, respectivamente. Estes locais foram escolhidos por favorecerem a atividade de corrida e por situarem-se próximo às Bases da Guarda Civil Metropolitanos. Os recrutas voluntários da Polícia Militar fazem parte do Centro de Formação de Soldados “Coronel Eduardo Assumpção” e foram treinados na pista de atletismo do próprio local, situado na Av. Dr. Felipe Pinel, 2859 – Pirituba – São Paulo/SP.

O período de treinamento foi de 18 a 20 semanas, com três sessões semanais, de 60 a 90 minutos de duração. A sessão de treinamento consistia em: aquecimento alongamento, exercícios de resistência muscular localizada, corrida, e alongamento. Apesar de a sessão ser realizada em grupo, o treinamento era individualizado, respeitando-se as frequências cardíacas correspondentes aos limiares ventilatórios de cada um dos indivíduos, avaliado no teste ergoespirométrico.

Nas primeiras nove semanas (Fase I) o treinamento teve um caráter progressivo em relação ao volume; iniciava-se com trinta minutos de corrida e chegando ao final da oitava semana com uma duração de cinquenta minutos à uma hora. Nesta fase, o treinamento aeróbio foi conduzido numa intensidade correspondente ao Limiar Anaeróbio. A frequência cardíaca foi monitorada por um professor de Educação Física,

por meio de monitor de frequência cardíaca (marca Polar, modelo A1) momento a momento durante todo o treinamento aeróbico.

Na Fase II do treinamento (nove semanas seguintes), o volume da corrida no treinamento físico foi mantido entre 50 e 60 minutos, mas com uma progressão da intensidade de treinamento (FC correspondente ao PCR). Nesta fase, em uma ou duas sessões de treinamento físico realizado por semana, a frequência cardíaca poderia ultrapassar a frequência cardíaca do PCR.

4.10 Análises Estatísticas

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Dados físicos, hemodinâmicos, RT-PCR, dados lipídicos e atividade da ECA pré-treinamento, foram comparados pela análise de variância de um caminho (one-way ANOVA) não pareado para avaliar possíveis diferenças basais entre os grupos.

Análise de Fluxo Sanguíneo do Antebraço (FSA) e Condutância Vascular do Antebraço (CVA) entre os grupos pré-treinamento físico foi realizada por Teste-T. Dados foram expressos para FSA em ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) e CVA em (units).

A comparação dos grupos, após serem submetidos ao treinamento físico, foi realizada pela análise de variância de dois caminhos (two-way ANOVA) para amostras repetidas, e por Teste -T.

Dados de (FSA) e (CVA) são apresentados em área sobre a curva (ASC).

No caso de F significativa, foi usado teste de Scheffè como post-hoc. O nível de significância aceito foi de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Distribuições dos alelos

As frequências alélicas e genóticas dos cento e sessenta e cinco indivíduos genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e são similares à distribuição verificada num estudo prévio realizado com a população brasileira (Pereira, 2005). A frequência encontrada para os alelos -9 e +9 foi de 49% e 51%, respectivamente. A frequência genotípica encontrada para os genótipos -9/-9, +9/-9 e +9/+9 foi de 23%, 52% e 25%, respectivamente.

5.2 Período pré-treinamento físico.

Do total de 211 indivíduos selecionados para o estudo, 165 fizeram parte da amostra pré-treinamento físico, destes, 40 eram homozigotos para o alelo (-9/-9), 84 eram heterozigotos (-9/+9) e 41 indivíduos eram homozigotos para o alelo (+9/+9), para o gene BDKRB2. No período pré-treinamento não foram encontradas diferenças, entre os grupos genótipos, nas características físicas, hemodinâmicas, e lipídicas. Frequência cardíaca e pressão arterial média no repouso e no exercício *handgrip*, também não se modificaram. Além disso, não encontramos diferenças nos valores basais e de exercício *handgrip*, do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço (Tabelas.1,2,3 respectivamente e Figura.3)

Tabela 1. Características basais de 165 indivíduos no pré-treinamento físico, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

	BDKRB2			<i>P</i>
	-9/-9	-9/+9	+9/+9	
N	40	84	41	
Idade, anos	26 ± 1,7	27 ± 1	28 ± 1	0.37
Peso, kg	74.8 ± 4	75.2 ± 2.8	73.7 ± 2.8	0.22
Altura, cm	172 ± 1	180 ± 0	180 ± 0	0.20
IMC, kg/m ²	24.2 ± 1.3	24.3 ± 0.8	24.0 ± 0.8	0.72
Pré-Treino VO _{2pico} , ml/kg/min	48.7 ± 1.65	43.3 ± 1.3	44.5 ± 1.9	0.06
Glicose, mg/dl	70.1 ± 10.4	67.3 ± 11	70.8 ± 9.6	0.24
Colesterol Total, mg/dl	135 ± 19	130 ± 20	145 ± 19	0.54
Colesterol-LDL, mg/dl	97 ± 14	93 ± 15	100 ± 14	0.21
Colesterol-HDL, mg/dl	31 ± 4.8	29 ± 5	33 ± 5	0.21
Triglicerídeos, mg/dl	83 ± 17	83 ± 20	97 ± 19	0.54

Valores de média ± EPM. IMC, índice de massa corporal; VO_{2pico} – Consumo de oxigênio pico.

Tabela 2 – Dados de frequência cardíaca e pressão arterial média no repouso e no exercício *handgrip*, de 165 indivíduos no pré-treinamento, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2, são apresentados na tabela 2.

		BDKRB2			
		Pré-Treinamento			
		Basal	1 min	2 min	3 min
FC, bpm/min	-9/-9	62 ± 2	73 ± 3	76 ± 3	79 ± 3
	-9/+9	61 ± 1	69 ± 2	73 ± 2	76 ± 2
	+9/+9	61 ± 1	69 ± 2	74 ± 2	78 ± 2
PAM, mmHg	-9/-9	90 ± 2	97 ± 2	106 ± 2	111 ± 3
	-9/+9	92 ± 1	99 ± 1	107 ± 1	113 ± 2
	+9/+9	91 ± 1	99 ± 2	105 ± 2	110 ± 2

Valores de média ± EPM. FC-frequência cardíaca; PAM-pressão arterial média.

Tabela 3. Valores basais (3A) e de exercício *handgrip* (3B), do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço, de 165 indivíduos genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

A- Basal	BDKRB2		
	-9/-9	-9/+9	+9/+9
	Pré-treinamento	Pré-treinamento	Pré-treinamento
FSA, (ml.min ⁻¹ .100 ml ⁻¹)	2.11 ± 0.23	2.75 ± 0.24	2.52 ± 0.17
CVA, (units)	2.40 ± 0.26	2.97 ± 0.41	2.89 ± 0.28

Valores de média ± EPM. FSA-Fluxo Sanguíneo no Antebraço; CVA-Conductância Vascular no Antebraço.

B- Handgrip 30%	BDKRB2		
	-9/-9	-9/+9	+9/+9
	Pré-treinamento	Pré-treinamento	Pré-treinamento
FSA, (AUC)	629 ± 27.85	626 ± 22,34	584 ± 22.10
CVA, (AUC)	584 ± 21.85	592 ± 27.10	558 ± 16.3

Valores de média ± EPM. FSA-Fluxo Sanguíneo no Antebraço; CVA-Conductância Vascular no Antebraço.

Figura 3. Variação do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço em 165 indivíduos, no período pré-treinamento físico, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

5.3 Efeitos do treinamento físico.

Foram 133 indivíduos que completaram o treinamento físico e respectivos exames. Entretanto, indivíduos que não apresentavam um ganho de 10% ou mais no $VO_{2\text{pico}}$, também foram excluídos no pós-treinamento. Desta forma, foram incluídos no estudo 17 indivíduos homozigotos (-9/-9), 26 indivíduos heterozigotos (-9/+9) e 16 indivíduos homozigotos (+9/+9), totalizando 58 indivíduos, para o gene BDKRB2.

No período pós-treinamento físico não encontramos diferenças, entre os grupos genótipos, nas características físicas, hemodinâmicas e lipídicas. Frequência cardíaca e pressão arterial média no repouso e no exercício *handgrip*, também não se modificaram. Além disso, não encontramos diferenças nos valores basais do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço. Entretanto, o treinamento físico modificou significativamente as respostas vasodilatadoras reflexas durante o exercício de *handgrip*, no genótipo -9/-9, do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina (Tabelas.4,5,6 respectivamente e Figura.4).

Tabela 4. Características basais de 58 indivíduos no pós-treinamento físico, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

BDKRB2				
	-9/-9	-9/+9	+9/+9	<i>P</i>
N	17	25	16	
Idade, anos	25 ± 1.4	27 ± 1.4	27 ± 1.5	0.47
Peso, kg	78 ± 3.3	70.8 ± 2.7	75.1 ± 3.3	0.11
Altura, cm	180 ± 0.0	180 ± 0.0	179 ± 0.0	0.79
IMC, kg/m ²	25.1 ± 0.8	23.0 ± 0.8	23.9 ± 0.8	0.08
Pós-treinoVO ₂ pico, ml/kg/min	55.3 ± 1.8*	52.8 ± 1.3*	53.6 ± 2.2*	0.58
Glicose, mg/dl	87.1 ± 8	77.5 ± 8	77.2 ± 7	0.54
Colesterol Total, mg/dl	163 ± 15	141 ± 17	154 ± 14	0.55
Colesterol-LDL, mg/dl	126 ± 12	104 ± 13	108 ± 11	0.26
Colesterol-HDL, mg/dl	34 ± 3.4	34 ± 4	37 ± 3.5	0.62
Triglicerídeos, mg/dl	103 ± 22.7	80 ± 12.9	92 ± 17	0.65

Valores de média ± EPM. IMC, índice de massa corporal. * vs. pré-treinamento $p < 0.05$

Tabela 5 – Dados de frequência cardíaca e pressão arterial média no repouso e no exercício *handgrip*, de 58 indivíduos no período pós-treinamento, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

BDKRB2									
		Pré-treinamento				Pós-treinamento			
		Basal	1 min	2 min	3 min	Basal	1 min	2 min	3 min
FC, bpm/min	-9/-9	61 ± 2	67 ± 3	71 ± 3	75 ± 4	62 ± 2	69 ± 3	71 ± 3	74 ± 4
	+9/-9	61 ± 1	68 ± 1	73 ± 2	76 ± 2	58 ± 1	65 ± 1	69 ± 1	73 ± 1
	+9/+9	62 ± 1	69 ± 1	71 ± 2	75 ± 2	55 ± 2	63 ± 1	66 ± 2	71 ± 2
PAM, mmHg	-9/-9	89 ± 3	95 ± 4	106 ± 4	112 ± 4	89 ± 4	94 ± 4	103 ± 4	111 ± 4
	+9/-9	93 ± 3	100 ± 3	109 ± 2	117 ± 2	90 ± 2	96 ± 2	106 ± 3	114 ± 4
	+9/+9	89 ± 3	96 ± 3	104 ± 3	110 ± 3	89 ± 3	98 ± 4	106 ± 3	113 ± 3

Valores de média ± EPM. FC-frequência cardíaca; PAM-pressão arterial média.

Tabela 6. Valores basais (6A) e de exercício *handgrip* (6B), do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço, de 58 indivíduos no período pós-treinamento, genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2.

A-Basal	BDKRB2					
	-9/-9		-9/+9		+9/+9	
	Pré-treinamento	Pós-treinamento	Pré-treinamento	Pós-treinamento	Pré-treinamento	Pós-treinamento
FSA (ml.min ⁻¹ .100 ml ⁻¹)	2.11 ± 0.23	2.32 ± 0.30	2.75 ± 0.24	2.45 ± 0.19	2.52 ± 0.17	2.14 ± 0.19
CVA, (units)	2.40 ± 0.26	2.62 ± 0.33	2.97 ± 0.41	2.61 ± 0.24	2.89 ± 0.28	2.46 ± 0.27

Valores de média ± EPM. FSA-Fluxo Sanguíneo no Antebraço; CVA-Conductância Vascular no Antebraço.

B- Handgrip 30%	BDKRB2					
	-9/-9		-9/+9		+9/+9	
	Pré-treinamento	Pós-treinamento	Pré-treinamento	Pós-treinamento	Pré-treinamento	Pós-treinamento
FSA, (ASC)	514 ± 65.52	629 ± 44.36*	672 ± 256.33	631 ± 37.31	569 ± 41.99	549 ± 45.43
CVA,(ASC)	512 ± 63.29	638 ± 56.28*	656 ± 101.22	621 ± 45.22	578 ± 49.27	549 ± 62.69

Valores de média ± EPM. FSA-Fluxo Sanguíneo no Antebraço; CVA-Conductância Vascular no Antebraço.

* vs. pré e pós-treinamento e entre os genótipos $p < 0.05$.

Figura 4. Variação do fluxo sanguíneo no antebraço e da condutância vascular no antebraço em 58 indivíduos, no pós-treinamento físico, genotipados para o polimorfismo do gene BDKRB2.

5.4 Associação dos genótipos BDKRB2 e a expressão do gene BDKRB2 em células do músculo liso vascular humano.

A técnica de real time PCR determinou a expressão do gene BDKRB2 em células do músculo liso vascular de artérias mamárias de seres humanos. Os resultados mostraram que o genótipo -9/-9 tem uma atividade transcricional significativamente maior do que os genótipos -9/+9 e +9/-9, conforme determinado pelo limiar comparativo (CT). (Figura 5). Isto confirma pela primeira vez a funcionalidade do polimorfismo estudado em células vasculares de seres humanos.

Figura 5. Análise real-time PCR utilizando primers específicos para BDKRB2 em células musculares lisas vasculares (VSMC). Os valores representam média $\pm$ EPM.

5.5 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no soro.

No período pré-treinamento a atividade da ECA no soro foi significativamente menor no grupo genótipo -9/-9 quando comparado ao grupo genótipo +9/+9 ($p < 0,02$). No período pós-treinamento, houve uma redução significativa da atividade da ECA em todos os grupos genótipos. No entanto, o grau de redução da atividade da ECA foi dependente do genótipo BDKRB2. Em indivíduos portadores do genótipo -9/-9 houve um decréscimo de 23% maior nos níveis atividade da ECA, quando comparados aos indivíduos com genótipos, -9/+9 e +9/+9 (figura 6). Finalmente, a associação entre o polimorfismo estudado BDKRB2 e a atividade da ECA foi confirmada em outra amostra independente. Neste experimento replicação, a atividade da ECA também foi significativamente menor no grupo genótipo -9/-9 quando comparado aos genótipos -9/+9 e +9/+9 ($p < 0,0004$) (Figura 7).

Figura 6. Atividade da ECA no soro no período pré e pós-treinamento físico, em indivíduos genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2. Os valores representam média $\pm$ EPM.

* $p < 0.01$ vs. pré e pós;

$p < 0.02$ vs. (+9/+9) pré.

Figura 7. Atividade da ECA no soro em uma amostra independente, indivíduos genotipados para o polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2. Os valores representam média $\pm$ EPM.

* $p < 0.0004$ vs. (+9/-9 e +9/+9)

6. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo são de que o genótipo -9/-9 do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ bradicinina, está associado à maior vasodilatação muscular reflexa durante o exercício isométrico de *handgrip* em resposta ao treinamento físico aeróbio, além disso, está associado a uma *upregulation* na atividade transcricional em células musculares lisas vasculares (VSMC) e finalmente está associado à menor atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), no pré-treinamento e no pós-treinamento físico aeróbio. Ademais todas essas respostas não foram observadas nos genótipos +9/-9 e +9/+9 do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ bradicinina.

Alguns estudos têm observado que indivíduos saudáveis portadores do alelo -9 têm uma potencialização no fluxo sanguíneo no antebraço, em resposta a infusão de bradicinina intra-arterial, durante o uso de inibidores de ECA (Guilder, 2008), sugerindo que os genótipos do polimorfismo +9/-9 afetariam a sensibilidade do receptor B₂. No presente estudo a resposta vasodilatadora reflexa basal e durante manobras fisiológicas não determinou possíveis diferenças no pré-treinamento em relação aos grupos genótipos (Tabela.3; Figura.3). Entretanto, observou-se na população em estudo e em outra população independente, que os indivíduos portadores da forma -9/-9 do gene BDKRB2, apresentaram menores atividades de ECA no período pré-treinamento, o que não foi observado nos genótipos +9/-9 e +9/+9 (figura 3 e 4).

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que aborda as implicações do polimorfismo +9/-9 do gene BDKRB2, sobre os efeitos na atividade da ECA em seres humanos.

Estudos prévios têm demonstrado o envolvimento dos genótipos BDKRB2 na modulação de inúmeros fenótipos cardiovasculares, como hipertensão e insuficiência cardíaca (Dell'Italia, 1999). O alelo -9 tem sido associado à menor hipertrofia do ventrículo esquerdo após 10 semanas de treinamento físico (Brull, 2001), maior eficiência metabólica muscular esquelética e maior desempenho físico em atletas de endurance (Williams, 2004). No presente estudo ficou demonstrado que o aumento na resposta vasodilatadora reflexa ao exercício de *handgrip* foi dependente do genótipo-9/-9 em resposta ao treinamento físico aeróbio, sugerindo que este genótipo modularia esta resposta vasodilatadora no pós-treinamento físico. (tabela.6 e figura.4). Alguns estudos têm evidenciado no músculo esquelético, um completo sistema caliceína cinina (Mayfield, 1996) que pode liberar cininas localmente em músculos e tendões (Langberg, 2002). Bradicininas geradas durante o treinamento físico no músculo esquelético podem influenciar o fluxo sanguíneo muscular e captação de glicose (Wasserman, 1987). De fato, os receptores B₂ de bradicinina (B₂KR) media a maioria dos efeitos nos vasos (Gunaruwan, 2009; Venema, 2002). Bradicininas (BK) ou calidinas (Lys-BK) quando acopladas aos receptores B₂K, induz uma mudança conformacional da proteína G trimérica dissociando as subunidades G α e G $\beta\gamma$. Esta clivagem induz fosforilação da tirosina e ativa PLC- γ , catalisando a produção de trifosfato inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) aumentando o transiente de cálcio no citoplasma. O cálcio estimula aumentos de PLA₂ citosólica, que produz a formação de prostaglandina I₂ (prostaciclina) (Ignarro, 1987). Prostaciclina, por sua vez, estimula a produção de AMP cíclico promovendo vasodilatação em células musculares lisas vasculares (VSMCs) (Bhoola, 1992; Langberg, 2002; Madeddu, 2007; Nishizuka, 1992). Portanto, um aumento na atividade transcricional do gene BDKRB2 em (VSMC), (Figura.5) afeta a expressão no número de receptores na superfície da membrana celular

(Lung, 1996; Braun, 1996), permitindo maior acoplamento do agonista bradicinina e, conseqüentemente maiores respostas vasodilatadoras reflexa ao exercício de *handgrip* no pós- treinamento físico no genótipo -9/-9. (Tabela.6, Figuras.4). (Bhoola, 1992; Campbell, 2000; Madeddu, 2007; Nishizuka, 1992).

Ademais, o grau de redução atividade da ECA foi também dependente do genótipo BDKRB2. Em indivíduos portadores do genótipo -9/-9 houve um decréscimo de 23% maior nos níveis atividade da ECA, quando comparados aos indivíduos com genótipos, -9/+9 e +9/+9 (figura 6).

A interação entre o receptor B₂K e a enzima conversora de angiotensina, tem sido amplamente pesquisada (Sabatini, 2008). Recentemente, Chen e colaboradores, demonstraram com sucesso a formação heterodímera entre o receptor B₂K e ECA na membrana plasmática (Chen, 2006). Além disso, sugerem também que os inibidores da ECA somente atuam no receptor B₂K indiretamente, via ECA acoplada na membrana celular (Chen, 2006). Marcic e colaboradores mostraram que essa interação entre ambas as proteínas poderia provocar uma alteração conformacional na ECA (Marcic, 1999; Marcic, 2002), prevenindo a internalização do receptor B₂K para a caveola (Benzing, 1999), além disso, os inibidores da ECA resensibilizariam os receptores B₂K o que poderia aumentar a atividade do agonista bradicinina em até 8 vezes (Marcic, 1999; Marcic, 2002; Minshall, 1997). No presente estudo, não determinamos como essa interação acontece. Ademais recente estudo, (Sabatini, 2008) não conseguiu elucidar quais são os mecanismos moleculares envolvidos entre a enzima e o receptor B₂K. O que ficou evidenciado no presente estudo é que a atividade da ECA é dependente do genótipo -9/-9 do gene BDKRB2, e o treinamento físico acentua essa modulação. Evidentemente, mais estudos são necessários para confirmar e esclarecer estas observações entre o polimorfismo do receptor B₂K e a atividade da ECA.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Deve-se reconhecer uma série de limitações nesse estudo. O treinamento físico foi realizado com indivíduos ativos e não com indivíduos sedentários, limitando assim a possibilidade de estudar a população em geral. Estudou-se indivíduos jovens, o que limita a extrapolação dos nossos resultados para outras faixas etárias. O mesmo argumento pode ser utilizado para a variável sexo. A amostra era constituída apenas de homens. Portanto, não se conhece os efeitos do polimorfismo +9/-9 do gene do receptor B₂ de bradicinina na reatividade vascular e na atividade da ECA em mulheres. Apesar desse estudo ganhar força pelo fato de envolver indivíduos de diferentes etnias, não há garantias de que os seus resultados sejam reproduzidos em outras populações.

Todavia, esses indivíduos faziam parte de um regime militar, o que nos deu mais controle sobre treinamento físico.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados do presente estudo ampliam a nossa compreensão sobre a regulação do gene *BDKRB2* na reatividade vascular e na atividade da ECA em resposta ao treinamento físico aeróbio.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abelous, J. Bardier, E. Les substances hypotensive de l'urine humaine normale. *C.R. Soc. Biol.* 1909 ;(Paris) 66:511-512.
2. Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, Juliano L, and Carmona AK. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:861-868.
3. An P, Hong Y, Weisnagel SJ, Rice T, Rankinen T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Chagnon YC, Bergman RN, Bouchard C, Rao DC. Genomic scan of glucose and insulin metabolism phenotypes the HERITAGE family study. *Metabolism* 2003b; 52:246 -253.
4. Aries, Margarida. Fisiologia, 3ª edição, São Paulo, Guanabara Koogan, 2008.
5. Baertschi, A.J., Zingg, H.H., and Dreifuss, J.J.: Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurophysial system. *Brain Res* 1981; 220:107-119.
6. Bascands, J., L., Girolami, J., P. La bradykinine. *Méd./Sci.* 1993; 12:582-592.
7. Batenburg, W.W. et.al., Bradykinin-induced relaxation of coronary microarteries: S-nitrosothiols as EDHF? *Br. J. Pharmacol* 2004; 142:125-135.
8. Beierwaltes, W. H., Prado, J., AND Carretero, O. A.: Kinin stimulation of renin release in isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol.* 1985a; 248: F757- F761.

9. Benzing T, Fleming I, Blaukat A, Muller-Esterl W, and Busse R. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation* 1999; 99:2034-2040.
10. Bhoola K.D, Figueroa C.D, and Worthy Karen. Bioregulation of kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacological Reviews* 1992; 44,(1)61,.
11. Blais Charles, et.al. The Kallikrein-Kininogen-Kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* 2000; 21:1903-1940.
12. Blaukat, A., Alla, S.,A., Lohse, M.,J., Muller-Esterl, W., Ligand Induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Boil Chem.* 1996; 271:32366-32374.
13. Bouchard, C.; Lesage, R.; Lortie, G.; Simoneau, J.; Hamel, P.,Boulay, M.R.; Pérusse, L.; Thériault, G.; Leblanc, C. Aerobic Performance in Brothers, Dizygotic and Monozygotic Twins. *Med. Sci. Sports Exerc* 1986; 18:(6),p639-646.
14. Bouchard C, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J. HERITAGE family study. Aims, design, and measurement protocol. *Med Sci Sport Exerc* 1995; 27:721-729.
15. Bouchard C, AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J. Genetics of fitness and physical performance. *Human Kinectis*, 1997;Champaign I11.
16. Bouchard C, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J. Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the HERITAGE Family Study. *J. Appl Pysiol.* 2000; 88:551-559.

17. Braith, R.W., M.L. Pollock, D.T. Lowenthal, J.E. Graves, & M.C. LIMACHER. Moderate and high-intensity exercise lowers blood pressure in normotensive subjects 60 to 79 years of age. *Am.J. Cardiol* 1994; 73:1124-1128.
18. Braun A., Kammerer S., Bohme E., Muller B., and Roscher A.A. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 211,n°1:234-240.
19. Braun A., Kammerer S., Maier E., Bohme E., and Roscher A.A. Polymorphisms in the gene for the human B₂- bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases *Immunopharmacology* 1996; 33: 32-35.
20. Bray Molly S. Genomics, genes, and environmental interaction: the role of exercise. *J.Appl. Physiol.* 2000; 88:788-792.
21. Britton, S.J., Metting, P.J. Reflex regulation of skeletal muscle blood flow. In: *Reflex Control of Circulation*. Boca Raton, FL. CRC Press, cap.25, p. 737-764, 1991.
22. Brull David, Sukhbir Dhamarait, Saul Myerson, Jeanette Erdmann, Vera Regitz-Zagrosek, Mike World, Dudley Pennell, Steve E. Humphries, Hugh Montgomery. Bradykinin B₂BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response *Lancet* 2001; 1358:1155-56.
23. Busse, R., & Fleming, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 1995; 27:331-340.
24. Butler R, Morris AD, Burchell B, ET AL. DD Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism Is Associated With Endothelial Dysfunction in Normal Humans. *Hypertension* 1999; 33:1164-68.

25. Campbell, D. J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J.Biol Res.* 2000; 33:665-677.
26. Campbell, D. J. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:1060-1065.
27. Cayla, D., Merino, V., F., Cabrini, D., A., Silava, J., A., Pesquero, J., B., BADER M. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. In *Immunopharmacol* 2002; 2:1721-1727.
28. Cervenka Ludek, Jan Maly, Ludmila Karasová, Marcela Simová, Stefan Vitko, Soňa Hellerová, Jiri Heller, Samir S. El-Dahr. Angiotensin II – Induced Hypertension in Bradykinin B₂ Receptor Knockout Mice. *Hypertension* 2001; 37:967-973.
29. Chagnon, Vera Regitz-Zagrosek, Mike World, Dudley Pennell,. Genomic scan for genes affecting body composition before and after training in Caucasians from HERITAGE. *J.Appl Physiol* 2001; 190:1777-1787.
30. Chao J., Robert P., Becker, Ervin G., Erdos. The tissue Kallikrein-Kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction. *Biol.Chem* 2006; 387,665-675.
31. Changeux, JP, and Edelstein, SJ. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* 2005; 308: 1424-1428.
32. Chen Zhenlong, Peter A. Daddish Richard D. Misall, Robert P. Becker, Ervin G. Erdos, and Fulong Tan. Human ACE and bradykinin B₂ receptors form a complex at the plasma membrane. *The FASEB Journal* 2006; 20:2261-2270.

33. Chung, D.W., Fujikawa, K., McMullen B.A., & Davie, E.W. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 1986; 25:2410-2417.
34. Daniel G., Rankinen T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Chagnon YC. Genes and human elite athletic performance - *Human Genetic* 2005; 116:331-339.
35. Dray, A., Perkins, M., Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 1993; 16, 99-104.
36. De Weerd, W.,F., Leeb-Lundberg L.,M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-couple Galpha subunits Galphaq and Galpha_i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Boil Chem* 1997; 272:17858-17866.
37. Dell'Italia, Louis J. MD; Suzanne Oparil. Bradykinin in the heart: friend or foe? *Circulation* 1999;100;2305-2307.
38. Edery H and G.P. Lewis. Inhibition of plasma kininase activity at slightly acid ph. *Brit.J. Pharmacol*, 19:299-305, 1962.
39. Eggerickx D, Raspe E, Bertrand D, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1306-1313.
40. Emanuelli, C., et.al. Akt/protein Kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer. *Circulation* 2004; 110:1638-1644.
41. Erdos, E.G.: From measuring the blood pressure to mapping the gene: the development of the ideas of Frey and Werle. In the Kallikrein-kinin System in

- Health and Disease, Ed. By H. Fritz, I. Schmidt, and G. Dietze, PP., **Limbach-Verlag, Braunschweig** 1989; 261-276-Germany.
42. Erdos, E.G.: Some old and some new ideas on kinin metabolism. **J. Cardiovasc Pharmacol.** 1990; 15 (suppl. 6): 520-524.
 43. Faussner, A., Proud, D., Towns, M., Bathon, J., M., Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. **J. Boil Chem** 1998; 273:2617-2623.
 44. Feron, O. & Balligand, J.L., Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. **Cardiovasc. Res**, 2006; 69:788-797.
 45. Figueroa, C.D., Dietze, G., AND Muller-Estert, W. Immunolocalization of bradykinin B₂ receptors on skeletal muscle cells. **Diabetes**, vol.45 (suppl 1) 1996; S24-S28.
 46. Frey, E.K. and Kraut, H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. Arch. Exp. **Pathol. Pharmacol.** 1928; 1331-1345.
 47. Geppetti, P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathological implications. **Regul. Pep** 1993; 47, 1-23.
 48. Gohla, A., S., Offermanns S, Wilkie T., M., AND Schultz, G. Differential involvement of G α_{12} and G α_{13} in receptor-mediated stress fiber formation. **J. Biol. Chem** 1999; 274:17901-17907.
 49. Guilder Gary, PV, Mias Pretorius, James M. Luther, J. Brian Byrd, Kevin Hill, James V. Gainer, Nancy J. Brown. Bradykinin type 2 BE! Genotype influences bradykinin-dependent vasodilation during angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**. 2008; 51 [part 2]:454-459.

50. Gunaruwan Prasad, Abdul Maher, Lynne Williams, James Sharman, Mattias Schmitt, Ross Campbell and Michael Frenneaux. Effects of bradykinin on venous capacitance in health and treated chronic heart failure. *Clinical Science* 2009; 116: 443-450.
51. Gutowski, S., Smreka, A., Nowak, I., Wu, D.,G., Simon M., Sternweis P.,C. Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem* 1999; 266:20519-20524.
52. Hagberg, J.M. Exercise, fitness and hypertension. In: Exercise Fitness and Health, edited by C. Bouchard, R. Shepard, T. Stephens, J. Sutton., and B. McPherson. Champaign, IL: *Human Kinetics* 1990; 455-465.
53. Hallberg, P., Lind, L., Michaelsson., K. Karlsson, J., Harris, M.B. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J. Boil Chem* 2001; 276:16587-16591.
54. Helgeland, A., Strommen, R., Hagelund, C.H.,Trelis.: Enalapril atenolol and hydrochlorothiazide in mild to moderate hypertension. *Lancet* 1986; 1:872-875.
55. Henderson, L., Figueroa, C.D.,Muller-Esterl, W., & Bhoola,K.D. Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H- kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. *Agents Actions Suppl Recent Prog. Kinins* 1992; 38:590-594.
56. Henderson, L., Figueroa, C.D.,Muller-Esterl, W., & Bhoola, K.D. Assembly of contact phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood* 1994; 34:474-482.

57. Hermann, A., Arnhod, M., Kresse H., Neth, P., & Fink, E. Expression of plasma Pre-kallikrein mRNA in human nonhepatic tissues and celllines suggests special local functions of the enzymes. *Boil Chem.* 1999; 380:1097-1102.
58. Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184: 260-268.
59. Higashida, H., Streaty R. A., Klee W., and Nirenberg M. Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second Messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci* 1986; USA 83:942-946.
60. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Mechanisms of endothelium dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am J Physiol* 1987; 253:H1074-108.
61. Jauch, K.W et.al. Dose-dependent effects of bradykinin infusion post-operative patients *Adv.Exp. Med. Biol* 1989; 247A:603-606.
62. Johnson, J. M. Circulation to skeletal muscle. In: Patton, H.D., Fuchs, A.F., B., Scher, A.M., Steiner, R. (editors), *Textbook of Physiology* 1989; 21st ed, p. 887-897.
63. Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA. The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regualtory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 226-233.
64. Kerllermann, J., Thelen, C., Lorrspcich, F., Henschen, A., Vogel, R., & Muller-Esterl, W., Arrangement of the disulphide bridges in human low-M, kininogen. *Biochem. J* 1987; 247:15-21.

65. Kraut, H. et al. Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdrüse. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem* 1930; 189:97-106.
66. Kurland, L., Kahan, T., et. al. B₂ bradykinin receptor (B2BKR) polymorphism and change in left ventricular mass in response to antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigations versus Atenolol (SILVHIA) Trial. *J Hypertens* 2003; 21:621-624.
67. Langberg H., Bjorn C., Boushel R., Hellsten Y., Kjaer M. Exercise –induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *Journal of Physiology* 2002; 542:977-983.
68. Leeb-Lundberg F. L.M., and Zuraw B. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences *Pharmacol Rev.* 2005; 57:27–77.
69. Liebmann, C., Graness, A., Ludwig, B., Adomeit, A., Boehmer A. Boehmer, F.D. Nurnberg, B., AND Wetzker R. Dual bradykinin B₂ receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a G_s mediated stimulation of the cyclic AMP pathway, *Biochem J.* 1996; 313:109-118.
70. Linder, M., E., Ewaald D., A., Miller, R., J., and Gilman A., G. Purification and characterization of G_o alpha and three types of G_i alpha after expression in Escherichia coli, *J. Biol. Chem* 1990; 265: 8243-8251.
71. Lopes, P., Couture, R., Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol* 1992; 210:137-147.

72. Lung Chien-Cheng, Edward K.L., and Bruce L.Zuraw. Analysis of na exon 1 polymorphism of the B₂ bradykinin receptor gene and its transcript in normal subject and patientes with C1 inhibitor deficiency. *J.allergy Clin. Immunol* 1996; 99,n°1,134-146.
73. Ma Jian-XinG, Buga GM, Wood KS. Structure and chromosomal Localization of the Gene (BDKRB2) Encoding Human Bradykinin B2 Receptor. *Genomics* 1994; 23:362-369.
74. Mcardle, W.D., Katch. F.I.Katch, V.L. In: Exercise Pysiology: Energy,Nutrition, and Human Performance. Funcional capacity of the cardiovascular system. Baltimore, MD. Williams & Wilkins, 4°edition, cap 17, p. 297-314, 2006.
75. MacDonald, R. J., Margolius, H. S., & Erdos, E.G. Molecular biology of tissue Kallikrein. *Biochem J* 1988; 253:313-321.
76. Madeddu P., Costanza Emanuelli & Samir El-Dahr. Mechanisms of Disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nature Clinical Praticce Nephology*. 2007; Vol.3, N°4:208-221.
77. Mahabeer Rajeshree, Bhoola Kanti D., Kallikrein and Kinin receptor genes.*Pharmacology & Therapeutics* 2000; 88:77-89.
78. Marceau, F., Hess, J.,F., Bachvarov D., R., The B1 receptors for kinins, *Pharmacol Rev.* 1998; 50:357-386.
79. Marcic Branislav, Peter A. Deddish, Herbert L. Jackman, Ervin G. Erdos. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B₂ receptor. *Hypertension* 1999; 33:835-843.
80. Marcic Branislav, Peter A. Deddish, Randal A. Skidgel, Ervin G. Erdos, Richard D. Minshall, and Fulong Tan. Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail

- affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (21):16110-16118.
81. Margolius S.H. *Kallikreins and Kinins*: Some Unanswered Questions About System Characteristics and Roles in Human Disease. *Hypertension* 1995; 26:221-229.
 82. Mayfield RK, Nobuo S, and Ayad AJ. Skeletal muscle kallikrein potential role in metabolic regulation. *Diabetes* 1996; Vol 45:Suppl 1, S20-S23.
 83. Menke, J.,G., Borkowski J.,A., Bierilo K., K., Macnel ,T., Derrick, A., W., Schneck, K.,A., et.al. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem* 1994; 269:21583-21586.
 84. Midgley, A.W., Mcnaughton, L.R. and Willkinson M. Is there na optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners? *Sport and Med* 2006; 36(2):117-132.
 85. Minshall RD, Tan F, Nakamura F, Rabito SF, Becker RP, Marcic B, and Erdos EG. Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I- converting enzyme in CHO cells. *Circ Res* 1997b; 81: 848-856.
 86. Mombouli, J. V.,Vanhoutte, P. M., Kinins and endothelial control for vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1995; 35: 679-705.
 87. Montgomery, H.E., R. Marshall, H. Hemingway, R. Myerson, P. Clarkson, C. Dollery,M. Hayward, D.E. Holliman, M. Jubb, M. World, E.L.Thomas, A.E. Brynes, N. Saeed,M. Barnard, J.D. Bell, K. Prasad, M. Rayson, P.J. Talmud, & S.E. Humphries. Human gene for physical performance, *Nature* 1998; 393: 221-222.

88. Montgomery HE, Clarkson P, Barnard M, et al. Angiotensin-Converting-Enzyme Gene Insertion / Deletion Polymorphism and Response to Physical Training. *The Lancet* 1999; 353:541-45.
89. Moreau,M.E., Garbacki, Molinaro, G., Brown, N.J.,Marceau,F., and Adam A. The Kallikrein-Kinin system:current and future pharmacological targets. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 99:6-38.
90. Myerson, S. Human angiotensin-I converting enzyme gene and endurance performance. *J. Applied Physiol* 1999; 87(4): 1313-6.
91. Myburgh, K.H. What makes an endurance athlete world-class? Not simply a physiological conundrum. *Comp Biochem Physiol* 2003; [A]136:171-190.
92. Negrão C.E., Forjaz, C.L.M., Rondon, M.U.P.B., Brum, P.C., Adaptação cardiovascular ao treinamento físico dinâmico. *Socesp Cardiol* 1996;Vol-II, pag. 532-540.
93. Negrão CE, Hamilton M, Foranow G, Hage A, Moriguchi JD, Middlekauff HR. Impaired endothelium-mediated vasodilatation is not the principal cause of vasoconstriction in hear failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: H168–H174.
94. Negrão CE, Trombetta IC, Batalha LT, Ribeiro MM, Rondon MUPB, Tinucci T et al. Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H469–H475.
95. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258:607-614.
96. Ody CE AND Goodfriend TL Bradykinin receptors, in *Handbook of Experimental Pharmacology* 1979;(Erdos EG ed), vol. XXV,pp 287-300, Springer- Verlag, Berlin, Germany.

97. Palmer, R.M., Ferrige A.G.,and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature (Lond)* 1987; 327:524-526.
98. Pearson & Manolio. How to interpret a Genome-wide Association study. *Journal American Medical Association* 2008; Vol.299,Nº11,1335-1344.
99. Pereira AC, Mota GFA, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Angiotensinogen 235T allele “dosage” is associated with blood pressure phenotypes. *Hipertension* 2003; 41: 25-30.
100. Pereira A.C, A.A.F. Morandini Filho, A.S. Heimann, E.T. Rabak, A.P.Z. Vieira, G.F.A. Mota and J.E. Krieger. Serum angiotensin converting enzyme activity association with the I/D polymorphism in an ethnically admixed population. *Clinica Chimica Acta*, 2005; Vol. 360, Issues 1-2:Pages 201-204.
101. Pollock, L., Fink, E., Maerker, E. Dietze, G. M. Effects of mode of training on cardiovascular function and body composition of adult men. *Med.Sci. Sports* 1977;7:139.
102. Regoli, D., Barabé, J., Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol.Rev.* 1980; 32:1-46.
103. Regoli D., Allogho S.N., Rizzi A., Gobeil F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. *European Journal of Pharmacology* 1998; 28:3481-10.
104. Rett, K., Wicklmayr, M., Fink, E., Maerker, E. Dietze, G. & Mehnert, H. Local generation of kinins in working skeletal muscle tissue in man. *Biological Chemistry* 1989; 370:445-449.
105. Rice C, Wolford JK, Hanson RL, Foley JE, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley REA genome wide linkage scan for abdominal subcutaneous and visceral fat in Black and White families. *Diabetes* 2002a; 51:848-855.

- 106.Rico-Sanz, Ho-Kim MA, Chagnon M, Province MA, Rao DC. Quantitative trait loci for maximal exercise capacity phenotypes and their responses to training in the HERITAGE Family Study. *Physiol Genomics* 2004; 16:256-26.
- 107.Rothaman, K J, Chagnon YC, Després JP, Lemieux S,. Concepts of interaction. *Am J. Epidemiol* 1980; 112: 467- 470.
- 108.Rowel., L.B, Foley JE, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Cutaneous and skeletal muscle circulation. In: Human Circulation: Regulation During Physical Stress. *Oxford*, 1986; NY. Oxford University Press, 1986, cap.5, p.96-116.
- 109.Sabatini Regiane A, Paola B. Guimarães, Liliam Fernandes, Felipe C.G. Reis, Patricia A. Bersanetti, Marcelo A. Mori, Alberto Navarro, Aline M. Hilzendeger, Edson L. Santos, Maria C.C. Andrade, Jair R. Chagas, Jorge L. Pesquero, Dulce E. Casarini, Michael Bader, Adriana K. Carmona, João B. Pesquero. Ace activity is modulated by kinin B₂ receptor. *Hypertension* 2008; 51:689-695.
- 110.Shariat-MadaR Zia, Alvin H. Schmaier. The plasma kallikrein/kinin and rennin angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. *Journal of Endotoxin Research* 2004; Vol.10, nº1: 3-13
- 111.Schachter, M. A. Delayed slow contracting effect of serum and plasma due to the realese of a substance resembling kallidin and bradykinin. *Br.J.Pharmacol Chemother* 1956; 11:111-118.
- 112.Shepherd, JT, Circulation of skeletal muscle. In: Handbook of Physiology.The cardiovascular sytem. Circulation. Bethesda, MD, *Am. Physiol. Soc.* 1983; sect.2, vol.III, cap.11,p.319-370.
- 113.Skinner J.,S. & Mclellan T.,H. The transition from Aerobic to in aerobic metabolism. *Research Quarterly for exercise and Sport* 1980; 51:nº1, 234-248.

114. Smith, J.,A.,M., Webb, C., Holford J., AND Burgess G.,M., Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptor in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol* 1995;47:525-534.
115. Staszewska-Barczak AND Vane, J.R.: The release of catecholamines from the adrenal medulla by peptides. *Br. J. Pharmacol.* 1967; 30:655-667.
116. Tousignant, C., Dion, S., Drapeau, G., REGOLI, D., Characterization of pre-and post junctional receptors for kinins and neurokinins in the rat vas deferens. *Neuropeptides* 1987; 9:33-343.
117. Ura C, Paterka M, Herz J, Bendix I, Ifergan I, Schadock I, Mori MA, Van Horssen. The role of kinins and atrial natriuretic peptide on the renal effects of neutral endopeptidase inhibitor in rats. *Clin Exp Hypertens* 1994; 16:799-808.
118. Van Berlo, J.H.; Pinto, Y.M. Polymorphism in the RAS and Cardiac Function. The International *Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; vol.35: p.932-943.
119. Vanhoutte, P.M., et.al. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J. Cardiol* 1995; 76: E3-E12.
120. Venema, Richard C. Post-translational mechanism of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *International Immunopharmacology* 2002; 2:1755-1762.
121. Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, Whipp BJ. Measurement of the Physiological Response to Exercise. In: Principles of exercise testing and interpretation. edited by Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, Whipp BJ: Philadelphia: Lea & Febiger, 1987.

122. Werle, E., Jesse CR, Bortolatto CF, Nogueira CW, Savegnago L. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontraierende Substanz. *Biochem. J.* 1937; 289:217-233.
123. Werle, E., M. Schachter. Kallikrein, kallidin and related substance. In: Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels, Ed. (*Oxford, UK Pergamon Press*) 1960; PP.199-209.
124. Williams, A.,G., Dhamrait, S.,S., Wootton, P.,T., Day, S.,H., Hawe, E., Payne, J.,R., et.al, Bradykinin receptor gene variant and huma physical performance. *J. Appl. Physical* 2004; 96:938-942.
125. Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M, Martin J, Humphries SE, Montgomery HE. The ACE gene and muscle performance. *Nature* 2000; 403: 614.
126. Zuraw B. Bradykinin in protection Against Left-Ventricular Hypertrophy. *The Lancet* 2001; 358:1116-7.

ANEXOS

ANEXO I – O protocolo de estudo aprovado pela Comissão Científica e de Ética.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22/08/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0483/07**, intitulado: **"INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR B2 DE BRADICININA NA REATIVIDADE VASCULAR E NA PERFORMANCE FÍSICA DE HOMENS JOVENS E SAUDÁVEIS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO AERÓBICO."** apresentado pelo Departamento de **FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profª. Drª. Edilamar Menezes de Oliveira**

Pesquisador (a) Executante: **Cléber Rene Alves**

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências
S.P., 10/09/07

CAPPesq, 27 de Agosto de 2007

Profª. Dra. Elza Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069

6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br -sol

12/9/07
E

ANEXO II – Termo de Livre Consentimento.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA :

PESQUISADOR: Profa. Dra. EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA

CARGO/FUNÇÃO: Profa. Dra. Na Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo.

UNIDADE: Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO **X** RISCO
MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. **Justificativa e Objetivos da Pesquisa:** O Sr ou Sra, está sendo convidado a participar de uma pesquisa que visa avaliar a influência de algumas características genéticas na melhora de condicionamento físico e adaptações cardíacas provocadas pelo treinamento físico.

2. Procedimentos:

Pletismografia: serão colocados dois manguitos, semelhantes ao aparelho de pressão, um no braço e um no punho, para medição da quantidade de sangue que vai passar pelo braço durante o exame.

Ecocardiograma: Exame simples e indolor, onde, através de um transdutor (semelhante à ultrassonografia) que é posicionado em alguns pontos do tórax, é feito um estudo da anatomia e função do coração.

Ergoespirometria: Serão colocados eletrodos no tórax para controle dos batimentos cardíacos, durante um esforço físico progressivo (andar / correr) em uma esteira ergométrica. Além disso, estará com um manguito no braço direito para controle da pressão arterial e estará respirando através de um bocal que é conectado ao aparelho, para análise dos gases expirados durante o exercício.

3. Desconfortos e Riscos:

Pletismografia: não há riscos, embora o manguito no punho fique inflado continuamente durante o exame, dificultando a circulação do sangue para a mão, o que provoca um leve desconforto.

Ergoespirometria: Consta de um teste de esforço máximo, onde, além da avaliação do eletrocardiograma durante o esforço e da pressão arterial, será feita coleta dos gases expirados para análise metabólica. Provoca leve desconforto, mas com riscos muito baixos.
Ecocardiograma: Não há riscos.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Para você: Possibilidade de melhorar o condicionamento físico e ganho de saúde, sob orientação direta de Professores de Educação Física, Médicos e avaliações médicas, estimulando também mudanças de hábito de vida. Para os pesquisadores: Avaliar a relação entre alguns fatores genéticos e o grau de hipertrofia cardíaca, assim como outras alterações fisiológicas provocadas pelo treinamento físico.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Nenhum

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e retirar o seu filho da participação do estudo, sem que isto traga prejuízo pessoal.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA
CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES
ADVERSAS.**

Edilamar Menezes de Oliveira. AV.PROF. MELLO MORAES, 65 - BUTANTÃ, SÃO PAULO FONE-3818-3136/ 3818-2149

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2008.

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

ANEXO III

OBS. **Teste de Aptidão Física (TAF)** tem por finalidade avaliar o estado de aptidão física do combatente, é o teste mais comumente usado, pois agrega várias qualidades físicas. Os objetivos variam de acordo com a faixa etária e grau hierárquico dos militares.

LEGENDA:

SCC - Sistema calicreína cinina;
SRA - Sistema renina angiotensina;
ECA – Enzima conversora de angiotensina;
B₂BKR – receptor B₂ de bradicinina;
VO_{2máx.} - Consumo de oxigênio máximo;
VO_{2pico.} - Consumo de oxigênio pico;
CP – Calicreína plasmática;
Fator Hageman ou Fator XII – Enzima de clivagem;
PCP – Pré-calicreína plasmática;
HC – H-cininogênio;
CA – Cininogênio de alto peso molecular;
CT – Calicreína tecidual;
CB – Cininogênio de baixo peso molecular;
BK – Bradicinina;
KD – Calidina;
NO – Óxido nítrico;
eNOS – Enzima óxido nítrico endotelial;
BDKRB1 – Gene do receptor B₁ de bradicinina;
BDKRB2 – Gene do receptor B₂ de bradicinina;
hB2DKR – Exon 1 do gene do receptor B₂ de bradicinina;
FSA – Fluxo sanguíneo no antebraço;
CVA – Condutância vascular no antebraço;
ASC – Área sobre a curva;
TAF – Teste de aptidão física.