

Análise Combinada de Fatores Genéticos e Ambientais na Hipertensão Essencial em um Município da Região Amazônica

Combined Analysis of Genetic and Environmental Factors on Essential Hypertension in a Brazilian Rural Population in the Amazon Region

Silvia Regina Sampaio Freitas, Pedro Hernan Cabello, Rodrigo Soares Moura-Neto, Luciana Cresta Dolinsky, Marcio Neves Bóia

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Instituto de Biologia – UFRJ, Instituto de Biociências – UNIGRANRIO - Rio de Janeiro, RJ

Resumo

Objetivo: Este estudo avaliou a contribuição de seis polimorfismos genéticos presentes em genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e fatores de risco clínicos para o desenvolvimento da hipertensão arterial essencial em um município da região Amazônica.

Métodos: Oitenta e dois indivíduos hipertensos e setenta e oito indivíduos normotensos foram genotipados quanto à presença de polimorfismos REN-G1051A (renina), AGT-M235T (angiotensinogênio), ECA-Alu I/D (enzima conversora de angiotensina I), AGTR1-A1166C (receptor tipo 1 da angiotensina II) e CYP11B2-C344T (aldosterona sintetase) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com análise de restrição quando necessário. A influência de polimorfismos genéticos e fatores de risco clínicos na variação da pressão arterial foi avaliada por meio de regressão linear *stepwise*.

Resultados: Relatamos a co-ocorrência de fatores de risco clínicos e polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) na população de um município da região amazônica. Nossos resultados mostram que a elevação da pressão arterial sistólica é favorecida pelo alelo D do polimorfismo de inserção/deleção do gene da ECA e pelo aumento da idade, enquanto consumo de bebida alcoólica e envelhecimento estão associados ao aumento da pressão arterial diastólica (PAD).

Conclusão: Esses achados indicam que os moradores de Santa Isabel do Rio Negro que possuem o alelo D da ECA ou têm o hábito de beber apresentam valores mais elevados de PAS e PAD, respectivamente, com o passar dos anos.

Palavras-chave: Polimorfismo, hipertensão essencial, riscos ambientais, genética.

Summary

Objective: In the present study, we evaluated the contribution of six genetic polymorphisms of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system (RAAS) and clinical risk factors in the development of essential hypertension in a Brazilian rural population in the Amazon region.

Methods: Eighty-two hypertensive patients and seventy-eight normotensive individuals were evaluated. Genotyping for renin (REN G1051A), angiotensinogen (AGT) M235T, insertion/deletion of angiotensin-converting enzyme (ACE I/D), angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) A1166C and aldosterone synthase (CYP11B2) C344T polymorphisms were performed using polymerase chain reaction, with further restriction analysis when required. The influence of genetic polymorphisms and clinical risk factors on blood pressure variation was assessed by stepwise linear regression.

Results: We report the co-occurrence of clinical risk factors and angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism in a Brazilian rural population in the Amazon region. Our results indicate that increase of systolic blood pressure (SBP) is favored by ACE I/D- D allele and advanced age, while alcohol consumption and aging are associated with high diastolic blood pressure (DBP).

Conclusion: These findings suggest that in the Santa Isabel do Rio Negro population, the residents that carry ACE-D allele or have an alcohol consumption habit present higher values of SBP and DBP, respectively, with the passing of years.

Key words: Polymorphisms, essential hypertension, environmental risks, genetic.

Introdução

Hipertensão essencial (HE) é uma doença multifatorial desencadeada pela associação de diversos fatores genéticos e ambientais. Estudos epidemiológicos indicaram que variantes

genéticas, inclusive variantes dos genes do angiotensinogênio (AGT)¹, da renina (REN)², da enzima conversora de angiotensina (ACE)³, do receptor tipo 1 da angiotensina II (AGTR1)^{4,5} e da aldosterona sintetase (CYP11B2)⁶, aumentam o risco de hipertensão essencial. Entretanto, a influência de formas polimórficas desses genes apresentou resultados conflitantes em diferentes populações^{7,8}. Talvez esse cenário seja um reflexo do impacto variável da herança genética das populações e da interação de fatores ambientais, que podem estar modulando

Correspondência: Silvia Regina Sampaio Freitas •
Avenida Adhemar Bebiano, 4800 Bl 07 apto 508 – 20766-721 – Rio de Janeiro, RJ – E-mail: sroig@ioc.fiocruz.br
Artigo recebido em 08/05/06; revisado recebido em 19/06/06; aceito em 03/07/06.

esses antecedentes moleculares. Dados recentes publicados na literatura mostraram que a presença isolada do genótipo/alelo desfavorável pode indicar uma associação pequena ou não-significante com HE. Contudo, a co-ocorrência de diferentes genótipos desfavoráveis e fatores de risco clínicos podem aumentar o risco de hipertensão. Os dados indicam que os fatores de risco ambientais mais importantes são idade avançada, ingestão de álcool, tabagismo e massa corporal. A associação desses fatores com um genótipo desfavorável, como ECA-DD e metilenetetraidrofolato redutase (MTHFR) 677-TT, pode aumentar substancialmente o risco de HE, comparado com pacientes que não apresentam riscos clínicos⁹.

O objetivo deste estudo foi investigar a associação de marcadores genéticos AGT-M235T, REN-G1051A, ACE-I/D, AGTR1-A1166C e CYP11B2-C344T e fatores antropométricos comuns com hipertensão essencial em uma comunidade isolada da região amazônica.

Métodos

Santa Isabel do Rio Negro está situada no nordeste do Estado do Amazonas (0° 28' sul e 65° 32' oeste), na região do Alto Rio Negro. O município ocupa uma área de 62.846 Km² (IBGE, 2003), 90% coberta pela Floresta Amazônica. A maior parte dos 10.561 habitantes de Santa Isabel do Rio Negro é descendente de índios. Destes, 4.220 moram na cidade e 6.341 estão distribuídos em comunidades ribeirinhas do município, inclusive na reserva indígena Yanomami¹⁰.

Os indivíduos foram selecionados para este estudo por meio da Técnica da Amostragem sistemática por Conglomerados, em que a cada residência foi considerada uma unidade amostral. Cento e quinze residências foram visitadas, e de cada uma delas foi selecionado um adulto. Ao todo, 82 indivíduos foram classificados como hipertensos de acordo com os seguintes critérios: 1) pressão arterial (PA) \geq 140/90 mmHg (obtida a partir de leituras repetidas realizadas segundo diretrizes internacionais)¹¹; 2) ausência de tratamento anti-hipertensivo e 3) exclusão de formas secundárias de hipertensão. Os controles normotensos consistiram de 78 indivíduos, caracterizados por ausência de história familiar de HE ou outro transtorno cardiovascular e PA < 140/90 mmHg.

Todos os participantes foram submetidos a exame físico completo e análises laboratoriais de rotina e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os participantes foram classificados como caucasianos, negróides, indígenas descendentes ou mistos (mestiços), de acordo com um conjunto de características fenotípicas¹². Indivíduos que fumavam mais de cinco cigarros por dia há pelo menos um ano foram classificados como fumantes, e os que bebiam de 30 a 40 ml de álcool ou mais por dia foram considerados bebedores.

A genotipagem de polimorfismo I/D da ECA³, AGT M235T¹³, REN G1051A², AGTR1 A1166C⁴ e C344T⁶ foi realizada pela técnica de PCR associada à análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). O controle de qualidade para esses testes foi avaliado por meio da seleção aleatória de amostras de grupos de indivíduos hipertensos e normotensos para nova genotipagem.

Os dados clínicos e antropométricos foram comparados pelo

teste *t* de Student para dados quantitativos e teste qui-quadrado (χ^2) para dados qualitativos. As frequências genotípicas foram calculadas com o programa estatístico SPSS (versão 10.1), e as frequências alélicas foram calculadas por meio da contagem direta de genes. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para a distribuição dos genótipos foi testado pelo teste χ^2 , com o auxílio do programa GENIOCI¹⁴. Realizamos também uma regressão linear stepwise (programa SPSS, versão 12.0) para explorar os efeitos dos genótipos e fatores antropométricos sobre a hipertensão. Nessa análise, as variáveis dependentes foram pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), e as variáveis independentes foram idade, índice de massa corporal (IMC), sexo (0 = feminino, 1 = masculino), tabagismo (0 = não-fumante, 1 = fumante), consumo de álcool (0 = abstêmio, 1 = bebedor), diabetes melito (0 para glicemia < 100 mg/dl, 1 para outros níveis), etnia (etnia_1 [negros], etnia_2 [caucasianos], etnia_3 [indígenas descendentes]; etnia_4 [mestiços]). Foram atribuídos valores de 0 e 1 para presença ou ausência de etnia, respectivamente.

Resultados

Consumo de álcool, idade avançada e tabagismo foram mais frequentes em hipertensos do que em normotensos (Tab.1). Esses resultados são corroborados por estudos anteriores, que demonstraram que o consumo de álcool contribui para o desenvolvimento de HE ao estimular o sistema nervoso simpático e aumentar a produção de hormônios adrenocorticóides¹⁵, enquanto idade avançada e tabagismo atuam como co-fatores que, em associação com sensibilidade ao sal, consumo de álcool ou obesidade, colaboram para o surgimento dessa doença¹⁶. Diabetes melito e obesidade também são importantes fatores de risco clínicos para hipertensão, mas suas frequências não diferiram significativamente entre os grupos, mesmo em pacientes com IMC ligeiramente elevado. Além disso, o perfil de etnia observado na população amazônica (onde um grande número de indivíduos de ambos os grupos são índios ou mestiços e poucos são negróides ou caucásóides) foi bastante semelhante entre normotensos e hipertensos.

A distribuição genotípica de cada polimorfismo ficou dentro das expectativas do EHW ($p > 0,05$) nos dois grupos. As frequências alélicas de todos os polimorfismos não diferiram entre normotensos e hipertensos (Tab.2). Mas a distribuição genotípica do polimorfismo I/D do gene da ECA diferiu entre os grupos: 9,76% de hipertensos contra 5,1% de normotensos tinham genótipo ECA-DD; e 57,32% de hipertensos contra 78,2% de normotensos tinham genótipo ECA-II. Observou-se que o genótipo da ECA (DD) considerado o "pior" era ligeiramente mais frequente em hipertensos do que em normotensos. Esses alelos/genótipos desfavoráveis estão associados com alterações fisiológicas que podem levar ao desenvolvimento de hipertensão. No entanto, os resultados de estudos realizados em todo o mundo são controversos e, conseqüentemente, as frequências de genótipos da ECA variam amplamente^{7,17,18}. As frequências genotípicas de M235T, G1051A, A1166C e C344T não apresentaram nenhuma diferença em ambos os grupos ($p > 0,05$).

Para investigar quais são os polimorfismos genéticos e/ou variantes clínicas que estão associados com a alteração da PA, analisamos simultaneamente o perfil genético e clínico

Tabela 1 - Características antropométricas e clínicas

		Normotensos (n = 78)	Hipertensos (n = 82)	p*
Sexo	Feminino/masculino	47/31	49/33	Não-significante
Idade (anos)		36,26 ± 12,46	49,27 ± 18,58	< 0,05
Etnia (%)	Negróide	1.3	0.0	Não-significante
	Caucasóide	5.1	9.1	
	Indígena descendente	32.1	40.9	
	Mestiça	61.5	50.0	
Tabagismo (%)		26.9	50.0	< 0,05
Consumo de Álcool (%)		33.3	45.5	< 0,05
Diabete melito (%)		9,0	9,1	Não-significante
IMC (kg/m ²)		24,62 ± 3,69	26,07 ± 3,43	Não-significante
PAS (kg/m ²)		111,73 ± 12,05	149,37 ± 11,81	< 0,05
PAD (mmHg)		70,76 ± 8,64	92,31 ± 4,38	< 0,05

Dados apresentados como média ± erro-padrão da média. * = T-test.

de indivíduos normotensos e hipertensos. A análise de regressão linear stepwise revelou que polimorfismo I/D da ECA (alelo D) e idade avançada contribuíram para a variação da PAS ($F = 12,958$, $p = 0,000$). O alelo D está associado a um aumento de 7,8 mmHg na PAS ($b = 7,829$, $p = 0,006$), enquanto idade avançada contribui para um aumento de 0,471 mmHg na PAS por ano de idade ($b = 0,471$, $p = 0,000$). Esse polimorfismo é responsável por metade da variação nos níveis plasmáticos de ECA, produzindo uma grande variabilidade entre os indivíduos¹⁹. Observou-se que homocigotos para o alelo D exibem quase o dobro dos níveis séricos de ECA dos homocigotos para o alelo I. Mas haplótipos específicos constituídos por polimorfismos de I/D e polimorfismos nucleotídicos simples dentro do gene da ECA foram mais exatos para a determinação dos níveis plasmáticos de ECA. Segundo Keavney e cols.¹⁹, o uso de análise de haplótipos da ECA foi capaz de determinar 36% da variação fenotípica dos níveis de ECA. A despeito do comprometimento fisiológico causado pelo polimorfismo I/D da ECA, estudos recentes demonstraram que fatores de risco clínicos podem aumentar a suscetibilidade do gene da ECA. Diversos estudos demonstraram que idade avançada, alcoolismo, tabagismo e massa corporal são importantes fatores de risco para HE, sobretudo quando ocorrem simultaneamente com genótipo ECA-DD⁷. Em conformidade com os relatos publicados na literatura, nossos achados também indicam que o polimorfismo I/D do gene da ECA constitui um fator de risco clínico específico para o desenvolvimento de HE. A análise de regressão linear stepwise revelou que indivíduos que têm o alelo D apresentam um aumento de 7,8 mmHg na PAS, em comparação com os indivíduos que têm apenas o alelo I. Além do polimorfismo I/D, o envelhecimento também contribui para os efeitos desfavoráveis do alelo D, acarretando um aumento progressivo da PAS. Em vista dos nossos achados, acreditamos que essa grande variação da PAS pode ser, em parte, determinada por predisposição genética (alelo ECA-D) e idade avançada. Portanto, um

genótipo desfavorável associado a um fator de risco clínico pode levar ao desenvolvimento de hipertensão. Observamos também que a variação na PAD está associada ao consumo de álcool e à idade avançada $F = 4,305$, $p = 0,016$. A análise estatística indicou que o consumo de álcool (mais de três drinques por dia) pode contribuir para um aumento de 4,781 mmHg na PAD. Idade avançada também está associada a um aumento de 0,140 mmHg da PAD por ano. Nossa observação corrobora relatos publicados anteriormente de que bebedores inveterados têm menor absorção de cálcio, o que poderia levar ao desenvolvimento de HE¹⁹. Além disso, a presença de álcool no organismo perturba o funcionamento do sistema renina-angiotensina, estimula o sistema nervoso simpático (possivelmente devido à flutuação dos níveis alcoólicos na corrente sanguínea) e aumenta a produção de hormônios adrenocorticóides²⁰. Segundo relatos publicados na literatura, o consumo de cerca de 40 ml de álcool por dia aumenta a PA e, conseqüentemente, dobra a hipertensão (PAS > 160 mmHg ou DBP > 95mmHg)¹⁹. Na população amazônica, o consumo contínuo de álcool através dos anos contribui para o aumento da PAD, elevando o número de casos de hipertensão.

Conclusões

A análise multifatorial de polimorfismos genéticos e fatores clínico-antropométricos indicou que as combinações de alelo D da ECA com idade avançada e consumo de álcool com envelhecimento podem contribuir para a elevação da PAS e PAD, respectivamente, na população de Santa Isabel do Rio Negro.

Financiamento: FIOCRUZ e CNPq.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes

Tabela 2 - Frequências genotípicas e alélicas

Polimorfismo do SRAA	Normotensos	Hipertensos	p*
Genótipos AGT M235T			
MM	08 (10%)	07 (8,54%)	0,154
MT	56 (72,5%)	50 (60,97%)	
TT	14 (17,5%)	25 (30,49%)	
Alelos AGT			
M	36 (45,15%)	35,5 (43,3%)	0,775
T	42 (53,85%)	46,5 (56,7%)	
Genótipos REN G1051A			
AA	40 (51,3%)	44 (53,66%)	0,136
GA	22 (28,2%)	30 (36,59%)	
GG	16 (20,5%)	08 (9,76%)	
Alelos REN			
A	51 (65%)	59 (71,95%)	0,370
G	27 (35%)	23 (23,05%)	
Genótipos ECA I/D			
II	61 (78,21%)	47 (57,32%)	0,019
ID	13 (16,67%)	27 (32,93%)	
DD	04 (5,13%)	08 (9,76%)	
Alelos da ECA			
I	67 (86%)	60 (73,17%)	0,199
D	11 (14%)	22 (26,86%)	
Genótipos AGTR1 A1166C			
AA	55 (70,5%)	46 (56,10%)	0,157
AC	20 (25,6%)	30 (36,59%)	
CC	03 (3,8%)	06 (7,32%)	
Alelos AGTR1			
A	65 (83%)	61 (74,9%)	0,69
C	13 (17%)	21 (25,1%)	
Genótipos CYP11B2 C344T			
CC	14 (17,%)	12 (14,3%)	0,88
TC	36 (46,%)	48 (58,4%)	
TT	28 (35,%)	22 (26,3%)	
Alelos CYP11B2			
C	32 (41%)	36 (43,0%)	0,13
T	46 (59%)	46 (56,0%)	

*Valor de p obtido por meio de teste χ^2 para comparação da distribuição genotípica e alélica.

Referências

- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotevlev YV, Lifton RP, Willians CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992; 71 (1): 169-80.
- Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, et al. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension*. 2003; 41(2): 308-12.
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 24: 63-9.
- Nalagowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukwaska-Szczechowska E, Poreba R, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced

- hypertension. *Med Sci Monit.* 2000; 6 (3): 523-9.
5. Araújo MA, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O polimorfismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II no infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 83 (5): 404-8.
 6. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension.* 1999; 33 (2): 703-7.
 7. Mettimano M, Lanni A, Migneco A, Specchia ML, Romano-Spica V, Savi L. Angiotensin-related genes involved in essential hypertension: allelic distribution in an Italian population sample. *Ital Heart J.* 2001; 2(8): 589-93.
 8. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med.* 2003; 35 (6): 545-9.
 9. Arias-Vásquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AFC, Bertolli-Avella AM, Vergeer JM, Aulchenko JCM, et al. Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35: 444-9.
 10. IBGE [homepage]. Sinopse preliminar do censo demográfico de 2000 – Malha municipal digital do Brasil, 1997 [citado em 2003 maio 05]. Disponível em: [url:http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php2000](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php2000).
 11. WHO Guidelines Subcommittee. World Health Organization- International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens.* 1999; 17: 151-83.
 12. Ethnicity, race and culture: guidelines for research, audit and publication. *BMJ.* 1996; 312 (7038): 1094.
 13. Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235--> Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet.* 1993; 2(5): 609-10.
 14. Cabello PH, Krieger H. GENIOC: Sistema para análises de dados de genética. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ; 1977.
 15. Perry IJ, Whincup PH, Sharper AG. Environmental factors in the development of essential hypertension. *Br Med Bull.* 1994; 50 (2): 246-59.
 16. Kornitzer M, Dramaix M. Epidemiology of risk factors for hypertension. Implications for prevention and therapy. *Drugs.* 1999; 57 (5): 695-712.
 17. Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med.* 2003; 35(6): 545-9.
 18. Henderson SO, Haiman CA, Wendy M. Multiple polymorphisms in the Renin- Angiotensin-Aldosterone system (ACE, CYP11B2, AGTR1) and their contribution to hypertension in African Americans and Latinos in the multiethnic cohort. *Am J Med Sci.* 2004; 328 (5): 266-73.
 19. Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, et al. Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1745-51.
 20. Clark LT. Alcohol use and hypertension: clinical considerations and implications. *Postgrad Med.* 1984; 75 (8): 273-6.