

## Atividade da Calicreína Tecidual Humana na Doença Coronariana Crônica Estável Angiograficamente Documentada

*Human Tissue Kallikrein Activity in Angiographically Documented Chronic Stable Coronary Artery Disease*

Estêvão Lanna Figueiredo<sup>1</sup>, Carolina Antunes Magalhães<sup>2</sup>, Karlyse Claudino Belli<sup>3,4</sup>, Ari Mandil<sup>5</sup>, José Carlos Faria Garcia<sup>5</sup>, Rosanã Aparecida Araújo<sup>5</sup>, Amintas Fabiano de Souza Figueiredo<sup>2</sup>, Lucia Campos Pellanda<sup>6,7</sup>

Departamento de Cardiologia – Hospital Lifecenter<sup>1</sup>, Belo Horizonte, MG; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)<sup>2</sup>, Belo Horizonte, MG; Laboratório de Pesquisa de Patofisiologia do Exercício – Divisão de Cardiologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre<sup>3</sup>, Porto Alegre, RS; Research on Research Network Team – Duke University<sup>4</sup>, North Carolina, USA; Departamento de Hemodinâmica – Hospital Lifecenter<sup>5</sup>, Belo Horizonte, MG; Programa de Pós-Graduação em Cardiologia – Fundação Universitária de Cardiologia (PPGFUC/RS)<sup>6</sup>, Porto Alegre, RS; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA)<sup>7</sup>, Porto Alegre, RS – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** A calicreína tecidual humana (hK1) é enzima-chave do sistema calicreína-cinina (SCC). A atividade amidásica da hK1 está reduzida na urina de pacientes com hipertensão e insuficiência cardíaca (IC); seu papel na doença arterial coronariana (DAC) ainda não está esclarecido.

**Objetivo:** Avaliar a atividade amidásica da hK1 na urina de pacientes com DAC.

**Métodos:** Sessenta e cinco indivíduos (18 a 75 anos) que se submeteram ao cateterismo cardíaco (CAT) coletaram amostra do jato médio de urina imediatamente antes do CAT. Baseando-se na presença de lesões coronarianas, os pacientes eram classificados em dois grupos: DAC (43 pacientes) e sem DAC (22 indivíduos). A atividade amidásica da hK1 foi estimada com o substrato cromogênico D-Val-Leu-Arg-Nan. Creatinina foi determinada pelo método de Jaffé. A atividade amidásica específica da hK1 urinária foi expressa em  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de creatinina) para corrigir diferenças no fluxo urinário.

**Resultados:** A atividade amidásica da hK1 urinária foi semelhante entre os pacientes com DAC [0,146  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de creatinina)] e aqueles sem DAC [0,189  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de creatinina)] ( $p = 0,803$ ), e permaneceu entre os baixos valores previamente publicados para pacientes com hipertensão primária [0,210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de creatinina)] e para aqueles com IC [0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  de creatinina)], respectivamente. Nenhum efeito estatisticamente significativo da gravidade da DAC e da hipertensão sobre a atividade amidásica da hK1 urinária foi observado.

**Conclusão:** A atividade amidásica da hK1 na urina estava reduzida nos pacientes com DAC, o que pode sugerir que a atividade do SCC renal esteja reduzida nessa doença. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(5):457-465)

**Palavras-chave:** Calicreína Tecidual Humana; Calicreína Tecidual; Sistema Calicreína-Cinina; Doença Arterial Coronariana.

### Abstract

**Background:** Human tissue kallikrein (hK1) is a key enzyme in the kallikrein-kinin system (KKS). hK1-specific amidase activity is reduced in urine samples from hypertensive and heart failure (HF) patients. The pathophysiologic role of hK1 in coronary artery disease (CAD) remains unclear.

**Objective:** To evaluate hK1-specific amidase activity in the urine of CAD patients.

**Methods:** Sixty-five individuals (18–75 years) who underwent cardiac catheterism (CATH) were included. Random midstream urine samples were collected immediately before CATH. Patients were classified in two groups according to the presence of coronary lesions: CAD (43 patients) and non-CAD (22 patients). hK1 amidase activity was estimated using the chromogenic substrate D-Val-Leu-Arg-Nan. Creatinine was determined using Jaffé's method. Urinary hK1-specific amidase activity was expressed as  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  creatinine) to correct for differences in urine flow rates.

**Results:** Urinary hK1-specific amidase activity levels were similar between CAD [0.146  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  creatinine)] and non-CAD [0.189  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  creatinine)] patients ( $p = 0.803$ ) and remained similar to values previously reported for hypertensive patients [0.210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  creatinine)] and HF patients [0.104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg}$  creatinine)]. CAD severity and hypertension were not observed to significantly affect urinary hK1-specific amidase activity.

**Conclusion:** CAD patients had low levels of urinary hK1-specific amidase activity, suggesting that renal KKS activity may be reduced in patients with this disease. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(5):457-465)

**Keywords:** Human Tissue Kallikrein; Tissue Kallikrein; Kallikrein-Kinin System; Coronary Artery Disease.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Estêvão Lanna Figueiredo •

Rua Dias Adorno, 39, apto. 1.703, Santo Agostinho. CEP 30190-100, Belo Horizonte, MG – Brasil

E-mail: [estevao@cardiol.br](mailto:estevao@cardiol.br)

Artigo recebido em 29/12/14; revisado em 14/05/15; aceito em 15/05/15.

DOI: 10.5935/abc.20150109

## Introdução

A Doença arterial coronariana (DAC) causou aproximadamente uma em cada seis mortes nos Estados Unidos em 2007<sup>1</sup>. Estima-se que 16 milhões e 300 mil americanos tenham DAC, e a hipertensão é um dos mais prevalentes fatores de risco<sup>1</sup>. A pressão sanguínea apresenta uma relação inversa em relação aos níveis da atividade da caliceína tecidual humana (hK1) urinária ou renal em pacientes com hipertensão primária<sup>2-4</sup>. Além disso, os níveis de hK1 urinária estão significativamente reduzidos na insuficiência cardíaca (IC)<sup>5-7</sup>.

Caliceínas (EC 3.4.21.8) são um subgrupo da família das serino-proteases conhecidas por apresentarem várias funções fisiológicas, incluindo o controle da pressão sanguínea, a perfusão das artérias coronarianas, o equilíbrio eletrolítico, a inflamação e outros diversos processos fisiológicos<sup>2,7-9</sup>. Nosso grupo demonstrou que a atividade amidásica específica da hK1 urinária está significativamente reduzida em pacientes com hipertensão primária e IC<sup>3,6</sup>.

A hipertensão é um fator de risco para a DAC e a IC. Por outro lado, a IC é a via final para a hipertensão não tratada e a DAC. No entanto, os níveis da atividade da hK1 urinária e sua associação com a gravidade da DAC estável angiograficamente determinada permanecem desconhecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade amidásica específica da hK1 medindo sua atividade na urina de pacientes com DAC estabelecida ou suspeita.

## Métodos

Realizou-se um estudo transversal, de janeiro de 2008 a janeiro de 2010. Foram incluídos no estudo 65 indivíduos de qualquer sexo e raça. Amostras do jato médio de urina foram coletadas no Laboratório de Hemodinâmica do Hospital Lifecenter momentos antes da realização do cateterismo cardíaco (CAT) em indivíduos com DAC conhecida ou suspeita.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Lifecenter de Belo Horizonte e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e também foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Todos os pacientes leram o protocolo, tiveram suas dúvidas satisfatoriamente esclarecidas e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de urina foram transferidas para o Laboratório de Enzimologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde foram visualmente e quimicamente examinadas com fita reagente (Urofit 10 U bioBRÁS Diagnósticos, Biobrás S.A., Belo Horizonte, MG, Brasil). Todas as amostras de urina foram negativas para todos os compostos químicos avaliados (bilirrubina, sangue, glicose, corpos cetônicos, nitritos, proteínas e urobilinogênio).

Fatores de risco tradicionais para DAC foram determinados por meio de entrevistas padrão realizadas pelos próprios médicos, bem como pela enfermeira e pela farmacêutica participante do estudo. Os exames de CAT foram realizados por cardiologistas intervencionistas certificados pela Sociedade Brasileira de Hemodinâmica e Cardiologia Intervencionista e

registrados nos registros do hospital. Os pacientes passaram por uma completa entrevista clínica, bem como por exame físico. Todos os sintomas e sinais clínicos dos pacientes, seus antecedentes pessoais e tipos de medicação (cardiovascular ou não) foram analisados. Todos os sujeitos foram estudados como pacientes externos.

## Crítérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes de qualquer sexo e raça, desde que maiores de 18 anos e com menos de 75 anos, com DAC conhecida ou suspeita, e que dessem seu consentimento. DAC suspeita foi definida pela história médica, exame físico, eletrocardiograma, anormalidades em outros exames de imagem (teste ergométrico e cintilografia miocárdica). Os critérios para exclusão foram: não concordância em participar do estudo, pacientes que tiveram recentemente síndromes coronarianas agudas (SCA, menos de 3 meses), creatinina sérica  $\geq 1,5$  mg/dL ou  $133 \mu\text{mol/L}$  para os homens e  $1,4$  mg/dL ou  $124 \mu\text{mol/L}$  para as mulheres, história de grave alergia a contrastes iônicos, presença de sangue ou nitrito na urina.

## Presença e gravidade da doença arterial coronariana

Os pacientes foram classificados quanto à presença ou ausência de DAC. Coronariografias diagnósticas foram realizadas sob anestesia local (90% por acesso femoral e 10%, radial) utilizando contraste não iônico e classificados por cada um dos dois examinadores pela análise visual da estenose como branda (<40%), moderada (40 a 70%) e grave (70 a 100%), e o fluxo sanguíneo foi classificado de acordo com critérios do *Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) Study Group*<sup>10</sup>. Casos duvidosos foram revistos por ambos os examinadores com o auxílio de angiografia coronariana quantitativa (AXIOM Artis, Siemens, Munich, Alemanha) e/ou submetidos a ultrassom intravascular IVUS (I-LAB Boston Scientific, Natick, MA, Estados Unidos). Nenhum dos examinadores conhecia os resultados da atividade amidásica específica da hK1.

## Atividade amidásica da hK1

A atividade amidásica da hK1 foi determinada com o substrato cromogênico D-Val-Leu-Arg-Nan (Chromogenix AB, Itália)<sup>11</sup>. A hidrólise do substrato foi obtida espectrofotometricamente em 410 nm, monitorando-se a liberação de 4-Nitroanilina (4-Nan) [ $\epsilon_{410} = 8.800/(\text{M} \cdot \text{cm})$ ], como descrito previamente<sup>12</sup>. O ensaio foi realizado como já descrito<sup>6</sup>. Especificamente, cinco misturas de incubação, identificadas pelas letras A, B, C, D e E, continham: A – 500  $\mu\text{L}$  de urina e 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0, contendo 0,05% (peso/volume) de  $\text{NaN}_3$  (Sigma Chemical Co., Estados Unidos); B – 500  $\mu\text{L}$  de urina e 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de Trasylol® a 1.000 KIU/mL (um forte inibidor de hK1, também conhecido como aprotinina, inibidor pancreático bovino de tripsina-BPTI, ou inibidor pancreático de tripsina de Kunitz)<sup>11</sup>; C – 500  $\mu\text{L}$  de urina e 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de inibidor de tripsina de soja (SBTI), que é um forte inibidor de serino-proteases e de caliceína plasmática, entretanto, não é inibidor da hK1<sup>6</sup>, a 1 mg/mL em tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0;

## Artigo Original

D – 500  $\mu\text{L}$  de urina e 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0; e E – 600  $\mu\text{L}$  de tampão glicina NaOH 200 mM, pH 9,0. As misturas foram pré-incubadas a 37°C durante 10 minutos para equilíbrio da temperatura. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de D-Val-Leu-Arg-Nan, o substrato, a 160  $\mu\text{M}$  em tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0 eram adicionados às misturas A, B, C e E e 400  $\mu\text{L}$  do tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0, ao invés da solução do substrato, eram adicionados à mistura D. As misturas foram, novamente, incubadas a 37°C durante 30 minutos e a reação foi paralisada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido acético a 60% (volume/volume). As misturas foram incubadas em quadruplicatas. A hidrólise enzimática foi monitorada medindo-se a absorvância da 4-Nan, liberada em 410 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV 160 UV-Vis (com largura da banda espectral de 2 nm). A cubeta de referência continha 1000  $\mu\text{L}$  de tampão glicina-NaOH 200 mM, pH 9,0 e 100  $\mu\text{L}$  da solução de ácido acético a 60%. A concentração total do substrato foi determinada a partir da quantidade de 4-Nan liberada na hidrólise completa por excesso de beta-tripsina bovina (que foi gentilmente fornecida pelo Professor Dr. Marcelo Matos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil). O  $\Delta A_{410}$  foi calculado e transformado em velocidade de reação (v) expressa em  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mL de urina})$ . As velocidades das reações eram lineares com o tempo até 60 minutos.

Em todas as amostras de urina avaliadas, a atividade enzimática foi completamente inibida pelo Trasylol® (mistura de incubação B) e nenhuma inibição foi observada na presença de SBTI (mistura de incubação C), indicando somente a presença da enzima hK1.

A atividade amidásica específica da hK1 era calculada dividindo-se a velocidade da reação (v) pela concentração de creatinina (mg/mL de urina). O resultado foi expresso em  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$  para corrigir diferenças no fluxo urinário<sup>13</sup>.

### Determinação da creatinina

A creatinina era determinada espectrofotometricamente com um *kit* de reagentes baseado na reação de Jaffé (Bioclin/Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) e expressa em mg/mL de urina, como previamente descrito<sup>3,6,13</sup>. Os ensaios foram também realizados em quadruplicatas.

### Confundidores

Informações sobre as medicações que os pacientes usavam foram obtidas por meio de entrevista. Os medicamentos foram classificados em dois grupos: um com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA)/bloqueadores do receptor da angiotensina (BRA); o outro, com qualquer medicação. A pressão arterial era medida com o paciente em repouso, na posição sentada, antes da realização do CAT, e classificada na entrevista de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais<sup>14-16</sup>.

### Análise estatística

Os dados foram analisados usando-se o programa Minitab® para Windows, versão 15.0, e expressos como medianas, por causa da distribuição irregular das variáveis

investigadas. Diferenças entre os grupos e os efeitos de medicamentos sobre a atividade amidásica específica da hK1 na DAC foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que a população estudada tinha uma distribuição não gaussiana, com variâncias não homogêneas. Diferenças entre os grupos de gravidade da DAC foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As frequências de ambos os sexos e a presença ou ausência de hipertensão, angina pectoris, dispnéia, acidente vascular encefálico (AVE) e diabetes melito foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado. A presença ou a ausência de gota e hipotireoidismo foi comparada pelo teste de Fisher. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

O tamanho da amostra foi calculado baseado em valores encontrados em nossos estudos prévios [diferença entre grupos: pacientes com IC 0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg creatinina})$ ] e controles 0,260  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg creatinina})$ , respectivamente], com desvio padrão de 0,23, estimando a necessidade de 35 pacientes em cada grupo, considerando o nível de significância de 0,95 e poder de 0,8.

Este estudo foi desenvolvido dentro do Programa *Research and Innovation Coaching*, uma parceria entre a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e o grupo de Pesquisa *Research on Research*, da Duke University, nos Estados Unidos<sup>17</sup>.

## Resultados

De janeiro de 2008 a janeiro de 2010, 4.254 CATs foram realizados no Hospital Lifercenter, com 65 pacientes sendo incluídos neste estudo (Figura 1). Quanto à presença de lesões coronarianas, os pacientes foram classificados em dois grupos: DAC (43 pacientes) e sem DAC (22 indivíduos) (Tabela 1). Os pacientes com DAC foram significativamente mais velhos que os pacientes sem DAC, mas a idade não diferiu entre aqueles com e sem hipertensão. Os subgrupos foram semelhantes quanto ao sexo e à presença ou ausência de hipertensão. Entre os 43 pacientes com DAC, 35 eram hipertensos e, entre os 22 indivíduos sem DAC, 20 eram hipertensos.

Entre os 43 pacientes com DAC, a mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária foi de 0,146  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ , enquanto que entre os 22 indivíduos sem DAC, foi de 0,189  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ , respectivamente.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas da atividade amidásica específica da hK1 urinária para os pacientes com DAC e aqueles sem DAC.

Entre os pacientes com DAC, 14 tinham uma doença leve, 6 moderada e 23 grave (Tabela 2). Não foi observado efeito estatisticamente significativo da gravidade da DAC sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária.

Entre os pacientes com DAC e aqueles sem DAC, não foi observado efeito estatisticamente significativo da hipertensão sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária (Tabela 3).

Com relação às medicações, 16 pacientes com DAC estavam usando IECA/BRA. Não foi observado efeito estatisticamente significativo do uso de IECA/BRA sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária (Tabela 4).

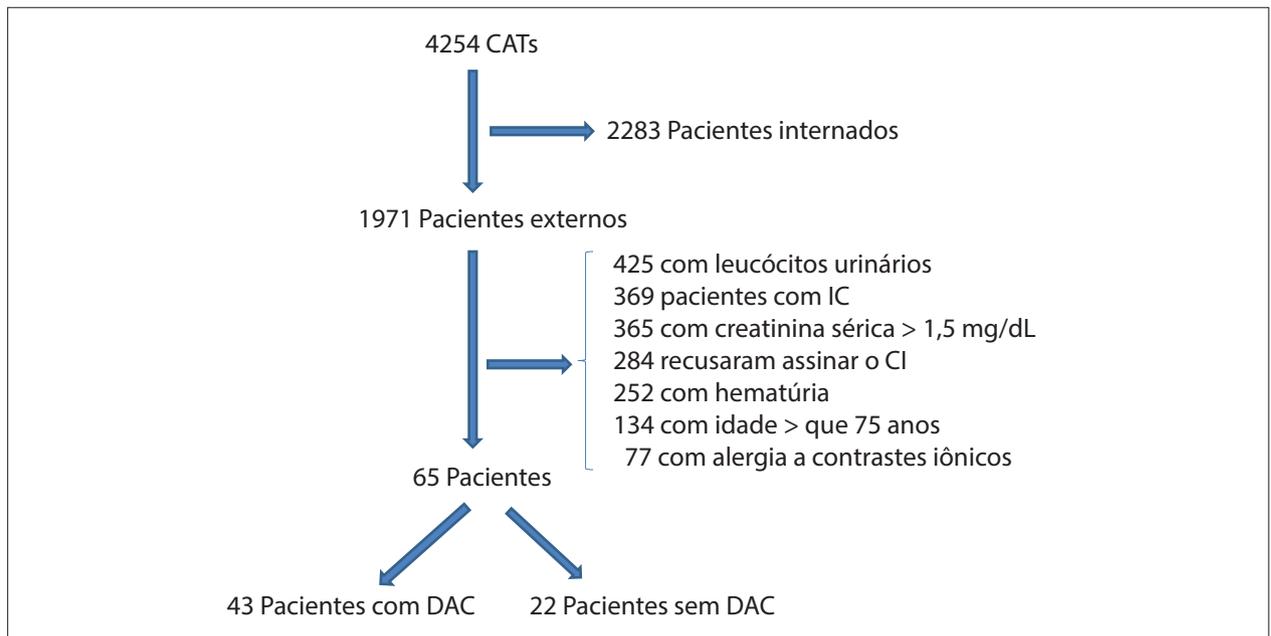


Figura 1 – Fluxograma dos pacientes elegíveis e incluídos no estudo. CATs: Cateterismo cardíaco; IC: Insuficiência cardíaca; CI: Consentimento informado; DAC: Doença arterial coronariana.

Tabela 1 – Características basais dos pacientes estudados

Parâmetro	Pacientes com DAC (n = 43)	Pacientes sem DAC (n = 22)	Valor de p
<b>Demográfico</b>			
Idade (anos) <sup>a</sup>	62,5 (55,0-69,0)	56,7 (49,3-64,3)	0,029 <sup>b</sup>
Sexo (masculino/feminino)	30/13	10/12	0,057 <sup>c</sup>
<b>Fisiológico</b>			
Hipertenso (sim/não)	36/07	19/03	0,085 <sup>c</sup>
Angina pectoris (sim/não)	18/25	2/20	0,007 <sup>c</sup>
Dispneia (sim/não)	4/39	4/18	0,516 <sup>c</sup>
AVE (sim/não)	0/43	1/21	0,338 <sup>c</sup>
Diabetes melitos (sim/não)	6/37	1/21	0,478 <sup>c</sup>
Gota (sim/não)	1/42	0/22	1,000 <sup>d</sup>
Hipotireoidismo (sim/não)	1/42	0/22	1,000 <sup>d</sup>
<b>Bioquímico</b>			
Ativ am esp hK1 <sup>e,d</sup>	0,146 (0,085-0,260)	0,189 (0,069-0,323)	0,803 <sup>b</sup>

Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>a</sup>Dados expressos como medianas; números entre parênteses são o intervalo interquartis 25% e 75%, respectivamente; <sup>b</sup>teste de Mann-Whitney; <sup>c</sup>teste do Qui-Quadrado; <sup>d</sup>teste de Fisher; <sup>e</sup> $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ . DAC: Doença arterial coronariana; AVE: Acidente vascular encefálico; Ativ am esp hK1: Atividade amidásica específica da hK1.

Tabela 2 – Atividade amidásica específica da hK1 urinária e classificação da doença arterial coronariana

Parâmetro	Brandia (n = 14)	Moderada (n = 06)	Grave (n = 23)	Valor de p
Ativ am esp hK1 <sup>e,d</sup>	0,181 (0,097-0,413)	0,245 (0,119-0,545)	0,141 (0,069-0,264)	0,234 <sup>c</sup>

Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>a</sup> $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ; <sup>b</sup>Dados expressos como medianas, números entre parênteses representam o intervalo interquartis 25% e 75%, respectivamente; <sup>c</sup>teste de Kruskal-Wallis; Ativ am esp hK1: Atividade amidásica específica da hK1.

**Tabela 3 – Efeito da hipertensão sobre a atividade amidásica específica da hK1 em pacientes com e sem doença arterial coronariana**

	DAC (n = 43)		p	Sem DAC (n = 22)		p
	Hip (n = 26)	Sem hip (n = 17)		Hip (n = 10)	Sem hip (n = 12)	
Ativ am esp hK1 <sup>c,d</sup>	0,139 (0,091-0,250)	0,245 (0,066-0,323)	0,785 <sup>c</sup>	0,202 (0,064-0,537)	0,148 (0,070-0,266)	0,531 <sup>c</sup>

Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>a</sup>  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ; <sup>b</sup> Dados expressos como medianas, números entre parênteses representam o intervalo interquartis 25% e 75%, respectivamente; <sup>c</sup> Teste de Mann-Whitney. DAC: Doença arterial coronariana; Sem DAC: Sem doença arterial coronariana; Hip: Hipertensos; Sem hip: Sem hipertensão; Ativ am esp hK1: Atividade amidásica específica da hK1.

**Tabela 4 – Efeitos de medicamentos sobre a atividade amidásica específica da hK1 na doença arterial coronariana**

	IECA/BRA (n = 16)	Outros medicamentos (n = 27)	Valor de p
Ativ am esp hK1 <sup>c,d</sup>	0,179 (0,089-0,259)	0,153 (0,069-0,291)	0,900 <sup>c</sup>

Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. <sup>a</sup> Dados expressos como medianas, números entre parênteses são o intervalo interquartis 25% e 75%, respectivamente; <sup>b</sup>  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ; <sup>c</sup> teste de Mann-Whitney. IECA/BRA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina/bloqueador do receptor da angiotensina II; Ativ am esp hK1: Atividade amidásica específica da hK1.

O valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária nos pacientes com DAC permaneceu dentro daqueles já descritos para pacientes com IC e hipertensão<sup>3,6</sup> (Tabela 5).

## Discussão

Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro estudo comparando a atividade amidásica específica da hK1 urinária em pacientes humanos com DAC estável e sem DAC angiograficamente documentada.

Mediu-se a atividade amidásica específica da hK1 na urina de pacientes com DAC e sem DAC, e nenhuma diferença estatística significativa entre os dois grupos foi observada.

Calicreínas (EC 3.4.21.8) constituem um subgrupo da família das serino-proteases conhecidas por terem várias funções fisiológicas. Elas são divididas em dois principais grupos: calicreínas plasmáticas (EC 3.4.21.34) e teciduais (EC 3.4.21.35)<sup>2</sup>. O gene humano KLK1, localizado no cromossomo 19q13.4, expressa a verdadeira calicreína tecidual (hK1) em tecidos como rins, pâncreas, glândulas salivares, vasos e coração<sup>2,8,9,11</sup>. A principal função bioquímica conhecida da hK1 é a liberação, da proteína plasmática cininogênio de baixo peso molecular, do decapeptídeo vasoativo e espasmogênico calidina (lisil-bradicinina – Lis-BK), que é envolvido no controle da pressão sanguínea, da perfusão das artérias coronárias, do equilíbrio eletrolítico, da inflamação e em outros diversos processos fisiológicos<sup>2,7-9</sup>. A atividade da hK1 pode ser medida na urina tanto por ensaio fotométrico, utilizando-se substratos sintéticos, quanto por radioimunoensaio<sup>11</sup>. Muitos estudos sobre o papel do SCC nas doenças cardíacas e circulatórias são relacionados às cininas<sup>2,18,19</sup>.

Em 2006, publicamos os resultados de um estudo com 28 pacientes com IC e 28 sujeitos saudáveis como controles, no

qual o valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária foi significativamente menor nos pacientes com IC [0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] do que nos controles [0,213  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] (valor de  $p = 0,020$ )<sup>6</sup>.

Em 2009, nosso grupo publicou estudo realizado com 100 pacientes não diabéticos com hipertensão primária e 89 indivíduos controles saudáveis, no qual o valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária foi significativamente menor nos pacientes hipertensos [0,210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] do que nos controles [0,260  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] (valor de  $p = 0,010$ )<sup>3</sup>.

No presente estudo, a atividade amidásica específica da hK1 urinária não foi significativamente diferente entre os pacientes com DAC e os indivíduos sem DAC (Tabela 1). O valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária para os pacientes com DAC [0,146  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] permaneceu entre os valores reportados para os pacientes hipertensos [0,210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] e para aqueles com IC [0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] de nossos prévios estudos<sup>3,6</sup>.

Por outro lado, o valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária para os sujeitos sem DAC encontrado no presente estudo [0,189  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] foi menor do que os das medianas reportados para ambos os controles para os pacientes com IC [0,213  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] e para os pacientes hipertensos [0,260  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] de nossos prévios estudos<sup>6,3</sup> (Tabela 5).

Para aprofundar a análise, comparou-se o valor da mediana da atividade amidásica específica da hK1 urinária para pacientes com IC [0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] e para hipertensos [0,210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] de nossos prévios estudos<sup>6,3</sup>, com o valor agora descrito para os pacientes com DAC [0,146  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ].

**Tabela 5 – Valores das medianas da atividade amidásica específica da hK1 nos pacientes com hipertensão, insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana**

Parâmetro	IC <sup>a</sup> (n = 28)	DAC (n = 43)	Sem DAC (n = 22)	Hip <sup>b</sup> (n = 100)	Controle IC <sup>a</sup> (n = 28)	Controle Hip <sup>b</sup> (n = 89)
Ativ am esp hK1 <sup>c,d</sup>	0,104 (0,067- 0,297)	0,146 (0,085-0,280)	0,189 (0,069-0,323)	0,210 (0,100-0,395)	0,213 (0,147-0,401)	0,260 (0,180-0,445)

<sup>a</sup> valores de medianas descritos em Figueiredo e cols.<sup>6</sup>; <sup>b</sup> valores de medianas descritos em Belo e cols.<sup>3</sup>; <sup>c</sup>  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ; <sup>d</sup> dados expressos como medianas, números entre parênteses representam o intervalo interquartis 25% e 75%, respectivamente; IC: Insuficiência cardíaca; DAC: Doença arterial coronariana; Sem DAC: Sem doença arterial coronariana; Hip: Hipertensos; Ativ am esp hK1: Atividade amidásica específica da hK1.

Nenhuma diferença significativa foi observada (valor de  $p = 0,131$  e valor de  $p = 0,297$ , respectivamente). Comparou-se, também, os valores das medianas das atividades amidásicas específicas da hK1 urinária para pacientes com IC [0,104  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] e para pacientes hipertensos [0,210  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ] de nossos estudos prévios<sup>6,3</sup>, com o valor agora descrito para pacientes sem DAC [0,189  $\mu\text{M}/(\text{min} \cdot \text{mg de creatinina})$ ]. Nenhuma diferença significativa foi também observada (valor de  $p = 0,184$  e valor de  $p = 0,629$ , respectivamente). Diferente de nossos estudos prévios, nos quais os controles eram assintomáticos e sem doença conhecida<sup>3,6</sup>, no presente estudo, todos os sujeitos submetidos aos CATs tinham sintomas, sinais ou suspeitas de DAC. Sabe-se que não se pode excluir doença endotelial ou microvascular em artérias coronarianas angiograficamente normais, e sabe-se também que angiografias normais ou quase normais são observadas em até 20% de mulheres com isquemia miocárdica documentada<sup>20-22</sup>. Assim, sugerimos que tal fato provavelmente explicaria a falta de diferença na atividade amidásica específica da hK1 urinária observada entre os dois grupos de pacientes (DAC e sem DAC).

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que a atividade amidásica específica da hK1 urinária nos pacientes com DAC está dentro dos valores já descritos para pacientes com IC e para pacientes hipertensos<sup>3,6</sup> (Tabela 5). Uma vez que, naqueles estudos, a atividade amidásica específica da hK1 estava reduzida em comparação com os controles normais, sugerimos que a atividade amidásica específica da hK1 poderia estar reduzida no grupo de pacientes com DAC estudado. Deve-se levar em conta o fato de que nosso grupo sem DAC foi submetido ao Cat. Assim, embora esse grupo tivesse ausência angiograficamente documentada de DAC, eles poderiam diferir de uma população completamente livre de outras doenças.

Um SCC local presente nos corações de ratos foi reportado por Nolly e cols.<sup>23</sup>, que sugeriram que as cininas produzidas localmente poderiam ajudar a regular a função cardíaca.

Há alguns trabalhos mostrando evidências diretas para algum papel cardioprotetor da caliceína tecidual em ratos infartados.

Em 2002, Agata e cols.<sup>24</sup> usaram a abordagem somática para explorar o papel do SCC no remodelamento cardíaco e na apoptose após infarto do miocárdio (IM) em ratos. Ratos foram submetidos à ligação da artéria coronária para induzir ao IM, e adenovírus transportando o gene da hK1

ou da luciferase (controle) foi injetado na veia da cauda 1 semana após a cirurgia. O débito cardíaco diminuiu gradualmente de 2 a 6 semanas após o IM, enquanto que a liberação do gene da hK1 preveniu essa diminuição.

Em 2005, Griol-Charhbili e cols.<sup>25</sup> testaram a hipótese de que a caliceína tecidual (CT) exerceria um papel protetor na isquemia miocárdica, provocando lesão de reperfusão da isquemia, com e sem o pré-condicionamento isquêmico (PCI) ou pré-tratamento com IECA (ramiprilat), *in vivo* em ninhadas de camundongos do tipo selvagem (TS) ou deficientes de caliceína tecidual (CT<sup>-/-</sup>). Reperfusão da isquemia (RI) induziu a infartos semelhantes nos camundongos TS e deficientes de caliceína tecidual (TK<sup>-/-</sup>). PCI reduziu a extensão do infarto em 65% nos camundongos TS e em 40% nos camundongos CT<sup>-/-</sup> (valor de  $p < 0,05$ ; CT<sup>-/-</sup> vs. TS). Ramiprilat também reduziu a extensão do infarto em 29% nos TS, mas, nos CT<sup>-/-</sup>, esse efeito foi completamente suprimido. O pré-tratamento dos camundongos TS com um antagonista do receptor B2 de cininas, mas não do receptor B1, reproduziu os efeitos da deficiência da CT. No entanto, camundongos deficientes do receptor B2 (B2<sup>-/-</sup>) inesperadamente responderam ao PCI ou ao ramiprilat como os camundongos TS. Não obstante o pré-tratamento dos camundongos B2<sup>-/-</sup>, a expressão genética do receptor B1 foi constitutivamente alta. Nos camundongos TS e CT<sup>-/-</sup>, os níveis de ambos os mRNA B2 e B1 aumentaram várias vezes durante a RI e ainda mais durante o PCI+RI. Assim, segundo os autores, a CT e o receptor B2 disputam um papel crítico na cardioproteção produzida por dois procedimentos experimentais de relevância clínica potencial (o PCI e a inibição da ECA) durante a isquemia.

Em 2006, Koch e cols.<sup>26</sup> reportaram um estudo no qual eles investigaram a fluxo de bradicinina (BK) coronariana, o desempenho do ventrículo esquerdo e as dimensões ventriculares esquerdas de ratos transgênicos portadores do gene da hK1 (hK1) sob condições basais e isquêmicas. O principal achado de seus estudos foi que os ratos transgênicos portadores do gene hK1, que foram caracterizados por níveis basais aumentados de BK coronariana, mostraram uma melhora na função cardíaca e no remodelamento cardíaco após indução *in vivo* de IM.

No mesmo ano, Spillmann e cols.<sup>27</sup> induziram IM camundongos anestesiados ocluindo permanentemente a artéria coronária descendente anterior. O gene hK1 foi liberado ao miocárdio peri-infarto por meio de um vetor adenoviral (Ad.hK1). Os controles receberam Ad.vazio ou salina. A taxa de sobrevivência foi semelhante entre os grupos. O Ad.hK1 aumentou o número de células endoteliais

progenitoras circulantes e promoveu o crescimento de capilares e arteríolas no miocárdio peri-infarto. Além disso, Ad.hKLK1 aumentou a abundância de células progenitoras cardíacas no peri-infarto e suprimiu a morte apoptótica de cardiomiócitos peri-infarto tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Como consequência desses efeitos benéficos, após 5 semanas do IM, corações com hKLK1-transferidos foram protegidos da dilatação ventricular pós-IM e mostraram melhores funções sistólica e diastólica. Resultados semelhantes foram reportados, em 2008, por Pons e cols.<sup>28</sup>.

Em 2007, Yao e cols.<sup>29</sup> publicaram um estudo, no qual eles examinaram os efeitos potenciais terapêuticos de um fornecimento estável de hK1 e da infusão de cinina em uma dose subdepressora sobre o remodelamento ventricular e a neovascularização em ratos após IM. Uma semana após a ligação da artéria coronária, CT ou BK foi infundida por meio de uma minibomba durante 4 semanas. Em 5 semanas após o IM, CT e infusão de BK melhorou significativamente a contractilidade e reduziu a disfunção diastólica, sem afetar a pressão sanguínea sistólica. CT e infusão de BK também reduziram a razão peso cardíaco/peso corporal, o tamanho dos cardiomiócitos, e a expressão dos peptídeos atrial natriurético e natriurético cerebral na área não infartada. Os autores concluíram que uma dose subdepressora de hK1 ou BK pode restaurar a função cardíaca prejudicada em ratos com IC pós-infarto, inibindo hipertrofia e fibrose, e promovendo angiogênese, por meio da formação aumentada de óxido nítrico (ON) e da supressão do estresse oxidativo, e além da expressão de fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1).

Em 2008, Chao e cols.<sup>30</sup> investigaram o papel da CT na proteção contra dano cardíaco por meio da ativação direta do receptor B2 de cinina usando ratos marrons Katholiek noruegueses deficientes em cininogênio, após IM agudo. A CT foi injetada localmente no miocárdio desses ratos após ligação da artéria coronária com e sem a injeção de icatibant (um antagonista do receptor B2 de cinina) e de N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster (um inibidor da ON sintetase). Um dia após o IM, o tratamento com CT aumentou significativamente a contratilidade cardíaca, reduzindo o tamanho do IM e a pressão diastólica ventricular esquerda nos ratos. A hK1 atenuou a apoptose induzida pela isquemia e o acúmulo de monócitos/macrófagos no miocárdio isquêmico em combinação com níveis aumentados de ON e reduzida atividade da mieloperoxidase. Icatibant e N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina metil éster aboliram os efeitos da hK1, indicando um evento mediado pelo receptor B2 de cinina e ON. Todos estes estudos mostraram efeitos benéficos do SCC em animais com IM agudo (uma forma severa de DAC), mas nenhum deles mediu a atividade da CT nos animais infartados como fizemos com nossos pacientes humanos com DAC estável e com os sem DAC. Uma vez que nestes estudos prévios a injeção de hK1 melhorou a função cardíaca e previniu a IC em condições isquêmicas em ratos, pode-se supor que a atividade da CT em ratos estava diminuída.

Em 2013, Yao e cols.<sup>31</sup> avaliaram se níveis de CT e biomarcador inflamatório, a proteína C-reativa de alta sensibilidade (as-PCR), no sangue periférico correlacionam-se com a estabilidade da placa, bem como a relação da expressão da CT, número de macrófagos e angiogênese na DAC. Os níveis plasmáticos da CT, do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) e da as-PCR foram medidos em 100 pacientes recém-diagnosticados

com DAC e em 33 controles sem DAC. Os pacientes com DAC foram definidos como tendo estenose coronária angiográfica de pelo menos 50% de redução do lúmen ou maior estenose do diâmetro luminal em uma principal artéria coronária. De acordo com o número de vasos doentes, os pacientes com DAC foram posteriormente divididos em grupo DAC de um único vaso, grupo DAC multivaso e grupo DAC com obstrução aguda de uma principal artéria coronária. Os níveis plasmáticos da CT humana foram determinados usando ELISA específica para a CT humana. De acordo com a gravidade da DAC, os pacientes foram estratificados como moderada (n = 33), multivaso (n = 35) e multivaso com síndromes coronárias agudas (SCA) (n = 32). Pacientes sem DAC foram usados como controles (n = 33). Os autores encontraram que pacientes com DAC e SCA tinham níveis significativamente elevados da CT. Além disso, a concentração de as-PCR estava aumentada na SCA. Uma forte correlação positiva entre a CT plasmática e a gravidade da DAC também foi demonstrada. Principais eventos cardiovasculares adversos (PECA) durante 8 a 24 meses de acompanhamento significativamente correlacionaram com os níveis da CT no grupo SCA. Eles concluíram que os níveis plasmáticos da CT eram um preditor útil para a presença e extensão da DAC.

Em 2014, Zhang e cols.<sup>32</sup> investigaram a relação dos níveis da CT plasmática com a presença e gravidade da DAC em uma população chinesa. O estudo envolveu 898 pacientes consecutivos com DAC e 905 controles, etnicamente e geograficamente emparelhados. A DAC foi confirmada angiograficamente em todos os pacientes, e a gravidade da DAC foi expressa pelo número de vasos afetados e a quantidade de estenose coronária. Os níveis plasmáticos da CT foram medidos usando-se um método de ELISA, tendo sido significativamente mais altos nos pacientes com DAC do que nos controles ( $0,347 \pm 0,082$  vs.  $0,256 \pm 0,087$  mg/L; valor de  $p < 0,001$ ), e diretamente associados com um risco mais alto de DAC (*Odds Ratio* – OR = 3,49; Intervalo de Confiança de 95% – IC95% = 2,90 ; -4,19). Os autores, eles mesmos, afirmaram que é um paradoxo que o nível da CT plasmática fosse independentemente e positivamente associado com a presença de DAC humana, embora numerosos estudos (como aqueles previamente mostrados acima) tenham confirmado o efeito cardioprotetor da CT em modelos animais. Por outro lado, ANOVA unidirecional e análise de regressão multivariável passo a passo demonstraram, no estudo de Zhang e cols.<sup>32</sup>, que os níveis plasmáticos da CT foram negativamente associados com a gravidade da DAC, de acordo com o número de vasos (valor de  $p < 0,001$ ) e o número de estenoses ( $r = -0,211$ ; valor de  $p < 0,001$ ).

Diferentemente desses dois últimos estudos, em nosso trabalho, medimos a atividade da hK1 urinária, cuja origem é renal, por um método espectrofotométrico. Os autores precedentes mediram os níveis de CT diretamente no plasma (com ELISA), e não sua atividade. Por outro lado, já se sabe que a CT no plasma tem sua origem em muitos tecidos (cérebro, pâncreas, glândulas salivares e coração)<sup>2</sup>.

Avaliamos, também, o efeito da gravidade de DAC sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária. Como mencionado acima, nenhum efeito foi observado (Tabela 2). Em estudo publicado sobre a atividade amidásica específica da

hK1 na IC<sup>6</sup>, não observamos relação entre a gravidade da IC e os valores da atividade amidásica específica da hK1 urinária. Yao e cols.<sup>31</sup> encontraram uma forte correlação positiva entre a CT plasmática e a gravidade da DAC, enquanto Zhang e cols.<sup>32</sup> demonstraram o oposto. Assim, estudos adicionais são realmente necessários para se entender o real papel da hK1 na DAC.

Avaliamos ainda o efeito da hipertensão sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária nos pacientes com DAC e nos sem DAC, a fim de excluir possíveis fatores de confusão e, nenhum efeito foi observado (Tabela 3). Com relação aos medicamentos que os pacientes com DAC estavam fazendo uso, 16 eram usuários de IECA/BRA e 27, não. Não houve nenhuma influência estatisticamente significativa do uso de IECA ou BRA sobre a atividade amidásica específica da hK1 urinária (Tabela 4).

Os resultados reportados no presente estudo mostraram que a atividade amidásica específica da hK1 urinária nos pacientes com DAC permaneceu dentro dos valores já descritos para pacientes com IC e com hipertensão<sup>6,3</sup> (Tabela 5). Uma vez que, naqueles estudos, a atividade amidásica específica da hK1 estava reduzida em comparação com controles normais, sugerimos que a atividade amidásica da hK1 urinária e, conseqüentemente, a atividade do SCC renal poderia estar reduzida no grupo de pacientes com DAC estudado. Deve-se ainda levar em conta o fato de que nosso grupo sem DAC foi submetido ao CAT. Assim, embora os pacientes deste grupo tenham apresentado ausência angiograficamente documentada de DAC, eles poderiam diferir de uma população completamente livre de outras doenças.

#### Limitações do estudo

Este estudo teve algumas limitações. Primeiro, é transversal e, portanto, não pode ser usado para inferir causalidade; nosso objetivo, porém, foi testar a hipótese da associação entre hK1 e DAC. Segundo, como observado na Figura 1, 1.971 pacientes possivelmente elegíveis foram avaliados e somente 65 deles puderam ser incluídos no estudo, 43 com DAC e 22 sem DAC. A despeito disso, as características de nossa amostra foram semelhantes às aquelas reportadas em estudos prévios com pacientes com DAC<sup>1</sup>. De acordo com o objetivo deste estudo, necessitávamos usar pacientes sem DAC, angiograficamente documentados, para a comparação da atividade amidásica específica da hK1 urinária nos pacientes com DAC angiograficamente documentada.

#### Referências

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18-209. Erratum in *Circulation*. 2011;124(16):e426, *Circulation*. 2011;123(6):e240.
2. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 1992;44(1):1-80.
3. Belo AA, Sousa Mde O, Machado EL, Figueiredo AF. On human tissue kallikrein activity in urine of Brazilian White and Black primary hypertensive patients. *Ethn Dis*. 2009;19(3):265-70.
4. Margolius HS, Geller R, de Jong W, Pisano JJ, Sjoerdsma A. Altered urinary kallikrein excretion in rats with hypertension. *Circ Res*. 1972;30(3):358-62.
5. Guarda E, Corbalán R, Albertini R, Jalil J, Croxatto H, Silva R, et al. Urinary kallikrein excretion in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1991;68(6):685-7.
6. Figueiredo EL, Garcia Leão FV, De Oliveira LV, Moreira Mda C, De Souza Figueiredo AF. The amidase activity of human tissue kallikrein is significantly lower in the urine of patients with systolic heart failure. *J Card Fail*. 2006;12(8):653-8.
7. Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(12):1060-5.

#### Conclusão

Como nos pacientes com IC e hipertensão, em comparação com controles normais, a atividade amidásica específica da hK1 urinária estava reduzida nessa população de pacientes com DAC angiograficamente documentada. Embora este pudesse ser um achado esperado, até agora nunca foi demonstrado. Se a atividade amidásica específica da hK1 urinária está reduzida nos pacientes com DAC, podemos sugerir que a atividade do SCC renal esteja também reduzida nos pacientes com DAC.

#### Agradecimentos

Pesquisa apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas gerais (FAPEMIG), processo CDS 923/98. Os autores agradecem a Aleida Nazareth Soares, pelo auxílio estatístico, e a Érick Ramalho, pela revisão do manuscrito.

#### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Figueiredo EL, Figueiredo AFS; Obtenção de dados: Figueiredo EL, Magalhães CA, Figueiredo AFS, Mandil A, Garcia JCF; Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Figueiredo EL, Magalhães CA, Figueiredo AFS, Pellanda LC, Belli KC; Obtenção de financiamento: Figueiredo AFS; Redação do manuscrito e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Figueiredo EL, Figueiredo AFS, Pellanda LC, Belli KC; Seleção dos pacientes: Araújo RA.

#### Potencial conflito de interesse

Declaramos não haver conflito de interesses pertinentes.

#### Fontes de financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela FAPEMIG.

#### Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

8. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev*. 2001;22(2):184-204.
9. Yousef GM, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biol Chem*. 2002;383(7-8):1045-57.
10. The thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. Phase I findings. The TIMI Study Group. *N Engl J Med*. 1985;312(14):932-6.
11. Geiger R, Fritz H. Human urinary kallikrein. *Methods Enzymol*. 1981;80 Pt C:466-92.
12. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
13. Miranda GM, Magalhães CA, Bosco AA, Reis JS, Ribeiro-Oliveira A Jr, Nogueira AI, et al. Increased tissue kallikrein amidase activity in urine of patients with type 1 diabetes under insulin therapy, and in those with gestational diabetes mellitus not under insulin therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(1):141-5.
14. Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1 supl. 1):1-51.
15. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-52.
16. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al; The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2007;28(12):1462-536.
17. Pellanda LC, Cesa CC, Belli KC, David VF, Rodrigues CG, Vissoci JR, et al. Research Training Program: Duke University and Brazilian Society of Cardiology. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(6):1075-81.
18. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA. Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37397-406.
19. Cugno M, Agostoni P, Brunner HR, Gardinali M, Agostoni A, Nussberger J. Plasma bradykinin levels in human chronic congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 2000;99(5):461-6.
20. Bugiardini R, Bairey Merz CN. Angina with "normal" coronary arteries: a changing philosophy. *JAMA*. 2005;293(4):477-84.
21. Sánchez-Recalde A, Galeote G, Moreno R, Dobarro D, Gómez-Rubin MC, Calvo L, et al. Long-term prognostic value of endothelial dysfunction in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Rev Port Cardiol*. 2009;28(7-8):785-91.
22. Ong P, Athanasiadis A, Borgulya G, Mahrholdt H, Kaski JC, Sechtem U. High prevalence of a pathological response to acetylcholine testing in patients with stable angina pectoris and unobstructed coronary arteries. The ACOVA Study (Abnormal COronary VAsomotion in patients with stable angina and unobstructed coronary arteries). *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(7):655-62.
23. Nolly H, Carbini LA, Scicli G, Carretero OA, Scicli AG. A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):919-23.
24. Agata J, Chao L, Chao J. Kallikrein gene delivery improves cardiac reserve and attenuates remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2002;40(5):653-9.
25. Griol-Charhbil V, Messadi Laribi E, Bascands JL, Heudes D, Meneton P, Giudicelli JF, et al. Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. *FASEB J*. 2005;19(9):1172-4.
26. Koch M, Spillmann F, Dendorfer A, Westermann D, Altmann C, Sahabi M, et al. Cardiac function and remodeling is attenuated in transgenic rats expressing the human kallikrein-1 gene after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*. 2006;550(1-3):143-8.
27. Spillmann F, Graiani G, van Linthout S, Meloni M, Campesi I, Lagrasta C, et al. Regional and global protective effects of tissue kallikrein gene delivery to the peri-infarct myocardium. *Regen Med*. 2006;1(2):235-54.
28. Pons S, Griol-Charhbil V, Heymes C, Fornes P, Heudes D, Hagege A, et al. Tissue kallikrein deficiency aggravates cardiac remodeling and decreases survival after myocardial infarction in mice. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(4):343-51.
29. Yao Y, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2007;13(7):588-96.
30. Chao J, Yin H, Gao L, Hagiwara M, Shen Bo, Yang ZR, et al. Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin B2 receptor activation independent of kinin formation. *Hypertension*. 2008;52(4):715-20.
31. Yao Y, Fu C, Ma GS, Feng Y, Shen CX, Wu GQ, et al. Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2013;423:90-8.
32. Zhang Q, Ran X, Wang DW. Relation of plasma tissue kallikrein levels to presence and severity of coronary artery disease in a Chinese population. *PLoS One*. 2014;9(3):e91780.