

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

RUBIA CALDAS UMBURANAS

O GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E SUAS VARIANTES
GENOTÍPICAS EM HIPERTENSOS E NORMOTENSOS

Ponta Grossa
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

RUBIA CALDAS UMBURANAS

O GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E SUAS VARIANTES
GENOTÍPICAS EM HIPERTENSOS E NORMOTENSOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Ponta Grossa
2013

Orientador
Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- U48 Umburanas, Rubia Caldas
 O gene da enzima conversora de angiotensina e suas variantes genotípicas em hipertensos e normotensos/ Rubia Caldas Umburanas. Ponta Grossa, 2013. 60 f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
 Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
1. Hipertensão arterial sistêmica. 2. Gene da ECA. 3. Polimorfismo I/D. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. III. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 10/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **RUBIA CALDAS UMBURANAS**.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **RUBIA CALDAS UMBURANAS**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador UEPG), Dr^a Mara Cristina de Almeida Matielo (UEPG) e Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **O Gene da Enzima Conversora de Angiotensina e suas variantes genotípicas em Hipertensos e Normotensos**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento da Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matielo

Prof^a Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi

Dedico este trabalho aos meus pais José e Maria Francisca, e ao meu irmão Renan que estiveram sempre comigo em todos os momentos da minha vida, me apoiando e orientando.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades que me proporcionou ao longo dos anos.

Aos meus pais José e Maria Francisca pelo apoio, paciência e dedicação que me proporcionaram sempre e pela ajuda a alcançar meus objetivos.

Ao meu irmão Renan pelo incentivo nos estudos.

Ao Professor Roberto F. Artoni por aceitar me orientar neste trabalho, pela paciência, pela confiança depositada e pelo pensamento positivo em todos os momentos do desenvolvimento da dissertação.

A Suzana, Helen, Regiane, Michelle e Kamilla, pela ajuda na organização das coletas.

Aos agentes comunitários Leila, Eduardo, Ionete e Francisca na ajuda em encontrar os pacientes para pesquisa e nas visitas a estes pacientes.

Aos professores Rogério Pincela Mateus e Vanderlei Aparecido de Lima na ajuda nas análises estatísticas.

A Prof^a Tajiana Costa da Silva pelo importante auxílio com as análises em laboratório e a experiência compartilhada.

A Zoli, pelo auxílio com os documentos necessários na secretaria do mestrado.

Aos pacientes que aceitaram fazer parte da pesquisa.

“Ao caminhar seus passos não
vão se embaraçar e, ao correr
você não tropeçará!” Pr 4,12.

Resumo

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). O sistema renina-angiotensina está envolvido no controle da PA, e tem como um dos componentes a enzima conversora de angiotensina (ECA). Estudos recentes relacionam que variantes do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) aumentam o risco de HAS, com relação à presença do alelo D. Com isso, se fazem necessários estudos voltados à investigação da relação do polimorfismo no íntron 16 do gene da ECA com a HAS. O objetivo do estudo foi verificar a existência de relação do polimorfismo I/D do gene da ECA e suas variantes genotípicas com a instalação da HAS, em quatro grupos distintos. Participaram da pesquisa 112 indivíduos arranjados nos seguintes grupos: normotenso (controle), hipertenso e não obeso, hipertenso e obeso, e hipertenso e com diabetes *mellitus* tipo II. Foi avaliada a possível relação do polimorfismo I/D do gene da ECA, em diferentes grupos de hipertensos, porém não foi encontrada diferença significativa quanto aos genótipos nos diferentes grupos na amostra analisada. Em relação à epidemiologia, quanto maior o índice de massa corporal (IMC), cintura abdominal, valores de colesterol e triglicerídeos e sedentarismo, maior foi a incidência de HAS na população. Os dados obtidos no presente estudo reforçam que interferências ambientais são prevalentes na evolução do quadro de HAS, e não relacionado à frequência do alelo D na população analisada.

Palavras-chave: Hipertensão arterial sistêmica, gene da eca, polimorfismo I/D.

Abstract

High blood pressure (HBP) is a multifactorial clinical condition characterized by high and sustained levels of blood pressure (BP). The renin-angiotensin system is involved in the control of the BP, and has as a component the angiotensin converting enzyme (ACE). Recent studies that relate gene variants of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene, increase the risk of hypertension, compared with the presence of the allele D. Thus, it becomes necessary studies aimed at investigating the relationship of the polymorphism in intron 16 of the ACE gene with hypertension. The aim of the study was to verify the relationship between I / D polymorphism of the ACE gene and genotypic variants with the installation of HBP in four distinct groups. Participants were 112 individuals arranged in the following groups: normotensive (control), hypertensive and non-obese, hypertensive and obese and hypertensive and with type II diabetes mellitus. We evaluated the possible relationship between I/D polymorphism of the ACE gene in different groups of hypertensive patients, but there was no significant difference between the genotypes in different groups in the sample. Regarding the epidemiology higher the body mass index (BMI), waist circumference, triglycerides and cholesterol levels and physical inactivity, was greater incidence of hypertension in the population. The data obtained in this study reinforce environmental interference that are prevalent in the evolution of the framework of HBP and not related to the frequency of the D allele in the population studied.

Keys words: High blood pressure, ACE gene, I/D polymorphism.

Lista de abreviaturas

ANG I - Angiotensina I

ANG II - Angiotensina II

AGT - Angiotensinogênio

AVC- Acidente vascular cerebral

AVE - Acidente vascular encefálico

C.A - Cintura abdominal

D - Deleção (Alelo)

DD - Genótipo Deleção/Deleção

DM - Diabetes *Mellitus*

DM2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2

DM1 - Diabetes *Mellitus* tipo 1

ECA - Enzima conversora de angiotensina

EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

I - Inserção (Alelo)

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

I/D - Inserção/Deleção

IECA - Inibidor da enzima conversora de angiotensina

II - Genótipo Inserção/Inserção

IMC - Índice de massa corporal

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Pressão Arterial

PAS - Pressão Arterial Sistólica

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

SINEs - *Short Interpesed Nuclear Element* (Elemento Nuclear Curto Interespaçado)

SM - Síndrome Metabólica

SNC - Sistema Nervoso Central

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1. Esquema do sistema renina-angiotensina aldosterona (modificado de Alonso 2012).....20

Figura 2. Esquema da localização e estrutura do gene da ECA, (A) destacando regiões do cromossomo 17 humano. No quadro destaque para a região 17q23.3 Fonte: Gene Cards: The human Gene Compendium, version 3 (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE). (B) Localização da região polimórfica presente no íntron 16 (seta) (modificado de Keavney *et al.*, 1998).....23

Figura 3. Estrutura cristalográfica do substrato de ligação do domínio C da ECA em humanos. (modificado de Geoffrey *et al.*, 2012)..... 23

Figura 4. Níveis de angiotensina nos diferentes genótipos do gene da ECA. Fonte: adaptado de Biolo e Rohde (2004) apud Alonso (2012).....25

Resultados

Capítulo I – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO I/D DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM DIFERENTES CLASSES DE HIPERTENSOS

Figura 1. Gráfico cintura abdominal x IMC.....43

Figura 2. Gráfico Sedentarismo x C.A.....44

Figura 3. Caracterização genotípica do polimorfismo I/D para o gene da ECA, segundo os grupos Normotenso, Hipertenso não Obeso, Hipertenso Obeso, Hipertenso com Diabetes *Mellitus* tipo 2.....44

Lista de tabelas

Introdução

Tabela 1. Prevalência de Hipertensão Arterial em indivíduos ≥ 18 anos no ano de 2011, segundo as capitais brasileiras e o Distrito Federal.....**18**

Tabela 2. Taxas de mortalidade específica (TME) a cada 100.000 habitantes por doenças do aparelho circulatório (AC) no Paraná por faixa etária no ano de 2010...**19**

Resultados

Capítulo I – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO I/D DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM DIFERENTES CLASSES DE HIPERTENSOS

Tabela 1. Dados epidemiológicos.....**38**

Tabela 2. Testes de Wilks, Pillai's, Hotteling e Roy's, para verificar a significância entre as variáveis.....**39**

Tabela 3. Teste de Tukey para o grupos e as variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.....**40**

Tabela 4. Teste de Tukey quanto ao gênero e as variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose de jejum, PAS e PAD.....**41**

Tabela 5. Teste de Tukey quanto a idade e as variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.....**42**

Tabela 6. Teste de Tukey quanto ao IMC e as variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.....**43**

Tabela 7. Classificação genotípica e gênero entre os grupos: grupo 1 normotenso, grupo 2 hipertenso (HAS) e não obeso, grupo 3 hipertenso e obeso, e grupo 4 hipertenso e com diabetes *mellitus* tipo 2.....**45**

Tabela 8. Frequências gênicas (D, I) e genotípicas (DD, ID, II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA quando verificado na população dos indivíduos (112) e p valor.
.....**45**

Tabela 9. Frequências gênicas (D, I) e genotípicas (DD, ID, II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA e p valor em todos os indivíduos analisados por grupos sendo grupo 1 normotenso, grupo 2 hipertenso e não obeso, grupo 3 hipertenso e obeso e grupo 4 hipertenso e com diabetes *mellitus* tipo II.....**46**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações gerais.....	14
1.2 Definição de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	15
1.3 Fatores de risco e complicações da HAS.....	15
1.4 Diabetes <i>Mellitus</i>	16
1.5 Dados epidemiológicos das doenças cardiovasculares.....	17
1.6 Sistema renina-angiotensina.....	19
1.7 A enzima conversora de angiotensina e seu gene.....	22
1.8 Sequências repetitivas <i>ALU</i>	23
1.9 Características populacionais do polimorfismo do gene da ECA.....	24
2 OBJETIVO	
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Critérios de inclusão e agrupamentos dos pacientes.....	29
3.2 Dados antropométricos e demais dados.....	30
3.3 Coleta do material biológico.....	30
3.4 Extração do DNA Genômico.....	31
3.5 Análise Genética.....	31
3.6 Análises Estatísticas.....	31
4 RESULTADOS	
Capítulo I.....	34
5 CONCLUSÃO	51
5.1 Considerações finais.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7 ANEXOS	57

1 Introdução Geral

1.1 Considerações gerais

Nos últimos 30 anos houve um grande aumento no predomínio das doenças e mortes devido a doenças crônicas não transmissíveis como as doenças cardiovasculares e o Diabetes *Mellitus*, mudando drasticamente o perfil de morbimortalidade da população brasileira. Com isso, o Ministério da Saúde vem adotando várias estratégias para reduzir este número, com medidas de prevenção, promoção na atenção básica e monitoramento das pessoas já acometidas (Ministério da Saúde, 2012).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2012), no Brasil existem mais de 30 milhões de hipertensos, e estima-se que destes apenas 10% façam o controle adequado da doença. Entre os anos de 2006 e 2010 o número de hipertensos passou de 21,6% para 23,3%, com recuo de 1,1% em 2011. A prevalência ocorre entre as mulheres com 25,5% e nos homens com 20,7%. Em ambos os sexos o diagnóstico é 50% mais comum na faixa etária de 55 anos ou mais de idade.

As graves implicações quanto a hipertensão na saúde perfazem um impacto econômico significativo sobre as finanças pessoais e para gestão pública da saúde, onde, medidas de promoção de saúde e controle são necessárias a fim de minimizar as complicações, maximizar a prevenção e desonerar o sistema de saúde (Ministério da Saúde, 2012).

Estudos recentes relacionam que variantes do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) aumentam o risco de hipertensão. Estas variações polimórficas são resultantes de modificações estruturais e regulatórias dos genes que podem alterar muitas funções metabólicas (Pedroso *et al.*, 2010).

Com isso, se faz necessários estudos voltados a investigação da relação do polimorfismo no íntron 16 do gene da ECA com a hipertensão, a fim de esclarecer sua ação frente a esta doença e contribuir com o diagnóstico e tratamento precoce.

1.2 Definição de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), segundo a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010):

É uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais.

Considera-se valores que define HAS como para Pressão Arterial (PA) sistólica ≥ 140 mmHg e/ou PA diastólica ≥ 90 mmHg. Valores para PA sistólica ≤ 130 mmHg e PA diastólica ≤ 85 mmHg são considerados normotensos. A HAS pode ocorrer também apenas com alteração da PA sistólica, dita como hipertensão arterial sistólica isolada onde a PA diastólica permanece normal (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

1.3 Fatores de risco e complicações da HAS

Entre 90% a 95% dos casos de hipertensão são classificados como hipertensão primária ou hipertensão essencial, isto significa que sua origem é desconhecida, diferente das formas de hipertensão secundária com causas conhecidas como na estenose de artéria renal. Em agravamento, na maioria dos pacientes o excesso de peso e a vida sedentária parecem desempenhar papel importante como causa de hipertensão, e estudos sugerem que o sobrepeso e obesidade são responsáveis por 65% a 75% do risco de HAS (Guyton e Hall, 2011).

São fatores de risco para hipertensão: histórico familiar de HAS, alcoolismo, tabagismo, excesso de peso, pessoas de origem negra, gênero, idade, excesso de sal na alimentação, diabetes, fatores socioeconômicos, alimentação não saudável e sedentarismo (Ministério da Saúde, 2011; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

As principais complicações decorrentes da HAS são: o excessivo trabalho cardíaco levando a insuficiência cardíaca e a doença coronariana precoce, que pode causar a morte por ataque cardíaco. Além disso, a alta pressão pode lesar vaso sanguíneo cerebral importante que leva ao infarto cerebral também conhecido como acidente vascular cerebral (AVC) ou, que dependendo da região cerebral afetada

leva a paralisia, demência, e cegueira e muitos outros distúrbios cerebrais graves. Também a HAS pode causar lesão renal produzindo muitas áreas de destruição renal, possível insuficiência renal, uremia e morte (Guyton e Hall, 2011).

Outra complicação decorrente da HAS, recentemente divulgada como principal causa de mortes registradas no Brasil, é o acidente vascular encefálico (AVE), que decorre de alterações da circulação cerebral seja por obstrução (isquêmico) ou ruptura (hemorrágico) de um vaso sanguíneo. Só em 2010 no Brasil foram 99.726 óbitos e, estima-se que no mundo anualmente 16 milhões de pessoas são acometidas de AVE e, destas, 6 milhões morrem. Diante deste quadro, algumas medidas simples que levem a hábitos de vida saudáveis, como a atividade física com supervisão adequada, devem ser adotados, visando minimizar os riscos causados pela HAS, diabetes, hipercolesterolemia e o tabagismo (Bessa, 2012).

Níveis aumentados de PA também são associados com a obesidade visceral e resistência à insulina, características estas fisiopatológicas da Síndrome Metabólica (SM) (Yanai *et al.*, 2008)

Vários fatores favorecem a HAS e SM como estresse oxidativo, disfunção endotelial, ativação do sistema renina-angiotensina, aumento de mediadores inflamatórios e a apnéia do sono. Estes fatores induzem a hiperatividade simpática, a vasoconstrição, o aumento do fluido intravascular, e diminui a vasodilatação dos vasos causando o desenvolvimento da HAS e da SM (Yanai *et al.*, 2008).

1.4 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, secundário a falta total ou parcial de insulina (SBD, 2007), resulta em defeitos da secreção e ação da insulina (Reis e Velho, 2002) e/ou diminuição de sua ação nos tecidos alvo, com consequente hiperglicemia que ao longo do tempo leva a sérios danos nos sistemas do corpo, especialmente em nervos e vasos sanguíneos (SBD, 2007; OMS, 2011). Pode ser classificado em dois principais grupos: DM tipo I e DM tipo II. O DM tipo I acomete crianças e jovens, corresponde entre 5% a 10% dos casos, pode ser de natureza auto-imune pela destruição das células beta pancreáticas ou idiopática quando não há evidências de processo auto imune. Neste caso sugere-se a forte associação com determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) em DM1. Já o DM tipo II que corresponde a 90% a 95% dos casos, pode

ocorrer em qualquer idade, geralmente é diagnosticado por volta dos 40 anos (SBD, 2007). Suas causas são complexas e acredita-se que grande parte do surgimento seja devido ao sobrepeso da população, obesidade e inatividade física (OMS, 2011). Tem forte predisposição genética e o risco de desenvolver aumenta com a idade, tendo, portanto fatores ambientais e genéticos envolvidos (SBD, 2007; Reis e Velho, 2002).

Mundialmente estima-se que há 346 milhões de pessoas com diabetes e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) este número duplicará até 2030 principalmente em países em desenvolvimento. Quanto à mortalidade atribuída a DM, mais de 80% das mortes ocorre em países de baixa e média renda. No Brasil é a quinta causa de mortalidade e, na maioria, está associada a doenças cardiovasculares (OMS, 2011).

1.5 Dados epidemiológicos das doenças cardiovasculares

A prevalência de HAS no Brasil no ano de 2011, segundo dados do Ministério da Saúde (2011), entre as capitais e o Distrito Federal variou entre 12,9% em Palmas e 29,8% no Rio de Janeiro considerando toda a população maior de 18 anos. Entre o sexo masculino a maior frequência foi no Rio de Janeiro e Campo Grande com 23,9% e a menor ocorreu em Porto Velho com 12,9%. Entre a população feminina a maior frequência foi no Rio de Janeiro com 34,7% e a menor em Palmas com 12,7%. Na capital paranaense, Curitiba, a frequência total foi de 22%, sendo para o sexo masculino 19,5% e para o feminino 24,2%, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de Hipertensão Arterial em indivíduos ≥ 18 anos no ano de 2011, segundo as capitais brasileiras e o Distrito Federal.

Capitais e Distrito Federal	Total %	Sexo masculino	Sexo feminino
Aracaju	23,3	21,1	25,1
Belém	19,9	19,5	20,2
Belo Horizonte	22,4	19,1	25,3
Boa Vista	17,0	15,6	18,4
Campo Grande	24,0	23,9	24,1
Cuiabá	21,4	21,0	21,8
Curitiba	22,0	19,5	24,2
Florianópolis	18,7	16,3	20,8
Fortaleza	17,3	19,6	19,8
Goiânia	21,1	20,1	21,9
João Pessoa	21,0	18,1	23,4
Macapá	19,0	22,0	21,0
Maceió	22,2	19,1	24,8
Manaus	18,6	15,4	21,6
Natal	24,9	20,8	28,2
Palmas	12,9	13,1	12,7
Porto Alegre	25,7	23,6	27,4
Porto Velho	16,8	12,9	20,6
Recife	26,1	21,0	30,3
Rio Branco	21,0	19,6	22,2
Rio de Janeiro	29,8	23,9	34,7
Salvador	21,2	18,1	23,8
São Luiz	17,	16,0	19,1
São Paulo	22,5	19,6	24,9
Teresina	20,7	19,6	21,5
Vitória	25,0	22,6	27,1
Distrito Federal	20,2	16,9	23,2

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, Vigitel, 2011.

Seguindo no ano de 2011 a frequência de diagnóstico prévio de HAS foi de 22,7% no Brasil, sendo maior entre o sexo feminino (25,4%) do que no sexo masculino (19,5%). O diagnóstico da HAS teve maior frequência entre o sexo feminino de acordo com a idade, e quando este foi depois dos cinquenta e cinco anos ou mais a frequência foi de 44,6% para o sexo masculino e 55,1% para o sexo feminino.

Quanto à mortalidade não existem dados que indiquem óbitos por hipertensão, mas sim de suas complicações decorrentes, como o infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular encefálico (AVE), insuficiência renal e outros. Na

tabela 2, estão as taxas por doenças específicas do aparelho circulatório, e a frequência é expressa a cada 100.000 habitantes.

Tabela 2. Taxas de mortalidade específica (TME) a cada 100.000 habitantes por doenças do aparelho circulatório (AC) no Paraná por faixa etária no ano de 2010.

Faixa etária	Doenças isquêmicas do coração	Doenças cerebrovasculares	Outras doenças do AC
0 a 29 anos	0,3	0,9	1,8
30 a 39 anos	6,5	7,0	7,0
40 a 49 anos	27,8	21,5	23,2
50 a 59 anos	85,4	63,3	68,8
60 a 69 anos	216,2	168,7	198,6
70 a 79 anos	477,3	530,7	574,8
80 anos e mais	914,8	1505,5	1835,2
Total	56,8	61,0	70,3

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde- Sistema de informação de mortalidade e IBGE, 2010.

1.6 Sistema renina-angiotensina

O controle da pressão arterial de resposta rápida é realizado pelo sistema nervoso simpático, em grande parte ocorre por efeitos do sistema nervoso sobre a resistência e capacitâncias vasculares periféricas e a capacidade de bombeamento do coração. É mediado pelos reflexos quimiorreceptores, situados em diversos pequenos órgãos quimiorreceptores na artéria carótida e aorta, e barorreceptores presentes nas paredes de diversas grandes artérias (Guyton e Hall, 2011).

O mecanismo de controle da pressão arterial ao longo de semanas e meses é relacionado com a homeostasia do volume do líquido corporal, determinado pelo balanço entre ingestão e eliminação de líquido. Este balanço é regulado por hormônios e controles nervosos múltiplos, além de sistemas de controle local como o rim que regula a secreção de sal e água. Um mecanismo muito importante neste processo é o sistema renina-angiotensina, esquematizado na figura 1 (Guyton e Hall, 2011).

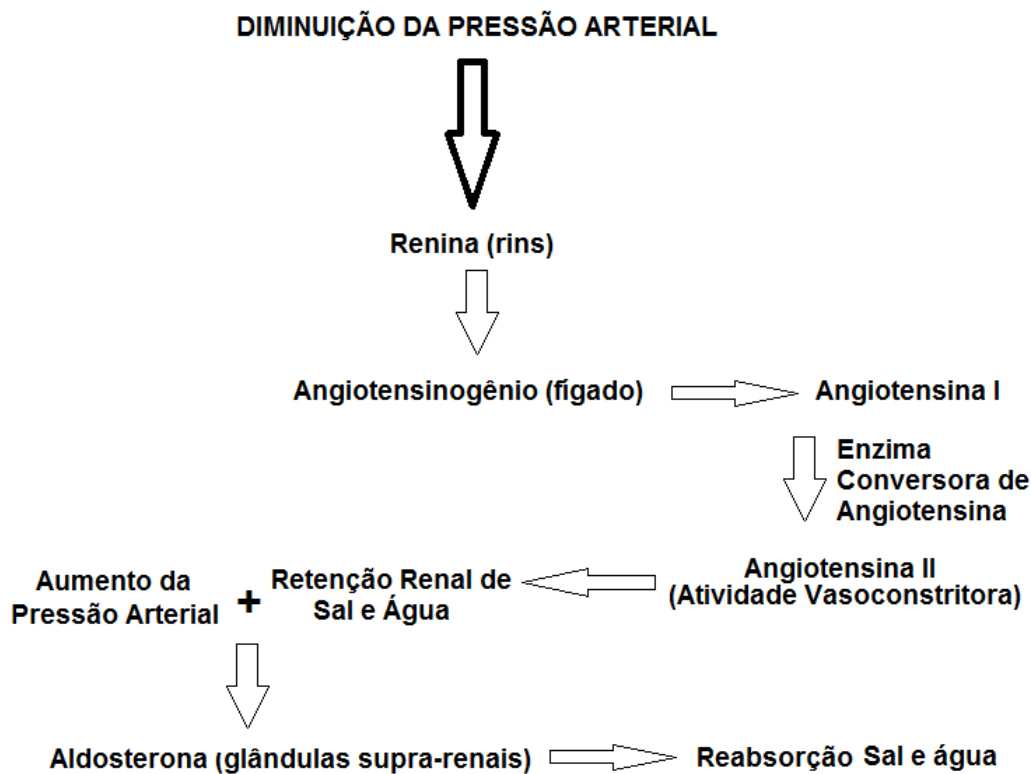


Figura 1. Esquema do sistema renina-angiotensina aldosterona (modificado de Alonso 2012).

Através das células justaglomerulares, situadas nas paredes das arteríolas aferentes imediatamente proximais aos glomérulos dos rins, a renina é sintetizada e armazenada na forma inativa chamada pró-renina. Com a queda da pressão arterial, reações intrínsecas dos rins fazem com que muitas moléculas de pró-renina sejam clivadas liberando renina, em sua maior parte, no sangue que passa a circular no corpo inteiro. Assim a renina, age enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT), liberando a angiotensina I (ANG I), um decapeptídeo. Esta possui propriedade vasoconstritora, porém não causa alterações circulatórias significativas (Guyton e Hall, 2011). Seguindo o processo, a ANG I é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), com a clivagem de dois aminoácidos e se transforma no octapeptídeo angiotensina II (ANG II) (Hubert *et al.* 1991; Guyton e Hall, 2011). A ECA é uma enzima presente no endotélio dos vasos pulmonares, dos rins e vasos sanguíneos (Guyton e Hall, 2011), e tem também ação de hidrolisar o peptídeo vasodilatador bradicinina (Hubert *et al.*, 1991). A ANG II é um potente vasoconstritor, afeta a função circulatória em muitas áreas do corpo com rapidez, aumentando a resistência vascular periférica pela vasoconstrição intensa das

arteríolas, e assim a elevação da PA e a leve constrição das veias causa o aumento do retorno venoso do sangue ao coração, aumentando o bombeamento cardíaco contra a pressão arterial elevada. Sua ação persiste entre um a dois minutos e pode ser inativada por uma angiotensinase (Guyton e Hall, 2011).

Além disso, pelo seu efeito vasoconstritor a ANG II esta associada também no desenvolvimento de aterosclerose nos vasos do tecido muscular por inibir a cascata de ação insulínica (Gosttschall e Busnello, 2009) Esta resposta vasoconstritora da ANG II é mediada por ação nos receptores AT₁ e AT₂. A estimulação do receptor AT₁ esta associada à disfunção endotelial por consequência de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição, ativação plaquetária, e maior liberação de inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1, ativação de alguns genes denominados *immediate early genes* como o c-fos e c-fun associado por exemplo a hipertrofia miocárdica, e ativação de fatores de crescimento. O receptor AT₂, pode atenuar estes efeitos proliferativos desencadeados por ação do receptor AT₁ (Fonseca e Izar, 2004).

Alguns estudos sugerem que com a inibição a ação da insulina, pela ANG II ocorra a diminuição da produção de óxido nítrico em células endoteliais e com isso aumente a vasoconstrição (Sowers, 2004).

Outro efeito exercido pela ANG II que leva ao o aumento da PA é a diminuição da excreção de sal e água pelos rins provocando aumento do volume do líquido extracelular durante horas e dias. Esta retenção de sal e água se faz pela ação direta nos rins, e pela ação das glândulas adrenais a secretar aldosterona que aumenta a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais se eleva a concentração do liquido extracelular (Guyton e Hall, 2011).

O angiotensinogênio, o gene do receptor de ANG I e a ECA são amplamente expressos no tecido adiposo humano, sendo assim, os níveis de angiotensinogênio e ECA aumentados em obesos e consequentemente a PA (Yanai *et al*, 2008).

Com quantidade excessiva de ANG II no sangue circulante, a longo prazo, o mecanismo de controle renal é ajustado para manter a PA acima do normal (Guyton e Hall, 2011), estabelecendo um quadro crônico de HAS.

1.7 A enzima conversora de angiotensina e seu gene

A ECA é um componente chave do sistema renina-angiotensina que contribui para a regulação da PA (Jeunemaitre *et al.*, 1992). Desempenha papel importante na produção de angiotensina II e no catabolismo da bradicinina, está envolvida na modulação do tônus vascular e na proliferação de células musculares lisas vasculares (Cambien *et al.*, 1992).

O gene da ECA está localizado no cromossomo 17 na região 17q23.3, é composto por 26 éxons e possui 21 Kb (Figura 2 A). O primeiro polimorfismo encontrado para este gene foi o de inserção/deleção (I/D) determinado pela ausência ou presença de uma sequência de 278 pares de bases no íntron 16, denominada sequência repetitiva ALU (Figura 2 B) (Lindpaintner *et al.*, 1995).

Os níveis plasmáticos de ECA estão relacionados ao polimorfismo I/D do gene da ECA em humanos, sendo que a deleção de uma sequência encontrada no íntron 16 está associada a maiores níveis de transcrição de RNA mensageiro e com isso maior expressão da ECA (Fonseca e Izar, 2004).

A enzima conversora de angiotensina apresenta uma isoforma somática com 150-180kDa, sendo expressa em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais, possui dois domínios homólogos cada um com seu sítio catalítico próprio os domínios N- e C- (Hubert *et al.*, 1991). A forma somática é codificada pelo gene completo, transcrita a partir dos éxons 1 a 26 com exceção do éxon 13, removido por *splicing* (Valee e Auld, 1990). A outra isoforma germinativa com 110 kDa é encontrada em células germinativas masculinas e apresenta um único sítio ativo o domínio C- correspondente a forma somática (Ehlers *et al.*, 1989). É transcrita a partir de um promotor presente no íntron 12, sendo formada do éxon 13 até o 26 (Howard *et al.*, 1990). O domínio C- (Figura 3) possui maior afinidade com a ANG II, sugerindo um papel regulatório do sistema renina-angiotensina (Geoffrey *et al.*, 2012).

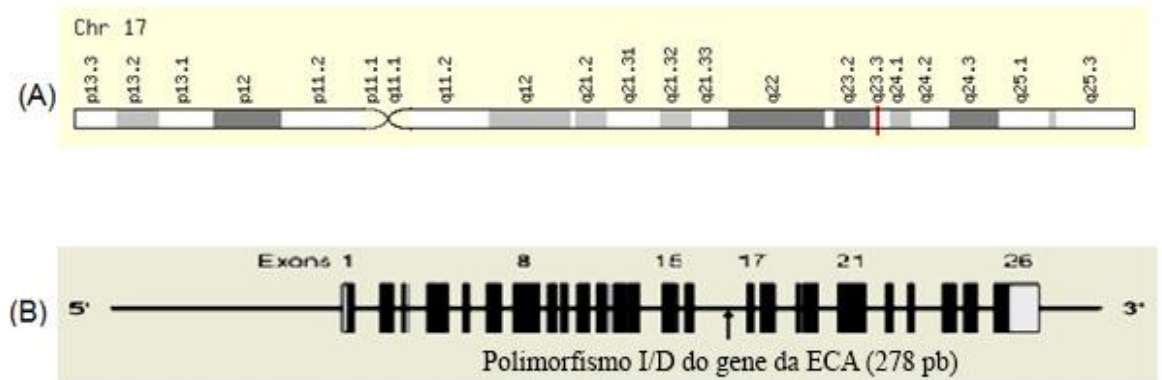


Figura 2. Esquema da localização e estrutura do gene da ECA, (A) destacando regiões do cromossomo 17 humano No quadro destaque para a região 17q23.3 Fonte: Gene Cards: The human Gene Compendium, version 3 (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE). (B) Localização da região polimórfica presente no íntron 16 (seta) (modificado de Keavney *et al.*, 1998).

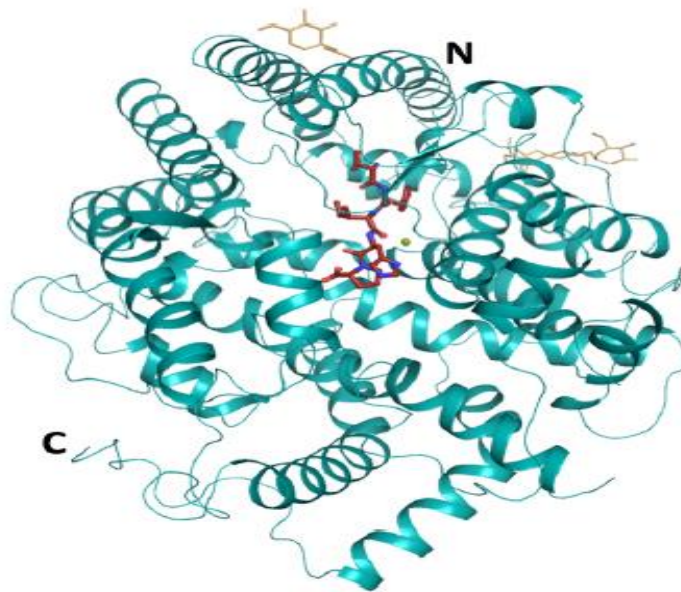


Figura 3. Estrutura cristalográfica do substrato de ligação do domínio C da ECA em humanos. (modificado de Geoffrey *et al.*, 2012).

1.8 Sequências repetitivas *ALU*

Os elementos *ALU* são seqüências de DNA repetitivo pertencentes à categoria SINEs (elementos nucleares intercalares curtos), são altamente difundidos no genoma humano e derivados de elementos de transposição. Nem todos os elementos *ALU* são idênticos, mas suficientemente similares para serem

considerados da mesma família. Seu comprimento médio é de 280 pb, ocorrem dispersos no genoma inclusive nos íntrons (Brown, 1999). Acredita-se que o genoma humano contenha um milhão destas cópias similares de sequências repetitivas (Brown, 1999; Pierce, 2004). Aproximadamente 50% do genoma humano, consiste em sequências derivadas de elementos de transposição (Pierce, 2004).

Estas sequências são similares ao gene que codifica a molécula RNA 7SL, que tem como função transportar proteínas recém-sintetizadas através do retículo endoplasmático. As sequências *ALU* criam curtas repetições diretas flanqueadoras quando se inserem no DNA, e possuem características sugestivas de que foram transportadas por RNA intermediário (Pierce, 2004).

Desse modo, acredita-se que a família *ALU* tenha se originado uma vez ou mais de um pseudogene derivado do RNA7SL, e que estes pseudogenes possuíam ou adquiriram mais tarde a atividade de transposição, possibilitando a replicação e deslocamento para novos locais do genoma (Brown, 1999).

Em um estudo realizado em chimpanzés, foi constatado que estes não possuíam a sequência *ALU* no íntron 16 do gene da ECA, sugerindo que a inserção desta sequência tenha ocorrido depois da divergência evolutiva há ± 50 m.a, quando surgiu o gênero *Homo* e aos demais primatas (Dufour *et al.*, 2000). A inserção de elementos *ALU* pode ser verificada em posição correspondente no genoma de outros primatas, mas cerca de 7 mil inserções *ALU* são únicas de humanos (The chimpanzee sequencing and analysis consortium, 2005).

1.9 Características populacionais do polimorfismo do gene da ECA

O polimorfismo genético deve ser entendido como uma variação observada ao nível populacional, e são assim classificadas quando duas ou mais formas variantes geneticamente apresentam frequência maior que a taxa de mutação (Ford, 1940). Quando os alelos são tão comuns e encontrados em mais de 1% da população geral estes constituem em polimorfismo genético. Já os alelos com frequências menores de 1% são chamados de variantes raras (Nussbaum *et al.*, 2001).

O gene da ECA tem sua atividade regulada geneticamente pelo polimorfismo de inserção e/ ou deleção (IND) de uma sequência *ALU* de 278 pb descrito no íntron 16 (Lindpaintner *et al.*, 1995), próximo à extremidade 3' do íntron (Rigat *et al.*, 1990).

Essa variação polimórfica I/D produz três genótipos possíveis: II, ID e DD, estes estão associados a 47% da variabilidade fenotípica da concentração sérica da ECA, sendo as concentrações mais elevadas quando associado ao alelo D, e o alelo I considerado fenótipo normal no paciente (Rigat *et al.*, 1990). Indivíduos com genótipo DD apresentam níveis plasmáticos aumentados de enzima conversora de angiotensina quando comparados com o genótipo II, atribuindo ao polimorfismo I/D a regulação da quantidade circulante da enzima (Cambien *et al.*, 1992), conforme figura 4.

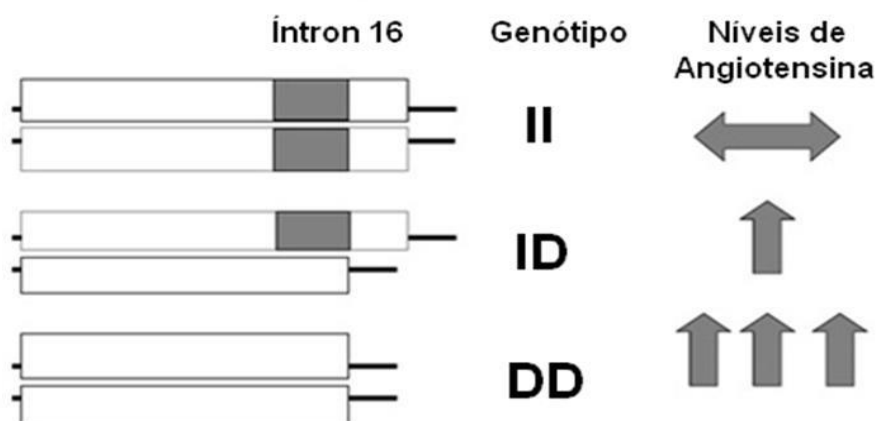


Figura 4. Níveis de angiotensina nos diferentes genótipos do gene da ECA. Fonte: adaptado de Biolo e Rohde (2004) apud Alonso (2012).

O polimorfismo está também associado com alterações fisiológicas que favorecem o surgimento da hipertensão quando o alelo/genótipos são desfavoráveis, constituindo um fator de risco clínico específico para o desenvolvimento de hipertensão (Freitas *et al.*, 2007). Porém, outros estudos afirmam que o polimorfismo não contribui para a HAS não tendo qualquer influência no nível de PA e homeostase (Mondorf *et al.*, 1998).

Alguns estudos não relacionam o polimorfismo I/D da ECA como fator de risco em doenças coronarianas (Martínez-Ríos *et al.*, 2008), porém outros afirmam que existe relação associado ao alelo D (Cambien *et al.*, 1992; Mendonça *et al.* 2004). Interação com outros genes e fatores ambientais são explicações possíveis para os resultados inconsistentes e contraditórios sobre a associação do polimorfismo I/D com as doenças estudadas (Montgomery *et al.*, 1997a).

Uma meta análise confirmou que o alelo D tem sido relacionado com o aumento de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, mas estas relações ainda são incertas quanto à longevidade e deterioração renal (Baudin, 2000). Outro

estudo amplo verificou associações entre várias desordens cardiovasculares e renais e o polimorfismo I/D do gene da ECA, e ainda concluiu que o alelo D não estava relacionado com a HAS, mas se comportava como marcador de complicações cardiovasculares ateroscleróticas e nefropatia diabética, mas contemplam que estes dados podem ter sido superestimados por viés dos dados compilados em diferentes publicações (Staessen *et al.*, 1997).

Estudos com pacientes que sofreram infarto do miocárdio, mostram que quando comparados com o grupo controle houve uma maior frequência do genótipo DD, e especialmente naqueles que apresentaram baixo índice de massa corporal. Neste estudo os pesquisadores consideraram que o polimorfismo I/D da ECA parece ser um fator de risco de doença coronária em indivíduos considerados de baixo risco com critérios diagnósticos de rotina clínica (Cambien *et al.*, 1992).

Mendonça *et al.* (2004), em trabalho com dois grupos, um de pacientes que haviam sofrido IAM ou doença coronária, e outro controle, avaliou se o polimorfismo do gene da ECA constituía fator de risco de doenças das artérias coronárias. Encontrou que o genótipo DD possuía uma associação significativa com as doenças coronarianas, tendo os portadores do genótipo DD o risco aumentado de desenvolverem esta doença.

Em pessoas com Diabetes *Mellitus* tipo 2, a presença do alelo D para a ECA está associada a um risco aumentado de doença arterial coronariana (Borges-Osório e Robinson, 2001).

Outro estudo mostra uma associação do polimorfismo do gene da ECA com o comprimento dos telômeros. Estes são localizados nas extremidades do DNA cromossômico e constituídos de milhares de repetições em tandem com a sequência TTAGGG e associados a proteínas, encurtam por repetidas divisões celulares atingindo o estágio crítico quando a célula entra em senescência seguida por apoptose. Na análise realizada em 1249 participantes foi testada a hipótese de associação do encurtamento dos telômeros, com o genótipo I/D e risco cardiovascular. Foi encontrado que o encurtamento foi maior nos indivíduos com genótipo DD e ID em relação ao II, isto é relacionado com o aumento da atividade da ANG II com a presença do alelo D que causa maior estresse oxidativo reduzindo o comprimento dos telômeros (Fyhrquist *et al.*, 2012).

Muitos estudos relatam os efeitos dos medicamentos com o polimorfismo do gene da ECA, como no estudo de Kohno *et al.* (1999), realizado em 54 pacientes

com diagnóstico de hipertensão essencial e hipertrofia ventricular esquerda moderada ou grave, onde foi administrado por dois anos o uso de inibidores de ECA (IECA). Eles encontraram que dezoito pacientes apresentaram o genótipo II, dezenove o ID e dezessete o DD. O uso da IECA foi eficiente na redução da PA, da espessura da parede posterior septal e no índice de massa ventricular esquerda, porém no grupo DD a redução da espessura da parede posterior foi significativamente menor (-9%) do que nos grupos ID (-21%) e II (-21%), e a diminuição da parede septal e do índice de massa ventricular também foi menor em DD, concluiu-se que os hipertensos com genótipos DD são menos propensos à regressão da hipertrofia ventricular esquerda quando tratados com IECA.

Em um estudo que avaliou a hipertrofia ventricular esquerda em 140 militares caucasianos antes e após dez semanas de atividade física e seus genótipos para o gene da ECA, constatou-se que aqueles com genótipo DD tiveram maior hipertrofia do que os com II e ID, mostrando que o alelo D é fortemente ligado a este aumento ventricular quando induzido ao treinamento físico (Montgomery *et al.*, 1997a).

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

- Verificar a existência de relação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA e suas variantes genotípicas com a pressão arterial (PA), salvaguardando as classes obeso, não obeso e Diabetes *Mellitus* tipo II

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar geneticamente e epidemiologicamente os grupos de hipertensos com relação ao gene da ECA.
- Distinguir o polimorfismo estrutural e variantes genotípicas para o íntron 16 do gene da ECA.
- Verificar as frequências genotípicas para DD, ID e II, e frequências gênicas para os alelos D e I.

3 Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, conforme resolução CNS 196/96 com o protocolo de pesquisa nº 13664/11 e parecer 47/2012 (Anexo 1).

Foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde cada participante que se dispôs a participar foi orientado a assina-lo, sendo explicados os objetivos da pesquisa (Anexo 2).

A pesquisa foi realizada no município de Pinhão-PR em três unidades de Saúde, em duas etapas. Na primeira foi realizada a coleta de dados antropométricos, de medicações em uso, PA e dados de exames laboratoriais recentes de rotina e, na segunda etapa foi realizada a coleta de sangue periférico por paciente.

3.1 Critérios de inclusão e agrupamento dos pacientes

Foi realizado uma pré-seleção de indivíduos de ambos os gêneros seguindo os seguintes critérios:

- Idade: $\geq$ a 50 anos
- Diagnóstico clínico prévio de Hipertensão Arterial (HAS)
- Fazer uso de três medicamentos ou mais para controle da PA;

Com isso, foram incluídos na pesquisa 112 indivíduos de ambos os gêneros, com mais de cinquenta anos e em uso de três medicações ou mais para controle da PA. A exceção foi a constituição do grupo normotenso (controle negativo) onde os indivíduos não faziam uso de nenhuma medicação hipotensora.

Os pacientes foram agrupados em quatro grupos conforme segue:

- Grupo 1: normotensos (controle negativo)
- Grupo 2: hipertensos e não obesos
- Grupo 3: hipertensos e obesos
- Grupo 4: hipertensos e com Diabetes *Mellitus* tipo II

3.2 Dados antropométricos e demais dados

Foram aferidos o peso e altura dos indivíduos em uma balança mecânica (Wellmy[®]), posteriormente calculado o IMC, obtido pela divisão do peso (em quilogramas) pela altura ao quadrado (em metros), e classificado nas classes: peso normal (18,5 – 24,9 kg/m²), sobrepeso (25-29,9 kg/m²), obesidade grau 1 (30-34,9 kg/m²), obesidade grau 2 (35-39,9 kg/m²), e obesidade mórbida ou grau 3 (≥ 40 kg/m²) segundo a OMS. A medida da circunferência abdominal foi mensurada entre o ponto médio do último arco costal e da espinha íliaca antero-superior com fita métrica flexível, com escala de 0,1 cm até 150 cm no máximo, estando o indivíduo em pé em frente ao avaliador e solicitado para que relaxasse a musculatura abdominal.

Os valores de ≥ 88 cm para mulheres e ≥ 102 para homens foram considerados de aumento substancial de riscos de complicações metabólicas (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009).

A pressão arterial foi aferida com estetoscópio e esfigmomanômetro aneróide Premium[®]. No momento da coleta de dados também foi averiguado se os participantes eram tabagistas e sedentários. Foram coletados ainda dados como idade, sexo, histórico familiar de HAS, medicações em uso e de exames laboratoriais de rotina recentes de triglicerídeos, colesterol total, glicose de jejum, e hemoglobina glicada (para DM2), aqueles que não apresentavam foram encaminhados a realizá-los, para viabilizar o adequado enquadramento dos participantes nos grupos.

3.3 Coleta do material biológico

Foi coletada uma amostra de 4 ml de sangue periférico de cada indivíduo através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis, e imediatamente colhido em tubo estéril contendo K₃ EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram mantidas congeladas a -20° C até a extração do DNA.

3.4 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada no laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Foi utilizado kit comercial para extração do DNA (PureLink® Genomic DNA mini kit - Invitrogen®) segundo instruções do fabricante (Anexo 3).

Foi realizada corrida do DNA e eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®), por uma hora a 100 v para verificar a integridade das amostras.

Ao DNA, bem como ao marcador de peso molecular (*Low Ranger* 100 bp DNA *Ladder*, marca: Norgen Biotek®) foi adicionado o corante fluorescente para ácidos nucleicos GelRed (Biotium®), para visualização das amostras sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador. Os géis foram documentados em fotodocumentador MF CHEMIBIS (DNR Bio Imaging Systems Ltd®).

As quantificações das amostras de DNA foram realizadas no equipamento NanoVue (GE Healthcare®).

3.5 Análise Genética

Cento e doze indivíduos foram genotipados quanto à presença da região polimórfica I/D presente no íntron 16 no gene ECA, pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), para amplificações de fragmentos de DNA com diferenças de aproximadamente 319 pb para alelo D, e para alelo I 597 pb.

Os oligonucleotídeos empregados nesta análise foram obtidos de acordo com Lindpaintner *et al.* (1995), e apresentaram as seguintes sequências ACE 1F: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT3' e ACE 1R: 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'. O protocolo empregado está descrito no anexo 4.

3.6 Análises Estatísticas

Foi realizada análise multivariada por Manova, onde foram consideradas como variáveis categóricas os quatro grupos, gênero, idade, polimorfismo I/D, IMC, tabagismo, sedentarismo e história familiar de HAS. Como variáveis dependentes foram consideradas a cintura abdominal (C.A), os exames laboratoriais de colesterol total, triglicerídeos e glicose de jejum; pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica

(PAD). As variáveis dependentes triglicerídeos, glicose jejum e PAS, foram transformadas em $\log_{10}$, para normalização dos valores. Nesta análise foram empregados os testes de Wilks, Pillai's, Hotteling e Roy's, no intuito de averiguar as diferenças significativas das variáveis categóricas frente às variáveis dependentes. Posteriormente, o teste *a posteriori* de Tukey também foi aplicado, com 95% de confiança ($<0,05$), com a finalidade de verificar as diferenças significativas de cada variável categórica com as variáveis dependentes, em comparação duas a duas, a fim de conferir em qual categórica de cada grupo houve diferença. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc, 2001).

Foi utilizado o programa de análise em genética de populações TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*) (Miller, 1997), a fim de verificar as frequências alélicas e genotípicas, o padrão de diferenciação genética entre os grupos, com o uso da estatística F e distâncias de Reynolds (Reynolds *et al*, 1983) e o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas foram comparadas entre os grupos pelo teste de qui-quadrado de Pearson com 5% de significância, através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc, 2001).

4 Resultados

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

**CAPÍTULO I – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO I/D DO GENE DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL
SISTÊMICA EM DIFERENTES CLASSES DE HIPERTENSOS**

CAPÍTULO I – ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO I/D DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM DIFERENTES CLASSES DE HIPERTENSOS

Resumo

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). No Brasil nos últimos 30 anos houve um grande aumento no predomínio das doenças e mortes devido a doenças crônicas não transmissíveis entre elas as doenças cardiovasculares e o Diabetes *Mellitus*. Estudos recentes relacionam que variantes do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) aumentam o risco de hipertensão. Estas variações polimórficas são resultantes de modificações estruturais e regulatórias dos genes que podem alterar muitas funções metabólicas. Com isso, se faz necessários estudos voltados a investigação da relação do polimorfismo no íntron 16 do gene da ECA com a hipertensão, a fim de elucidar sua ação frente a esta doença e contribuir com o diagnóstico e tratamento precoce. Com o estudo objetivou-se verificar a existência de relação do polimorfismo I/D do gene da ECA e suas variantes genotípicas com a PA em quatro grupos distintos de hipertensos, e caracterizar geneticamente e epidemiologicamente as amostras investigadas. Participaram da pesquisa 112 indivíduos de ambos os gêneros arranjados nos seguintes grupos: normotenso (controle), hipertenso e não obeso, hipertenso e obeso e hipertenso e com Diabetes *Mellitus* tipo II. Foram colhidos dados de caráter epidemiológico, e coletado sangue periférico dos participantes para posterior extração de DNA e amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase com *primers* específicos para o polimorfismo I/D. As frequências alélicas (D=0,5446; I=0, 4554) e genotípicas (DD=0,2411; ID=0,6071; II=0,1518) apresentaram baixa diferenciação genética ($F_{st} < 0,05$), e estavam fora Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$). Entre os grupos não houve diferença significativa (qui-quadrado= 4,4339065; $p = 0,61748$). Não houve associação do alelo D com a HAS, os dados obtidos reforçam que interferências ambientais são prevalentes na evolução do quadro de HAS.

Palavras-chave: Hipertensão arterial sistêmica, gene da ECA, polimorfismo I/D.

Abstract

The arterial hypertension is a multifactorial clinical condition characterized by high and sustained levels of blood pressure (BP). In Brazil in the last 30 years there has been a large increase in the prevalence of diseases and deaths due to chronic diseases including cardiovascular disease and diabetes mellitus. Recent studies that relate gene variants of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene, increase the risk of hypertension. These variations are the result of polymorphic modifications of structural and regulatory genes that may alter many metabolic functions. Thus, it becomes necessary studies aimed at investigating the relationship of the polymorphism in intron 16 of the ACE gene with hypertension in order to elucidate its action against this disease and help with early diagnosis and treatment. With the study aimed to verify the existence of relationship between I/D polymorphism of the ACE gene and genotypic variants with BP in four distinct groups of hypertensive and characterize genetically and epidemiologically investigated samples. Participants were 112 individuals of both gender arranged in the following groups: normotensive (control), hypertensive and non-obese, hypertensive and obese and hypertensive and with type II diabetes mellitus. We collected data from epidemiologic, and peripheral blood collected from participants for subsequent DNA extraction and amplification by Polymerase Chain Reaction with specific primers for polymorphism I/D. The allele frequencies (D = 0.5446, I = 0, 4554) and genotypic (DD = 0.2411; ID = 0.6071; II = 0.1518) showed low genetic differentiation ($F_{st} < 0.05$), and were out of Equilibrium of *Hardy-Weinberg* ($p < 0.05$). Among the groups there was no significant difference ($\chi^2 = 4.4339065$, $p = 0.61748$). There was no association of the D allele with hypertension, the data supports that are prevalent in environmental interference evolution of the HBP.

Keywords: Arterial hypertension, ACE gene, I/D polymorphism.

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Nos últimos 30 anos houve um grande aumento no predomínio das doenças e mortes devido a doenças crônicas não

transmissíveis entre elas as doenças cardiovasculares e o diabetes *mellitus* (Ministério da Saúde, 2012), sendo importante o estudo da HAS.

O sistema renina-angiotensina (SRA) exerce papel importante no controle da pressão arterial (PA) (Guyton e Hall, 2011), sendo que muitos genes componentes deste sistema atualmente são alvos de estudos, pela implicação na regulação da PA (Lee *et al.*, 1993). A ECA é um componente chave do sistema renina-angiotensina, que contribui para a regulação da PA (Jeunemaitre *et al.*, 1992). Essa enzima desempenha papel importante na produção de angiotensina II e no catabolismo da bradicinina, esta envolvida na modulação do tônus vascular e na proliferação de células musculares lisas vasculares (Cambien *et al.*, 1992).

O gene da ECA tem sua atividade regulada geneticamente pelo polimorfismo de inserção e/ ou deleção (I/D) de uma sequência *ALU* de 278 pb descrita no íntron 16. (Lindpaintner *et al.*, 1995), próximo a extremidade 3' do íntron (Rigat *et al.*, 1990). Essa variação polimórfica I/D produz três genótipos possíveis: II, ID e DD (Rigat *et al.*, 1990). Indivíduos com genótipo DD apresentam níveis plasmáticos aumentados de enzima conversora de angiotensina quando comparados com o genótipo II, atribuindo ao polimorfismo I/D a regulação da quantidade circulante da enzima (Cambien *et al.*, 1992). Estas alterações fisiológicas favorecem o surgimento da hipertensão quando o alelo/genótipos são desfavoráveis, constituindo um fator de risco clínico específico para o desenvolvimento de hipertensão (Freitas *et al.*, 2007). Porém, outros estudos afirmam que o polimorfismo não contribui para a HAS não tendo qualquer influência no nível de PA e homeostase (Mondorf *et al.*, 1998).

Este artigo objetivou verificar a existência de relação do polimorfismo I/D do gene da ECA e suas variantes genótípicas com a PA, salvaguardando as classes obeso, não obeso e Diabetes *Mellitus* tipo II.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no município de Pinhão-PR em três unidades de Saúde, em duas etapas. Na primeira foi realizada a coleta de dados antropométricos (IMC, cintura abdominal), de medicações em uso, PA e dados de exames laboratoriais recentes de rotina (colesterol total, triglicerídeos e glicose de jejum). Na segunda etapa foi realizada a coleta de sangue periférico por paciente. No total participaram do estudo 112 indivíduos de ambos os gêneros, com mais de cinquenta anos e em uso de três medicações ou mais para controle da PA. Estes foram

classificados em quatro grupos, sendo três de hipertensos em diferentes classes como não-obeso, obeso e com Diabetes *Mellitus* tipo II, e um grupo controle negativo classificado como normotenso.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - COEP da Universidade Estadual de Ponta Grossa, conforme resolução CNS 196/96 com o protocolo de pesquisa nº 13664/11 e parecer 47/2012) e informados do teor da pesquisa.

As amostras de DNA foram extraídas de linfócitos do sangue periférico, com o uso de kit comercial para extração do DNA (Purelink Invitrogen®) segundo instruções do fabricante. A genotipagem do polimorfismo I/D do gene ECA de cada indivíduo, foi realizada por reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), seguido de eletroforese em gel de agarose.

Os oligonucleotídeos utilizados nesta análise foram obtidos de acordo com Lindpaintner *et al.* (1995), e apresentaram as seguintes sequências ACE 1F: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT3' e ACE 1R: 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 15 µL seguindo-se as condições: 1,5 µL de tampão de reação (1X) (contendo 200mM de Tris, pH 8,4 e 500mM de KCL); 0,25 µL de *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL) (Invitrogen®); 1µL de MgCl₂ (50mM); 1µL de dNTP (2mM)(Ludwig Biotec®); 0,6µL de *primer forward* e 0,6µL de *reverse* (10mM)(Ludwig Biotec®), e 20 ng/µL do DNA genômico obtido dos participantes do estudo. As reações de polimerização foram realizadas em um termociclador (Biocycler®), sob o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C; 5 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C e 45 segundos a 72 °C; seguidos por 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 45 segundos a 72 °C; finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da amplificação dos fragmentos de DNA e coradas com GelRed (Biotium®).

Para a análise em genética de populações foi utilizado o programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*) (Miller, 1997), a fim de verificar as frequências alélicas e genotípicas, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o padrão de diferenciação genética entre os grupos, com a estatística F e distâncias de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983). As frequências genotípicas foram comparadas entre os

grupos pelo teste de qui-quadrado de Pearson com 5% de significância, através do programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc, 2001). Para os demais dados de PA, sedentarismo ou não, tabagista ou não, exames laboratoriais, história familiar de HAS, IMC, cintura abdominal, foi realizada análise multivariada por Manova utilizando os testes de Wilks, Pillai's, Hotelling e Roy's, e o teste *a posteriori* de Tukey com 5% de significância, pelo programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc, 2001).

Resultados

Os dados epidemiológicos divididos por grupo estão descritos na tabela 1, com a média e desvio padrão para as variáveis quantitativas e em porcentagem simples para as variáveis qualitativas.

Tabela 1. Dados epidemiológicos

	Grupo 1 normotenso	Grupo 2 HAS+NO	Grupo 3 HAS+O	Grupo 4 HAS+DM2
	n: 29	n: 30	n: 24	n:29
Idade	59,14 (±5,92)	63,43(±8,89)	64,17(±9,34)	65,17(±8,81)
PAS	118,62(±13,55)	135,3(±15,25)	134,17(±13,81)	139,66(±24,57)
PAD	78,45 (±8,77)	86,33(±9,99)	84,17(±9,29)	86,55(±12,89)
IMC	28,13(±4,75)	26,75(±2,51)	34,05(±4,75)	30,56(±5,33)
C.A	93,14(±12,10)	92(±8,34)	109,50(±13,54)	102,66(±10,10)
Colest. T	190,45(±48,69)	188,26(±49,93)	186,88(±35,71)	148,38(±41,41)
Triglicerídeos	141,55(±74,10)	142,4(±90,90)	155,58(±53,34)	201,62(±132,73)
Glicose j	90,14(±9,50)	89,23(±12,31)	90,58(±13,23)	141,03(±44,43)
Sedentarismo	58,6%	20,0%	83,3%	63,3%
Tabagismo	24,1%	23,3%	20,8%	23,3%
His. f. HAS	65,5%	80,0%	79,1%	80,0%

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; **NO:** não obeso; **O:** obeso; **DM2:** diabetes mellitus tipo 2; **PAS:** pressão arterial sistólica; **PAD:** pressão arterial diastólica; **IMC:** índice de massa corporal; **C.A:** cintura abdominal; **Colest. T:** colesterol total; **Glicose J:** glicose de jejum; **His. f. HAS:** história familiar de HAS.

Análise Multivariada (MANOVA)

Os resultados podem ser verificados na tabela 2, sendo que não obtiveram diferenças significativas para as variáveis polimorfismo I/D, tabagismo e história familiar de HAS.

Tabela 2. Testes de Wilks, Pillai's, Hotteling e Roy's, para verificar a significância entre as variáveis.

	C.A	Colesterol total	Triglicerídeos	Glicose jejum	PAS	PAD
Grupos (4)	+	+	+	+	+	+
Gênero	+	+	+	+	+	+
Idade	+	+	+	+	+	+
Sedentarismo	+	+	+	+	+	+
IMC	+	+	+	+	+	+
Polimorfismo I/D	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Tabagismo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
História familiar de HAS	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

C.A: cintura abdominal, **PAS:** pressão arterial sistólica, **PAD:** pressão arterial diastólica, **n.s:** valor não significativo, **+**: valor apresentado foi significativo ($<0,05$).

Posteriormente, o teste de Tukey foi aplicado, com 95% de confiança ($<0,05$), para verificar as diferenças estatísticas de cada variável categórica com as variáveis dependentes.

Para os quatro grupos os resultados foram significantes para cintura abdominal, entre os grupos normotenso com HAS e obeso, grupo normotenso com HAS e DM2, e entre o grupo HAS e não obeso com o grupo HAS e obeso e HAS e DM2. Quanto ao colesterol total os grupos normotenso, HAS e não obeso, HAS e obeso tiveram significância em relação ao grupo HAS e DM2. Os grupos quando comparados aos valores de triglicerídeos não tiveram diferença significativa. Quanto a glicose de jejum os grupos normotenso, HAS e não obeso, HAS e obeso tiveram diferença significativa em relação ao grupo HAS e DM2. Quanto a PAS o grupo normotenso teve diferença significativa com os outros três grupos. E quanto a PAD houve diferença entre o grupo normotenso e os grupos HAS e obeso, e HAS e DM2. Todos os dados podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3. Teste de Tukey para os grupos e as variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.

C.A	Normotenso	HAS+NO	HAS+O	HAS+DM2
Normotenso		0,979006	0,000140	0,007635
HAS e Não Obeso	0,979006		0,000138	0,001990
HAS e Obeso	0,000140	0,000138		0,118112
Diabetes e HAS	0,007635	0,001990	0,118112	
Colesterol total				
Normotenso		0,997714	0,991547	0,002901
HAS e Não Obeso	0,997714		0,999541	0,004778
HAS e Obeso	0,991547	0,999541		0,012191
Diabetes e HAS	0,002901	0,004778	0,012191	
Triglicerídeos				
Normotenso		0,999980	0,610200	0,124889
HAS e Não Obeso	0,999980		0,580077	0,109875
HAS e Obeso	0,610200	0,580077		0,814001
Diabetes e HAS	0,124889	0,109875	0,814001	
Glicose Jejum				
Normotenso		0,993552	1,000000	0,000138
HAS e Não Obeso	0,993552		0,994954	0,000138
HAS e Obeso	1,000000	0,994954		0,000138
Diabetes e HAS	0,000138	0,000138	0,000138	
PAS				
Normotenso		0,000974	0,003893	0,000197
HAS e Não Obeso	0,000974		0,996745	0,891478
HAS e Obeso	0,003893	0,996745		0,813685
Diabetes e HAS	0,000197	0,891478	0,813685	
PAD				
Normotenso		0,019232	0,177632	0,016447
HAS e Não Obeso	0,019232		0,872882	0,999838
HAS e Obeso	0,177632	0,872882		0,840821
Diabetes e HAS	0,016447	0,999838	0,840821	

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; **NO:** não obeso; **O:** obeso; **DM2:** diabetes mellitus tipo 2.

Os valores em negrito indicam as diferenças significativas.

Entre os gêneros, houve diferença significativa apenas quanto ao colesterol total, sendo o valor maior em relação ao sexo feminino, conforme tabela 4.

Tabela 4. Teste de Tukey quanto ao gênero e às variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose de jejum, PAS e PAD.

C.A	F	M
F		0,249780
M	0,249780	
Colesterol total		
F		0,002493
M	0,002493	
Triglicerídeos		
F		0,584581
M	0,584581	
Glicose Jejum		
F		0,732201
M	0,732201	
PAS		
F		0,564972
M	0,564972	
PAD		
F		0,653770
M	0,653770	

Os valores em negrito indicam diferenças significativas

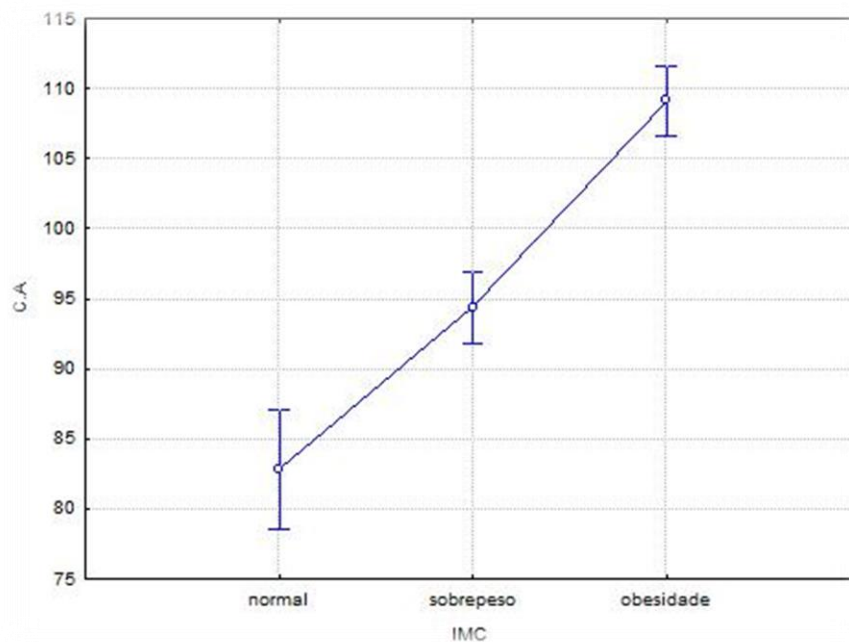
Quanto à idade houve significância quanto ao valor de triglicerídeos entre 60-69 e 70-79 anos, e quanto à PAD entre 70-79 e 80-82 anos, conforme tabela 5.

Tabela 5. Teste de Tukey quanto à idade e às variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.

C.A	50-59	60-69	70-79	80-82
50-59		0,990030	0,995848	0,576883
60-69	0,990030		0,999997	0,658405
70-79	0,995848	0,999997		0,681287
80-82	0,576883	0,658405	0,681287	
Colesterol total				
50-59		0,566577	0,050446	0,262158
60-69	0,566577		0,419890	0,565605
70-79	0,050446	0,419890		0,960444
80-82	0,262158	0,565605	0,960444	
Triglicerídeos				
50-59		0,198305	0,421435	0,998004
60-69	0,198305		0,012579	0,752900
70-79	0,421435	0,012579		0,940501
80-82	0,998004	0,752900	0,940501	
Glicose Jejum				
50-59		0,748555	0,999991	0,978244
60-69	0,748555		0,865792	0,999999
70-79	0,999991	0,865792		0,982924
80-82	0,978244	0,999999	0,982924	
PAS				
50-59		0,055033	0,986577	0,070455
60-69	0,055033		0,313773	0,496648
70-79	0,986577	0,313773		0,130265
80-82	0,070455	0,496648	0,130265	
PAD				
50-59		0,658540	0,572367	0,140434
60-69	0,658540		0,130284	0,337029
70-79	0,572367	0,130284		0,040498
80-82	0,140434	0,337029	0,040498	

Os valores em negrito indicam diferenças significativas.

Em relação ao polimorfismo I/D não foram encontrados valores significantes para os genótipos II, ID e DD, o mesmo para tabagismo e história familiar de HAS. Quanto ao IMC foi encontrada relação significativa entre o da cintura abdominal e todas as classes de IMC (gráfico 1), quanto aos triglicerídeos foi significativo entre os grupos normal e sobrepeso, normal e obesidade, e em relação à PAS houve diferença entre os indivíduos normais e obesos, sendo valores maiores para obesidade (tabela 6).

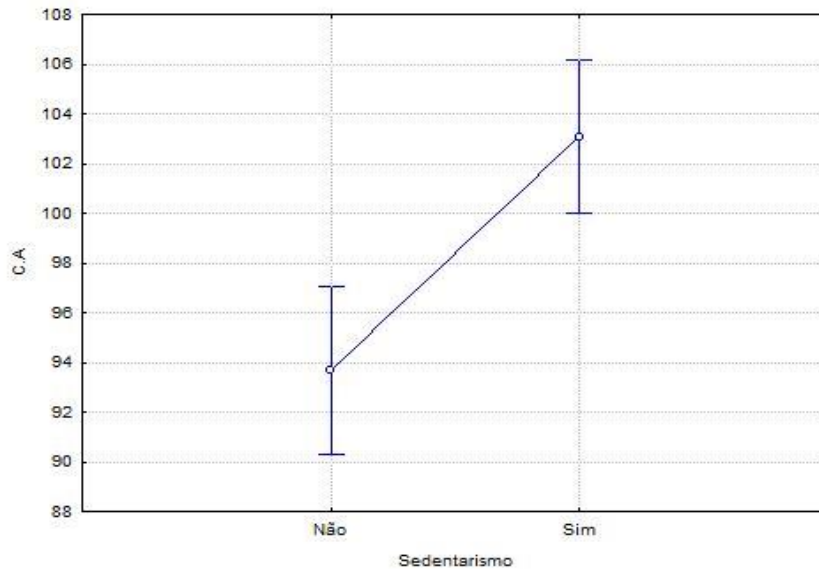
Figura 1. Gráfico cintura abdominal x IMC**Tabela 6.** Teste de Tukey quanto ao IMC e às variáveis C.A, colesterol total, triglicerídeos, glicose jejum, PAS e PAD.

C.A	Normal	Sobrepeso	Obesidade
Normal		0,000138	0,000114
Sobrepeso	0,000138		0,000114
Obesidade	0,000114	0,000114	
Colesterol total			
Normal		0,711409	0,760688
Sobrepeso	0,711409		0,993417
Obesidade	0,760688	0,993417	
Triglicerídeos			
Normal		0,001333	0,000145
Sobrepeso	0,001333		0,378305
Obesidade	0,000145	0,378305	
Glicose jejum			
Normal		0,412460	0,667112
Sobrepeso	0,412460		0,837278
Obesidade	0,667112	0,837278	
PAS			
Normal		0,281706	0,014512
Sobrepeso	0,281706		0,165675
Obesidade	0,014512	0,165675	
PAD			
Normal		0,641368	0,243000
Sobrepeso	0,641368		0,583753
Obesidade	0,243000	0,583753	

Os valores em negrito indicam diferenças significativas.

Quanto ao sedentarismo foi significativo o aumento da cintura abdominal em relação àqueles que não praticavam nenhuma atividade física (Gráfico 2).

Figura 2. Gráfico Sedentarismo x C.A



Análise em genética de populações pelo programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*)

O gene da ECA para o polimorfismo I/D foi amplificado com eficiência conforme descrito por Lindpaintner *et al.*(1995) e seus genótipos identificados, conforme figura 3. Os genótipos foram tabulados em grupos conforme tabela 7.

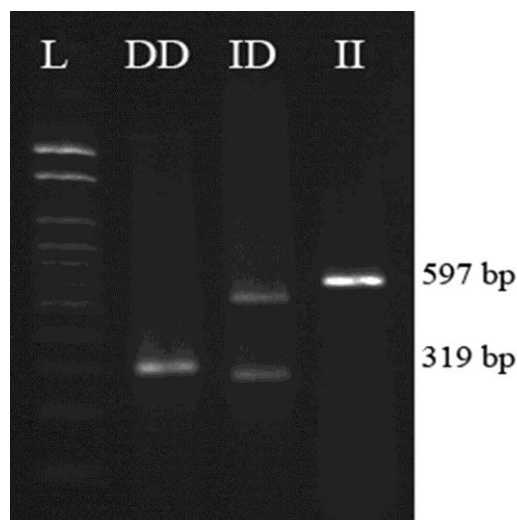


Figura 3. Caracterização genotípica do polimorfismo I/D para o gene da ECA. **L:** marcador de peso molecular, **DD** deleção/deleção, **ID** inserção/deleção, **II** inserção/inserção alelo **D** 319bp, alelo **I** 597bp.

Tabela 7. Classificação genotípica e gênero entre os grupos: grupo 1 normotenso, grupo 2 hipertenso (HAS) e não obeso, grupo 3 hipertenso e obeso, e grupo 4 hipertenso e com diabetes *mellitus* tipo 2.

Grupo 1 Normotenso		Grupo 2 HAS+NO		Grupo 3 HAS+O		Grupo 4 HAS+DM2	
Genótipo	Sexo	Genótipo	Sexo	Genótipo	Sexo	Genótipo	Sexo
DD= 8	F=15	DD=7	F=16	DD=7	F=15	DD=5	F=15
ID=17	M=14	ID=21	M=14	ID=12	M=9	ID=18	M=14
II=4		II=2		II=2		II=6	
n=29		n=30		n=24		n=29	

Genótipos: deleção/deleção **DD**, inserção/deleção **ID**, inserção/inserção **II**; **M**: sexo masculino, **F**: sexo feminino; **n**: número de indivíduos por grupo.

As frequências alélicas/gênicas e genotípicas para o polimorfismo I/D da ECA, considerando os 112 indivíduos podem ser verificadas na tabela 8, sendo que as frequências genotípicas estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p < 0,05$).

Tabela 8. Frequências gênicas (D, I) e genotípicas (DD, ID, II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA quando verificado na população dos indivíduos (112) e p valor.

Alelo/Genótipo	Frequência
Freq D	0,5446
Freq I	0,4554
Freq DD	0,2411
Freq ID	0,6071
Freq II	0,1518
P valor	0, 0245

As frequências gênicas e genotípicas foram obtidas considerando o agrupamento da população em quatro classes, como indicado na tabela 9. As classes que estão em EHW foram os grupos 1, 3 e 4, enquanto o grupo 2 está fora do EHW. A comparação das frequências entre o grupos foi analisada pelo teste de qui-quadrado de Pearson que determina a significância das diferenças encontradas entre os grupos comparados, e este evidenciou que não existe diferença significativa entre eles (qui-quadrado= 4,4339065; $p = 0,61748$).

Tabela 9. Frequências gênicas (D, I) e genótípicas (DD, ID, II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA e p valor em todos os indivíduos analisados por grupos sendo grupo 1 normotenso, grupo 2 hipertenso e não obeso, grupo 3 hipertenso e obeso e grupo 4 hipertenso e com diabetes *mellitus* tipo II.

Alelo/Genótipo	Grupo 1 Normotenso	Grupo 2 HAS e não obeso	Grupo 3 HAS e obeso	Grupo 4 HAS e DM2
Freq D	0,5690	0,5833	0,5417	0,4828
Freq I	0,4310	0,4167	0,4583	0,5172
Freq DD	0,2759	0,2333	0,2917	0,1724
Freq ID	0,5862	0,7000	0,5000	0,6207
Freq II	0,1379	0,0667	0,2083	0,2069
P valor	0,4442	0,0276	1,0000	0,2771

A análise de diferenciação genética (estatística F) foi baixa ($F_{st} < 0,05$). Como medida de distância genética entre os pares das populações foi utilizada a distância de Reynolds *et al.* (1983), onde a maior distância encontrada foi entre o grupo HAS e não obeso e HAS e DM2 (0,0032), e a menor foi entre o grupo normotenso e HAS e obeso (-0,0177).

Discussão

Os níveis plasmáticos da ECA em humanos estão relacionados ao polimorfismo I/D do gene, situado no cromossomo 17, sendo que os portadores do genótipo DD para o gene ECA possuem níveis plasmáticos maiores de ECA quando comparados aos genótipos II e ID (Fonseca e Izar, 2004), e maior atividade plasmática da enzima também em genótipo DD (Lindpaintner *et al.*, 1995).

O polimorfismo I/D do gene da ECA na região do íntron 16 é atribuído a um fenômeno conhecido como desequilíbrio de ligação (Keavnei, 2002b), o qual descreve o grau de associação não aleatória entre dois alelos em dois locos diferentes do mesmo cromossomo (Pasternak, 2007). Em caso extremo, um alelo encontrado no loco é um perfeito preditor do alelo que será encontrado no loco vizinho (Keavnei, 2002b). O desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes é originado de desequilíbrio gamético de ligação decorrente, e atribuído à ligação física entre os locos, pela redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo (Weir, 1996; Coelho, 2000 apud Carneiro e Vieira, 2002). É pouco provável, mas não impossível

que o polimorfismo intrônico I/D seja uma mutação, com isso pode sim existir o desequilíbrio de ligação com uma suposta mutação patogênica em outras regiões do gene da ECA e servir como um marcador genético útil (Lindpaintner *et al.*, 1995).

O polimorfismo I/D do gene da ECA tem sido associado à hipertensão arterial sistêmica (Freitas *et al.*, 2007), aterosclerose (Prasad *et al.*, 2000), doença arterial coronariana como o infarto agudo do miocárdio (Cambien *et al.*, 1992), pois associa-se a presença do alelo D com aumento da vasoconstrição vascular (Prasad *et al.*, 2000), e com níveis mais elevados de ECA do que o alelo I no plasma e nos tecidos (Montgomery *et al.*, 2002b). Porém, outras investigações não tem verificado esta associação com a ocorrência de doenças arteriais coronárias (Lindpaintner *et al.*, 1995), acidente vascular encefálico (Dikmen *et al.*, 2006), trombose venosa profunda e tromboembolismo (Munhoz *et al.*, 2005) e hipertensão arterial sistêmica (Jeunemaitre *et al.*, 1992).

O número de hipertensos no Brasil tem aumentado consideravelmente segundo o Ministério da Saúde (2012), isto se deve ao estilo de vida pela alta ingestão de sal, sedentarismo e alimentação não saudável. Além disso, segundo Young (2007) a HAS é um produto, em parte, da história evolutiva dos humanos, pois a adaptação ao clima, primeiro na África e depois no resto do mundo, tem impulsionado a evolução e a frequência de HAS. Sugere-se no mesmo estudo que populações de ambientes quentes e úmidos possuem mais suscetibilidade de apresentar HAS do que indivíduos que moram em regiões frias, pela retenção de sal e água ser mais favorável.

A obesidade e a cintura abdominal foram fatores prevalentes e que contribuíram ao quadro de HAS neste estudo, com valores aumentados nos grupos HAS e obeso e HAS e DM2, relacionado a valores aumentados de IMC e sedentarismo. O colesterol total foi prevalente no grupo HAS e DM2 e maior no sexo feminino. Valores aumentados de triglicerídeos foram encontrados na idade entre 60-69 e em indivíduos obesos. Valores aumentados de PAS foram mais evidentes nos 3 grupos com HAS e em indivíduos com obesidade, e a PAD em indivíduos com idade maior de 80 anos e nos grupos HAS e não obeso e HAS e DM2. Esses dados corroboram a hipótese de que pessoas com HAS e DM2 apresentam risco aumentado de desenvolver Diabetes *Mellitus* e dislipidemia (Carneiro *et al.* 2003). No estudo de Narne *et al.* (2012), verificou-se a relação entre o alelo D com a ocorrência de IAM e aterosclerose em indivíduos com DM2, favorecido também pela

hipercolesterolemia que apresenta papel central na evolução de aterosclerose em pacientes com DM2, e a hipertrigliceridemia que eleva os níveis do inibidor de plasminogênio e diminui a atividade fibrinolítica, fator este reconhecido como causador de disfunção endotelial.

Os pacientes hipertensos podem ser classificados com hipertensão sistólica isolada, hipertensão diastólica isolada, ou hipertensão sistólica-diastólica. A hipertensão diastólica pode ser considerada um subgrupo de hipertensão essencial, pois estudos associam o aumento da pressão arterial diastólica (PAD) com genótipo DD (Jiménez *et al.*, 2007). Na amostra analisada verificou-se associação da PAD com a idade avançada, mais de 80 anos, e nos grupos hipertenso e não obeso e hipertenso e com diabetes, mas não com relação ao genótipo.

Fatores hereditários, em combinação com fatores de risco ambientais, são determinantes importantes da instalação da HAS. Não houve relação do polimorfismo I/D do gene da ECA com a HAS, pois as diferenças genótípicas entre os quatro grupos verificados não foi significativa, e a história familiar de HAS também não se encontrou associada, sendo os fatores ambientais os que mais contribuíram para o desenvolvimento da HAS na amostra analisada. Porém não se descarta a possibilidade do fator genético estar envolvido, pois outros genes envolvidos no sistema renina-angiotensina-aldosterona podem contribuir na instalação da HAS, e outras variáveis poderiam ser avaliadas em estudos clínicos como a hipertrofia ventricular esquerda. Na análise de Montgomery *et al.* (2002) foi avaliada a relação entre o polimorfismo I/D da ECA e o crescimento do ventrículo esquerdo (VE) apenas em indivíduos com genótipos homozigotos II e DD, submetidos a 10 semanas de atividade física. Aqueles com genótipo DD obtiveram uma maior resposta hipertrófica do que os de II genótipo, variável esta importante em patologias como a HAS e insuficiência cardíaca.

Além disso, há outros caminhos não dependentes de ECA para se gerar ANG II (Lindpaintner *et al.*, 1995), com isso estas formas também deveriam ser investigadas com relação à instalação de HAS.

Na população de hipertensos e normotensos estudados as frequências genótípicas estão fora do EHW, mas quando considerado em grupos como subpopulação, apenas o grupo 2 HAS e não obeso estava fora. O EHW, segundo Beiguelman (2008), só é mantido na população se nela não estiverem atuando os fatores evolutivos como mutação, seleção natural, deriva genética, fluxo gênico de

populações migrantes e endogamia. Como a frequência genótipica para heterozigoto no grupo HAS e não obeso foi de 0,700, este efeito pode ser atribuído a uma seleção a favor do heterozigoto, ou à deriva aleatória pelo tamanho pequeno da população. Não foi observada estruturação genética (F_{st}) na amostra total, com isso não houve associação das classes genotípicas com os quatro grupos.

Em um estudo realizado na população brasileira por Inácio *et al.* (2004) com 210 pessoas, a frequência alélica para o gene da ECA foi de 0,39 e 0,61 para o alelo I e D respectivamente e frequências genotípicas de II: 0,20, ID: 0,43 e DD: 0,37. Quando verificado na região Sul do Brasil este foi de 0,35 e 0,65 para o alelo I e D respectivamente e frequências genotípicas de II: 0,22, ID: 0,24 e DD: 0,54 diferente da população brasileira em geral, com aumento do genótipo homozigoto DD e diminuição do heterozigoto. Os achados foram atribuídos à diferente composição étnica da região, com o destaque de que a amostra pequena possa ter favorecido a deriva aleatória para este resultado. A população investigada no presente estudo também pertence à região Sul do Brasil, sendo composta por 112 indivíduos e obtido o valor 0,4554 para o alelo I e 0,5446 para D, e para os genótipos DD, ID e II respectivamente 0,2411, 0,6071 e 0,1518, resultados diferentes do estudo de Inácio *et al.* (2004) na região Sul, com maior frequência para o genótipo heterozigoto e não para o homozigoto DD, como seria esperado e até superado, haja vista que a amostra do presente estudo foi propositalmente tendenciosa a inclusão de pacientes triados para HAS e suas comorbidades. Contudo, os resultados aqui obtidos foram semelhantes àqueles obtidos por Inácio *et al.* (2004) quando comparado aos genótipos para a população brasileira, com maior frequência para o heterozigoto. A maior frequência de heterozigotos favorece a variabilidade genética e dilui efeitos de genes deletérios, embora oportunize o aparecimento destes em homozigoze em cruzamentos entre heterozigotos. Segundo Beiguelman (2008), a seleção em favor do heterozigoto conduz sempre a um polimorfismo equilibrado.

Com base nos dados encontrados e da literatura pode-se inferir que não é o genótipo que modula a quantidade de ECA circulante, mas hipoteticamente regula a eficiência da enzima produzida. Também sugere-se que a regulação do íntron pode favorecer a inserção da sequência *ALU* por esta situar-se logo no início do íntron 16.

Os dados obtidos no presente estudo reforçam que interferências ambientais são prevalentes na evolução do quadro de HAS e não relacionado à frequência do alelo D na população analisada.

Referências

As referências estão apresentadas no final da dissertação em Referências Bibliográficas.

5 Conclusão

Através do presente estudo procurou-se analisar a relação do polimorfismo I/D do gene da ECA com a HAS, segundo as diferentes classes de hipertensos e o grupo normotenso, porém não foi encontrada diferença estatística entre os grupos quando aplicado o teste de qui-quadrado de Pearson e nem associação dos genótipos com a história familiar de HAS. Mas, quanto aos fatores ambientes houve estreita relação principalmente com o grupo que possuía HAS e DM2, sendo com isso o grupo de maior risco cardiovascular.

5.1 Considerações finais

Quanto aos objetivos do início do trabalho o primeiro foi caracterizar geneticamente e epidemiologicamente os grupos de hipertensos com relação ao gene da ECA. Não houve diferença relevante quanto aos genótipos nos diferentes grupos na amostra analisada, em relação à epidemiologia quanto maior o IMC cintura abdominal, valores de colesterol e triglicerídeos, sedentarismo maior foi a incidência de HAS na população.

Quanto ao segundo objetivo, foi distinguir o polimorfismo estrutural e variantes genotípicas para o íntron 16 do gene da ECA, este foi alcançado com a análise das bandas por PCR e bem caracterizado para cada genótipo.

O terceiro foi verificar as frequências genotípicas para DD, ID e II, e frequência gênica para os alelos D e I. As frequências genotípicas não se encontravam em EHW, o que sugere que fatores evolutivos estão atuando nesta amostra, no caso os ambientais.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados com o polimorfismo I/D do gene da ECA, associados com outros genes envolvidos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, com análise de múltiplos marcadores genéticos e com investigações de interações epistáticas, com análises estatísticas bem estruturadas, número amostral maior. Também com seleção de amostras mais homogêneas, pois alguns estudos atribuem a heterogeneidade de amostras aos diferentes achados quanto à relação do polimorfismo I/D com doenças cardíacas.

6 Referências Bibliográficas:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME MATABÓLICA. ABESO. Diretrizes Brasileiras da Obesidade. 3ª ed. Itapeví, SP, 2009.

ALONSO, K.C. Polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina em indivíduos hipertensos do sul do Brasil. 2012, 118 f. Dissertação. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2012.

BAUDIN, B. Angiotensin I – converting enzyme gene polymorphism and drug response. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, n. 9, p. 353-356, 2000.

BEIGUELMAN, B. Genética de populações humanas. SBG, Ribeirão Preto, 2008.

BESSA, S. AVC: Governo alerta para principal causa de mortes. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/7904/162/avc:-governo-alerta-para-principal-causa-de-mortes.html>> Acesso em: 30/10/2012.

BORGES-OSÓRIO, M, R; ROBINSON, W.M. Genética Humana. 2 ed. Artmed, 2001.

BROWN, T.A. Genética: um enfoque molecular. 3 ed. Guanabara Koogan, 1999.

CAMBIEN, F; POIRIER, O; LECERF, L; EVANS, A; CAMBOU, J.P; ARVEILER, D; LUC, G; BARD, J.M; BARA, L; RICARD, S; TIRET, L; AMOUYEL, P; A-G, F; SOUBRIER, F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potente risk fator for myocardial infarction. **Nature**. v. 359, p. 641-644, Oct, 1992.

CARNEIRO, G; FARIA, A.N; RIBEIRO FILHO, F.F; GUIMARÃES, A; LERÁRIO, D; FERREIRA, S.RG; ZANELLA, M.T. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. **Rev Assoc Med Bras**. v.3,n.49, p. 306-311, 2003.

CARNEIRO, M. S; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**. v.61, n.2, p. 89-100, 2002.

DIKMEN, M; GÜNES, H.V; IDEGIRMENCI, I; ÖZDEMİR, G; BASARAN, A. Are the angiotensin-converting enzyme gene and activity risk factors for stroke?. **Arq neuropsiquiatria**. v.2, n.64, p. 211-216, 2006.

DUFOUR, C.; CASANE, D.; DENTON, D.; WICKINGS, J.; CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X. Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the renin angiotensin system. **Genomics**, v. 69, n. 1, p 14-26, 2000.

EHLERS, M.R; FOX, E.A; STRYDOM, D.J; RIORDAN, J.F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isoenzyme is identical to

the C- terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proc Natl Acad Scid.** v.86, n.20, p. 7741-7745, 1989.

FYHRQUIST, F; ERIKSSON, A; SAIJONMAA, O; NORDESTGAARD, B.G; KONTULA, K; FAIRE, U; IBSEN, H; KJELDSEN, S; OS, I; DAHLÖF, B. Telomere length is associated with ACE I/D polymorphism in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. **Jraas.** 2012 Disponível em: <<http://jra.sagepub.com/content/early/2012/10/17/1470320312460292>> Acesso em: 12 dez 2012.

FONSECA, F.A.H; IZAR, M,C,O. Polimorfismos em Genes relacionados ao Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, associação com a doença arterial coronariana e suas características anatômicas. **Arq Bras de Cardio.** v. 83. n. 5. p. 371-372, 2004.

FORD, E. B. **Polymorphism and taxonomy.** In Huxley J. The new systematics. Oxford. 1940.

FREITAS, S.R.S; CABELLO, P.H; MOURA-NETO, R.S; DOLINSKY, L.C; BÓIA, M.N. Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em um município da região Amazônica. **Arq Bras Cardio,** v.88, n.4, p. 447-451, 2007

GOSTTSCHALL, C.B.A; BUSNELLO, F.M. **Nutrição e Síndrome Metabólica.** São Paulo: Atheneu, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Tradução da 12ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HOWARD, T. E.; SHAI, S.; LANGFORD, K. G.; MARTIN, B. M.; BERNSTEIN, K. E. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. **Mol Cell Biol,** v. 10, p. 4294-4302, 1990.

HUBERT, C; HOUOT, A.M; CORVOL, P; SOUBRIER, F. Structure of the angiotensin I- converting enzyme gene: two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **J Bio Chem.** v.15, p.377-383, 1991.

INÁCIO, J; GOULART-FILHO, L.R; VIEIRA, G.S. Frequências genotípicas e alélicas do gene do polimorfismo da ECA I/D na população brasileira. **Biosci.J.** v.20, n.1, p.47-51, Jan/Abr. 2004.

JEUNEMAITRE, X; LIFTON, P.R; HUNT, S.C; WILLIAMS, R.R; LALOUEL, J-M. Absence of linkage between angiotensin enzyme locus essential hypertension. **Nature Genetics,** v.1, p. 72-75, 1992.

JIMÉNEZ, P.M; CONDE, C; CASANEGRA, A; ROMERO, C; TABARES, A.H; ORÍAS, M. Association of ACE genotype and predominantly diastolic hypertension: a preliminary study. **JRAAS.** v.42, n. 8, p. 42-44, 2007.

KEAVNEY, B.; MCKENZIE, C. A; CONNELL, J. M. C.; JULIER C.; RATCLIFFE, P. J.; SOBEL, E.; LATHROP, M.; FARRALL, M. Measured Haplotype Analysis of the

Angiotensin-I Converting Enzyme Gene. **Human Mol Genet**, v. 7, n. 11, p. 1745-1751, 1998a.

KEAVNEY, B. Genetic epidemiological studies of coronary heart disease. **International journal of epidemiology**. v. 31, p. 730-736, 2002b.

KOHNO, M; YOKOKAWA, K; MINAMI, M; YASUNARI, K; HANEHIRA, T; YOSHIKAWA J. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and regression of left ventricular hypertrophy and patients treated with angiotensin converting enzyme inhibitors. **Am J Med**. v.5, p.544-549, Mai, 1999.

LEE, M. A.; BOHM, M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 87, Supl IV, p. 7-13, 1993

LINDPAINTNER, K.; PFEFFER, M. A.; KREUTZ, R.; STAMPFER, M. J.; GRODSTEIN, F.; LAMOTTE F.; BURING, J.; HENNEKENS, C. H. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. **N Engl J Med**, v. 332, n. 11, p. 706-711, 1995.

MARTÍNEZ-RÍOS, M. A; PEÑA-DUQUE, M. A; FRAGOSO, J.M; DELGADILLO-RODRÍGUEZ, H; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N; MIRANDA-MALPICA, E; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.M; GONZÁLEZ-QUESADA, C; VARGAS-ALARCON, G. No association found between the insertion/deletion of a 287-bp alu repeat sequence within intron 16 of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) gene in Mexican patients and binary restenosis after coronary stenting. **Clinica Chimica Acta**. v.397, p. 65-67, Nov, 2008.

MENDONÇA, I; FREITAS, I.A; SOUSA, C.A; GOMES, S; FARIA, P; DRUMOND, A; SILVA, G; ARAÚJO, J.J; FREITA, S; ORNELAS, I; ANDRADE, G; COELHO, A.P; SILVA, P.M; CARDOSO, A; BREHM, A.A; REIS, P. Polimorfismo do gene da ECA e risco de doença coronária numa população portuguesa. **Rev Port Cardiol**. v. 23, n.12, p.1593-1601, 2004.

MILLER, M.P. **TFPGA – Tools For Population Genetic Analyses**, 1997, Version 1.3, <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sishiperdia. Apresentação. Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br/apresentação.asp>>. Acesso em: 20 fev 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados estatísticos no Brasil. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=36868&janela=1>. Acesso em: 08 out. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Pratique saúde contra a hipertensão arterial. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23616>. Acesso em: 14 nov 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. VIGITEL, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores de mortalidade: Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório. 2010. Disponível em:< <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defhtm.exe?idb2011/c08.def>>. Acesso em: 01 nov 2012.

MONTGOMERY, H.E; CLARKSON P; DOLLERY, C.M, PRASAD, K; LOSI, M.A; HEMINGWAY, H; STATTERS, D; JUBB, M; GIRVAIN, M; VARNAVA, A; WORLD, M; DEANFIELD, J; TALMUD, P; MCEWAN, J.R; MCKENNA, W.J; HUMPHRIES, S. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**. v. 3, p. 741-747, Ago, 1997a.

MONTGOMERY H, BRULL D, HUMPHRIES S.E. Analysis of gene-environment interactions by "stressing-the-genotype" studies: the angiotensin converting enzyme and exercise-induced left ventricular hypertrophy as an example. **Italian Heart J**. v. 3, Jan, 2002b.

MONDORF, U.F; RUSS, A; WIESEMANN, A; HERRERO, M; O, GERHARD; L, TOMAS. Contribution of Angiotensin I Converting Enzyme Gene Polymorphism and Angiotensinogen Gene Polymorphism to Blood Pressure Regulation in Essential Hypertension. **American Journal of Hypertension**. v. 11, p.174-183, Fev ,1998.

MUNHOZ, T.P; SHEIBE, R.N; SCHMITT, V.M. Angiotensin converting enzyme (ACE) DD genotype: relationship with venous thrombosis. **Rev. bras. hematol. hemoter**. v.2,n.27, p. 87-90, 2005.

NARNE, P; PONNALURI, K; SINGH, S; SIRAJ,M; ISHAQ, M. Relationship between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiographically defined coronary artery disease and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes mellitus. **JRAAS**. v.4, n.13, p. 478-486, June, 2012.

NUSSBAUM, R.L; MCINNES, R.R; WILLARD, H.F. Thompson e Thompson. *Genética Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

PASTERNAK, J.J. Introdução a Genética Molecular Humana: Mecanismos das doenças hereditárias. 2 ed. Guanabara Koogan, 2007.

PEDROSO, J.A.R; PASKULIN, D.A; DIAS, F.S; FRANÇA.E; ALHO,C.S. Análise da tendência temporal de dano agudo entre pacientes graves conforme polimorfismo I/D e -262A> T da enzima conversora de angiotensina. **J Bras Nefol.**, v. 32, n.2, p. 182-194, 2010.

PIERCE, B.A. *Genética: um enfoque conceitual*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

PRASAD, A; NARAYANAN, S; WACLAWIW, M.A; EPSTEIN, N; QUYYUMI, A.A. The Insertion/Deletion Polymorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene Determines Coronary Vascular Tone and Nitric Oxide Activity. **JACC**. v. 36, n. 5, p.1579-1586, Nov, 2000.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: bases for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105, p. 767-779, 1983.

REIS, A.F; VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. **Arq Bras Endocrinologia metab.** v.46, n.4, Ago, p.426-432, 2002.

RIGAT B, HUBERT C, ALHENC-GELAS F; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. An insertion-deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest.** v.86, p.1343-1346,1990.

RIGAT, B; HUBERT, C; CORVOL, P; SOUBRIER, F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). **Nucleic Acids Res.** v.20, n.6, p. 1433. Mar,1992.

SOWERS, J.R: Insulin resistance and hypertension. **Am J PhysiolHeart Circ Physiol.** V. 286, p.1597-1602, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. SBD. Diretrizes SBD 2007. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/educação/docs/Diretrizes_SBC_2007.pdf>. Acesso em: 11 mar 2012.

STAESSEN, J.A; WANG, J.G; GINOCCHIO, G; PETROV, V; SAAVEDRA, A.P; SOUBRIER, F; VLIETINCK, R; FAGARD, R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. **Journal of Hypertension.** v. 15,p.1579-1592, 1997.

The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. **Nature.** v. 437, p.69–87, (2005).

VALEE B, L; AULD, D.S. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry.** v.29, p.5647-59, 1990.

YANAI, H; TOMONO, Y; ITO,K; FURUTANI, N; YOSHIDA, H; TADA,N. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. **Nutrition Journal.** v.7. n.10. Apr. 2008. Disponível em: <<http://www.nutritionj.com/content/7/1/10>>. Acesso em: 20 out 2012.

YOUNG, J.H. Evolutions of blood pressure regulation in humans. **Curr Hypertens Rep.** v.9, n.1, p 13-18, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.** WHO, Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diabetes.** Agosto, 2011. Disponível em <<http://www.who.int>>. Acesso em: 26 mar 2012.

7 ANEXOS

Anexo 1: Parecer COEP



PARECER Nº 47/2012

Protocolo: 13664/11

No dia 08 de Agosto de 2012, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** a solicitação de expansão do número de pacientes a serem amostrados no protocolo de pesquisa intitulado "**Estudos de Polimorfismos genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose**" de responsabilidade da pesquisadora Viviane Nogaroto Vicari.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: Após o final da pesquisa.

Ponta Grossa, 08 de Agosto de 2012.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Universidade Estadual de Ponta Grossa****Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Av.: Gen. Carlos Cavalcanti, 4748 CEP: 84030-900 Bloco M, Sala 12

Campus Uvaranas Ponta Grossa Fone: (42) 3220.3108 e-mail: seccoep@uepg.br

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)
PESQUISA COM SERES HUMANOS

Eu, _____, original da cidade de _____, Estado _____, nascido (a) no dia/mês/ano _____, portador (a) do documento de identidade número _____ e C.P.F número _____, residente à Rua/Av. _____, número _____, complemento _____, no Bairro _____, localizado no município de _____, Estado _____, concordo com a minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Estudos de polimorfismos genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose” à realizar-se na Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob supervisão da Profa Dra. Viviane Nogaroto Vicari, contato pelo telefone (42) 3220-3739 / celular (42) 9965-6338.

Estou ciente de que o objetivo deste trabalho consiste em coletar material biológico (4 mL de sangue) que será utilizado com o intuito de desenvolver estudos genéticos e que os resultados destes trabalhos poderão ser apresentados à comunidade científica em geral, respeitando toda a informação adquirida que será tratada como confidencial pelos pesquisadores. Apenas pacientes voluntários serão incluídos como participantes deste estudo, no qual qualquer tipo de identificação pessoal será mantido sob sigilo e não constará em nenhum relatório ou publicação científica. Os procedimentos não trarão ônus nenhum aos pacientes participantes deste estudo.

....Estou ciente ainda de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento. Da mesma forma, não haverá qualquer dano e, que em caso de reclamação, ou recurso poderei entrar em contato com a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, Campus Uvaranas – UEPG, localizado na Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP: 84030-900, Bloco M, Sala 12, e-mail: seccoep@uepg.br, telefone (42) 3220-3108.

Li, portanto, este termo, fui orientado (a) quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nenhum valor econômico por minha participação.

Voluntário

Profª. Dra. Viviane Nogaroto Vicari
(Pesquisadora responsável)

Ponta Grossa, ____ de _____ de 2012.

Anexo 3: Protocolo de Extração de DNA de sangue

PROTOCOLO: EXTRAÇÃO DE DNA – KIT PURELINK INVITROGEN®)

Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar em banho a 56°C.

1. Transferir 200µL de sangue total para um tubo de reação de 1,5mL.
2. Adicionar 200µL de Tampão A de Lise e 20µL de Proteínase K. Vortexar por 5 segundos.
3. Incubar por 15 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua.
4. Adicionar 400µL de Tampão B6 de Ligação e vortexar.
5. Transferir a mistura do passo 4 para a coluna que estará em um tubo de 2mL e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 2 minutos a 13000rpm. Descartar o filtrado e o tubo.
7. Utilize um novo tubo de 2mL. Adicionar 500µL de Tampão I de Lavagem na coluna e centrifugar por 1 minuto a 13000rpm, descartar o filtrado.
8. Adicionar 800µL de Tampão II de Lavagem, centrifugar por 1 minuto a 13000rpm, descartar o filtrado.
9. Uma nova centrifugação por 4 minutos a rotação máxima deverá ser realizada para eliminar toda a solução que ficou na coluna.
10. Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5mL. Adicionar 100-200µL de Tampão de Eluição aquecido a 56°C. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto e descartar a coluna. Armazenar a amostra a -20°C.

Anexo 4: Protocolo de PCR

A reação de amplificação do DNA foi obtida utilizando-se os componentes a seguir para cada amostra de DNA no mix de reação contendo: As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 15 μ L seguindo-se as condições: 1,5 μ L de tampão de reação (1X) (contendo 200mM de Tris, pH 8,4 e 500mM de KCL); 0,25 μ L de *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) (Invitrogen®); 1 μ L de MgCl₂ (50mM); 1 μ L de dNTP (2mM)(Ludwig Biotec®); 0,6 μ L de *primer forward* e 0,6 μ L de *reverse* (10mM)(Ludwig Biotec®), e 20 ng/ μ L do DNA genômico obtido dos participantes do estudo. As reações de polimerização foram realizadas em um termociclador (Biocycler®), sob o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C; 5 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C e 45 segundos a 72 °C; seguidos por 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 45 segundos a 72 °C; finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, para verificação da amplificação dos fragmentos de DNA, por 1 hora a 100 v. Ao DNA, com 5 μ L, bem como ao marcador de peso molecular (*Low Ranger* 100 bp DNA Ladder, marca: Norgen Biotek®) foi adicionado o corante fluorescente para ácidos nucleicos GelRed (Biotium®) 3 μ L, para visualização das amostras sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador e 3 μ L de azul de bromo. Os géis foram documentados em fotodocumentador MF CHEMIBIS (DNR Bio Imaging Systems Ltd®). Protocolo este adaptado de Alonso (2012).