

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

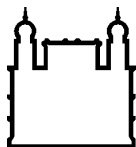
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

*Epidemiologia Genética da Hipertensão Arterial Primária
em Populações Brasileiras:*

*Estudo de polimorfismos em genes do sistema renina-angiotensina-
aldosterona e fatores clínicos/antropométricos.*

SILVIA REGINA SAMPAIO FREITAS

Rio de Janeiro
2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SILVIA REGINA SAMPAIO FREITAS

Epidemiologia Genética da Hipertensão Arterial Primária em Populações Brasileiras:
Estudo de polimorfismos em genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e fatores
clínicos/antropométricos.

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, na área de Genética Molecular Humana.

Orientador (es): Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello
Prof. Dr. Rodrigo Soares Moura-Neto

RIO DE JANEIRO

2006

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

F865 Freitas, Silvia Regina Sampaio

Epidemiologia genética da hipertensão arterial primária em populações
brasileiras : estudo de polimorfismos em genes do sistema renina-angiotensina-
aldosterona e de fatores clínicos/antropométricos / Silvia Regina Sampaio

Freitas. – Rio

de Janeiro, 2006.

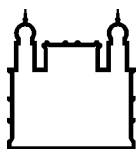
xxviii, 194 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular,
2006.

Bibliografia: f. 113-137.

1. Hipertensão. 2. Hipertensão – Brasil. 3. Polimorfismo genético. 4. Fatores
de risco. 4. Herança multifatorial. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Título.

CDD: 616.132



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SILVIA REGINA SAMPAIO FREITAS

**EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PRIMÁRIA
EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS: ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES
DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA E
FATORES CLÍNICOS/ANTROPOMÉTRICOS.**

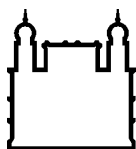
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello
Prof. Dr. Rodrigo Soares Moura Neto

Aprovada em: 23/ 11/ 2006

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcio Neves Bóia (IOC/FIOCRUZ) - Presidente
Profa. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (UERJ)
Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto (USP)

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PRIMÁRIA EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS: ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA E FATORES CLÍNICOS/ANTROPOMÉTRICOS.

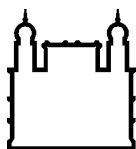
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Silvia Regina Sampaio Freitas

A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial cuja presença de fatores genéticos e ambientais contribuem para a sua expressão. Estudos epidemiológicos sugerem que variantes genéticas, principalmente as descritas nos genes do angiotensinogênio (AGT), enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR₁), aldosterona sintetase (CYP11B2) e do receptor de mineralocorticoide (RM), podem contribuir para o desenvolvimento da HA. Entretanto, estudos de associação de polimorfismos genéticos e a HA têm apresentado resultados conflitantes em diferentes populações. Este cenário pode ser um reflexo da modulação variável do fenótipo, causado pela interação entre o perfil genético do indivíduo e fatores ambientais. Neste trabalho, estabelecemos como objetivos avaliar a associação entre os polimorfismos AGT*M235T, ECA**AluI/D*, AGTR₁*A1166C, CYP11B2*C344T, RM*G3514C e RM*A4582C; e fatores clínicos/antropométricos (gênero, idade, etnia, índice de massa corporal [IMC], fumo e consumo de bebidas alcoólicas), para o desenvolvimento do quadro hipertensivo em duas populações brasileiras. Para este estudo foram avaliados 221 indivíduos (106 hipertensos e 115 normotensos) provenientes do município do Rio de Janeiro/RJ e 160 indivíduos (82 hipertensos e 78 normotensos) do município de Santa Isabel do Rio Negro/AM. A caracterização genotípica foi conduzida com auxílio da técnica de reação em cadeia da polimerase, enquanto que a caracterização clínica foi realizada através de entrevista e exame clínico. A contribuição dos polimorfismos genéticos e dos fatores clínico-antropométricos na variação da pressão arterial foi avaliada pelo cálculo de *ODDS Ratio* e por regressão linear – stepwise. Os resultados obtidos no Rio de Janeiro indicaram que os genótipos AGT*235T/235T, AGTR₁*1166A/1166A, AGTR₁*1166A/1166A, CYP11B2*344T/344T e RM*4582C/4582C apresentam maior suscetibilidade para a hipertensão ($p < 0,05$). Além disso, combinações haplotípicas entre estes polimorfismos contribuem para um aumento gradual no risco de desenvolver HA ($p < 0,05$). Nesta

população, os fatores idade, IMC e etnia também foram relacionados com elevados níveis pressóricos ($p < 0,05$). As análises clínicas e genéticas realizadas na amostra de Santa Isabel do Rio Negro/Amazonas mostraram que a elevação da pressão arterial foi favorecida pelos genótipos ECA**Alu*D/*Alu*D, RM*4582C/4582C, e pela idade e o consumo de bebidas alcoólicas ($p < 0,05$). Com base nestes resultados concluímos que o perfil genético associado a fatores antropométricos contribui para o desenvolvimento da HA, entretanto o peso individual destes fatores varia entre diferentes populações.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PRIMÁRIA EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS: ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA E FATORES CLÍNICOS/ANTROPOMÉTRICOS.

TESE DE DOUTORADO

Silvia Regina Sampaio Freitas

Essential hypertension (EH) is a multifactorial disease triggered by several genetic and multiple environmental factors. Epidemiological studies have suggested that genetic variants, including those of the genes for angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II receptor type 1 (AGTR₁), aldosterone synthase (CYP11B2) and mineralocorticoid receptor (MR), can increase the risk for EH. However, associative studies among polymorphic forms of these genes and EH have showed conflicting results in different populations. This scenario may be reflecting the variable impact of the genetic background of populations and the interaction of environmental factors, which can be modulating this molecular background. In this work, we aimed to investigate the association among AGT*M235T, ACE**AluI*/D, AGTR₁*A1166C, CYP11B2*C344T, MR*G3514C and MR*A4582C genetic markers and clinical/anthropometrical factors (gender, age, ethnical profile, body mass index [BMI], smoking and alcohol consumption), with essential hypertension in two Brazilian population. In this study, 221 individuals from Rio de Janeiro/RJ (106 hypertensives and 115 normotensives), and 160 from Santa Isabel do Rio Negro/AM (82 hypertensives and 78 normotensives) were evaluated. Genetic determination was conducted by polymerase chain reaction, while clinical/anthropometrical characterization was realized through clinical examination. The influence of genetic polymorphisms on blood pressure variation was assessed by analysis of ODDS Ratio and stepwise linear regression. Results from Rio de Janeiro sample indicated an increase in risk for hypertension associated with AGT*235T/235T, AGTR₁*1166A/1166A, AGTR₁*1166A/1166C, CYP11B2*344T/344T, MR*4582C/4582C genotypes ($p < 0.05$). Moreover, genotype combinations contribute to an increased EH risk ($p < 0.05$). In RJ sample, clinical/anthropometrical factors as age, BMI and ethnical profile were associated to raise blood pressure ($p < 0.05$). The clinical-genetics analysis in Santa Isabel do Rio Negro/Amazon sample indicates that increase of blood pressure was favoured by ACE**AluI*/*AluI* and MR*4582C/4582C genotypes, and advanced age and alcohol

consumption ($p < 0.05$). Our findings suggest that unfavorable genetic patterns combined with clinical/anthropometrical factors contribute to EH development, however, the single influence impact of each factor vary among populations.

Dedico essa tese ao meu filho Daniel.

Aos meus pais, Luci e Antônio. Obrigada pela compreensão, amparo, carinho e incentivos dispensados durante toda a minha vida.

As minhas irmãs Isabel e Ana Carolina. Agradeço a amizade e companheirismo,
fundamentais durante os meus momentos de alegria e tristeza.

Ao meu namorado Adilson. Agradeço de coração pelo companheirismo e,
principalmente, pelo suporte emocional.

Agradecimientos

Aos meus orientadores Pedro e Rodrigo, que me ensinaram, com maestria, a difícil arte da pesquisa científica.

Aos pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Genética Humana, pelo carinho e amizade.

Aos Colegas de Trabalho do Laboratório Genética Humana e do Departamento de Genética, pelo companheirismo e apoio durante todos esses anos.

A equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical, em especial ao Dr. Marcio Neves Bóia.

Aos funcionários do Departamento de Ensino, em especial à Cleide, Eliete e Daniele, pela amizade e orientação quanto aos assuntos burocráticos.

A equipe do Setor de Hipertensão Arterial/INCL, em especial ao Dr. Ivan, Ana Beatriz, Marcelo e Iara.

A equipe do Laboratório de Análises Clínicas/INCL, em especial ao Dr. Constante e a Francis.

Agradeço a Deus que em sua infinita bondade tem me permitido o equilíbrio necessário para que eu alcance os meus objetivos, servindo de alavanca para a realização dessa conquista.

Lista de Abreviaturas

A	AGT	Angiotensinogênio
	AGTR₁	Gene do receptor tipo 1 de angiotensina II
	AGTR₂	Gene do receptor tipo 2 de angiotensina II
	AM	Amazonas
	AmP A	Aminopectidade A
	AmP N	Aminopectidase N
	Ang I	Angiotensina I
	Ang II	Angiotensina II ou Angiotensina 1-8 (Ang 1-8)
	Ang III	Angiotensina III
	Ang IV	Angiotensina IV
	Ang 1-7	Angiotensina 1-7
	Ang 1-9	Angiotensina 1-9
	AT₁	Receptor tipo 1 de angiotensina II
	AT₂	Receptor tipo 2 de angiotensina II
	AT₄	Receptor tipo 4 de angiotensina IV
C	°C	Graus Celsius
	CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
	CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
D	dATP	Desoxiadenosina trifosfato
	dCTP	Desoxicitidina trifosfato
	dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
	dTTP	Desoxitimidina trifosfato

dNTP	Desoxirribonucleotídeos-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
E	
ECA	Enzima conversora tipo 1 de angiotensina I
ECA2	Enzima conversora tipo 2 de angiotensina I
ECAs	Forma testicular da enzima conversora tipo 1 de angiotensina I
ECA_t	Forma somática da enzima conversora tipo 1 de angiotensina I
eNOS	Óxido nítrico endotelial sintetase
EDTA	Ácido etilenoamino tetra-acético
G	
g	Grama (unidade de medida)
H	
HA	Hipertensão arterial
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
hRMα	Isoforma α do RNA mensageiro do gene do receptor de mineralocorticóide
hRMβ	Isoforma β do RNA mensageiro do gene do receptor de mineralocorticóide
H-W	Hardy-Weinberg
I	
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
INCL	Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras

K	kb	Quilobase
	KCl	Cloreto de potássio
	kDa	Quilodalton
	KHCO₃	Monocarbonato de potássio
L	LDL	lipoproteínas de baixa densidade
M	M	Molar
	mg	miligramas
	MgCl₂	Cloreto de magnésio
	mg/dl	Miligramas/decilitro
	mmHg	Milímetros de mercúrio
	mRNA	RNA mensageiro
	μL	microlitro
	μg	micrograma
	mL	mililitro
	mM	milimolar
N	Na⁺	Íon de sódio
	NaCl	Cloreto de sódio
	Nh₄Cl	Cloreto de amonia
	ng	nanograma
O	OMS	Organização Mundial de Saúde

OR	Odds ratio
oz	Onça (unidade de medida)
11-OHase	11- β -hidroxalase
P	
p	probabilidade
P⁺	Íons de potássio
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
R	
REN	Renina
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RJ	Rio de Janeiro
RM	Receptor de mineralocorticóide
RNA	Molécula de ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF-1	Fator Esteróide tipo 1 de transcrição
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

T	TBE	Tampão TRIS-Ácido bórico-EDTA
	TE	Tampão TRIS-EDTA
U	U	Unidade
V	v	Volts
Z	Zn²⁺	Zinco

Lista de Figuras

Figura 1.1. Esquema ilustrativo das pressões diastólica e sistólica	28
Figura 1.2: Prevalência da hipertensão arterial primária	30
Figura 1.3: Ilustração do mecanismo de ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, no controle da pressão arterial	32
Figura 1.4: Organização esquemática do gene do angiotensinogênio.....	33
Figura 1.5: Organização esquemática do gene da renina.....	36
Figura 1.6: Organização esquemática do gene da enzima conversora tipo 1 de angiotensina I	38
Figura 1.7: Organização esquemática do gene da enzima conversora tipo 2 de angiotensina	39
Figura 1.8: Organização esquemática do gene do receptor tipo 1 de angiotensina II ...	41
Figura 1.9: Organização esquemática do gene do receptor tipo 2 de angiotensina II ...	42
Figura 1.10: Via metabólica da biossíntese de aldosterona	43
Figura 1.11: Organização esquemática do gene da aldosterona sintetase	44
Figura 1.12: Organização esquemática do gene do receptor de mineralocorticóide	46
Figura 3.1: Mapa geográfico do Brasil	59
Figura 3.2: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo AGT*M235T.....	68
Figura 3.3: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo ECA*AluI/D.....	70
Figura 3.4: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo AGTR ₁ *A1166C...	73
Figura 3.5: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo CYP11B2*C344T.	76
Figura 3.6: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo RM*G3514C	80
Figura 3.7: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo RM*A4582C.....	81

Lista de Tabelas/Gráficos

Tabela 1.1: Classificação da pressão arterial em adultos (> 18 anos)	29
Tabela 1.2: Doenças genéticas diagnosticadas com o auxílio de marcadores moleculares	52, 53
Tabela 3.1: Critérios de inclusão /exclusão adotados no presente estudo	60
Tabela 3.2: Classificação do Índice de Massa Corporal	62
Tabela 3.3: Critérios de avaliação de níveis lipêmicos	63
Tabela 4.1: Caracterização clínica e antropométrica dos normotensos e hipertensos	87
Tabela 4.2: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos <i>loci</i> estudados	89
Tabela 4.3: Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos gênicos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, em normotensos e hipertensos	90
Tabela 4.4: Caracterização clínica e antropométrica dos normotensos e hipertensos	95
Tabela 4.5: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos <i>loci</i> estudados	96
Tabela 4.6. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos gênicos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, em normotensos e hipertensos	98
Gráfico 4.1: Apresentação dos valores de ODDS Ratio (box preto) e os intervalos de confiança (barra vertical), obtidos nos polimorfismos do sistema renina-angiotensina-aldosterona	92

Índice

1. Introdução	27
1.1. Definindo Hipertensão	28
1.2. Etiologia da Hipertensão Arterial	30
1.3. O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona na Gênese da Hipertensão Arterial	31
1.3.1. Angiotensinogênio	33
1.3.2. Renina	34
1.3.3. Enzima Conversora Tipo 1 de Angiotensina I	36
1.3.4. Enzima Conversora Tipo 2 de Angiotensina	38
1.3.5. Receptores de Angiotensina II	40
1.3.6. Aldosterona e Aldosterona Sintetase	42
1.3.7. Receptor de Mineralocorticoide	44
1.4. Fatores Ambientais e Antropométricos que Influenciam a Variação da Pressão Arterial	46
1.4.1. Atividade Física	46
1.4.2. Climatério	47
1.4.3. Consumo de Bebidas Alcoólicas	47
1.4.4. Etnia	48
1.4.5. Ingesta de Sódio	49
1.4.6. Obesidade	49
1.4.7. Tabagismo	51
1.5. Aplicação da Epidemiologia Genética no Estudo de Doenças Complexas	51
2. Objetivos	55
2.1. Objetivos Gerais	56
2.2. Objetivos Específicos	56
3. Material e Métodos	57
3.1. Avaliação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa	58
3.2. Caracterização das Amostras de Estudo	58
3.3. Avaliação Clínica e Antropométrica	60
3.3.1. Critérios de Inclusão/Exclusão	60
3.3.2. Determinação dos Níveis Pressóricos	60
3.3.3. Classificação Étnica	61
3.3.4. Padronização do Consumo de Bebidas Alcoólicas e Fumo	61
3.3.5. Determinação do Índice de Massa Corporal	62
3.3.6. Avaliação Laboratorial do Perfil Lipídico	62

3.4. Avaliação Genético-Molecular	63
3.4.1. Extração do DNA Genômico	63
3.4.1.1. Extração do DNA Genômico pelo Método Salino	63
3.4.1.2. Extração do DNA Genômico pelo Método Orgânico	64
3.4.2. Estimativa da Concentração de DNA	65
3.4.3. Análise dos Polimorfismos Genéticos	66
3.4.3.1. Análise Molecular do Polimorfismo M235T	66
3.4.3.2. Análise Molecular do Polimorfismo <i>Alu</i> I/D	69
3.4.3.3. Análise Molecular do Polimorfismo A1166C	71
3.4.3.4. Análise Molecular do Polimorfismo C344T	74
3.4.3.5. Análise Molecular dos Polimorfismos G3514C e A4582C	77
3.5. Análise Estatística	82
3.5.1. Análise das Características Clínicas e Antropométricas	82
3.5.2. Correlação entre Variáveis Clínicas/Antropométricas e a Pressão Arterial	82
3.5.3. Estimativa das Frequências Genotípicas e Alélicas	83
3.5.4. Aderência das Frequências Genotípicas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	83
3.5.5. Diferenciação Genética das Amostras de Hipertensos e Normotensos ...	83
3.5.6. Análise da ODD Ratio	84
3.5.7. Associação das Variáveis Genéticas com a Pressão Arterial	84
3.5.8. Associação das Variáveis Clínicas/Antropométricas e Genéticas com a Pressão Arterial	84
4. Resultados	85
4.1. Resultados da Avaliação Ambulatorial e da Caracterização Genética Realizada nas Amostras de Indivíduos do Rio de Janeiro.....	86
4.1.1. Avaliação Clínica e Antropométrica	86
4.1.2. Avaliação Genética	88
4.1.2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos Marcadores Genéticos Polimórficos	88
4.1.2.2. Frequências Genotípicas e Alélicas	89
4.1.2.3. Análise de “ODDS ratio”	91
4.1.2.4. Análise de Regressão Linear Múltipla dos Fatores Genéticos	93
4.1.3. Análise Conjunta dos Fatores Clínicos/Antropométricos e Genéticos	93
4.2. Resultados da Avaliação Ambulatorial e da Caracterização Genética Realizada nas Amostras de Indivíduos de Santa Isabel do Rio Negro	94

4.2.1. Avaliação Clínicas e Antropométrica	94
4.2.2. Avaliação Genética.....	96
4.2.2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos Marcadores Genéticos Polimórficos	96
4.2.2.2. Freqüências Genóticas e Alélicas	97
4.2.2.3. Análise da “ODDS ratio”	99
4.2.2.4. Análise de Regressão Linear Múltipla dos Fatores Genéticos	99
4.2.3. Análise Conjunta dos Fatores Clínicos/Antropométricos e Genéticos ...	99
5. Discussão	101
5.1. Estudo Multifatorial Realizada nas Amostras de Hipertensos e Normotensos do Rio de Janeiro	102
5.1.1. Avaliação Clínica e Antropométrica	103
5.1.2. Avaliação Genética	103
5.1.3. Avaliação Multifatorial	107
5.2. Estudo Multifatorial Realizada nas Amostras de Hipertensos e Normotensos de Santa Isabel do Rio Negro.....	107
5.2.1. Avaliação Clínica e Antropométrica	108
5.2.2. Avaliação Genética	108
5.2.3. Avaliação Multifatorial	109
5.3. Considerações Finais	110
6. Conclusão	111
6.1. Conclusões das Análises Realizadas nas Amostras do Rio de Janeiro	112
6.2. Conclusões das Análises Realizadas nas Amostras de Santa Isabel do Rio Negro	112
7. Bibliografia	113
8. Anexos	137
Anexo 1 – Parecer de Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras	138
Anexo 2 – Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	139
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	140
Anexo 4 – Ficha de Atendimento Clínico – Santa Isabel do Rio Negro	141
Anexo 5 – Ficha de Atendimento Clínico – Rio de Janeiro	143
Anexo 6 – Trabalhos Aceitos para Publicação	146
Anexo 7 – Trabalhos Submetidos para Publicação	172

1- Introdução

1.1. DEFININDO HIPERTENSÃO

A pressão arterial (PA), ou simplesmente pressão sanguínea, é a medição referente à tensão exercida pelo fluxo sanguíneo contra as paredes das artérias e vasos. Clinicamente, a pressão sanguínea arterial é uma medida que reflete o estado do sistema cardiovascular. Durante a ejeção sanguínea cardíaca, o coração transfere a energia para o sistema arterial, gerando um pulso de pressão. A pressão máxima atingida no sistema arterial durante a ejeção cardíaca é denominada de PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS). Durante a fase de diástole do ciclo cardíaco, a pressão arterial decai progressivamente. A pressão mínima alcançada durante este período é a PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD) (Figura 1.1) (FRIEDMAN, 1979).

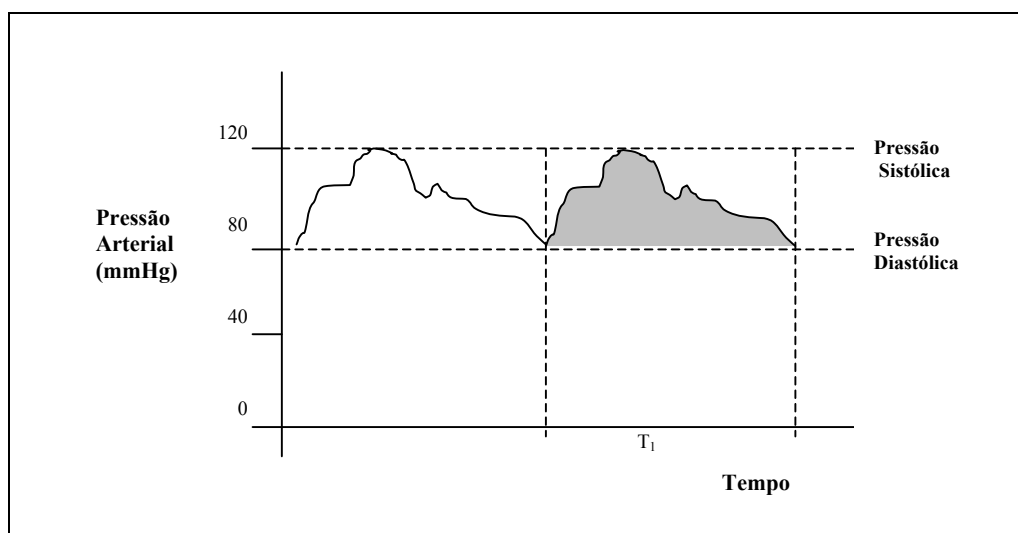


Figura 1.1: Esquema ilustrativo das pressões diastólica e sistólica. A pressão arterial média representa a área sob a curva de pressão arterial (área sombreada) dividida pela duração do ciclo cardíaco ($t_2 - t_1$).

A pressão arterial é um traço quantitativo altamente variável. Em estudos populacionais, a distribuição da pressão arterial se assemelha a uma distribuição normal. Ainda existe uma correlação positiva entre os níveis de pressão arterial de um indivíduo e a incidência de doenças cardiovasculares, renais e mortalidade, mesmo que esse indivíduo tenha sua pressão arterial na faixa dita de normalidade. Uma vez que não existe um nível definido a partir do qual os valores de pressão arterial passam a aumentar o risco

cardiovascular, a caracterização de hipertensão arterial (HA) é arbitrária, determinada operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo.

Dessa maneira, a Sociedade Brasileira de Cardiologia, através da IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2002) define e classifica hipertensão em adultos com base na média entre 2 medidas de PAS e PAD, em pelo menos 3 visitas ao médico (Tabela 1.1). Com a utilização deste procedimento, estima-se que aproximadamente 20% da população mundial seja classificada como hipertensa (Figura 1.2).

Tabela 1.1: Classificação da pressão arterial em adultos (> 18 anos).

Classificação da PA	Pressão Sistólica (mmHg)	Pressão Diastólica (mmHg)
Hipotensão	< 100	< 60
Ótima	100 - 120	60 - 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130 - 139	85 - 89
Hipertensão		
Estágio 1 (leve)	140 - 159	90 - 99
Estágio 2 (moderado)	160 - 179	100 - 109
Estágio 3 (grave)	≥ 180	≥ 110

O valor mais elevado de sistólica ou diastólica estabelece o estágio do quadro hipertensivo. Quando as pressões sistólicas e diastólicas situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação do estágio (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2002).

Apesar da prevalência de hipertensão arterial ser aproximadamente constante nas mais diferentes populações humanas, a frequência dessa condição varia dependendo de uma série de fatores como idade, etnia, tabagismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, gênero ou *status* socioeconômico; indicando que indivíduos hipertensos de uma população podem não possuir um mesmo conjunto de alterações que hipertensos de outra população, ainda que a média pressórica de ambos os grupos seja exatamente igual. Dessa maneira, a hipertensão arterial pode ser considerada uma doença complexa, multifatorial, na qual diferentes pacientes podem apresentar diferentes fatores causais para o traço, podendo estes ser tanto ambientais quanto genéticos.

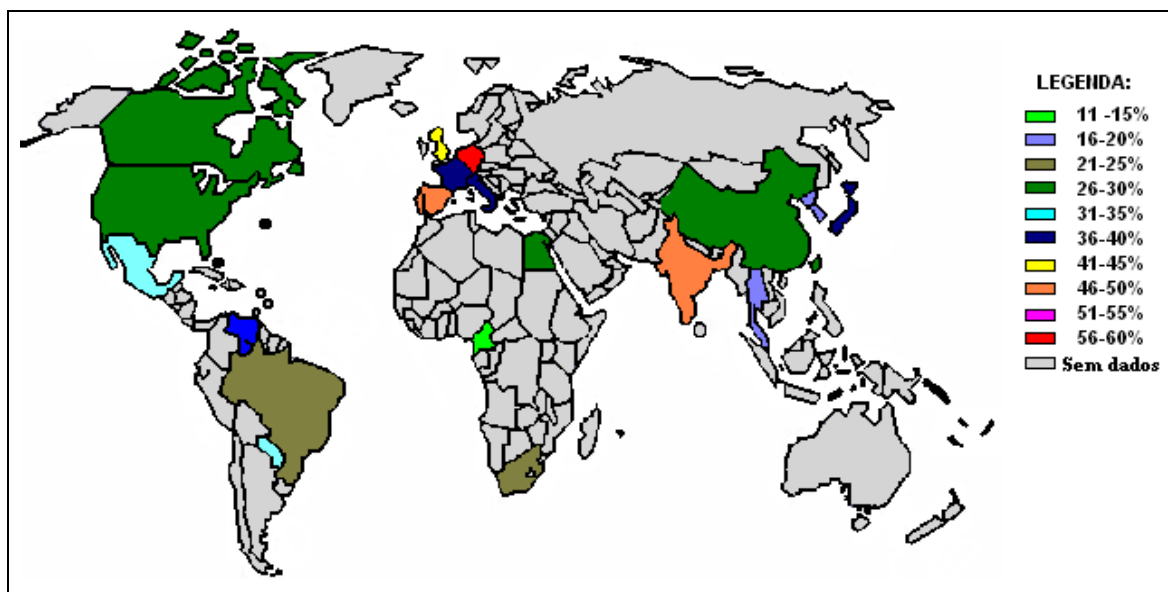


Figura 1.2: Prevalência da hipertensão arterial primária (WOLF-MAIER *et al.*, 2003; KEARNEY *et al.*, 2005; HAJJAR *et al.*, 2006).

1.2. ETIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Em aproximadamente 10% dos casos de hipertensão, a pressão sanguínea elevada é um sinal clínico de uma disfunção renal, endócrina ou cardiovascular. Esta minoria de pacientes hipertensos, cuja elevação da pressão arterial apresenta uma causa específica, é classificada como HIPERTENSOS SECUNDÁRIOS. Entretanto, aproximadamente 90% dos casos não existem etiologia conhecida ou cura, sendo o controle da pressão arterial obtido por meio de mudanças no estilo de vida e/ou tratamento farmacológico. Conseqüentemente, pacientes com hipertensão arterial sem causa definida são admitidos como portadores de HIPERTENSÃO PRIMÁRIA OU SISTÊMICA (FRIEDMAN, 1979). Do ponto de vista fisiopatológico, a HA primária é um fenótipo complexo, influenciado pelo meio ambiente e por múltiplos sistemas regulatórios, que participam da manutenção “momento a momento” da PA (mecanismos neuro-humorais) e a longo prazo (rins e sistema renina-angiotensina-aldosterona) (ANDREOLLI *et al.*, 1993). Portanto, potencialmente, múltiplos genes devem influenciar a equação *débito cardíaco x resistência periférica* e o equilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores. A identificação de tais genes tem propiciado um melhor entendimento sobre as bases genéticas da hipertensão arterial primária, mediante a investigação dos mecanismos moleculares que atuam na gênese desta doença.

1.3. O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA NA GÊNESE DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) corresponde a um complexo sistema hormonal e parácrino cujo principal componente, a angiotensina II (Ang II) – um potente vasoconstritor, desempenha papel importante na manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo e no controle da pressão arterial.

A ativação do SRAA está condicionada a redução da pressão arterial renal, detectada por células justaglomerulares localizadas nas paredes das artérias aferentes, que estimula a secreção de renina pelos rins. Na circulação sanguínea a renina converte o angiotensinogênio circulante em angiotensina I (Ang I). Posteriormente, a Ang I é convertida em angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) presente, principalmente, nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar. A Ang II tem uma série de efeitos sistêmicos e renais, além estimular a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, resultando em aumento da reabsorção de sódio pelos túbulos renais (AIRES, 1999). A Ang II pode ainda ser convertida em angiotensina III (Ang III), por intermédio da enzima aminopeptidase A (AmP A), cujas funções fisiológicas são similares às executadas pela Ang II nos sistemas nervoso e cardiovascular, que incluem resposta pressórica, liberação de vasopressina e consumo de água (ARDAILLOU & CHANSEL, 1997). A clivagem da Ang III pela aminopeptidase N (AmP N) gera a angiotensina IV (Ang IV), cujo efeito vasodilatador, mediado pelo receptor AT₄, produz aumento do fluxo sanguíneo renal cortical (COLEMAN *et al.*, 1998), natriurese (HAMILTON *et al.*, 2001) e relaxamento da artéria pulmonar (CHEN *et al.*, 2000).

Recentemente, foi identificada uma enzima similar a ECA, denominada enzima conversora tipo 2 de angiotensina (ECA2), responsável pela via de degradação das angiotensinas. A ECA2 atua na clivagem de um resíduo de aminoácido da angiotensina I, convertendo-a em angiotensina 1-9 (Ang 1-9), cuja função ainda é desconhecida (DONOGHUE *et al.*, 2000), e na conversão da angiotensina II em angiotensina 1-7 (Ang 1-7). Sendo assim, a ECA2 regula negativamente o sistema-renina-angiotensina devido a geração da proteína inativa Ang 1-9 e do peptídeo Ang 1-7 de ação vasodilatadora (ERIKSSON *et al.*, 2002), antiproliferativa (FERRARIO *et al.*, 1997) e diurética (FERRARIO *et al.*, 1998). A competição entre a ECA e a ECA2 pelo mesmo substrato, a angiotensina I, contribui para contrabalançar a função do SRAA (Figura 1.3).

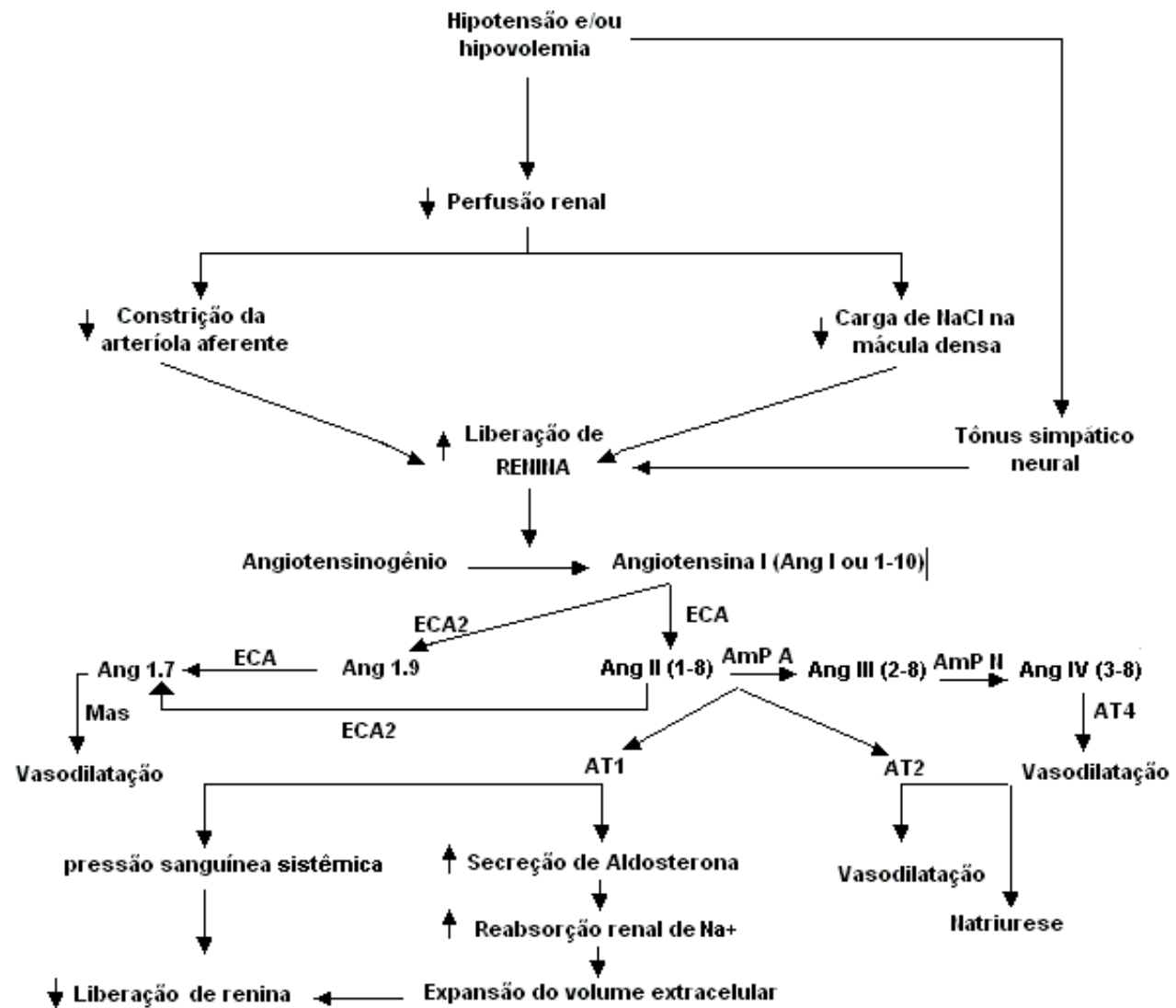


Figura 1.3: Ilustração do mecanismo de ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, no controle da pressão arterial.

1.3.1. Angiotensinogênio

Esta substância corresponde a uma α_2 globulina que circula em quantidades abundantes no plasma. O angiotensinogênio humano contém 452 aminoácidos e é sintetizado basicamente no fígado, embora o RNA mensageiro que codifica a proteína também seja abundante no tecido gorduroso, em determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC) e nos rins. A síntese do angiotensinogênio é estimulada por vários hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônio tireoideano e pela própria Ang II. O angiotensinogênio é um peptídeo biologicamente inativo sobre o qual irá atuar a renina, gerando a angiotensina I. O aumento na concentração do angiotensinogênio eleva a produção de angiotensina I e conseqüentemente de angiotensina II, proporcionando a elevação nos níveis pressóricos. Sabendo-se da sua contribuição na gênese da hipertensão arterial, o angiotensinogênio tem sido exaustivamente analisado com o propósito de desvendar a origem genética da variação sérica desta proteína.

O gene do angiotensinogênio (*AGT*), situado na região q42-q43 do cromossomo 1, é composto por 5 exons e 4 introns distribuídos por uma região de 12kb de comprimento (GAILLARD-SANCHEZ *et al.*, 1990; ISA *et al.*, 1990). Inúmeros polimorfismos já foram identificados neste gene, dentre os quais destaca-se uma mutação denominada de M235T, que corresponde a uma substituição do aminoácido metionina por uma treonina na posição 235 da proteína madura (Figura 1.4) (JEUNEIMATRE *et al.*, 1992a). Este polimorfismo apresenta uma estreita relação com os níveis plasmáticos de angiotensinogênio. Indivíduos portadores do genótipo homozigoto *AGT**235M/235M apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio, os heterozigotos *AGT**235M/235T têm níveis intermediários e os homozigotos *AGT**235T/235T possuem as médias maiores (WINKELMANN *et al.*, 1999). Apesar da correlação positiva entre o polimorfismo M235T e a concentração plasmática de angiotensinogênio ter sido observada em diferentes populações (INOUE *et al.*, 1997; METTIMANO *et al.*, 2001; AGACHAN *et al.*, 2003; GUI-YAN *et al.*, 2006), não se conhecia o mecanismo genético que proporcionava a variação sérica da proteína. Esta questão foi solucionada quando se observou que o alelo *AGT**235T encontrava-se em desequilíbrio de ligação com uma variante molecular [A(-6) G] no promotor do gene do angiotensinogênio (INOUE *et al.*, 1997). Esta variante, responsável pela substituição de uma adenina por guanina (A→G) no nucleotídeo seis, afeta interações de pelo menos um fator de transcrição com o promotor do angiotensinogênio, influenciando assim a velocidade basal de transcrição do gene (INOUE *et al.*, 1997). Especula-se que o aumento

na expressão do gene do *AGT* pode desencadear uma elevação da produção de angiotensina II, tanto pelo SRAA circulante quanto pelo SRAA tecidual, resultando assim na expansão do volume sanguíneo. O aumento do volume sanguíneo pode, por sua vez, favorecer o aumento da pressão arterial. Estudos conduzidos em humanos mostraram que a infusão de angiotensina II em indivíduos homocigotos para o alelo *AGT**235T proporciona um pequeno aumento na circulação sanguínea renal, quando comparado com indivíduos portadores dos outros genótipos (INOUE *et al.*, 1997). Este achado muito provavelmente explica porque os homocigotos para o alelo *AGT**235T possuem níveis plasmáticos de angiotensinogênio 10% a 20% maior que os homocigotos *AGT**235M (WINKELMANN *et al.*, 1999).

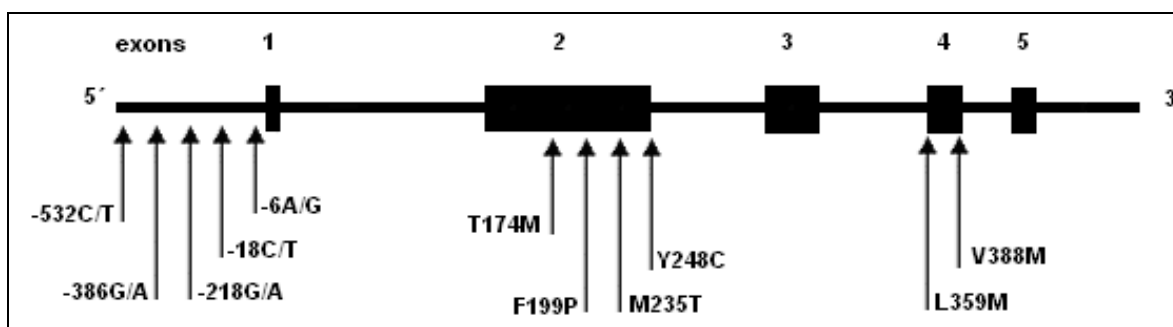


Figura 1.4: Organização esquemática do gene do angiotensinogênio (adaptado de JEUNEMAITRE *et al.*, 1992a). As setas mostram alguns dos polimorfismos descritos neste gene.

1.3.2. Renina

O principal determinante da taxa de produção de Ang II é a quantidade de renina liberada pelos rins. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação renal pelas células justaglomerulares granulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes. Vale a pena salientar que outros órgãos como cérebro, coração e útero podem produzir renina. A forma ativa da renina é uma glicoproteína que contém 340 aminoácidos. A secreção de renina pelas células justaglomerulares é controlada por três mecanismos, dois que agem predominantemente no rim, e o terceiro, que age através do sistema nervoso central e é mediado pela liberação de noradrenalina pelos nervos noradrenérgicos renais. O primeiro mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismos da mácula densa. Aumentos do fluxo de cloreto de sódio (NaCl) através da mácula densa inibem a liberação de renina, e reduções do fluxo, a estimulam (JACKSON *et al.*, 1982). O

segundo mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo barorreceptor intra-renal. Aumentos e reduções da pressão sanguínea nos vasos pré-glomerulares inibem e estimulam a liberação de renina, respectivamente. Acredita-se que o estímulo imediato para a secreção seja uma redução da tensão da parede da arteríola aferente o que, talvez, controle em parte o mecanismo barorreceptor intra-renal (DATA *et al.*, 1978; LINAS, 1984). O terceiro mecanismo envolve o receptor β -adrenérgico. Este mecanismo é mediado pela liberação de noradrenalina das terminações dos nervos simpáticos pós-ganglionares. Ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos por esta catecolamina (noradrenalina), nas células justaglomerulares, aumenta a secreção de renina (JACKSON & GARRISON, 1995). Os receptores α -adrenérgicos renais podem também mediar a secreção de renina. Alguns autores afirmam que, *in vitro*, a estimulação desses receptores inibe a liberação de renina, outros, porém, afirmam que *in vivo* esses receptores podem ativar a liberação de renina (AIRES, 1999). Os três mecanismos que regulam a secreção de renina estão interligados constituindo uma rede fisiológica. Elevações da secreção de renina aumentam a formação de Ang II que, interagindo com seus receptores renais, inibe a liberação de renina nas células justaglomerulares. Este sistema foi denominado mecanismo de “*feedback* negativo de alça curta” (JACKSON & GARRISON, 1995). Além disso, aumentos da pressão sanguínea inibem a liberação de renina por três outros processos: (1) a ativação dos barorreceptores carotídeos e aórticos, portanto reduzindo o tônus simpático renal; (2) aumentando a pressão nos vasos pré-glomerulares; e (3) reduzindo a reabsorção de NaCl no túbulo proximal (natriurese pressórica), o que aumenta a liberação nos túbulos de NaCl para a mácula densa. A inibição da liberação de renina devida a aumentos da pressão sanguínea induzidos pela Ang II foi denominada de mecanismo de “*feedback* negativo de alça longa” (JACKSON & GARRISON, 1995).

Cerca de 30% dos pacientes hipertensos apresentam níveis plasmáticos elevados de renina, e esta variação pode ser um dos fatores que estaria contribuindo para alterações na pressão sanguínea observada em tais pacientes (BRUNNER *et al.*, 1972; CORVOL *et al.*, 1997). Na tentativa de investigar o(s) mecanismo(s) genético(s) envolvido(s) com este fenótipo, foram descritas e estudadas mutações no gene da renina (*REN*), localizado numa região de 12.5kb de comprimento na porção q32 do cromossomo 1 (Figura 1.5) (MIYAZAKI *et al.*, 1984; SHINE *et al.*, 1984). Dos polimorfismos descritos, destaca-se a transição de uma guanina para adenina no nucleotídeo 1051 do exon 9 do gene, que

acarreta a substituição de uma Valina por uma Isoleucina na posição 351 da proteína. A análise desta mutação em hipertensos mostrou que a frequência do genótipo *REN**1051G/1051G era significativamente elevada entre pacientes com altos índices de renina plasmática, quando comparados com os pacientes portadores dos genótipos *REN**1051A/1051A e *REN**1051G/1051A. A constatação desta correlação fenótipo-genótipo indica uma possível interferência da variante *REN**1051G na atividade desta enzima, que conseqüentemente favorece o desenvolvimento da hipertensão arterial (HASIMU *et al.*, 2003).

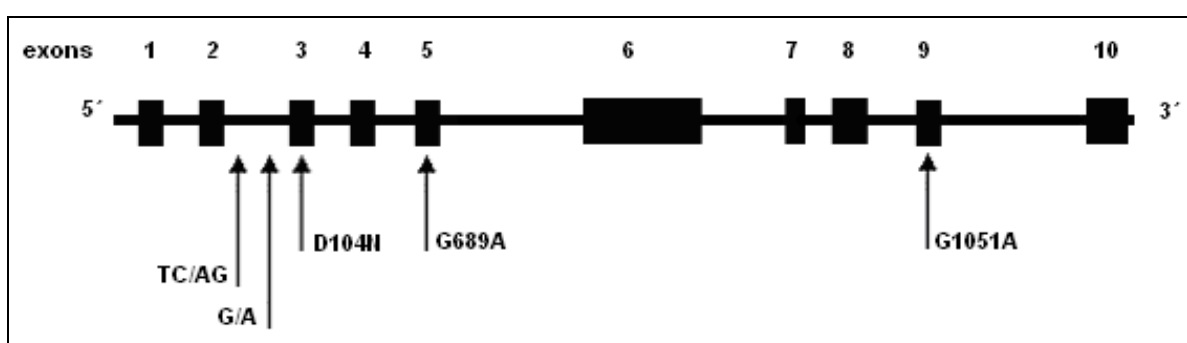


Figura 1.5: Organização esquemática do gene da renina. As setas indicam a posição de alguns polimorfismos já descritos neste gene.

1.3.3. Enzima Conversora Tipo 1 de Angiotensina I

A enzima conversora de angiotensina é uma glicoproteína dipeptidil-carboxipeptidase inespecífica, que catalisa a hidrólise de dipeptídeos carboxi-terminais com diferentes seqüências de aminoácidos. Várias substâncias podem ser hidrolisadas pela ECA, tais como encefalinas, neurotensina e substância P.

O *locus* da enzima conversora de angiotensina, situado na região 17q22-q24 (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992b), ocupa um espaço de 21kb de comprimento no qual 26 exons e 25 introns encontram-se distribuídos (Figura 1.6) (SOUBRIER *et al.*, 1988). O gene *ECA* codifica duas isoformas; uma delas somática, de distribuição sistêmica, encontrada em grandes concentrações na superfície luminal das células endoteliais vasculares, que é composta de uma cadeia polipeptídica simples e longa. A isoforma somática da *ECA* (*ECAs*) é um importante componente do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sua ação clássica neste sistema compreende a conversão do peptídeo inativo

angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II, que por sua vez estimula a liberação do hormônio esteróide aldosterona do córtex da glândula adrenal, ocasionando a retenção de sódio e desempenhando papel fundamental na manutenção da pressão sanguínea e na homeostase hidroeletrolítica. A segunda isoforma é a testicular que, influenciada por hormônios andrógenos, estimula a expressão do gene em células germinativas de testículos (*ECA_t*). As isoformas são resultantes da expressão de dois promotores distintos. Na isoforma somática, o gene *ECA_s* é transcrito a partir do promotor que precede o primeiro exon, produzindo uma proteína de 170kDa; enquanto que a isoforma testicular é expressa a partir de um promotor intragênico situado no intron 12, e o seu produto de transcrição possui 100kDa (EL-DORRY *et al.*, 1982; HOWARD *et al.*, 1990).

A clonagem do gene da *ECA* permitiu a detecção de muitos polimorfismos, sendo um desses caracterizado pela presença (inserção - alelo I) ou ausência (deleção - alelo D) de um segmento *Alu* no intron 16 (Figura 1.6) (RIGAT *et al.*, 1990). A análise dos genótipos relativos a este polimorfismo mostrou uma associação direta com os níveis de *ECA* no plasma circulante. Assim, indivíduos que apresentam o genótipo *ECA*AluD/AluD* (que não possui a inserção) exibem aproximadamente o dobro da concentração de *ECA* circulante em relação aqueles com genótipo *ECA*AluI/AluI* (que possui a inserção *Alu*), enquanto o genótipo *ECA*AluI/AluD* apresenta níveis intermediários de *ECA* (RIGAT *et al.*, 1990). Entretanto não foram observadas alterações na cinética da enzima, nem nos níveis de angiotensina II ou aldosterona, em decorrência da variação plasmática da *ECA* (RIGAT *et al.*, 1990; HARRAP *et al.*, 1993). Investigando a associação entre este polimorfismo e a variação da pressão arterial, JEUNEMAITRE e colaboradores (1992b) não observaram evidências que pudessem corroborar a hipótese de associação entre o polimorfismo Inserção/Deleção e a hipertensão arterial primária. Similarmente, SCHMIDT e colaboradores (1993) não encontraram correlação entre a inserção/deleção da sequência *Alu* em indivíduos com pressão arterial elevada ou baixa. Esta ausência de associação foi repetidamente observada em outros trabalhos (IWAI *et al.*, 1994; SCHUNKERT *et al.*, 1994; TIRET *et al.*, 1998; VASKU *et al.*, 1998; CASTELLANO *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos reportaram associação positiva entre o alelo D e a pressão arterial elevada (KARIO *et al.*, 1999; GINER *et al.*, 2000; AGACHAN *et al.*, 2003). Um estudo por meta-análise, que incluiu 28 grupos caso-controle com um total de 6.923 indivíduos, indicou um risco 10 vezes maior de desenvolver hipertensão arterial em portadores do genótipo DD

quando comparados com os portadores do genótipo II. Apesar desta correlação positiva, os resultados não foram estatisticamente significativos devido ao intervalo de confiança (Odd ratio = 1,0 [95% Intervalo de confiança: 0,95, 1,27]) (STAESSEN *et al.*, 1997). Uma outra meta-análise, publicada por AGERHOLM-LARSEN e colaboradores (2000), cujos critérios de seleção resultaram em uma coleção de 19 estudos, mostrou que a pressão de sangue também não foi influenciada pelo genótipo *ECA*AluD/AluD* (diferença da média ponderada = 0,5mmHg [Intervalo de Confiança de 95%: -0,5 - 1,8]). Em 2005, uma revisão sobre as bases genéticas da hipertensão arterial humana, publicada por AGARWAL e colaboradores (2005) listou 26 estudos da associação, nos quais 12 publicaram resultados positivos enquanto que 14 apresentaram resultados negativos.

Esse cenário talvez seja um reflexo de um impacto genético, discreto e variável, que o polimorfismo Inserção/Deleção do segmento *Alu*, no gene da *ECA*, tenha sobre a fisiopatologia da pressão arterial.

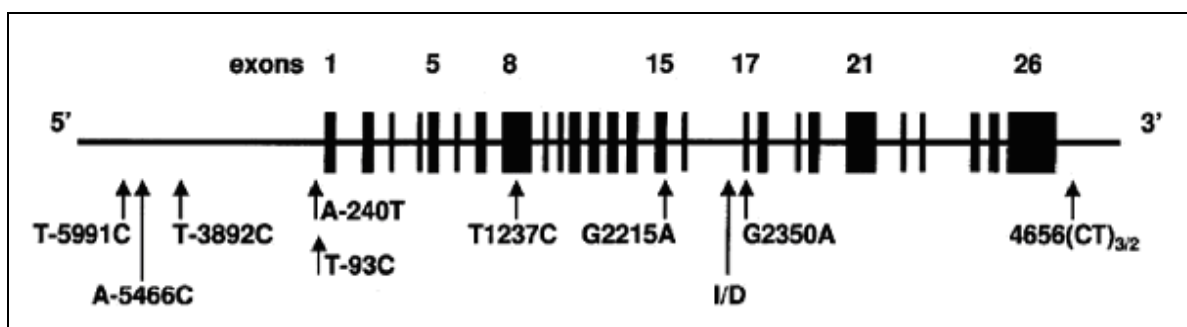


Figura 1.6: Organização esquemática do gene enzima da conversora tipo 1 de angiotensina I. A disposição dos polimorfismos descritos neste gene está indicada pelas setas (SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2006).

1.3.4. Enzima Conversora tipo 2 de Angiotensina

Análise da sequência genômica da Enzima Conversora tipo 2 de Angiotensina, situada na região Xq22, mostrou que o gene possui 18 exons (DONOGHUE *et al.*, 2000, TIPNIS *et al.*, 2000). A expressão do gene da *ECA2* foi observada em diferentes tecidos, tais como: células do endotélio vascular, coração, rins (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000), trato gastrointestinal, cérebro e fígado (HARMER *et al.*, 2002).

Esta carboxipeptidase, formada por 805 aminoácidos, possui dois domínios: um hidrofóbico, próximo à região C-terminal que provavelmente atua na ancoragem desta

proteína na membrana plasmática; e o outro, de ação catalítica, localizado próximo a região N-terminal (BURRELL *et al.*, 2004). Inicialmente, a única função catalítica associada a ECA2 foi a conversão de Ang I em um peptídeo de função desconhecida, denominado Ang 1-9 (DONOGHUE *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que o sítio ativo desta proteína também atua na remoção de um resíduo de fenilalanina, na posição C-terminal, da Ang II, convertendo-a em um peptídeo, de ação vasodilatadora, denominado Ang 1-7. Estudos *in vitro* mostraram que a ECA2 possui maior afinidade pela Ang II, quando comparada com a Ang I, evidenciando que a sua principal função é a produção de Ang 1-7. Com base nestes fatos, sugere-se que a ECA2 atue como um limitador da ação vasoconstritora da Ang II, ou através da sua inativação, ou pela ação agonista da Ang 1-7 (BURRELL *et al.*, 2004).

A elucidação da ação fisiológica exercida pela ECA2 no SRAA, e a recente identificação de seu gene, estimularam a realização de estudos para averiguar a influência de variantes polimórficas no gene *ECA2* e diferentes patologias cardiovasculares. Desde então, mais de 100 polimorfismos já foram descritos, sendo a maioria em regiões intrônicas (Figura 1.7). Estudos recentes indicaram associação entre as variantes *ECA2**1075G, *ECA2**8790G com o infarto do miocárdio e doenças coronarianas (YANG *et al.*, 2006) e com a hipertrofia ventricular esquerda (LIEB *et al.*, 2006). Entretanto, resultados conflitantes têm sido descritos para a hipertensão arterial (BENJAFIELD *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005; LIEB *et al.*, 2006). Até o momento, ainda é desconhecido a função exercida pelos polimorfismos avaliados neste gene.

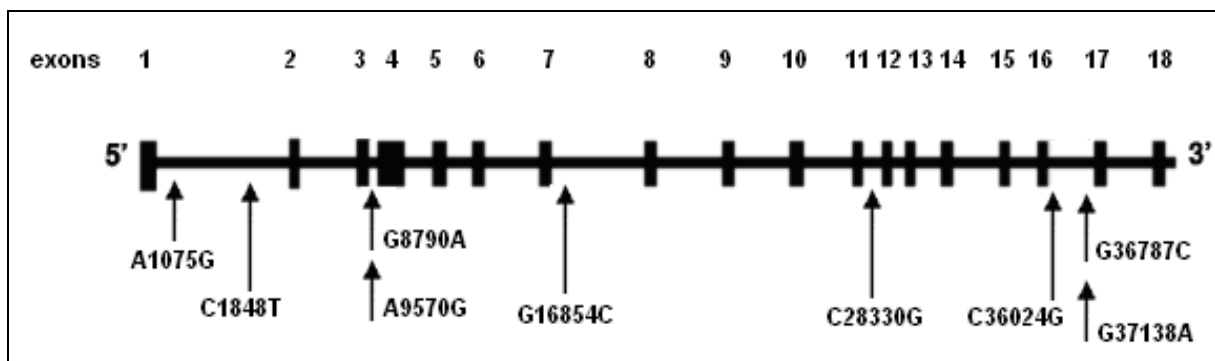


Figura 1.7: Organização esquemática do gene da enzima conversora tipo 2 de angiotensina. As localizações de alguns polimorfismos estão indicadas pelas setas. (adaptado de BENJAFIELD *et al.*, 2004 e CHIU *et al.*, 2004).

1.3.5. Receptores de Angiotensina II

Os receptores de angiotensina II atuam como mediadores das funções de vasoconstrição/vasodilatação e do transporte de sódio (nos rins), e por este motivo seus genes são importantes candidatos no controle da pressão arterial. Até o momento já foram identificados dois subtipos de receptores para a Ang II: o receptor tipo 1 de angiotensina II (AT₁) e o receptor tipo 2 de angiotensina II (AT₂) (CLAUSER *et al.*, 1996).

O gene do receptor tipo 1 de angiotensina II (*AGTR*₁), localizado na região q23 do cromossomo 3, (DORIA *et al.*, 1994), é composto por 5 exons, distribuídos por uma região de 55 kb de comprimento (Figura 1.8). Um grande número de polimorfismos foi descrito neste gene. BONNARDEAUX e colaboradores (1994) realizaram um estudo caso-controle e examinaram a associação entre polimorfismos no gene do *AGTR*₁ (T573C, A1062G, A1166C, G1517T e A1878G) e a hipertensão arterial primária. Dos polimorfismos analisados, somente a substituição de uma adenina por uma citosina, na posição 1166 na região 3'-não traduzida do gene, foi observada com frequência significativamente elevada entre pacientes hipertensos. Esta associação também foi observada em indivíduos com hipertensão severa (BONNARDEAUX *et al.*, 1994; KAINULAINEN *et al.*, 1999), hipertensão de início precoce (BONNARDEAUX *et al.*, 1994) e hipertensão na gestação (NALOGOWSKA-GLOSNIKA *et al.*, 2000). Esta associação foi confirmada por um estudo subsequente no qual observou-se que a combinação do alelo *AGTR*₁*1166C com a idade e o alelo *ECA***Alu*D contribuem para o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica (HENSSEN *et al.*, 2003). Entretanto, alguns estudos realizados em outras populações não detectaram a mesma associação entre o polimorfismo A1166C e a hipertensão arterial (SCHMIDT *et al.*, 1997), ou com a hipertensão em gestantes (TIRET *et al.*, 1998). Este polimorfismo também tem sido investigado em pacientes com doenças renais e cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda, alterações coronarianas. Sendo estes resultados também conflitantes (BOURTHIER *et al.*, 1985; LONDON *et al.*, 1990; FARRAR *et al.*, 1991; OIKE *et al.*, 1995; BENETOS *et al.*, 1996; AMANT *et al.*, 1997).

Apesar de inúmeros trabalhos demonstrarem a associação da variante 1166C com a hipertensão primária e outras doenças cardiovasculares, até o momento não se conhece o mecanismo fisiológico desta mutação. É possível que esta A¹¹⁶⁶->C esteja em desequilíbrio de ligação com alguma variante funcional, ainda não identificada. Alternativamente, este

polimorfismo pode estar associado com genes próximos responsáveis por essas associações com os fenótipos patológicos.

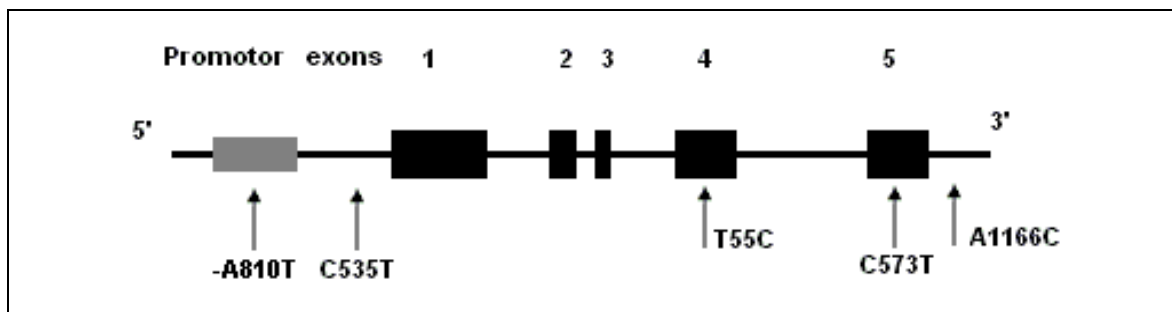


Figura 1.8: Organização esquemática do gene do receptor tipo 1 de angiotensina II. A disposição de alguns dos polimorfismos já identificados neste gene estão indicados por setas.

O gene do receptor tipo 2 de angiotensina II (*AGTR₂*) é expresso durante o período fetal e decai após o nascimento (SECHI *et al.*, 1992; SHANMUGAN *et al.*, 1995). Em adultos a expressão deste gene é restrita a poucos tecidos, sendo o seu RNA mensageiro detectado no coração, cérebro e na glândula adrenal (SHANMUGAN *et al.*, 1995; SHANMUGAN *et al.*, 1996). Durante anos, estudos indicavam que o AT₂ era responsável por ações como natriurese e vasodilatação, entretanto achados recentes mostraram que este receptor atua de forma contrária ao AT₁, regulando a sua atividade (SIRAGY & CAREY, 1999; CAREY *et al.*, 2000; CAREY *et al.*, 2001). Recentemente, estudos em modelo animal indicaram a importância do AT₂ na regulação da pressão arterial (GIGANTE *et al.*, 1998; TSUTSUMI *et al.*, 1999).

O gene *AGTR₂*, localizado no cromossomo X (KOIKE *et al.*, 1994), apresenta um comprimento de 5 kb que incluem 3 exons, elementos regulatórios no primeiro intron e a região promotora (MARTIN & ELTON, 1995; WARNECKE *et al.*, 1999). Inúmeras variantes polimórficas foram descritas neste gene, sendo que as mais estudadas foram aquelas que revelaram correlação com doenças cardiovasculares (Figura 1.9). A substituição da adenina pela citosina, no nucleotídeo 3123 do gene, apresentou significativa associação com a hipertrofia cardíaca em mulheres com cardiomiopatias (DEINUM *et al.*, 2001). Recentemente, ZHANG e colaboradores (2003) descreveram uma série de SNPs em diferentes regiões do gene *AGTR₂*, e mostraram que a mudança da timina pela citosina, na posição 13347 da região promotora, resulta na perda do sítio de ligação a

fatores de transcrição. Este achado foi associado positivamente com presença da hipertensão arterial em homens chineses (ZANG *et al.*, 2003) e no Reino Unido (ALFAKIH *et al.*, 2004).



Figura 1.9: Organização esquemática do gene do receptor tipo 2 de angiotensina II. As setas indicam a posição de algumas variantes polimórficas descritas para este gene.

1.3.6. Aldosterona e Aldosterona Sintetase

A aldosterona é um hormônio esteróide, sintetizado na zona glomerulosa do córtex da glândula supra-renal, cujo papel no rim é estimular a reabsorção de sódio e a secreção de potássio e hidrogênio, agindo principalmente no tubo coletor. Os efeitos da aldosterona sobre a reabsorção de sódio causam: (1) hipernatremia, aumento da osmolaridade plasmática, com conseqüente estimulação da secreção; (2) liberação do hormônio natriurético e (3) maior absorção de água nos túbulos contornados distais e ductos coletores. Paralelamente, a elevação da osmolaridade plasmática produz maior ingestão hídrica. Secundariamente a esses efeitos, verifica-se aumento do volume do líquido extracelular, do volume sanguíneo, do débito cardíaco e da pressão arterial. A extirpação cirúrgica, experimental ou por qualquer processo patológico, do córtex adrenal determina os efeitos opostos: diminuição da reabsorção de sódio (hiponatremia) e queda na secreção de potássio (hipercalemia), com conseqüente queda do volume do líquido extracelular e hipotensão arterial (MIGLIORINI, 1999).

A produção da aldosterona é regulada por múltiplos fatores, entre os mais importantes destacam-se: (1) o sistema renina-angiotensina, cuja ativação resulta na liberação da angiotensina II que estimula a síntese da aldosterona; e (2) por íons de potássio, cujo aumento no sangue também estimula a síntese do esteróide alvo. A

biossíntese da aldosterona envolve várias etapas catalisadas por enzimas específicas, dentre as quais destaca-se a aldosterona sintetase (CYP11B2), uma isozima responsável pelos últimos estágios de conversão de corticosteróide para aldosterona (Figura 1.10) (ARAI *et al.*, 2002).

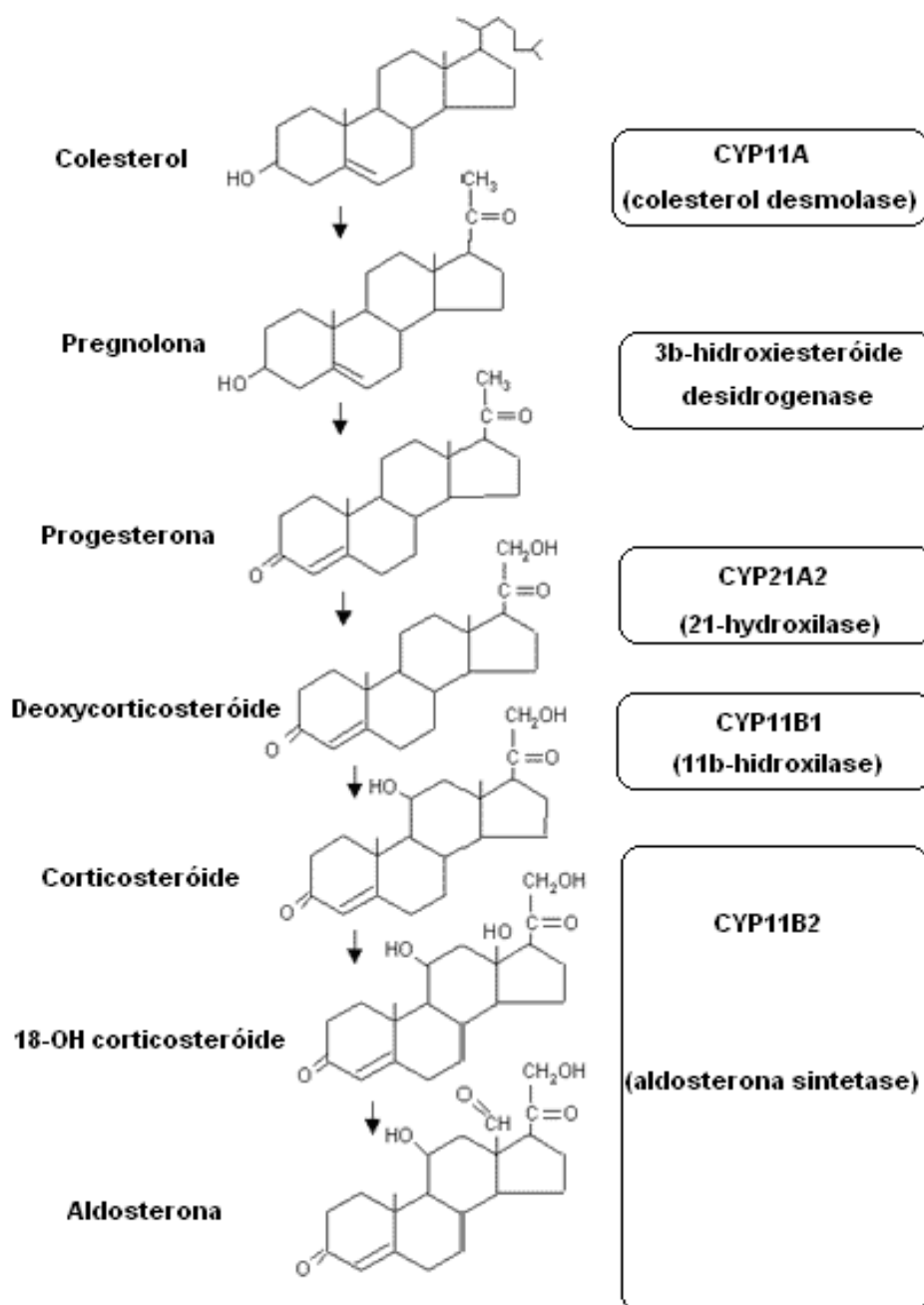


Figura 1.10: Via metabólica da biossíntese de aldosterona. As enzimas envolvidas nesse processo estão indicadas no lado direito da figura (ARAI *et al.*, 2002).

O gene da aldosterona sintetase foi mapeado no braço longo do cromossomo 8 (região 8q21-q22) (CHUA *et al.*, 1987) e apresenta 9 exons dispersos por uma região de aproximadamente 8 kb (Figura 1.11) (MORNET *et al.*, 1989). Entre os polimorfismos descritos para este gene, destacam-se as variantes denominadas C344T, A2713G e T4986C, associadas com a hipertensão arterial primária em diferentes populações (FARDELLA *et al.*, 1996; BRAND *et al.*, 1998; LIM *et al.*, 2002) e com níveis alterados de aldosterona (DAVIES & KENYON, 2003; NICOD *et al.*, 2003). O polimorfismo C344T, situado na região promotora do gene CYP11B2, interrompe o sítio de ligação do fator de transcrição chamado Fator Esteróide tipo 1 (SF-1) (WHITE & SLUTSKER, 1995). Trabalhos prévios mostraram um incremento de 4 vezes na ligação do SF-1 com o alelo CYP11B2*344C, que pode resultar numa taxa de transcrição alterada. O polimorfismo CYP11B2*A2713G, presente no exon 3, acarreta numa mudança de lisina para arginina na posição 173 da proteína (BRAND *et al.*, 1998). Esta variação foi relacionada com a hipertensão, por diminuir a concentração de renina, em pacientes chilenos e japoneses (FARDELLA *et al.*, 1996; KOMIYA *et al.*, 2000). Entretanto, a transição 4986 T → C no exon 7, causando uma mudança de valina por alanina na posição 386 da proteína, ainda não foi relacionada com nenhuma patologia cardiovascular (POJOGA *et al.*, 1998; KUMAR *et al.*, 2003).

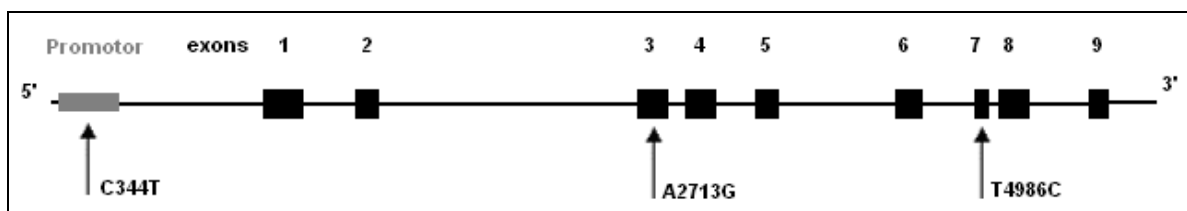


Figura 1.11: Organização esquemática do gene da aldosterona sintetase. As setas indicam a posição de algumas variantes polimórficas descritas para o gene CYP11B2.

1.3.7. Receptor de Mineralocorticóide

O receptor de mineralocorticóide (RM) é um fator de transcrição ligante-dependente, que se torna ativo quando associado a hormônios esteróides, principalmente a aldosterona (ARRIZA *et al.*, 1987; RODDERSON & FULLER, 2000). Uma vez formado o complexo receptor-esteróide, este migra para o núcleo onde interage com sítios de ligação específicos do DNA, regulando a transcrição de RNA mensageiro e

proporcionando um aumento na produção de proteínas indutoras. Essas proteínas têm dois efeitos fisiológicos primários: (1) estimulam a secreção ativa primária de H^+ pela membrana luminal e (2) estimulam diretamente a permeabilidade ao sódio da membrana luminal (por aumento da síntese e ou da incorporação de canais de sódio na membrana e por aumento do suprimento de energia pela mitocôndria). O aumento da permeabilidade ao sódio da membrana luminal resulta em uma elevação da concentração celular de sódio (Na^+). O aumento desta estimula a atividade da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral, aumentando a reabsorção de sódio e a concentração intracelular de potássio. A estimulação do transporte de sódio torna a carga da luz tubular mais negativa. O aumento da concentração intracelular de potássio e a negatividade luminal determinam uma elevação da secreção de potássio. Através deste mecanismo, a aldosterona, juntamente com o receptor de mineralocorticóide, contribuem para a manutenção do volume e osmolaridade do líquido extracelular (AIRES, 1999).

O descompasso no complexo RM-Aldosterona acarreta inúmeras patologias, tais como resistência a mineralocorticóide (ZENNARO, 2004), distúrbios no sistema nervoso (DE KLOET *et al.*, 1998), hipertensão (LIFTON *et al.*, 2001) e deficiência cardíaca (PITT, 2004). Por este motivo o gene do receptor de mineralocorticóide se tornou um alvo em potencial para rastrear as possíveis variantes genéticas que possam contribuir para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares. O gene do receptor de mineralocorticóide (Figura 1.12), localizado na região 4q31.1 (MORRISON *et al.*, 1990), apresenta 10 exons e ocupa uma região de 450kb (ZENNARO *et al.*, 1995). O *RM* possui duas regiões promotoras que proporcionam a transcrição alternativa de sua região codificante, dando origens a isoformas de mRNA conhecidas como $hRM\alpha$ e $hRM\beta$. Os dois promotores estão situados entre os exons 1 α e 1 β , que não são traduzidos e cujas funções estão relacionadas com o controle transcricional (ZENNARO *et al.*, 1997). Desde a clonagem do gene *RM*, inúmeras variantes moleculares já foram descritas para este gene, sendo algumas relacionadas com diferentes fenótipos de hipertensão, que seguem o padrão de doenças monogênicas, tais como a hipertensão exacerbada pela gravidez (GELLER *et al.*, 2000), Síndrome do Pseudoaldosteronismo (LUFT, 2004), e Síndrome de Liddle (LUFT, 2004). Apesar de mutações descritas no gene *RM* serem responsáveis por distúrbios hipertensivos monogênicos, nenhuma apresentou relação com a hipertensão arterial primária nas populações avaliadas (POCH *et al.*, 2001).

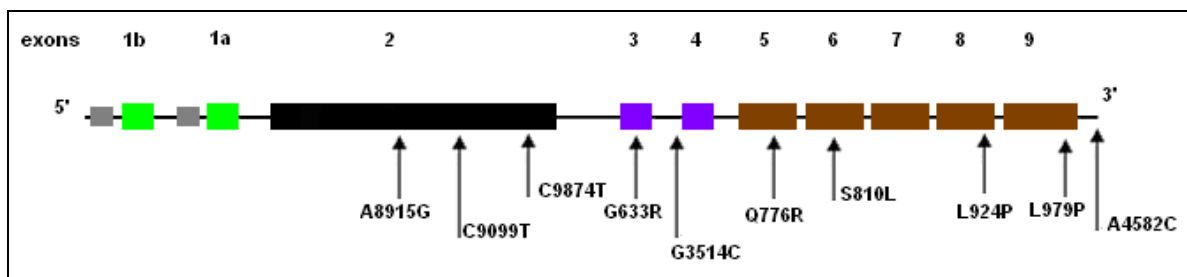


Figura 1.12: Organização esquemática do gene do receptor de mineralocorticóide. As setas indicam a localização de alguns polimorfismos. Boxes cinza = regiões promotoras, boxes azuis = domínio de ligação ao DNA, boxes marrons = domínio de ligação do esteróide (TALLEC & LOMBÈS, 2005).

1.4. FATORES AMBIENTAIS E ANTROPOMÉTRICOS QUE INFLUENCIAM A VARIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Vários fatores implicados no aumento da pressão arterial já foram claramente identificados. São exemplos destes: obesidade, consumo exagerado de álcool, consumo aumentado de sal, idade, sedentarismo, entre outros. O reconhecimento desses fatores de risco pode levar a um diagnóstico precoce e a instalação de medidas de prevenção não-farmacológicas.

1.4.1. Atividade Física

O risco de desenvolvimento da hipertensão arterial em indivíduos sedentários é em torno de 20 a 50% (NEGRÃO *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2005). Análises recentes evidenciaram que a atividade física regular promove uma redução média de 3,38mmHg da pressão arterial sistólica, e de aproximadamente 2,72mmHg na diastólica, em indivíduos normotensos e hipertensos, independente da redução de peso (WHELTON *et al.*, 2002).

Os mecanismos envolvidos na queda da pressão arterial em indivíduos hipertensos parecem estar relacionados com fatores hemodinâmicos, neurais e humorais. Humanos hipertensos treinados apresentam redução da pressão arterial de repouso associada a diminuição da atividade simpática periférica e/ou do débito cardíaco (JENNINGS *et al.*, 1986; HAGBERG *et al.*, 1989; VERAS-SILVA *et al.*, 1997). Nesse aspecto, a normalização do tônus simpático cardíaco exacerbado estaria associada a bradicardia de repouso e, conseqüentemente, a redução do débito cardíaco (GAVA *et al.*, 1995; VERAS-

SILVA *et al.*, 1997). Além disso, o treinamento físico melhora o prejuízo da sensibilidade dos pressorreceptores, observado em humanos e animais hipertensos (BRUM *et al.*, 2000; O'SULLIVAN & BELL, 2000). Alguns estudos em humanos vêm demonstrando alterações de fatores humorais associadas à redução da pressão arterial, entre eles a produção de substâncias vasoativas, como peptídeo natriurético atrial (KINOSHITA *et al.*, 1991). A redução da noradrenalina plasmática em hipertensos treinados sugere ainda uma diminuição da atividade nervosa simpática nesses indivíduos (KOMIYAMAY *et al.*, 1997).

Todavia, é importante enfatizar que a redução dos níveis pressóricos de indivíduos hipertensos não é um achado universal (FUCHS *et al.*, 2001a), sugerindo que existem populações mais ou menos responsivas ao exercício físico.

1.4.2. Climatério

Os efeitos decorrentes do climatério na pressão arterial são difíceis de serem avaliados, já que sofrem influência de diversos fatores, tais como envelhecimento, índice de massa corporal, e tabagismo (IRIGOYE *et al.*, 2003). No entanto, observa-se que a pressão arterial é mais elevada em homens do que em mulheres até a faixa de 45 anos (STAMLER *et al.*, 1976; AUGUST & OPARIL, 1999). Após essa fase, a pressão arterial (particularmente a sistólica) aumenta nas mulheres e a hipertensão torna-se mais prevalente (STAMLER *et al.*, 1976) ou, pelo menos, igualmente prevalente em homens e mulheres, sugerindo que os hormônios ovarianos podem ser responsáveis pela pressão arterial mais baixa em mulheres pré-climatério e também pelo aumento da pressão arterial em mulheres na menopausa (STAESSEN *et al.*, 1997).

1.4.3. Consumo de Bebidas Alcoólicas

Estudos epidemiológicos têm demonstrado associação entre hipertensão arterial e consumo de álcool, sendo considerada uma causa comum de elevação reversível da pressão arterial. A contribuição do álcool sobre a prevalência de hipertensão arterial na população varia de acordo com a quantidade ingerida e da população em estudo. O consumo de doses superiores a 30g de etanol (4oz de vinho = 10,8g etanol; 12oz de cerveja = 13,2g etanol; 1,5oz de cachaça = 15,2g de etanol) por dia está relacionado a aumento da

pressão arterial (CUSHMAN, 2001; FUCHS *et al.*, 2001b); a abstinência, ao contrário, diminui os níveis pressóricos. Diversos mecanismos vêm sendo aventados para explicar a plausibilidade biológica da associação entre hipertensão e alcoolismo. Além do estresse, tem sido proposta a elevação das catecolaminas como explicação (KAYSEN & NOTH, 1984). Sabe-se, entretanto, que o álcool interfere na ativação do sistema nervoso central e autônomo (simpático) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (CLARK, 1984); e, além disso, a baixa absorção de sódio observada nos consumidores ativos de álcool pode ser um mecanismo adicional para o desenvolvimento da hipertensão arterial (LIMA *et al.*, 1999).

1.4.4. Etnia

A hipertensão arterial é uma doença de expressiva prevalência em populações de origem africana, quando comparada com outras populações étnicas (BURT *et al.*, 1998; LANDMAN & CRUICKSHANK, 2001). Por este motivo considera-se a etnia negra um importante fator de risco para esta doença. Porém, apesar de relatos epidemiológicos indicarem uma estreita associação entre a etnia negra e a prevalência da HA, observa-se também que populações africanas da região do sub-Sahara apresentam baixas taxas de hipertensão (KAUFMAN & BARKLEY, 1993). A constatação destes dados epidemiológicos discrepantes propiciou a elaboração de duas teorias que associam a origem da correlação entre a etnia negra e a prevalência da HA a fatores genéticos de sensibilidade ao sódio e ao estresse de viver em uma sociedade sob pressões sócio - econômicas (GRIM *et al.*, 1995).

A teoria de evolução dos genótipos sal-sensível especula que durante o período de escravidão inúmeros africanos, retirados de seu habitat e enviados para as Américas e Europa, sofreram com as situações adversas, tais como: má alimentação, falta de higiene, umidade e calor excessivo. Além desses fatores, o desenvolvimento de doenças, como diarreia e doenças febris, também proporcionavam a perda de líquidos, sais minerais e conseqüentemente, o óbito. Portanto, esta situação adversa vivida pelos escravos impôs a necessidade fisiológica de absorver/conservar maiores quantidades de sódio. Como conseqüência desta pressão seletiva houve o favorecimento daqueles que eram capazes de reservar sódio, o que proporcionou uma maior prevalência dos genótipos que conferem sensibilidade ao sal (sal-sensíveis). Esta sensibilidade ao sal está relacionada com o

incremento da captação de sódio e/ou no seu transporte renal, que desencadeia um maior influxo de sódio contra-regulado pelo lítio, em eritrócitos, baixa atividade da renina plasmática e maior conservação da sobrecarga de sódio (BARRETO *et al.*, 1993). As gerações atuais (afro-descendentes), oriundas dos escravos sobreviventes, podem ter herdado este caráter. A sensibilidade ao sódio associada a uma dieta rica em sal favorece a elevação da pressão arterial, e conseqüentemente a elevação da prevalência da HA entre afro-descendentes (GRIM *et al.*, 1995).

A teoria do estresse social sugere que padrões neuroendócrinos induzidos pelo estresse psicossocial experimentado pelos afro-descendentes, bem como seus antepassados escravos, contribuíram também para o aumento da pressão arterial devido a indução do sistema nervoso simpático, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e mudanças estruturais vasculares (GRIM *et al.*, 1995).

1.4.5. Ingesta de Sódio

Diversos autores têm apontando para o papel preponderante da ingestão de sal na determinação da elevação da pressão arterial (DE WARDENER & MAC GREGOR, 2002). Entretanto, comparações entre diferentes populações sob vários graus de ingestão de sódio na dieta torna-se um pouco confusa, em decorrência dos inúmeros fatores potencialmente relacionados aos níveis de pressão arterial e ao sódio, como a própria heterogeneidade populacional (GROBEE, 1994).

O desenvolvimento da hipertensão determinado pelo consumo de sal é favorecido, inicialmente, à retenção de sódio e ao conseqüente aumento de volemia. Este processo contribui de forma significativa para elevações no débito cardíaco e da pressão arterial (COLEMAN & GUYTON, 1969).

1.4.6. Obesidade

Estudos transversais e prospectivos evidenciaram que a obesidade é associada a níveis pressóricos mais elevados, e que o ganho de peso que acompanha o envelhecimento é um importante fator de predição para o desenvolvimento de hipertensão (HUBERT *et al.*, 1983; STEVENS *et al.*, 1998; MIKHAIL *et al.*, 1999). De fato, trabalhos demonstram que a redução de peso corporal está freqüentemente associada à redução dos níveis pressóricos

(MACMAHON & MACDONALD, 1987; GORDON *et al.*, 1997), confirmando o papel da obesidade na fisiopatologia da hipertensão. Além disso, a obesidade é a alteração fisiológica mais comum na síndrome metabólica, que inclui também hipertensão arterial, dislipidemia, e alterações no metabolismo da glicose, sendo a hiperinsulinemia secundária a resistência à insulina um possível mecanismo fisiopatológico para explicar a presença de hipertensão nessa situação (REAVEN *et al.*, 1996). Em uma revisão recente, por meio da análise de vários estudos experimentais e clínicos, ROCCHINI (2002) conclui que a hipertensão em obesos está associada à retenção de fluidos. Entre os fatores que podem alterar as curvas de função renal em indivíduos obesos estão: resistência à insulina, alterações estruturais renais, alterações na estrutura e função vascular, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, ativação do sistema nervoso simpático e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A resistência à insulina pode resultar em retenção crônica de sódio, já que a insulina promove reabsorção de sódio no túbulo renal, estimula o sistema nervoso simpático e facilita a responsividade adrenal à angiotensina II na secreção da aldosterona (ROCCHINI *et al.*, 1990). Além disso, a insulina, em indivíduos normais, promove vasodilatação; todavia, em indivíduos com resistência à insulina, a resposta endotelial de vasodilatação mediada pela insulina apresenta-se atenuada (BARON *et al.*, 1995). As alterações estruturais renais em obesos consistem de acúmulo de gordura nos rins, o que acaba por induzir compressão e aumento da pressão hidrostática nesse tecido, levando ao aumento da fração de reabsorção tubular (HALL *et al.*, 1998).

É importante salientar que o aumento do tecido adiposo *per se* pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão, já que os adipócitos são capazes de produzir angiotensinogênio (FREDERICH *et al.*, 1992), catepsinas D e G – envolvidas na síntese de angiotensina II (KARLSSON *et al.*, 1998), inibidor do ativador do plasminogênio 1 – fator pró-trombótico (LUNDGREN *et al.*, 1996), fator de necrose tumoral – marcador de risco cardiovascular elevado (SAMAD *et al.*, 1999) e leptina – estimulador do sistema nervoso simpático (FLIER, 1998). Além disso, estudos recentes vêm demonstrando a associação do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina I (DENGEL *et al.*, 2002, LEE & TSAI, 2002), da eNOS (CHEN *et al.*, 2001), da leptina (SHINTANI *et al.*, 2002), do receptor beta(3)-adrenérgico (STRAZZULLO *et al.*, 2001) entre outros, com fatores determinantes da síndrome metabólica.

1.4.7. Tabagismo

O ato de fumar um cigarro causa elevação transitória da pressão arterial, sendo a duração do efeito na elevação dos níveis pressóricos influenciada pelo número de cigarros consumidos por dia. Estudos experimentais em humanos e animais têm demonstrado que o mecanismo pelo qual o tabagismo promove essas alterações está associado ao efeito da nicotina sobre a liberação de catecolaminas neuronais e das suprarrenais, os quais aumentam a frequência cardíaca, o volume sistólico e a contratilidade miocárdica, promovendo vasoconstrição sistêmica e aumento de fluxo para a musculatura esquelética. A nicotina atua sobre o eixo hipotálamo-hipófise, estimulando a secreção do fator liberador de corticotrofina e aumentando os níveis de endorfina, hormônio adrenocorticotrófico, vasopressina e corticosteróides proporcionalmente à concentração plasmática alcançada (BENOWITZ *et al.*, 1984; BANG *et al.*, 2000). Outro importante efeito da nicotina sobre o sistema cardiovascular está relacionado à alteração da função endotelial, demonstrada em estudos de complacência venosa de veia dorsal da mão em tabagistas. Também a administração de nicotina transdérmica (adesivos) em não-tabagistas ou tabagistas de grau leve pode causar disfunção endotelial (SABHA *et al.*, 2000; TANUS-SANTOS *et al.*, 2001). Dessa forma, o tabagismo está associado à elevação persistente da PA e ao aumento da variabilidade pressórica (BENOWITZ *et al.*, 2002; HALIMI *et al.*, 2002).

1.5. APLICAÇÃO DA EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA NO ESTUDO DE DOENÇAS COMPLEXAS

A epidemiologia genética progrediu de sua abordagem inicial, analisando doenças mendelianas raras, para um estudo de patologias de características complexas. Esta vertente da Genética tem permitido o reconhecimento, ou até mesmo a elucidação, dos fatores envolvidos na expressão fenotípica de várias doenças genéticas complexas. Este é o caso de alguns distúrbios hipertensivos inicialmente considerados como complexos, mas que atualmente podem ser facilmente identificados através de marcadores moleculares (Tabela 1.2). Este grande passo só foi possível após uma intensa investigação multidisciplinar que permitiu a identificação e caracterização de polimorfismos genéticos envolvidos com alterações fisiológicas específicas.

Tabela 1.2: Doenças genéticas diagnosticadas com o auxílio de marcadores moleculares (KRIEGER *et al.*, 2004)

Doença	Características gerais	Locus	Gene	Polimorfismo
Aldosteronismo suprimível por glicocorticoide	Distúrbio caracterizado pelo desenvolvimento precoce da HA, hipocalcemia variável, supressão da atividade plasmática de renina e altos níveis dos esteróides 18-hidroxicortisol e 18-oxocortisol;	9q21-q22	CYP11B2 11-β-hidroxilase	Gene quimérico
	Caracterizada bioquimicamente pelo controle aberrante da aldosterona e dos esteróides pelo hormônio adrenocorticotrófico;			
Hipertensão exacerbada pela gravidez	Formação do gene híbrido pelo <i>crossing over</i> desigual entre o gene da aldosterona sintase e 11-β-hidroxilase (11-OHase), que possui a região regulatória do gene da 11-OHase e a porção codante proveniente do gene da aldosterona.	4q31.1	RM	S810L
	O gene quimérico tem padrão de expressão semelhante ao gene da 11-OHase e conseqüentemente pode ser controlado sob o estímulo dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico, que resultará em alterações na atividade enzimática da aldosterona sintase.			
	Mutação <i>missense</i> no domínio ligante do RM, que favorece a sua ativação por componentes que normalmente não o ativam, como é o caso da progesterona;			
	Durante o período gestacional, mulheres portadores do RM mutante desenvolvem a hipertensão, devido o aumento na concentração plasmática de progesterona.			

Tabela 1.2: Doenças genéticas diagnosticadas com o auxílio de marcadores moleculares - continuação (KRIEGER *et al.*, 2004)

Doença	Características gerais	Locus	Gene	Polimorfismo
Síndrome do excesso aparente de mineralocorticóide	Doença de expressão variável, com hipertensão de início precoce acompanhada por supressão da atividade da renina plasmática e ausência virtual de aldosterona circulante;	16q22	11 β -hidroxilase 17 α -hidroxilase	Arg 208Cis
				Arg208His
	Pacientes com esta síndrome têm um defeito na conversão de cortisol para cortisona devido à ausência da enzima 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenase;			Arg213Cis
				Arg278His
	“In vivo”, sabe-se que o cortisol apresenta concentração 100X maior que a aldosterona, contudo quase toda a ativação do RM está mediada pela aldosterona.			Pro227Leu
				Arg337Cis
	Esta observação sugere que a especificidade do RM pela aldosterona é mediada indiretamente, com a 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenase protegendo o RM do cortisol, metabolizando-o para cortisona, o qual não ativa o receptor;			Tir 299Del
	Na síndrome do excesso aparente de mineralocorticóide, a ausência desta enzima permite ao cortisol ativar o RM, resultando em hipertensão mediada pelo aumento da atividade dos canais epiteliais de sódio.			Arg337His
				Tir338Del
Síndrome de Liddle	A presença de mutações <i>missense</i> promove a perda do segmento citosólico do canal epitelial de sódio, resultando num aumento de sua atividade;	16p13-p12	β -subunidade	Tre594Met
	A excessiva reabsorção de sódio pelo canal de sódio favorece o desenvolvimento precoce da hipertensão arterial.	16p13-p12	γ -subunidade	G104T, C649G

Contudo, para a maioria das doenças complexas, como a hipertensão arterial primária, distúrbios cardiovasculares, doenças infecciosas e certas neoplasias, é difícil estabelecer quais fatores estão contribuindo para o seu surgimento e evolução. Diante disso, a aquisição de informações precisas sobre a seqüência de genes ao longo do genoma humano e de outros organismos, tornou-se primordial no interesse da epidemiologia genética para desvendar a natureza dos fatores que influenciam essas características. Entretanto, esses parâmetros têm-se mostrado muito mais desafiadores e as esperanças de grandes avanços foram frustradas, principalmente devido ao pequeno efeito de cada uma de suas múltiplas causas, e pelo fato de que os métodos planejados para detectar genes com efeitos significativos terem se mostrado insuficiente. Porém, apesar de os efeitos individuais dos genes serem relativamente pequenos, as interações entre esses genes e outros genes e o meio ambiente podem contribuir significativamente para o desvendamento dessas características.

Quanto à hipertensão arterial primária, observa-se um grande número de trabalhos guiados por marcadores moleculares, descritos em genes de sistemas fisiológicos envolvidos no controle da pressão arterial. O SRAA é um dos mecanismos que atua na homeostase pressórica, e conseqüentemente, seus genes são considerados importantes candidatos na investigação da suscetibilidade genética a hipertensão arterial. Dentre os polimorfismos descritos nos genes do SRAA destacam-se o *AGT**M235T, *ECA***Alu*/D, e *CYP11B2**C344T, por estarem envolvidos com disfunções fisiológicas específicas. Entretanto, observamos que os resultados provenientes dos estudos de epidemiologia genética têm sido conflitantes, em diferentes populações (SCHMIDT *et al.*, 1993; KASSILIKIOTI *et al.*, 1996; METTIMANO *et al.*, 2001; AGACHAN *et al.*, 2003; CASTELLANO *et al.*, 2003). As justificativas para este cenário contrastante são múltiplas: (1) a análise de um único *locus*, ao invés da investigação de vários *loci*; (2) a contribuição variável dos polimorfismos para a expressão da doença; (3) a interação gene-gene; e (4) a influência de fatores ambientais.

Certamente, a investigação simultânea de diferentes genótipos desfavoráveis, combinada com a análise de fatores não-genéticos (ambientais) de risco, é a abordagem mais apropriada para o estudo de doenças multifatoriais, pois pode auxiliar na investigação dos principais parâmetros que estão contribuindo para o desenvolvimento desta doença, em uma certa população.

2 - OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Uma vez estabelecida a existência e a importância de fatores de risco ambientais e genéticos para o desenvolvimento da hipertensão arterial primária, surge a necessidade de que esses tais fatores sejam corretamente identificados e validados para as populações brasileiras.

Para tanto estabelecemos como objetivos gerais avaliar: (1) a potencialidade de múltiplos fatores antropométricos, tais como gênero, idade, etnia, índice de massa corporal, consumo de fumo e de bebidas alcoólicas, e (2) os polimorfismos específicos descritos para os genes do angiotensinogênio (*AGT**M235T), da enzima conversora de angiotensina I (*ECA***Alu*/D), do receptor tipo 1 de angiotensina II (*AGTR*₁*A1166C), da aldosterona sintetase (*CYP11B2**C344T) e do receptor de mineralocorticóide (*RM**G3514C e *RM**A4582C) para o desenvolvimento do quadro hipertensivo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as principais variáveis antropométricas relacionadas com a hipertensão arterial nas populações do Rio de Janeiro/RJ e de Santa Isabel do Rio Negro/AM;
- Caracterizar o perfil genético, para os polimorfismos *AGT**M235T, *ECA***Alu*/D, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T, *RM**G3514C e *RM**A4582C, dos pacientes hipertensos e de indivíduos normotensos dos municípios do Rio de Janeiro e de Santa Isabel do Rio Negro/AM;
- Verificar dentre os polimorfismos genéticos estudados, quais estão associados com a hipertensão arterial nas populações do Rio de Janeiro/RJ e de Santa Isabel do Rio Negro/AM;
- Verificar se o perfil genético e os fatores antropométricos associados contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial;
- Verificar se a presença cumulativa de fatores genéticos de risco está relacionada com o aumento da gravidade do quadro hipertensivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AVALIAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Primeiramente, o projeto de pesquisa foi encaminhado à análise do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras (INCL). Após a sua aprovação (Anexo 1), o projeto foi enviado para avaliação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que também emitiu parecer favorável (Anexo 2).

Com a aprovação do projeto de pesquisa, a equipe multidisciplinar do Setor de Hipertensão Arterial-INCL contactou os pacientes hipertensos cadastrados para uma revisão clínica. Nesse momento, os pacientes foram informados do estudo e os que se mostraram interessados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a investigação genética (Anexo 3). A mesma conduta foi adotada com os normotensos, que neste caso, eram funcionários do INCL. Estes voluntários, ao tomarem conhecimento do trabalho que seria realizado e da necessidade de se formar um grupo controle, consentiram em participar do estudo que se iniciava.

Em paralelo, uma equipe multidisciplinar do Departamento de Medicina Tropical – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) coletou dados clínicos (Anexo 4) e amostras biológicas (sangue) dos moradores do município de Santa Isabel do Rio Negro/Amazonas, que concordaram em participar do estudo. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a realização da investigação genética (Anexo 3).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESTUDO

Neste estudo, analisamos o perfil genético de polimorfismos presentes nos genes do sistema renina–angiotensina–aldosterona, e as características antropométricas de indivíduos normotensos e hipertensos, provenientes do município do Rio de Janeiro (Grupo I) e de Santa Isabel do Rio Negro (Grupo II).

GRUPO I: Formado por 106 pacientes com hipertensão primária resistente a medicamentos, e 115 indivíduos normotensos. Os pacientes hipertensos severos foram selecionados no ambulatório de Hipertensão Arterial do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras/Rio de Janeiro, onde fazem acompanhamento clínico (Figura 3.1). A amostra de normotensos

foi formada por profissionais do INCL, que voluntariamente participaram desse estudo. Todos os participantes do Grupo I passaram por avaliações clínico-laboratoriais, que possibilitaram a exclusão de casos de hipertensão secundária na amostra de pacientes, e de qualquer tipo de hipertensão na amostra controle.



Figura 3.1: Mapa geográfico do Brasil. Os municípios de Santa Isabel do Rio Negro e do Rio de Janeiro estão indicados por pontos.

GRUPO II: Os indivíduos deste grupo, formado por 160 pessoas provenientes do município de Santa Isabel do Rio Negro (Figura 3.1), foram selecionados pela Técnica de Amostragem Sistemática por Conglomerado. Nesta abordagem, os domicílios foram considerados como unidade amostral, sendo que a cada cinco domicílios, um era o escolhido para ser visitado. Em cada casa, o primeiro morador que preenchesse os critérios para hipertensão era convidado a participar. Na próxima casa selecionada da amostra era convidado a participar o primeiro morador examinado normotenso, que preenchesse os demais critérios de estudos. Todos os participantes do estudo foram examinados pelo médico-chefe da equipe multidisciplinar do Departamento de Medicina

Tropical/FIOCRUZ, para afastar a possibilidade de casos de hipertensão arterial secundária. Aqueles participantes em que não se podia afastar esta possibilidade eram excluídos da investigação. A avaliação clínica detectou 82 indivíduos hipertensos primários e 78 normotensos. Os indivíduos hipertensos não faziam uso de medicamentos para o controle da pressão arterial, até o momento da nossa avaliação.

3.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA

Os integrantes dos grupos I e II foram clinicamente avaliados por médicos cardiologistas do INCL (Anexo 5) e do Departamento de Medicina Tropical/FIOCRUZ, respectivamente, seguindo um *check-list* apropriado (Anexos 4).

3.3.1. Critérios de Inclusão/Exclusão

Tabela 3.1: Critérios de inclusão/exclusão adotados no presente estudo.

Parâmetros	Normotenso	Hipertensão estágio 1	Hipertensão estágio 2
Idade	≥ 30 anos	≥ 30 anos	≥ 30 anos
Histórico familiar para doenças coronarianas	ausente	presente	presente
Níveis pressóricos	<139/89mmHg	140/90-159/99mmHg	160/100 – 179/109mmHg
Terapia antihipertensiva	ausente	presente	três drogas antihipertensivas (incluindo um diurético)
Hipertensão secundária	ausente	ausente	ausente

3.3.2. Determinação dos Níveis Pressóricos

A medida da pressão arterial obedeceu algumas regras a fim de evitar erros na avaliação, seja para mais ou para menos. Por esse motivo, a determinação do nível pressórico foi realizada por um único médico, obedecendo algumas regras básicas: repouso de 5 minutos antes de medir a pressão; medição em local confortável, sentado e/ou deitado, com braço apoiado, no mesmo nível do coração; uso de aparelho adequadamente calibrado. Além disso, o avaliador certificou-se que o paciente não estava com a bexiga cheia, não

praticou exercícios físicos, não ingeriu bebidas alcoólicas, café, alimentos, ou fumou até 30 minutos antes da medida. Após dois minutos, realizou-se uma segunda aferição. A pressão arterial de cada indivíduo foi determinada pela média das duas aferições realizadas na mesma consulta. De acordo com o valor médio da pressão arterial, os indivíduos foram classificados como sendo portadores ou não da hipertensão arterial (Tabela 3.1). Para tanto se utilizou o critério da Sociedade Brasileira de Cardiologia, que considera hipertensão valores pressóricos iguais ou superiores a 140 x 90mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2002).

Os equipamentos utilizados para aferição da pressão arterial foram o esfigmomanômetro zero-randômico *Hawksley*, com manguito padrão para adulto (23 por 12mm) devidamente calibrado e estetoscópio *Littmann Cardiology*.

3.3.3. Classificação Étnica

Todos os participantes foram etnicamente classificados como sendo Caucasiano, Negróide, Caboclo (mestiço de branco com índio), Pardo ou Índio-Descendente. A determinação da etnia foi feita de acordo com a presença das características fenotípicas, tais como: cor da pele (branco, negro ou pardo), cor de cabelo (loiro, marrom claro, marrom médio, marrom escuro e preto), textura do cabelo (liso, ondulado, crespo), cor das linhas e da palma das mãos (palma rosa e linhas sem cor, palma rosa com linhas vermelhas, palma branca com linhas escuras), formato do nariz e lábios (FUCHS *et al.*, 2002).

3.3.4. Padronização do Consumo de Bebidas Alcoólicas e Fumo

O consumo exagerado de álcool foi considerado para indivíduos que ingerem de 30-40g, ou mais, de bebida alcoólica por dia (4oz de vinho = 10,8g etanol; 12oz de cerveja = 13,2g etanol; 1,5oz de cachaça = 15,2g de etanol). Aqueles que só relataram o consumo de álcool em “ocasiões sociais” foram classificados como não-consumidores de álcool.

Os participantes que consumiram mais de cinco cigarros por dia, por um período superior a um ano, foram classificados como fumantes. O consumo inferior a cinco cigarros, ou o não consumo, foi associado aos casos de não-fumantes.

3.3.5. Deteminação do Índice de Massa Corporal

O peso foi aferido em gramas através de balança portátil digital calibrada, e a altura, em centímetros, através de fita métrica invertida e posicionada a 50cm do piso, em parede plana. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pela fórmula:

$$IMC = \frac{peso(kg)}{altura^2(m^2)}$$

Os critérios de classificação do IMC foram os preconizados pela Organização Mundial da Saúde - OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Classificação do Índice de Massa Corporal

Peso	Valores de IMC
Baixo peso	IMC < 17,0
Adequado	18,5 ≤ IMC < 25,0
Sobrepeso I	25,0 ≤ IMC < 30,0
Sobrepeso II	30,0 ≤ IMC < 40,0
Sobrepeso III	IMC ≥ 40,0

3.3.6. Avaliação Laboratorial do Perfil Lipídico

Para a caracterização do perfil lipídico foram avaliados os níveis de colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol (colesterol contido nas lipoproteínas de alta densidade) e cálculo do LDL-colesterol (colesterol contido nas lipoproteínas de baixa densidade). Os níveis de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos foram determinados diretamente por química seca (VITROS 250), enquanto que o LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de FRIEDEWALD (1972). Os valores de referência adotados no presente estudo foram os recomendados pela III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Tabela 3.3; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

O estudo do perfil lipídico foi realizado no Laboratório Central do INCL. Esta análise não foi realizada nas amostras de Santa Isabel do Rio Negro devido a carência de infra-estrutura no local de coleta.

Tabela 3.3: Critérios de classificação de níveis lipêmicos.

Tipo	Classificação	Valores
Colesterol total	Desejável	Até 200mg/dl
	Limítrofe	De 200mg/dl até 240mg/dl
	Elevado	Acima de 240mg/dl
HDL-colesterol	Desejável	Mulheres > 50 anos e homens: acima de 35mg/dl Mulheres: acima de 45mg/dl
	Desejável	Até 130mg/dl
LDL-colesterol	Limítrofe	De 130mg/dl até 160mg/dl
	Elevado	Acima de 160mg/dl
	Desejável	Até 200mg/dl
Triglicerídios	Limítrofe	De 200mg/dl até 499mg/dl
	Elevado	Acima de 499mg/dl
	Desejável	Até 200mg/dl

3.4. AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR

3.4.1. Extração do DNA Genômico

A obtenção do DNA genômico, proveniente de células nucleadas do sangue periférico, foi feita pelo método salino (para amostras recém coletadas) ou por fenol-clorofórmio (para amostras antigas e congeladas). As amostras de sangue do Grupo I foram processadas pelo método salino, enquanto que as do Grupo II foram processadas pelo método de fenol-clorofórmio.

3.4.1.2. Extração do DNA Genômico pelo Método Salino

O DNA foi extraído a partir da camada de leucócitos, seguindo o protocolo salino descrito por MILLER e colaboradores (1998).

Para um volume de 5mL de sangue total, eram adicionados 10mL do tampão de lise de hemácias (NH₄Cl 155mM; KHCO₃ 10mM; EDTA 1mM, pH 7.4). Após a homogeneização por inversão, os tubos foram centrifugados a 1.000 rpm, durante 4 minutos, em centrífuga clínica (Excelsa 2, Modelo 205 – N [FANEM]). Ao término deste período, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5mL de tampão de lise de hemácias ao precipitado (células nucleadas). O material foi homogeneizado suavemente e

centrifugado por mais 4 minutos, a mesma velocidade. Esta etapa foi repetida por uma ou duas vezes, até que ocorresse a lise total das hemácias (precipitado claro). As células brancas purificadas foram ressuspensas em 1mL de tampão de lise de núcleo (Tris-HCl 10mM; NaCl 400mM; EDTA 2mM; pH 8.2). Em seguida foram adicionados 50µL de dodecil sulfato de sódio 10% e 34µL de proteinase K (20mg/mL). Após a homogeneização, essa solução foi incubada por 20 horas em banho de aquecimento, a 37°C (Banho-maria, B.M. 60 [TempTherm]). Após a digestão das proteínas, a cada amostra foi adicionado 400µL de NaCl saturado (5,6M) e o homogeneizado por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos, a 5.000rpm (Excelsa 2, Modelo 205 – N [FANEM]). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram acrescentados dois volumes de etanol absoluto gelado, para precipitação das fibras de DNA. Após a precipitação da molécula de DNA, esta foi transferida para um microtubo e centrifugado por 4 minutos a 14.000rpm (Microcentrifuga 5414C [Eppendorf]). O sobrenadante foi descartado e ao DNA foi adicionado cerca de 1mL de etanol 75% gelado. Centrifugou-se DNA por igual período. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o DNA foi ressuspenso em 500µL de TE 1X (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 7.4).

As amostras ressuspensas foram mantidas em banho de aquecimento (Banho-maria com circulação, NT-248 [Nova Técnica]) a 65°C, por 30 minutos, para a solubilização do DNA. Após essa etapa, as amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de 4°C.

3.4.1.2. Extração do DNA Genômico pelo Método Orgânico

O DNA foi extraído a partir da camada de leucócitos, seguindo o protocolo orgânico descrito por SAMBOOK & RUSSELL (2001).

A cada 100µL de sangue periférico total foram adicionados 3 volumes de tampão de lise de hemácias (item 3.4.1.2) e os microtubos contendo o homogeneizado foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos (Excelsa 2, Modelo 205 – N [FANEM]). Ao término desta fase, o sobrenadante foi descartado e novamente adicionou-se às células 300µL de tampão de lise de hemácias. O material foi homogeneizado suavemente e centrifugado por mais 10 minutos a mesma velocidade. Esta etapa foi repetida até que a lise total das células anucleadas. Ao final das lavagens, adicionou-se 300µL de tampão de

proteínase K (10mM Tris, 10mM EDTA, 10mM SDS 10%) ao precipitado. Essa mistura foi homogeneizada em vortex (Maxi Mix II, Type 37600 Mixer [ThermoLyne]), e em seguida adicionou-se 33 μ L de proteínase K (20mg/mL). As amostras foram incubadas por 20 horas em banho de aquecimento, a 37°C (Banho-Maria, B.M. 60 [TempTherm]). Após a digestão, a cada amostra foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na razão de 25:24:1 (INVITROGEN). As misturas foram homogeneizadas em vortex (Maxi Mix II, Type 37600 Mixer [ThermoLyne]), por 15 minutos, e posteriormente centrifugadas por mais 2 minutos a 14.000rpm (Microcentrifuga 5414C [Eppendorf]). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 30 μ L de acetato de sódio 3M. Após a homogeneização por inversão, foram acrescentados 3 volumes de etanol absoluto gelado para precipitação das fibras de DNA. O DNA foi centrifugado por 4 minutos a 14.000rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao DNA foi adicionado cerca de 1mL de etanol 75% gelado. Centrifugou-se DNA por igual período e sob as mesmas condições da etapa anterior. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o DNA foi ressuspensão em 300 μ L TE 1X.

Para solubilizar o DNA foi necessário mantê-lo em banho de aquecimento (Banho-maria com circulação, NT-248 [Nova Técnica]) a 65°C, por 30 minutos. Ao final deste período, as amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de 4°C.

3.4.2. Estimativa da Concentração de DNA

Para avaliar a quantidade do material extraído e estimar a concentração das amostras de DNA, estas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (GIBCO BRL) diluída em tampão TBE 1X (Tris 89mM [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH], ácido bórico 89mM [ISO FAR], EDTA 2mM [GIBCO BRL]). No preparo das amostras, 1 μ l da alíquota de DNA foi adicionado a 1 μ l de corante de corrida (azul de bromofenol 0,025% [SIGMA], xileno-cianol 0,025% [MERK], glicerol 30% [MERK]) e 8 μ l de água Milli-Q. A eletroforese foi realizada a 60V, por uma hora, em cuba horizontal (Horizon 58 – GIBCO BRL), usando-se como tampão de corrida TBE 1X. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,5 μ g/mL (SIGMA), por 10 minutos, e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (ImagenMaster® VDS – PHARMACIA BIOTECH).

A quantidade de DNA foi estimada através da comparação de sua intensidade com a de um marcador de peso molecular λ -DNA (GIBCO BRL), cuja concentração foi previamente estabelecida em 100ng e 200ng.

3.4.3. Análise dos Polimorfismos Genéticos

3.4.3.1. Análise Molecular do Polimorfismo M235T

O Polimorfismo de Fragmentos de DNA, obtidos por Enzimas de Restrição (RFLP), foi detectado em fragmento amplificado pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Desta forma, foi possível observar a transição Timina→Citosina (T → C), na posição 704, do exon 2, no gene do angiotensinogênio (Figura 3.2). Para a análise deste polimorfismo foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por RUSS e colaboradores (1993):

AGT_{senso} 5' - CAG GGG TGC TGT CCA CAC TGG ACC CC - 3'

AGT_{antisenso} 5' - CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T - 3'

As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 1μM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (Peltier-Effeci Cycling; Mj Research, Inc.). As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 90°C, por três minutos, seguida de 10 ciclos com três etapas: desnaturação a 94°C, por um minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 68°C, por um minuto, e extensão a 72°C, por 1 minuto. Posteriormente, foram realizados mais 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 90°C, por trinta segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 68°C, por um minuto, e extensão a 72°C, por trinta segundos. A extensão final foi conduzida a 72°C, por 10 minutos. Cinco microlitros do produto amplificado foram misturados com 1μL de corante de corrida e aplicados em gel de agarose 1,5%. A eletroforese transcorreu em cuba horizontal (Horizon 58 – GIBCO BRL), usando-se como tampão de corrida TBE 1X, a temperatura ambiente, com voltagem constante de 90V, por 50 minutos. Após o término da

eletroforese, gel foi corado em solução de brometo de etídeo (item 3.4.2), por 10 minutos, e os fragmentos de 165pb foram visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (ImagenMaster® VDS).

Após a amplificação da região alvo, as amostras foram preparadas utilizando-se uma alíquota de 4µL de produto da PCR, ao qual se adicionou 2U da enzima Tth 111I (GACN↓NNGTC [NEW ENGLAND-BIOLABS]), tampão de reação 1X (10mM Bis Tris Propano-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT). O volume final da reação foi de 10µL. A digestão enzimática do produto amplificado ocorreu em banho-maria a 65°C, por 12 horas. Dez microlitros do produto da digestão foram adicionados a 2,5µL de corante de corrida e a preparação foi aplicada no gel de poliacrilamida 10% não desnaturante, composto de 10% de poliacrilamida (acrilamida:bis acrilamida [29:1]), 1X TBE, 1% de Persulfato de Amônio e 0,1% de TEMED®. A eletroforese foi realizada em cuba vertical (SIGMA-ALDRICH), contendo TBE 1X, a uma voltagem constante de 250V por aproximadamente duas horas. Ao término da corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas e imerso em solução de brometo de etídeo (item 3.4.2), por aproximadamente 5 minutos. Após a coloração, os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e a sua imagem foi fotografada pelo sistema ImagenMaster® VDS.

O padrão obtido a partir da digestão do produto amplificado, que contém o polimorfismo M235T no gene do angiotensinogênio, pela enzima Tth 111I está demonstrado esquematicamente na figura 3.2. A presença da variante alélica T cria um sítio de clivagem da enzima de restrição Tth 111I, sendo assim, nos indivíduos homozigotos AGT*235T/235T o fragmento de 165pb gerado pela PCR é clivado em dois fragmentos, um com 141pb e outro com 24pb (não observado no gel). Os indivíduos heterozigotos AGT*235M/235T apresentam, além destes dois fragmentos, um terceiro fragmento de 165pb resultante do alelo *M* não clivado pela enzima de restrição. Os indivíduos homozigotos AGT*235M/235M, o fragmento amplificado não é clivado e, nestes, só observamos um fragmento de 165pb.

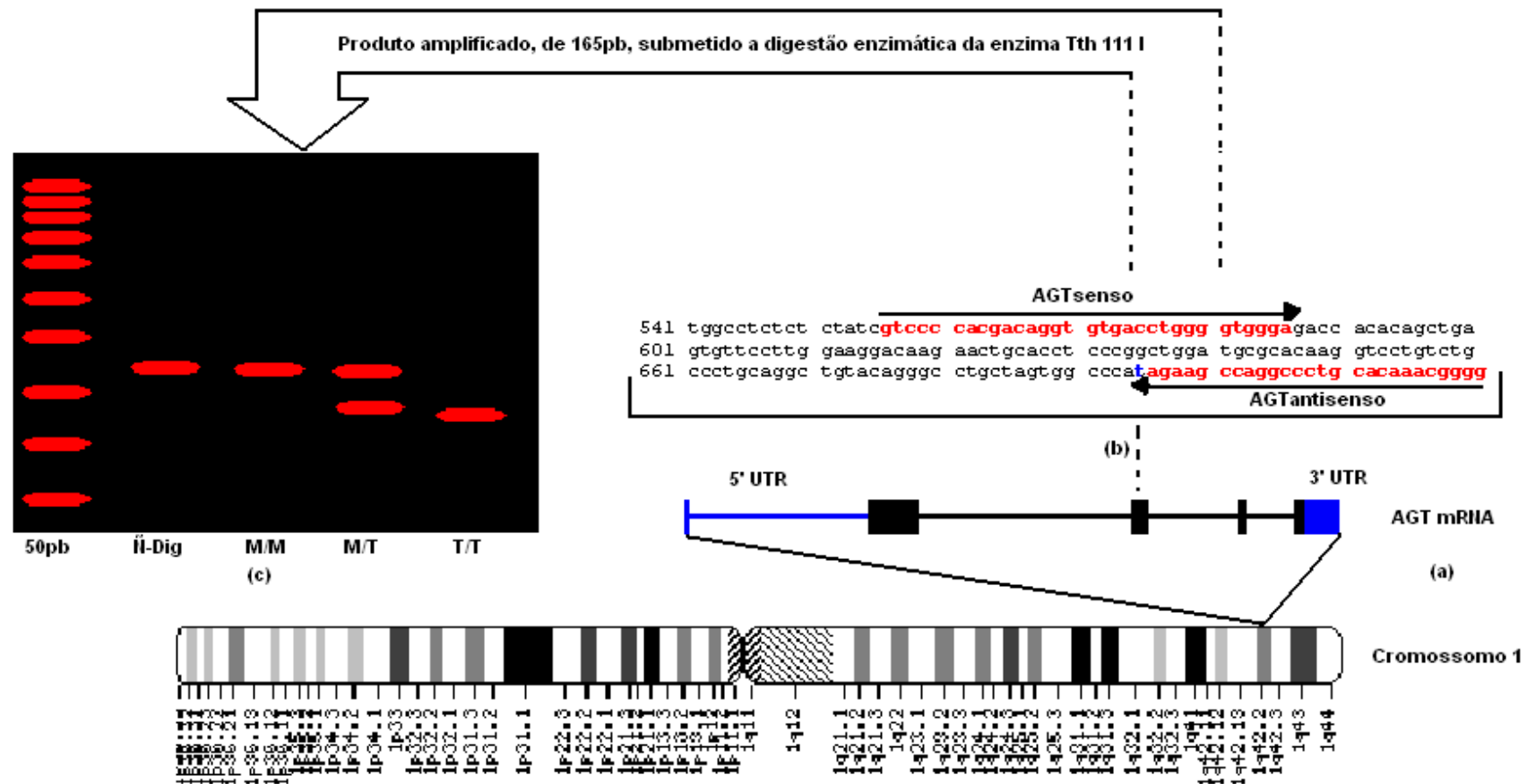


Figura 3.2: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo AGT*M235T. (a) Localização cromossômica do gene do AGT e seu RNA mensageiro. (b) As regiões reconhecidas pelos iniciadores AGT_{senso} e AGT_{antisenso} estão destacadas em vermelho. (c) Representação esquemática dos padrões de bandas obtidos em gel de poliacrilamida, após a digestão com a enzima Tth 111I do fragmento de 165pb (linha 2) que contém o polimorfismo M235T. Linha 1 – marcador de peso molecular de 50pb, linha 2 – produto de PCR não digerido, linha 3 – padrão de digestão obtido para um indivíduo homocigoto AGT*235M/235M (165pb), na linha 4 - padrão obtido para um indivíduo heterocigoto AGT*235M/235T (165,141 e 24pb), e na linha 5 o padrão para indivíduos homocigotos AGT*235T/235T(141 e 24pb). O fragmento de 24pb não é observado no gel.

3.4.3.2. Análise Molecular do Polimorfismo *Alu* I/D:

A identificação a presença (alelo I) ou ausência (alelo D) de um fragmento de 287 pares de base, presente no intron 16 do gene da enzima conversora de angiotensina I, foi realizada pela técnica de PCR (Figura 3.3). Para a análise deste polimorfismo foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por RIGAT e colaboradores (1990), sendo estes:

ECA_{senso} 5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT – 3'

ECA_{antisenso} 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TCC GTC AGA T – 3'.

As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 0,5μM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PCRExpress Hybaid. As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 94°C, por cinco minutos, seguida de 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 94°C, por um minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 58°C, por um minuto, e extensão a 72°C, por 1 minuto. A extensão final foi conduzida a 72°C, por 10 minutos. Dez microlitros dos produtos da PCR foram misturados com 2μL de corante de corrida e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. A eletroforese ocorreu em cuba horizontal, usando-se como tampão de corrida TBE 1X. As condições eletroforéticas utilizadas foram: voltagem constante de 100V com duração de 70 minutos a temperatura ambiente. Ao término da corrida eletroforética, o gel foi retirado da cuba e imerso em solução de brometo de etídeo (item 3.4.2), por 5 minutos. Após a coloração, o gel foi colocado sob um transiluminador, que permitiu a visualização dos fragmentos obtidos pela PCR. Os géis foram fotografados pelo sistema ImagenMaster® VDS.

A figura 3.2 apresenta o esquema do gel de agarose com o padrão de amplificação dos fragmentos de PCR. Este contém o polimorfismo Inserção/Deleção da sequência *Alu*, presente no gene da enzima conversora de angiotensina I. A presença do alelo ECA**Alu*I é indicada pelo fragmento de 490pb, enquanto que o alelo ECA**Alu*D é identificado pelo fragmento de 190pb. Os fragmentos observados seguem o padrão mendeliano de codominância.

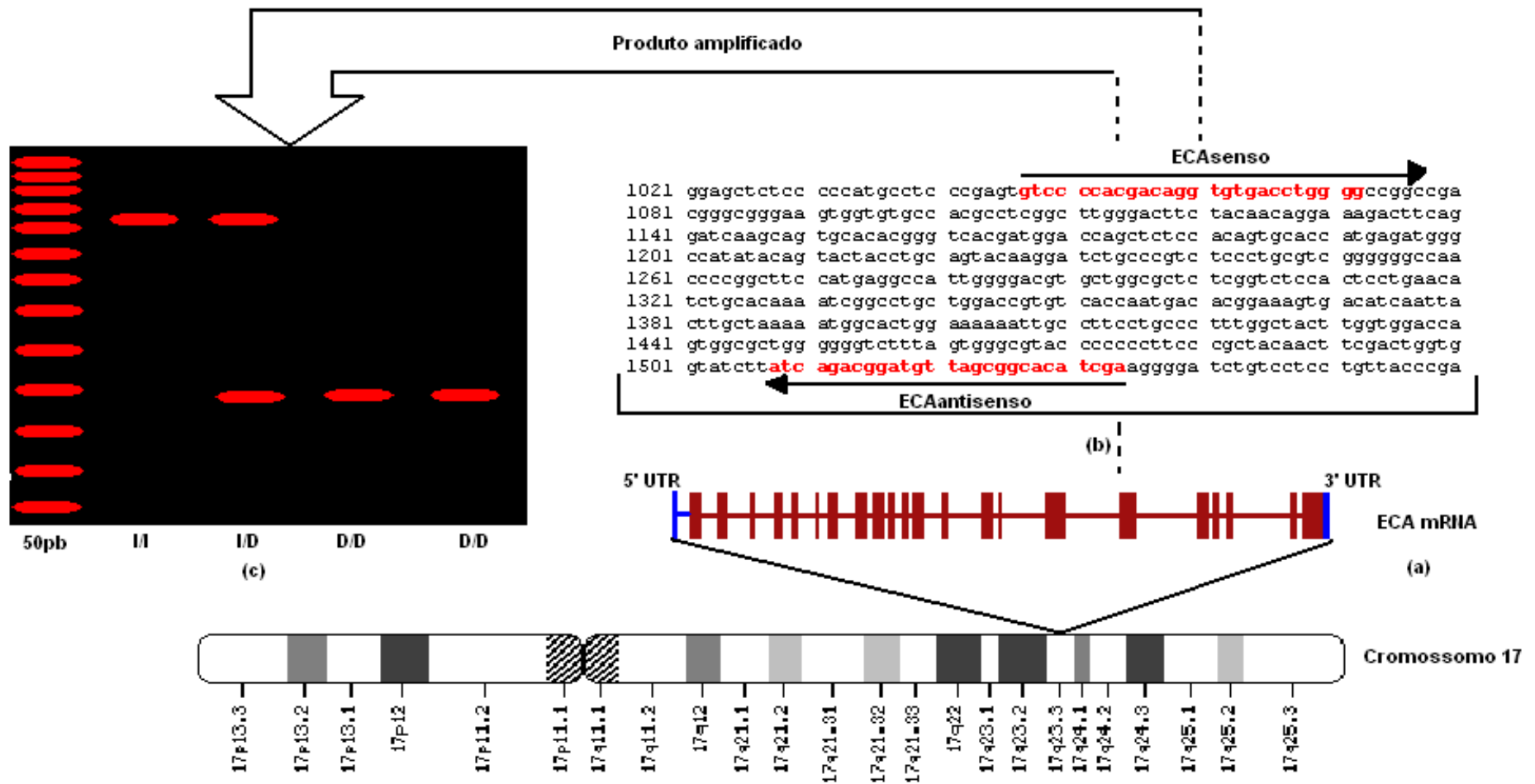


Figura 3.3: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo ECA*Alu/D. **(a)** Localização cromossômica do gene do ECA e seus RNAs mensageiros. **(b)** Sequências em vermelho destacam os locais de pareamento dos iniciadores ECA_{senso} e ECA_{antisenso}. **(c)** Figura esquemática dos fragmentos de PCR visualizados em gel de agarose 2%. Linha 1- marcador de peso molecular 50pb, linha 2 – genótipo *Alu/AluI* (490pb), linha 3 – genótipo ECA**Alu/AluD* (490/190pb), linhas 4 e 5 – genótipo ECA**AluD/AluD* (190pb).

3.4.3.3. Análise Molecular do Polimorfismo A1166C

O gene do AGTR₁ abriga uma variante caracterizada pela transversão Adenina → Citosina (A→C) na posição 1166 do gene (Figura 3.4) que foi detectada pela técnica de PCR-RFLP. Para a análise deste polimorfismo foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por NALOSGOWSKA-GLOSNIICKA e colaboradores (2000):

P1_{senso} 5'-CGA CTA CTG CTT AGC ATA - 3'

P2_{antisenso} 5'-GCA CCA TGT TTT GAG GTT - 3'

As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 1μM de cada oligonucleotídeo e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller. As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 95°C, por cinco minutos, seguida de 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 94°C, por um minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 55°C, por um minuto, e extensão a 72°C, por 1 minuto. A extensão final foi conduzida a 72°C, por 10 minutos. Cinco microlitros do produto da PCR foram adicionados a 1μL de corante de corrida, e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, com voltagem constante de 90V. Os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2) e os produtos visualizados sobre luz ultravioleta ImagenMaster® VDS.

Após a amplificação da região alvo, as amostras foram preparadas utilizando-se uma alíquota de 4μL de produto da PCR, ao qual se adicionou 2U da enzima Dde I (C↓TNAG [NEW ENGLAND-BIOLABS]) e tampão de reação 1X (50mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM DTT). O volume final da reação foi de 10μL. A digestão enzimática do produto amplificado ocorreu em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após este período, a enzima de restrição foi inativada através da incubação em banho-maria 65°C, por 20 minutos. Dez microlitros do produto da digestão foram adicionados a 2,5μL de corante e a preparação foi aplicada no gel de poliacrilamida 10% não desnaturante. A eletroforese foi realizada em cuba vertical a uma voltagem constante de 250V, por aproximadamente duas horas. Ao término da corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas e imerso em

solução de brometo de etídeo (item 3.4.2). Após a coloração, os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e a sua imagem foi fotografada pelo sistema ImagenMaster® VDS.

A figura 3.4 apresenta o esquema do gel de poliacrilamida com o padrão de digestão do fragmento de 546pb com Dde I, contendo o polimorfismo A1166C do gene do receptor tipo 1 de angiotensina 1. No fragmento de estudo do gene $AGTR_1$, o alelo mutante apresenta o sítio de reconhecimento da enzima Dde I, por substituição de A por C. O alelo selvagem $AGTR_1^{*1166A}$ possui um comprimento de 546 pares de base, enquanto que o alelo $AGTR_1^{*1166C}$, mutante, possui um sítio que produz dois fragmentos de 435 e 111pb.

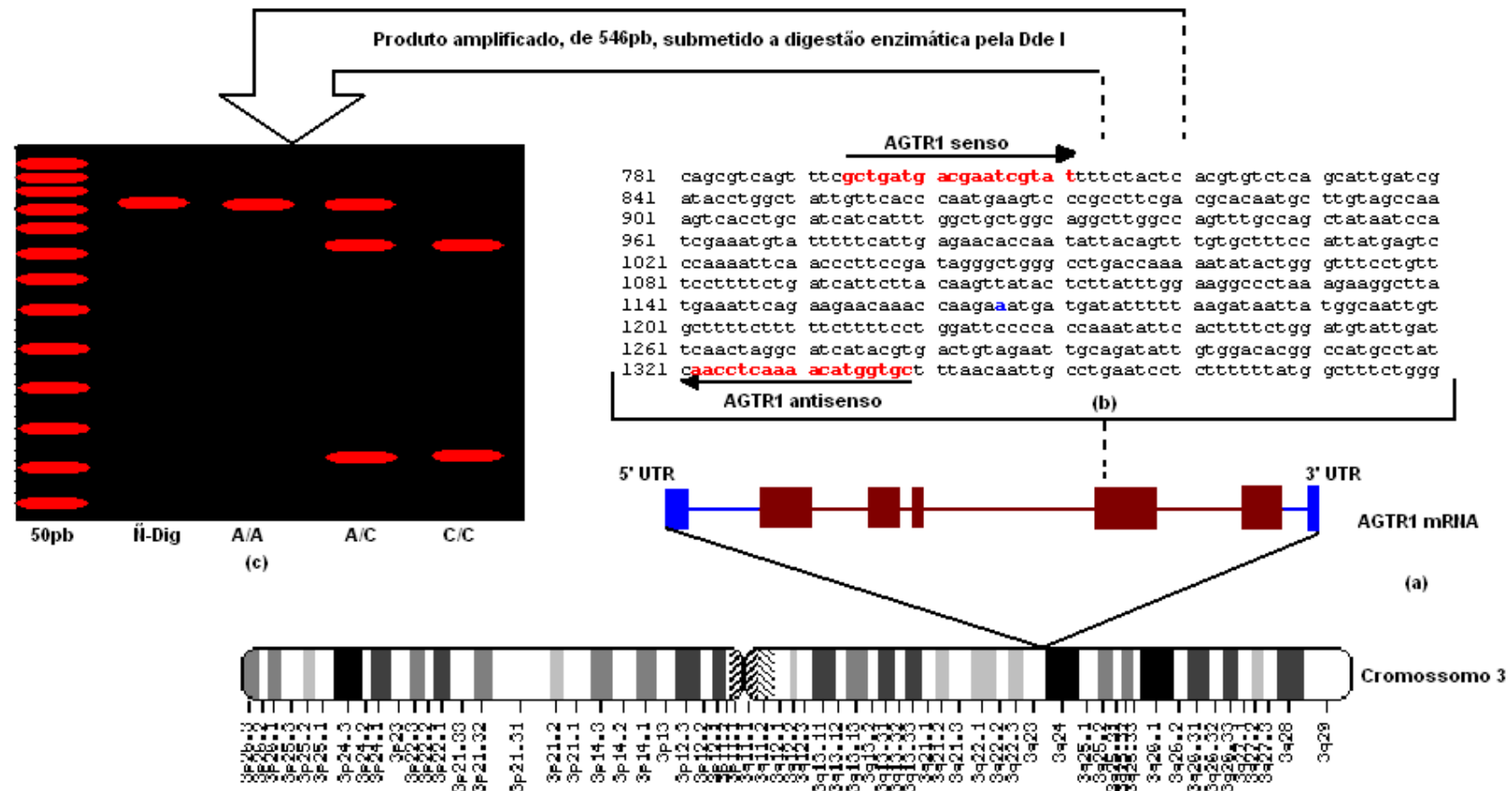


Figura 3.4: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo AGTR₁*1166C. **(a)** Localização cromossômica do gene do AGTR₁ e seu RNA mensageiro. **(b)** Sequências em vermelho destacam os locais de pareamento dos iniciadores P1 e P2. **(c)** Figura esquemática dos fragmentos de PCR digeridos pela enzima DdeI e visualizados em gel de PAGE 10%. Linha 1 – Marcador de peso molecular de 50pb, linha 2 – produto amplificado de 546pb não submetido a digestão enzimática, linha 3 - genótipos AGTR₁*1166A/1166A (546pb), linha 4 – genótipos AGTR₁*1166A/1166C (546, 435, 111pb), linha 5 - genótipo e AGTR₁*1166C/1166C (111pb).

3.4.3.4. Análise Molecular do Polimorfismo C344T

O gene da aldosterona sintetase (Figuras 3.5) possui uma transição Citosina → Timina (C→T), situada na posição 344 da sua região promotora (DAVIES *et al.*, 1999). Esta variação foi detectada pela técnica de PCR-RFLP, utilizando o protocolo descrito por DAVIES e colaboradores (1999). Para tanto se utilizou os iniciadores:

$$\text{SF1}_{\text{sens}} 5' - \text{GTG TCA GGG CAG GGG GTA} - 3'$$
$$\text{SF1}_{\text{antisens}} 5' - \text{AGG CGT GGG GTC TGG ACT} - 3'$$

As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 3μM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller. As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 94°C, por três minutos, seguida de 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 93°C, por um minuto, pareamento dos oligonucleotídeos a 68°C, por um minuto, e extensão a 72°C, por 1 minuto. A extensão final foi conduzida a 72°C, por 10 minutos. Cinco microlitros do produto amplificado foram misturados com 1μL de corante de corrida, e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, com voltagem constante de 90V. Os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2), por cinco minutos, e os produtos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta ImagenMaster® VDS.

Quatro microlitros do produto amplificado foram submetidos à digestão enzimática, com duas unidades da enzima Hae III, por duas horas a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante (INVITROGEN). Esta enzima reconhece o sítio GG↓CC. Após a obtenção dos fragmentos de estudo, o produto digerido foi aplicado em gel de poliacrilamida 10%. A eletroforese transcorreu em temperatura ambiente por 70 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2) e os perfis de digestão foram visualizados sob luz ultravioleta. As imagens dos géis foram fotografadas pelo sistema ImagenMaster® VDS.

A figura 3.5 apresenta o esquema do gel de poliacrilamida com o padrão de digestão do fragmento de 228pb com a enzima Hae III, contendo o polimorfismo C344T no gene da aldosterona sintetase. A presença da variante alélica *C* cria um sítio extra de clivagem da Hae III, o que permite diferenciar os genótipos através do tamanho dos produtos amplificados. Nos indivíduos homocigotos CYP11B2*344T/344T, a clivagem do produto da PCR, com a enzima de restrição, gera um fragmento de 175pb. Nos indivíduos heterocigotos CYP11B2*344T/344C, visualizamos além deste fragmento, duas outras bandas de 104pb e 71pb. Nos indivíduos homocigotos CYP11B2*344C/344C, visualizamos somente os fragmentos de 104pb e 71pb. Todos os genótipos apresentam ainda um fragmento de 53pb, que não foi utilizado neste estudo.

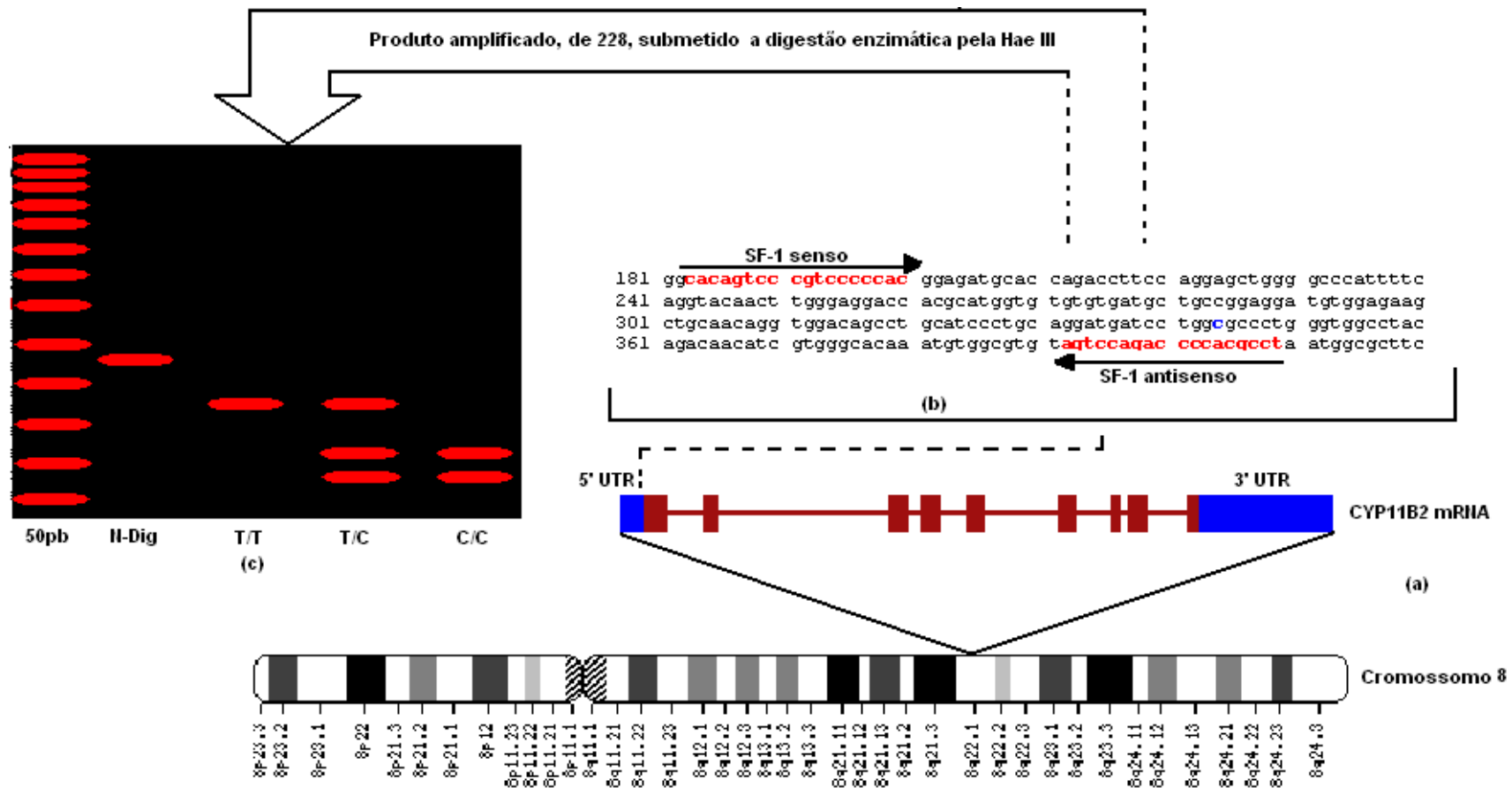


Figura 3.5: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo CYP11B2*344T. **(a)** Localização cromossômica do gene do CYP11B2 e seu RNA mensageiro. **(b)** Sequências gênicas em vermelho destacam os locais de reconhecimento dos iniciadores SF-1_{senso} e SF-1_{antisense}. **(c)** Figura esquemática dos perfis genotípicos visualizados em gel de poliacrilamida 10%, após a clivagem enzimática do produto de PCR de 228pb pela da endonuclease Hae III. Linha 1 – marcador de peso molecular 50pb, linha 2 – produto de PCR não digerido (226pb), linha 3 – genótipo CYP11B2*344T/344T (175), linha 4 – genótipo CYP11B2*344T/344C (175pb, 104pb, 71pb), linha 5 – genótipo CYP11B2*344C/344C (104pb, 71pb).

3.4.3.5. Genotipagem dos Polimorfismos G3514C e A4582C

O gene do receptor renal de mineralocorticóide apresenta inúmeras variantes genéticas, dentre os quais destacam-se: Guanina→Citosina (G→C), na posição 3514, do intron 4 (Figura 3.6); e Adenina→Citosina (A→C), na posição 4582, da região 3' não traduzida (Figura 3.7). Estas variações foram detectadas pelo método PCR-RFLP.

Para a amplificação da região que contém o polimorfismo G3514C foram utilizados os iniciadores descritos por LUDWIG e colaboradores (1998), sendo estes:



As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 1μM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller. As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 95°C, por cinco minutos, seguida de 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 96°C, por trinta segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 58°C, por trinta segundos, e extensão a 72°C, por trinta segundos. A extensão final foi conduzida a 72°C, por sete minutos. Cinco microlitros do produto amplificado foram misturados com 1μL de corante de corrida, e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, com voltagem constante de 90V. Os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2), por cinco minutos, e os produtos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta ImagenMaster® VDS.

Quatro microlitros do produto amplificado foram submetidos à digestão enzimática, com duas unidades da enzima Ban II, por duas horas a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante (INVITROGEN). Esta enzima reconhece o sítio GRG₃₅₁₄C. Após a obtenção dos fragmentos de estudo, este foi aplicado em gel de poliacrilamida 10%. A eletroforese transcorreu em temperatura ambiente, por 70 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2) e os perfis de digestão foram visualizados sob luz ultravioleta. As imagens dos géis foram fotografadas pelo sistema ImagenMaster® VDS.

A figura 3.6 apresenta o esquema do gel de poliacrilamida com o padrão de digestão do fragmento de 242pb com enzima Ban II, contendo o polimorfismo G3514C no gene do receptor renal de mineralocorticoide. A presença da variante alélica RM*3514C cria um sítio de reconhecimento da enzima Ban II, sendo assim, nos indivíduos homozigotos RM*3514C/3514C, o fragmento de 242pb é clivado em dois fragmentos de 142pb e 100pb. Os indivíduos heterozigotos RM*3514G/3514C visualizamos, além destes fragmentos, uma banda de 242pb resultante do alelo *G* não clivado pela enzima. Os indivíduos homozigotos RM*3514G/3514G, o fragmento amplificado não é clivado e, nestes, só observamos um fragmento de 242pb.

O polimorfismo A4582C foi analisado utilizando-se os iniciadores descritos por POCH e colaboradores (2001), sendo estes:



As reações de PCR incluíram 100ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM Tris-HCL, 50mM KCl [BIOTOOLS]), 1,5mM MgCl₂ (BIOTOOLS), 0,2mM de dNTP (1mM de dATP, 1mM de dTTP, 1mM de dGTP e 1mM de dCTP [INVITROGEN]), 1μM de cada um dos oligonucleotídeos e 0,3U de *Taq* DNA polimerase (BIOTOOLS) em um volume final de 10μL. As amostras foram processadas no termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller. As condições de ciclagem foram estabelecidas incluíram uma desnaturação inicial a 96°C, por cinco minutos, seguida de 30 ciclos com três etapas: desnaturação a 94°C, por trinta segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 68°C, por trinta segundos e extensão a 72°C, por trinta segundos. A extensão final foi conduzida a 72°C, por cinco minutos. Cinco microlitros do produto amplificado foram misturados com 1μL de corante de corrida, e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, com voltagem constante de 90V. Os géis foram corados com brometo de etídeo (item 3.4.2), por 5 minutos, e os produtos visualizados em transiluminador de luz ultravioleta ImagenMaster® VDS.

Quatro microlitros do produto amplificado foram submetidos à digestão enzimática, com duas unidades da enzima MspA1 I, por duas horas a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante (INVITROGEN). Esta enzima reconhece o sítio CMG↓CKG. Após a obtenção dos fragmentos de estudo, este foi aplicado em gel de poliacrilamida

10%. A eletroforese transcorreu em temperatura ambiente por 70 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídeo e os perfis de digestão foram visualizados sob luz ultravioleta. As imagens dos géis foram fotografadas pelo sistema ImagenMaster® VDS.

A figura 3.7 apresenta o esquema do gel de poliacrilamida com o padrão de digestão do fragmento de 246pb com enzima MspA1 I, contendo o polimorfismo A4582C. A presença da variante alélica RM*4582C cria um sítio de reconhecimento para a endonuclease. Sendo assim, nos indivíduo homozigotos RM*4582C/4582C, o fragmento de 246pb é clivado em dois fragmentos de 171pb e 75pb. Nos indivíduos heterozigotos RM*4582G/4582C visualizamos, além destes fragmentos, uma banda de 246pb, resultante do alelo *A* não clivado pela enzima. Os indivíduos homozigotos RM*4582A/4582A, o fragmento amplificado não é clivado e, nestes, só observamos um fragmento de 246pb.

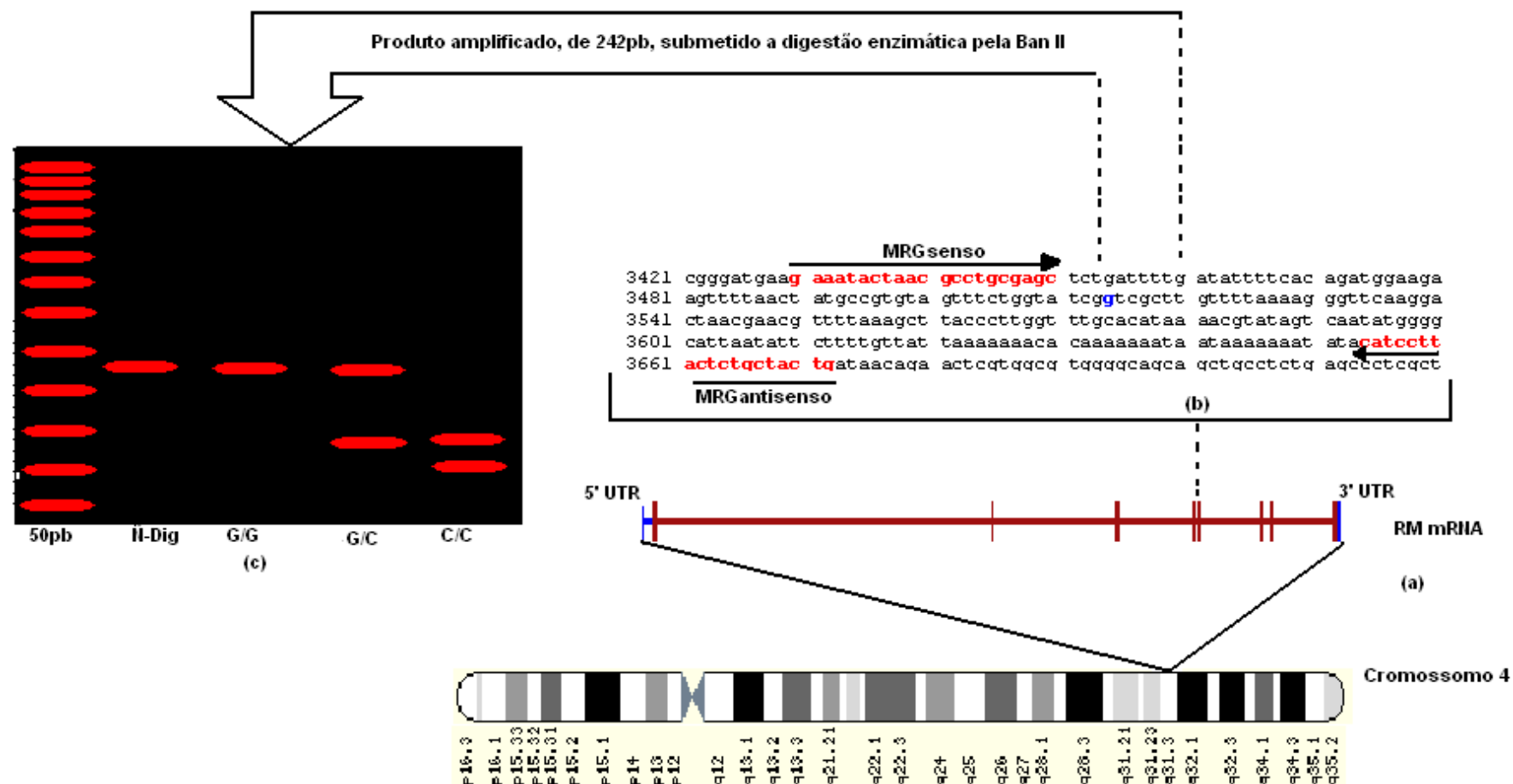


Figura 3.6: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo RM*G3514C. **(a)** Localização cromossômica do gene do RM e seu RNA mensageiro. **(b)** Sequências gênicas em vermelho destacam os locais de reconhecimento dos iniciadores RMG_{senso} e RMG_{antisenso}. **(c)** Figura esquemática dos perfis genotípicos visualizados em gel de poliacrilamida 10%, após a clivagem enzimática do produto de PCR de 242pb pela da endonuclease Ban II. Linha 1 – marcador de peso molecular 50pb, linha 2 – produto amplificado não digerido (242pb), linha 3 - genótipo RM*3514G/3514G (242pb), linha 4 – genótipo RM*3514G/3514C (242, 142, 100pb) e linha 5 – genótipo RM*3514C/3514C (142, 100pb).

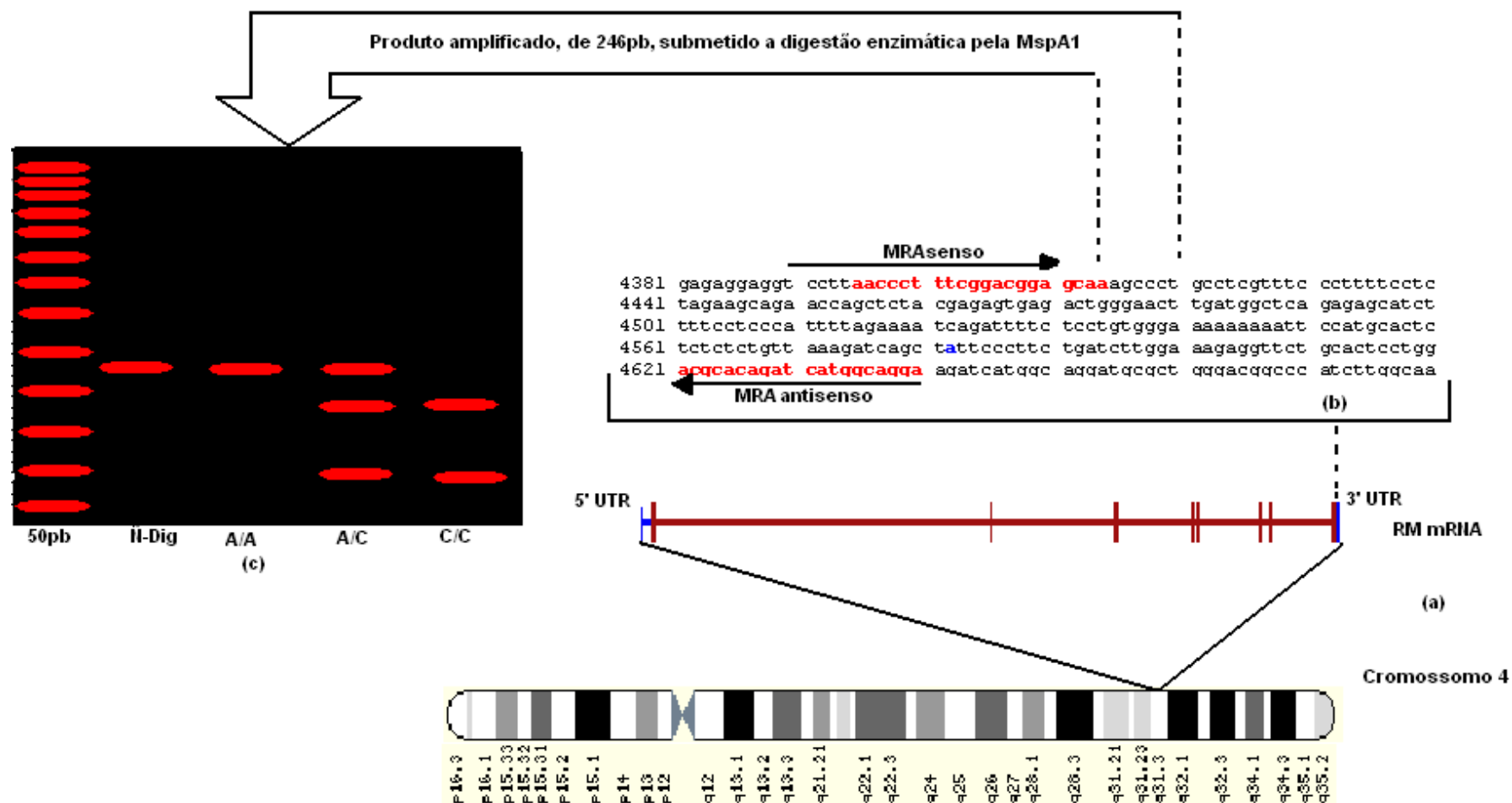


Figura 3.7: Ilustração do mecanismo de análise do polimorfismo RM*A4582C. **(a)** Localização cromossômica do gene do RM e seu RNA mensageiro. **(b)** Sequências gênicas em vermelho destacam as regiões reconhecidas pelos iniciadores RMA_{senso} e RMA_{antisenso}. **(c)** Representação esquemática dos padrões de bandas obtidos no gel de poliácridamida, após a digestão do produto de PCR (246pb) pela enzima MspA1. Linha 1 – marcador de peso molecular de 50pb, linha 2 – fragmento de PCR não digerido, linha 3 – banda observada em indivíduos com o genótipo RM*4582A/4582A (246pb), linha 4 – padrão de bandas observados em indivíduos heterozigotos RM*4582A/4582C (246, 171, 75pb), linha 5 – padrão de bandas de indivíduos com genótipo RM*4582C/4582C (171, 75pb).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para a execução das análises estatísticas foram utilizados diferentes programas, cada um com aplicações específicas. Os pacotes estatísticos usados foram: (1) SPSS (versão 12.0) – empregado na execução dos testes t-Student e regressão linear; (2) Stat-Xact (versão 3.0) – usado nos testes de qui-quadrado; (3) GENIOC (CABELLO & KRIEGER, 1977) – aplicado na averiguação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW); e (4) EpiInfo (versão 3.3.2) – utilizado para a determinação das *ODDS ratio* (OR).

A inferência dos resultados foi avaliada ao nível de significância de 0.05.

3.5.1. Análise das Características Clínicas e Antropométricas

Os parâmetros clínicos e antropométricos foram comparados com o propósito de averiguar diferenças e similaridades entre os controles e pacientes.

Os valores das variáveis contínuas, como idade, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, perfil lipídico e índice de massa corporal foram expressos como média \pm desvio-padrão, e as diferenças entre as a mostras de controles e pacientes foram comparadas pelo teste de t-Student. As variáveis qualitativas (gênero, etnia, tabagismo e consumo de bebida alcoólica) foram comparadas pelo teste de qui-quadrado.

3.5.2. Correlação entre Variáveis Clínicas/Antropométricas e a Pressão Arterial

A influência de múltiplas variáveis clínicas e antropométricas na variação da pressão arterial foi medida pelo teste de regressão linear-*stepwise*. Nesta análise, as variáveis dependentes foram a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica. As variáveis independentes foram: idade, índice de massa corporal, gênero (0 = feminino, 1 = masculino), fumante (0 = não fumante, 1 = fumante), consumo de bebida alcoólica (0 = não consome, 1 = consome bebida alcoólica). As etnias foram normalizadas seguindo o seguinte padrão: etnia_1 (caucasóide), etnia_2 (negróide), etnia_3 (pardo), etnia_4 (índio descendente), etnia_5 (caboclo). Para a presença da etnia foi atribuído o valor 1, e a sua ausência foi conferido o valor 0.

3.5.3. Estimativa das Frequências Genóticas e Alélicas

Os *loci* do SRAA apresentam alelos codominantes, o que permite inferir os genótipos a partir dos respectivos fenótipos. As frequências alélicas (x_i) e genóticas (X_{ii}) de cada loco, em cada comunidade, foram estimadas por contagem direta, segundo a equação:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

Em que:

x_i é a frequência do alelo “i”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

3.5.4. Aderência das Frequências Genóticas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Em que:

x_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i;

$2x_i x_j$ é a frequência esperada do homozigoto ij;

$2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

3.5.5. Diferenciação Genética entre as Amostras de Hipertensos e Normotensos

Para a execução dos testes exatos para diferenciação das amostras de pacientes e controles utilizou-se tabelas de contingência **RxC** geradas automaticamente para cada *locus*, onde **R** é o número de populações e **C** é o número de alelos no loco. Este procedimento compara cada loco para pares de populações, para determinar se existem

diferenças nas frequências alélicas observadas, onde a hipótese nula testada é a de que a distribuição alélica é idêntica entre as populações (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

A diferenciação genotípica foi realizada pelo teste exato **G** (GOUDET *et al.*, 1996), que tem o mesmo princípio e testa a hipótese nula na qual a distribuição genotípica é idêntica entre as populações.

3.5.6. Análise da “ODDS Ratio”

A existência de associação entre os polimorfismos nos genes do SRAA e a hipertensão arterial foi investigada pelas estimativas da *ODDS ratio*, com os respectivos intervalos de 95% de confiança (IC 95%).

Posteriormente, os genótipos que apresentaram associação com a hipertensão arterial foram selecionados e analisados em conjunto, com o propósito de identificar efeitos aditivos de múltiplos polimorfismos para o desenvolvimento da hipertensão arterial.

3.5.7. Associação das Variáveis Genéticas com a Pressão Arterial

Como propósito de investigar a influência dos polimorfismos genéticos na variação da pressão arterial, realizamos análises de regressão múltipla. Para tanto, as variáveis dependentes foram PAS e PAD, enquanto que as variáveis independentes foram os polimorfismos. Os genótipos foram normatizados de acordo com a presença/ausência de alelos de risco, sendo assim: 0 foi atribuído aos genótipos sem alelos de risco, 1 para genótipos com um alelo de risco, e 2 para genótipos com 2 alelos de risco.

3.5.8. Associação das Variáveis Clínicas/Antropométricas e Genéticas com a Pressão Arterial

A influência de múltiplas variáveis clínicas/antropométricas e dos polimorfismos genéticos na variação da PA foi medida pela análise de regressão múltipla. Nesta análise, as variáveis dependentes foram PAS e PAD. As variáveis independentes foram: idade, etnia, índice de massa corporal, gênero, fumante, consumo de bebida alcoólica, AGT*M235T, ECA*AluI/D, AGTR₁*A1166C, CYP11B2*C344T, RM*G3514C e RM*A4582C. A normatização dos genótipos foi igual ao descrito no item anterior.

4 - RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO AMBULATORIAL E DA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA REALIZADA NAS AMOSTRAS DO RIO DE JANEIRO

4.1.1. Avaliação Clínica e Antropométrica

Os resultados provenientes das avaliações ambulatoriais, realizados nas amostras de normotensos e hipertensos, estão sumarizados na tabela 4.1.

As medições pressóricas mostraram que todos os indivíduos incluídos na amostra controle apresentavam níveis tensionais inferiores a 140/90mmHg. Quanto aos pacientes, constatamos que dos 106 indivíduos estudados, 93% possuíam médias tensionais superiores a 160/100mmHg; somente 7% apresentaram a pressão sistólica ou diastólica superior a 160mmHg ou 100mmHg, respectivamente. Para o controle da PA, todos os pacientes deste grupo fazem uso de três medicamentos anti-hipertensivos, sendo um deles o diurético. Com base nestas informações, este grupo de pacientes foi classificado como sendo hipertensos de estágio 2.

A averiguação do IMC, realizada em ambas as amostras, constatou que 91% dos normotensos apresentavam valores adequados de IMC ($18,5 \leq \text{IMC} < 25,0$). Entretanto, esta porcentagem foi de 11% entre os pacientes. Além disso, observou-se que 97,5% dos avaliados apresentaram sobrepeso de nível 1 ($25,0 \leq \text{IMC} < 30,0$), e 1,5% possuíam sobrepeso de nível 2 ($30,0 \leq \text{IMC} < 40,0$).

Os testes de χ^2 e t-Student, utilizados para detectar possíveis diferenças entre os perfis biométricos dos controles e dos pacientes, mostraram uma predominância da etnia negra entre os pacientes ($\chi^2 = 61,30$; $p = 0,000$), e da etnia caucasóide entre os controles ($\chi^2 = 42,29$; $p = 0,000$). Os valores de IMC foram estatisticamente diferentes entre as amostras avaliadas ($t = 14,023$; $p = 0,000$). Este resultado refletiu o aumento nos valores de IMC entre os hipertensos. Grande parte dos pacientes avaliados apresentavam obesidade de nível 1 ou obesidade de nível 2. Com relação ao perfil lipídico, observou-se que os pacientes apresentaram valores elevados de triglicérides, quando comparados com os controles ($t = 3,411$; $p = 0,004$). Apesar desta diferença significativa, os valores de triglicéridos dos pacientes encontravam-se dentro do padrão de normalidade. A análise comparativa dos valores de LDL-colesterol mostrou diferença significativa entre as duas amostras ($t = 4,781$; $p = 0,003$). Neste caso, verificou-se que os controles apresentaram níveis normais de LDL, enquanto que os pacientes exibiram níveis elevados. Em relação

ao gênero, observou-se uma maior frequência do feminino ($\chi^2 = 5,849$; $p = 0,0156$); observa-se ainda, uma idade média maior entre os pacientes ($t = 5,841$; $p = 0,000$).

Os demais parâmetros avaliados, HDL, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, colesterol total, não apresentaram diferenças significativas, entre as amostras.

Tabela 4.1: Caracterização clínica e antropométrica dos normotensos e hipertensos.

Parâmetros	Valores de referência	Normotensos (n = 115)	Hipertensos (n = 106)	p	
Gênero	Feminino/Masculino	----	57/58	69/36	< 0,05
Idade (ano)		----	57,16 ± 10,96	58,85 ± 8,54	<0,05
Etnia (%)	Caucasóide	----	73	31	<0,05
	Negróide	----	0,00	42	<0,05
	Pardo	----	27	27	Não significativo
	Indígena descendente	----	0,00	0,00	Não significativo
PAS (mmHg)¹	até 139,9	120,08 ± 7,02	174,03 ± 25,03	< 0,05	
PAD (mmHg)¹	até 89,9	77,11 ± 6,28	115,92 ± 15,96	< 0,05	
IMC (kg/m²)²	até 24,9	24,92 ± 5,21	29,71 ± 4,70	< 0,05	
Perfil lipídico³	Triglicerídeos (mg/dl)	até 200	121,63 ± 92,69	141,59 ± 80,60	< 0,05
	Colesterol total (mg/dl)	até 200	204,60 ± 46,79	209,32 ± 56,54	Não significativo
	HDL-colesterol (mg/dl)	> 45	48,00 ± 13,09	49,87 ± 12,96	Não significativo
	LDL-colesterol (mg/dl)	> 50 ³	52,00 ± 13,09	48,87 ± 12,96	Não significativo
		até 130 ³	105,55 ± 34,16	128,32 ± 23,98	< 0,05
Fumo (%)	----	10,2	11,8	Não significativo	
Bebida (%)	----	12,5	18,9	Não significativo	

1 – Padrões de referência nacionais recomendados pela IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2002).

2 – Padrões de referência internacionais recomendados pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (1995).

3 – Padrões de referência recomendados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001).

Para avaliar a contribuição concomitante dos parâmetros clínicos e antropométricos, na variação da pressão arterial, foi utilizada análise de regressão linear múltipla. Este procedimento mostrou que o índice de massa corporal, etnia, LDL-colesterol, gênero e idade apresentam efeitos significativos sobre a variação da pressão arterial sistólica ($F = 12,450$; $p = 0,000$). Neste caso, os resultados indicaram que a média da pressão sistólica é aumentada em 2,8mmHg no grupo negro em relação aos caucasóides ($p = 0,036$); o sobrepeso contribui para uma elevação de 9,1mmHg ($p = 0,000$); e idade proporciona um incremento de 0,426mmHg ($p = 0,000$). Em contraste, LDL-colesterol ($p = 0,009$) e o gênero masculino ($p = 0,017$) mostraram ser os parâmetros que estão contribuindo para a diminuição da PAS. Estes fatores de “proteção” favorecem uma diminuição de 0,046mmHg e de 8,3mmHg na PAS, respectivamente.

A análise de regressão linear também foi aplicada na investigação e identificação dos fatores que pudessem estar contribuindo para o aumento da pressão arterial diastólica. Esta análise mostrou que dentre as variáveis analisadas, somente o IMC e a etnia contribuíram para a elevação da pressão arterial diastólica ($F = 20,597$; $p = 0,000$). Os resultados da regressão linear indicaram que o sobrepeso induz um aumento de 6,4mmHg na PAD ($p = 0,000$), enquanto que a etnia negro foi associada a uma contribuição de 1,78mmHg ($p = 0,030$).

4.1.2. Avaliação Genética

4.1.2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos Marcadores Genéticos Polimórficos

O teste de χ^2 mostrou que, dos seis *loci* estudados, somente as frequências genotípicas do polimorfismo *RM*G3514C* não estavam em concordância com os pressupostos de Hardy-Weinberg. Neste polimorfismo observou-se, que em ambas as amostras analisadas, a discrepância entre os valores observados e esperados para os três genótipos foi determinada pela carência de heterozigotos e excesso de homozigotos *MR*3514G/3514G* e *MR*3514C/3514C*. Este polimorfismo foi excluído das análises subsequentes.

Os valores de χ^2 e p dos *loci* estudados estão sumarizados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos *loci* estudados.

	Polimorfismos (valor de p)					
	M235T	<i>Alu</i> /D	A1166C	C344T	A4582C	G3514C
Normotenso	0,004	0,360	0,537	0,829	0,413	62,160
	(0,998)	(0,982)	(0,764)	(0,,365)	(0,813)	(0,000)
Hipertenso	3,700	0,422	1,266	0,074	0,069	27,207
	(0,054)	(0,516)	(0,260)	(0,785)	(0,793)	(0,000)

4.1.2.2. Freqüências Genotípicas e Alélicas

As freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *AGT**M235T, *ECA**I/D, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T, *RM**G3514C e *RM**A4582C estão apresentadas na tabela 4.3.

Para detectar possíveis diferenças entre os perfis genotípicos e alélicos, de normotensos e hipertensos realizou-se uma análise comparativa das freqüências observadas. Este procedimento estatístico mostrou que as freqüências genotípicas dos polimorfismos *AGT**M235T, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T e *RM**A4582C diferiram significativamente entre as amostras de normotensos e hipertensos [$p < 0.05$ (Tabela 4.3)]. Para cada polimorfismo, identificou-se um ou dois genótipos que contribuíram para esta diferença. Tal procedimento mostrou que estas diferenças foram devidas à freqüência aumentada dos genótipos TT (*AGT**M235T), AC e AA (*AGTR*₁*A1166C), TT (*CYP11B2**C344T) e CC (*RM**A4582C) na amostra de pacientes. Por tal razão, esses genótipos foram adotados como marcadores de suscetibilidade nas análises subseqüentes.

A análise comparativa das freqüências alélicas revelou que a distribuição dos alelos dos polimorfismos *AGT**M235T, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T e *RM**A4582C foram estatisticamente diferentes entre as amostras (Tabela 4.3). Estas diferenças foram devidas à freqüência aumentada dos alelos *AGT**235T, *AGTR*₁*1166A, *CYP11B2**344T e *RM**4582C entre os hipertensos.

O polimorfismo *ECA***Alu*/D foi excluído das análises subseqüentes, uma vez que não foram detectadas diferenças no perfis genotípicos e alélicos, entre as amostras.

Tabela 4.3: Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos gênicos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, em normotensos e hipertensos.

Polimorfismos	Genótipos e alelos	Normotensos	Hipertensos	p	
AGT*M235T	235M/235M	64 (56%)	27 (26%)	0,000	
	Genótipos 235M/235T	43 (37%)	42 (40%)		
	235T/235T	7 (7%)	36 (34%)		
	Alelos	235M	171 (75%)	96 (46%)	0,000
		235T	57 (25%)	114 (54%)	
ECA*AluI/D	<i>AluI/AluI</i>	12 (11%)	16 (15%)	0,208	
	Genótipos <i>AluI/AluD</i>	52 (45%)	54 (52%)		
	<i>AluD/AluD</i>	51 (44%)	35 (33%)		
	Alelos	<i>AluI</i>	76 (33%)	86 (41%)	0,085
		<i>AluD</i>	154 (67%)	124 (59%)	
AGTR₁*A1166C	1166A/1166A	58 (50%)	68 (64%)	0,000	
	Genótipos 1166A/1166C	45 (30%)	36 (34%)		
	1166C/1166C	12 (11%)	2 (2%)		
	Alelos	1166A	161 (70%)	171 (81%)	0,005
		1166C	69 (30%)	39 (19%)	
CYP11B2*C344T	344C/344C	31 (27%)	15 (14%)	0,000	
	Genótipos 344T/344C	62 (54%)	48 (45%)		
	344T/344T	22 (19%)	43 (41%)		
	Alelos	344C	106 (46%)	78 (37%)	0,047
		344T	124 (54%)	134 (63%)	
RM*G3514C	3514G/3514G	57 (50%)	36 (34%)	0,006	
	Genótipos 3514G/3514C	15 (13%)	26 (25%)		
	3514C/3514C	43 (37%)	44 (41%)		
	Alelos	3514G	129 (56%)	98 (46%)	0,004
		3514C	101 (44%)	114 (54%)	
RM*A4582C	4582A/4582A	63 (55%)	43 (41%)	0,038	
	Genótipos 4582A/4582C	48 (42%)	50 (47%)		
	4582C/4582C	04 (3%)	13 (12%)		
	Alelos	4582A	174 (76%)	136 (64%)	0,008
		4582C	56 (24%)	76 (36%)	

4.1.2.3. Análise de “ODDS ratio”

A investigação da suscetibilidade genética para o desenvolvimento da hipertensão, feita através da análise de “odds ratio”, foi realizada individualmente para cada polimorfismo. Aqueles que apresentaram resultados positivos foram posteriormente analisados aos pares, trios ou grupos.

Os primeiros resultados das análises de OR mostraram um risco significativo para a hipertensão arterial associado aos genótipos *TT* do *AGT**M235T; *AC/AA*, do *AGTR*₁*A1166C; *TT* do *CYP11B2**C344; e *CC* do *RM**A4582C. Os valores de OR observados para estes genótipos variaram de 2,846 até 6,527 (Gráfico 4.1). Logo, portadores destes genótipos são geneticamente suscetíveis para esta doença, quando comparados com os indivíduos que não os possuem.

Em seguida, os genótipos considerados de “risco” para a hipertensão foram analisados aos pares (Gráfico 4.1). Os resultados destas análises mostraram que a presença concomitante de dois genótipos de risco provoca um incremento substancial no risco da doença. O estudo dos haplótipos de risco evidenciou que os valores da OR, cuja variação foi de 7,502 a 12,941, eram maiores que os detectados para um único genótipo.

Posteriormente, os genótipos de risco foram agrupados em trios e analisados (Gráfico 4.1). Os resultados mostraram que todas as combinações genotípicas apresentaram um risco aumentado para a hipertensão, quando comparados com os resultados da análise anterior. A presença de haplótipos formados a partir da combinação de três genótipos de risco fez com que os valores de OR subissem de 14,170 a 17,676.

Por fim, o haplótipo formado pela combinação dos genótipos de risco dos polimorfismos *AGT**M235T + *AGTR*₁*A1166C + *CYP11B2**C344T + *RM**A4582C apresentou um incremento na OR, associado com um risco de 27,857 (Gráfico 4.1).

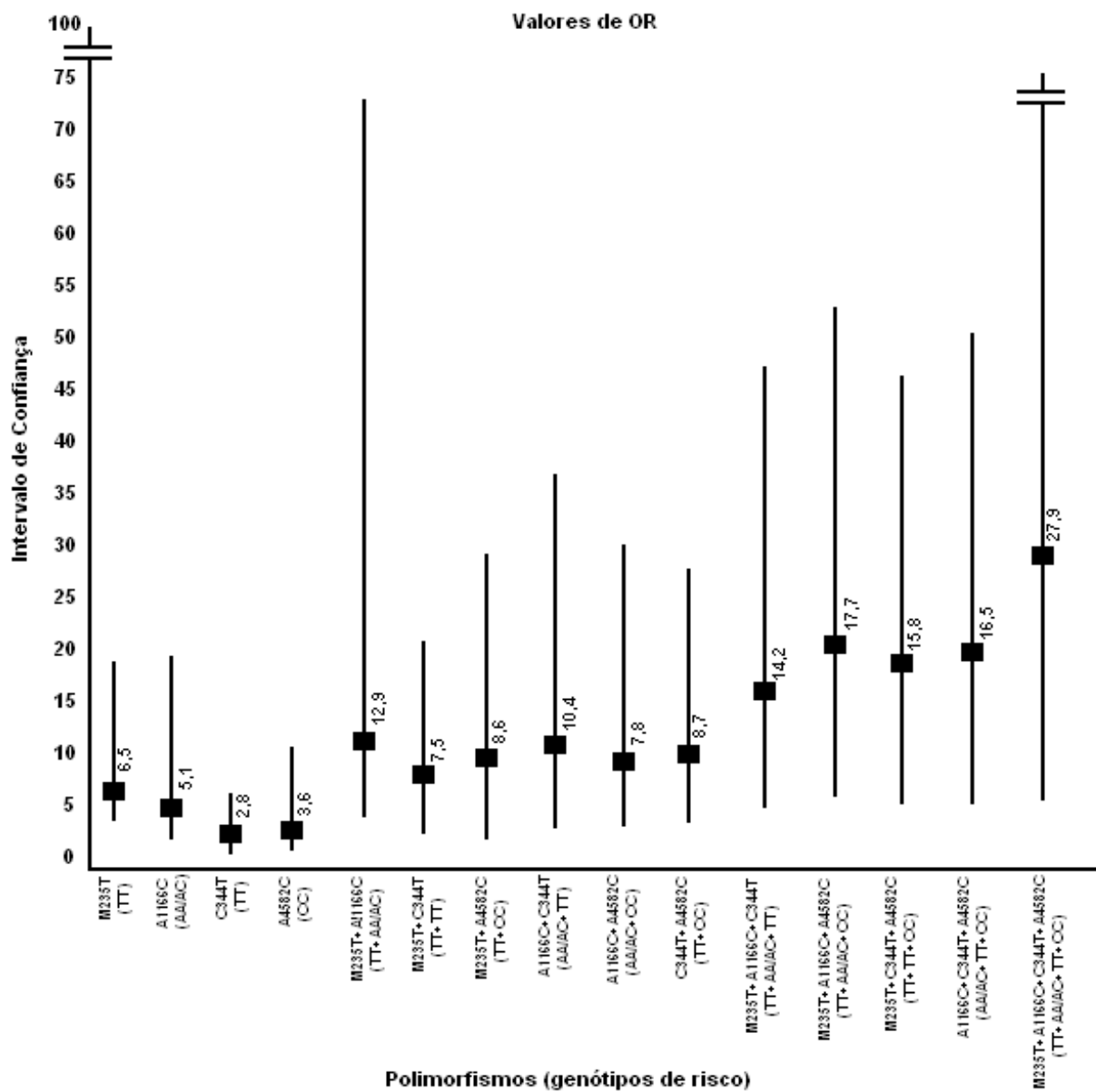


Gráfico 4.1: Apresentação dos valores da ODDS ratio (box preto) e os intervalos de confiança (barra vertical), obtidos nos polimorfismos do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Os valores das odd ratio são apresentados no gráfico.

4.1.2.4. Análise de Regressão Linear Múltipla dos Fatores Genéticos

A avaliação do impacto das variantes polimórficas sobre a pressão arterial foi mensurada através de uma análise de regressão linear múltipla. A qual apontou que a presença dos genótipos *AGT**235T/235T, *AGTR*₁*1166A/1166A e/ou *AGTR*₁*1166A/1166C, *CYP11B2**344T/344T e *RM**4582C/4582C contribuem para aumentos na PAS de 6,3mmHg ($p = 0,002$), 4,3mmHg ($p = 0,001$), 3,4mmHg (0,021) e 2,1mmHg ($p = 0,000$), respectivamente.

Também foi averiguada a influência destes polimorfismos na variação da PAD. Os resultados desta análise mostraram que a presença dos genótipos de risco presentes nos genes do *AGT*, *AGTR*₁ e da aldosterona sintetase conferem aumentos de 2,8mmHg ($p = 0,003$), 2,1mmHg (0,003) e 2,6mmHg (0,002), respectivamente. Não foi detectada interferência do genótipo *RM**4582C/4582C na variação da PAD.

4.1.3. Análise Conjunta dos Fatores Clínicos/Antropométricos e Genéticos

Para investigar quais são os polimorfismos genéticos e/ou variantes clínicos que estão associados com a alteração da PA, e mensurar os seus impactos na pressão arterial, analisamos simultaneamente o perfil genético e clínico de indivíduos normotensos e hipertensos. Esta análise mostrou que o IMC, etnia, gênero, idade e os polimorfismos *AGT**M235T, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T e *RM**A4582C contribuem para o aumento da PAS ($F = 18,450$; $p = 0,000$). Os resultados desta análise mostraram que valores de IMC superiores a 25 favorecem um aumento de 2,42mmHg na PAS ($p = 0,003$). A presença da etnia negra foi relacionada com um incremento de 2,5mmHg ($p = 0,003$). Enquanto que o gênero feminino, bem como a idade avançada foram associados com aumentos de 3,4mmHg ($p = 0,023$) e 0,326mmHg ($p = 0,013$), respectivamente. Quanto aos polimorfismos genéticos, foi verificado que o impacto das variantes moleculares, na pressão arterial sistólica, é diferente. Sendo assim, portadores do genótipo *AGT**235T/235T podem apresentar aumentos de até 5,4mmHg ($p = 0,003$) na PAS, enquanto que esta elevação pode ser de 3,4mmHg ($p = 0,004$) para portadores dos genótipos *AGTR*₁*1166A/1166A ou 1166A/1166C. Para os indivíduos que possuem o genótipo *CYP11B2**344T/344T, o aumento na PA pode ser de até 2,4mmHg ($p = 0,002$), e de até 1,7mmHg para os portadores do genótipo *RM**4582C/4582C ($p = 0,003$).

Observou-se também que a variação elevada da pressão arterial diastólica está relacionada tanto com fatores antropométricos, como o IMC (categorizada em normais e sobrepeso) e a etnia, quanto com os polimorfismos genéticos, *AGT**M235T, *AGTR*₁*A1166C e *CYP11B2**C344T ($F = 15,311$; $p = 0,003$). Os resultados da regressão múltipla (escalonada) indicaram que a etnia negróide é o fator de maior contribuição para o aumento da PAD - 3,4mmHg ($p = 0,021$). O segundo efeito importante foi o sobrepeso (IMC superior a 25) que provoca um aumento de 1,53mmHg na PAD ($p = 0,032$). Com relação aos polimorfismos genéticos, observou-se que portadores dos alelos *AGT**235T, *AGTR*₁*1166A e *CYP11B2**344T possuem valores aumentados da pressão arterial diastólica, quando comparados com os que não o possuem. Isto porque, a presença dos alelos 235T do *AGT*, 1166A do *AGTR*₁ e 344T do *CYP11B2* contribuem para a elevação de 1,83mmHg ($p = 0,002$); 1,50mmHg ($p = 0,001$) e 1,22mmHg ($p = 0,021$), respectivamente.

4.2. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO AMBULATORIAL E DA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA REALIZADA NAS AMOSTRAS DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO

4.2.1. Avaliação Clínica e Antropométrica

Os resultados provenientes das avaliações ambulatoriais, realizada nas amostras de indivíduos normotensos e hipertensos, estão sumarizados na tabela 4.4.

As medições pressóricas mostraram que todos os indivíduos incluídos na amostra controle apresentavam níveis tensionais inferiores a 140/90mmHg. Quanto aos pacientes, constatamos que todos os indivíduos estudados apresentaram médias tensionais entre 140/90mmHg e 159/99mmHg. Portanto, estes indivíduos foram classificados como sendo hipertensos de estágio 1. Os hipertensos que faziam uso de terapias anti-hipertensivas, e conseqüentemente apresentavam níveis pressóricos normais, foram descartados do estudo.

A avaliação do IMC constatou baixa prevalência da obesidade nesta população. Na amostra controle, cerca de 93% dos indivíduos avaliados apresentaram valores de IMC adequados ($18,5 \leq \text{IMC} < 25,0$), enquanto que 7% apresentaram sobrepeso de nível 1 ($25,0 \leq \text{IMC} < 30,0$). Entre os paciente, constatou-se que 15% dos avaliados possuíam IMC adequado, ao passo que 85% apresentaram sobrepeso de nível 1. Nestas amostras não foi verificado indivíduos com IMC superior a 30.

A análise realizada para detectar possíveis diferenças entre os perfis biométricos dos controles e dos pacientes mostrou que o consumo de álcool ($\chi^2 = 10,93$; $p = 0,000$), idade ($t = 0,243$; $p = 0,001$) e tabagismo ($\chi^2 = 8,969$; $p = 0,002$) foram as únicas variáveis com expressiva prevalência entre os indivíduos hipertensos. Quanto aos valores de IMC, verificou-se um discreto aumento entre os hipertensos, entretanto a diferença observada não foi estatisticamente significativa ($t = 2,451$; $p = 0,183$). O perfil étnico, outro importante fator de risco para a hipertensão, foi similar entre as duas amostras analisadas. Este dado mostrou que a população estudada possui uma homogeneidade étnica, caracterizada pela elevada frequência de caboclos e indígenas descendentes das tribos Tukano, Piratapuaia, Desano, Aruak, Baré e Tariano. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, entre as amostras.

Tabela 4.4: Caracterização clínica e antropométrica dos normotensos e hipertensos.

Parâmetros	Padrões Normais	Normotensos (n = 78)	Hipertensos (n = 82)	p	
Gênero	Feminino/Masculino	----	47/31	49/33	Não significativo
Idade (ano)		----	36,27 ± 12,46	49,27 ± 18,58	<0,05
Etnia (%)	Caucasóide	----	5,1	9,0	Não significativo
	Negróide	----	1,3	0,0	Não significativo
	Caboclo	----	61,5	50,4	Não significativo
	Índigena descendente	----	32,1	40,9	Não significativo
PAS (mmHg)¹	até 139,9	111,73 ± 12,05	149,37 ± 11,81	< 0,05	
PAD (mmHg)¹	até 89,9	70,76 ± 8,64	92,31 ± 4,38	< 0,05	
IMC (kg/m²)²	até 24,9	24,62 ± 3,69	26,07 ± 3,43	Não significativo	
Fumo (%)	----	26,9	50,0	< 0,05	
Bebida (%)	----	33,3	45,5	< 0,05	

1 – Padrões de referência nacionais recomendados pela IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2002).

2 – Padrões de referência internacionais recomendados pela WORD HEALTH ORGANIZATION (1995).

Para avaliar a contribuição concomitante dos parâmetros biométricos, na variação da pressão arterial, foi utilizado o teste de regressão linear múltipla (escalonada). Esta análise revelou que a idade e o índice de massa corporal contribuíram para a variação da PAS nesta população ($F = 8,383$; $p = 0,000$). Os resultados indicaram que a idade proporciona um aumento de 0,413mmHg ($p = 0,002$) na pressão arterial sistólica, enquanto que o IMC contribui para um aumento de 7,3mmHg ($p = 0,048$).

A elevação da pressão arterial diastólica, na população ribeirinha de Santa Isabel do Rio Negro, foi favorecida pelo índice de massa corporal, consumo de bebidas alcoólicas e idade ($F = 12,957$; $p = 0,001$). Os resultados da regressão linear indicaram que o consumo de álcool (mais de 30 g de etanol por dia) contribui para um aumento de 4,8 mmHg na PAD ($p = 0,000$), enquanto que a idade e o índice de massa corporal proporcionam um aumento de 0,14mmHg ($p = 0,000$) e de 7,7mmHg na PAD ($p = 0,001$), respectivamente.

4.2.2. Avaliação Genética

4.2.2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos Marcadores Genéticos Polimórficos

O teste de χ^2 mostrou que, dos seis *loci* estudados, somente o polimorfismo *AGT**M235T estava desviado do Equilíbrio de HW ($p < 0.05$) (Tabela 4.5). Neste polimorfismo observou-se, que em ambas as amostras analisadas, a discrepância entre os valores observados e esperados para os três genótipos foi determinada principalmente pelo excesso de heterozigotos. Este polimorfismo foi excluído das análises subseqüentes.

Tabela 4.5: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos *loci* estudados.

	Polimorfismos (valor de p)					
	M235T	<i>Alu</i> I/D	A1166C	C344T	A4582C	G3514C
Normotenso	15,407 (0,000)	2,83 (0,092)	0,462 (0,500)	0,166 (0,683)	3,0 (0,081)	1,846 (0,179)
Hipertenso	6,486 (0,014)	1,819 (0,071)	0,130 (0,718)	2,911 (0,157)	1,93 (0,061)	0,402 (0,687)

4.2.2.2. Freqüências Genotípicas e Alélicas

As freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *AGT**M235T, *ECA***Alu*I/D, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T, *RM**G3514C e *RM**A4582C estão descritas na tabela 4.6.

Para detectar possíveis diferenças entre os perfis genotípicos e alélicos, de normotensos e hipertensos realizou-se análise comparativa das freqüências observadas. Este procedimento estatístico mostrou que as freqüências genotípicas dos polimorfismos *ECA***Alu*I/D e *RM**A4582C diferiram significativamente entre as amostras controle e paciente ($p < 0.05$). Essas diferenças foram proporcionadas, principalmente, pela prevalência elevada do genótipo *Alu*D/*Alu*D da *ECA* e do genótipo 4582C/4582C do *RM*, no grupo de pacientes. O genótipo de “proteção” para *ECA* (*ECA***Alu*I/*Alu*I) foi observado em cerca de 76% dos indivíduos normotensos e 57% dos hipertensos. Assim como o observado na população carioca, o genótipo *RM**4582C/4582C teve maior prevalência entre os hipertensos (30%) quando comparados com os normotensos (17%). A análise comparativa das freqüências genotípicas dos polimorfismos *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T e *RM**G3514C não apresentaram diferenças significativas entre as amostras avaliadas ($p > 0,05$).

A comparação dos perfis alélicos, observados entre as amostras de normotensos e hipertensos, revelou que os alelos *ECA***Alu*D e *RM**4582C foram mais expressivos entre os hipertensos, quando comparados com os observados nos controles (Tabela 4.6). A análise realizada nos demais polimorfismos não indicou diferenças significativas entre as amostras ($p > 0.05$).

Os polimorfismos que não apresentaram diferenças nos perfis genotípicos e alélicos, entre amostras de hipertensos e normotensos foram excluídos das análises subseqüentes.

Tabela 4.6: Freqüências genóticas e alélicas dos polimorfismos gênicos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, em normotensos e hipertensos.

Polimorfismo	Genótipos e alelos	Normotensos	Hipertensos	p	
<i>AGT</i> *M235T	235M/235M	08 (10%)	07 (8%)	0,154	
	Genótipos 235M/235T	56 (73%)	50 (61%)		
	235T/235T	14 (17%)	25 (31%)		
	Alelos	235M	72 (46%)	64 (39%)	0,197
		235T	84 (54%)	100 (61%)	
<i>ECA</i> * <i>Alu</i> I/D	<i>Alu</i> /I	59 (76%)	47 (57%)	0,022	
	Genótipos <i>Alu</i> /I	16 (21%)	27 (33%)		
	<i>Alu</i> /D	2 (3%)	08 (10%)		
	Alelos	I	134 (87%)	121 (74%)	0,003
		D	20 (13%)	43 (26%)	
<i>AGTR</i> ₁ *A1166C	1166A/1166A	55 (70%)	46 (56%)	0,157	
	Genótipos 1166A/1166C	20 (26%)	30 (37%)		
	1166C/1166C	3 (4%)	06 (7%)		
	Alelos	1166A	130 (83%)	122 (74%)	0,050
		1166C	26 (17%)	42 (26%)	
<i>CYP11B2</i> *C344T	344C/344C	14 (18%)	12 (15%)	0,881	
	Genótipos 344T/344C	36 (46%)	48 (58%)		
	344T/344T	28 (36%)	22 (27%)		
	Alelos	344C	64 (41%)	72 (44%)	0,602
		344T	92 (59%)	92 (56%)	
<i>RM</i> *G3514C	3514G/3514G	32 (41%)	37 (45%)	0,390	
	Genótipos 3514G/3514C	40 (51%)	38 (46%)		
	3514C/3514C	6 (8%)	07 (9%)		
	Alelos	3514G	104 (67%)	112 (68%)	0,756
		3514C	52 (33%)	52 (32%)	
<i>RM</i> *A4582C	4582A/4582A	24 (50%)	15 (22%)	0,003	
	Genótipos 4582A/4582C	16 (33%)	28 (40%)		
	4582C/4582C	08 (17%)	26 (38%)		
	Alelos	4582A	64 (67%)	58 (42%)	0,000
		4582C	32 (33%)	80 (58%)	

4.2.2.3. Análise de “ODDS ratio”

A investigação da suscetibilidade genética para o desenvolvimento da hipertensão, conduzida pela análise de ORs, foi realizada individualmente para cada polimorfismo. Aqueles que apresentaram resultados positivos foram posteriormente analisados aos pares e trios.

Esta investigação indicou que portadores dos genótipos *ECA*AluD/AluD* apresentam um risco de 2,35 (IC: 1,32 – 4,17) de desenvolver a hipertensão arterial, enquanto que, os portadores do genótipo *RM*4582C/4582C* possuem um risco de 2,73 (IC: 1,60 – 4,67). Posteriormente, realizou-se a análise pareada dos genótipos de “risco”. Os resultados obtidos indicaram um aumento significativo no valor da OR relacionado aos haplótipos *ECA*AluI/D + RM*A4582C* (DD + CC: OR = 9,023 [2,98 – 27,00]).

4.2.2.4. Análise de Regressão Linear Múltipla dos Fatores Genéticos

Para avaliar o impacto dos polimorfismos *ECA*AluI/D* e *RM*A4582C* na variação da pressão arterial utilizamos a análise de regressão linear. Esta última mostrou que a presença dos genótipos *ECA*AluD/AluD* e *RM*4582C/4582C* provocam aumentos de 6,2 mmHg ($p = 0,000$) e 4,6mmHg ($p = 0,002$) na PAS, respectivamente. Na variação da PAD, verificou-se que a presença dos referidos genótipos favorecem o incremento de 1,1mmHg ($p = 0,030$) e 1,0mmHg ($p = 0,018$), respectivamente.

4.2.3. Análise Conjunta dos Fatores Clínicos/Antropométricos e Genéticos

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 de indivíduos normotensos e hipertensos. A análise de regressão múltipla revelou que a idade e os polimorfismos *AluI/D* da *ECA* (alelo D) e A4582C (alelo C) do *RM* contribuíram para a variação da PAS ($F = 12,958$; $p = 0,000$). Os alelos *ECA*AluD* e *RM*4582C* estão associados a aumentos de 7,8mmHg ($p = 0,006$) e 4,3mmHg na PAS ($p = 0,004$), respectivamente, enquanto que a idade avançada contribui para um aumento de 0,47mmHg ($p = 0,000$) na PAS por ano de vida. Tendo em vista estes resultados, acreditamos que essa grande variação da PAS pode ser, em parte, determinada por

predisposição genética (alelos *ECA*AluD* e *RM*4582C*) e idade. Portanto, um genótipo desfavorável associado a um fator de risco idade 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 bebidas alcoólicas pode contribuir para um aumento de 4,3mmHg na PAD ($p = 0,003$). Idade avançada também está associada a um aumento de 0,21mmHg ($p = 0,001$) da PAD por ano de vida.

5 - DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é decorrente da interação pouco conhecida entre características genéticas individuais e inúmeros fatores ambientais. A contribuição destes fatores é responsável pelo amplo espectro de expressão fenotípica. Em alguns poucos casos o componente genético desta equação é tão importante que a modulação dos fatores ambientais é praticamente inexistente, na maior parte das vezes o envolvimento de múltiplas alterações genéticas associadas a um ou mais fatores ambientais predispõem o indivíduo à doença. Exemplos do primeiro caso incluem as formas monogênicas de hipertensão, como a Síndrome de Liddle; enquanto que entre as formas mais prevalentes de hipertensão arterial, a despeito da existência de fatores genéticos múltiplos, existem situações onde a simples diminuição da ingestão de sal é eficaz na redução, ou normalização, dos níveis pressóricos.

Como identificar estas diversas situações? Qual é o risco de um determinado indivíduo vir a desenvolver hipertensão arterial e quando? Se a patologia se desenvolver, qual será a sua intensidade? Quais órgãos-alvo serão preferencialmente acometidos? Qual o medicamento mais eficaz e com menores efeitos colaterais para aquele indivíduo? Respostas a estas questões exigem conhecimentos detalhados a respeito das complexas interações entre fatores genéticos e ambientais que estamos começando a entender.

5.1. ESTUDO MULTIFATORIAL REALIZADO NAS AMOSTRAS DE NORMOTENSOS E HIPERTENSOS DO RIO DE JANEIRO

O número exato de indivíduos hipertensos na Cidade ou Estado do Rio de Janeiro é difícil de ser estimado, sobretudo devido ao alto grau de subnotificação. Entretanto, a frequência elevada de doenças cardiovasculares desencadeadas pela HA sugere uma prevalência expressiva da hipertensão (BRANDÃO *et al.*, 2003). De fato, um dos poucos estudos populacionais existentes verificou que a frequência da hipertensão arterial é 38% em indivíduos com idade entre 18 a 80 anos (BRANDÃO *et al.*, 2003). Sabendo-se da importância da HA como fator de risco para doenças coronarianas, e mais, a sua prevalência elevada na população do Rio de Janeiro, tornou-se interessante investigar a existência de mecanismos genéticos que poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento desta doença. Baseados nestas observações, analisamos a contribuição de

variantes genéticas, clínicas e antropométricas para o desenvolvimento da HA, bem como a interação entre estas para a gravidade da doença.

5.1.1. Avaliação Clínica e Antropométrica

Os resultados da avaliação clínica/antropométrica detectaram índices alterados de IMC e LDL-colesterol entre os hipertensos. Além disso, também foi observada a presença expressiva da etnia negra, do gênero feminino e da idade aumentada neste grupo. A importância destas características para a variação da pressão arterial é amplamente conhecida, entretanto o impacto que estas apresentam sobre a PA pode ser variável entre as populações (GRIM *et al.*, 1995; MIKHAIL *et al.*, 1999; IRIGOYE *et al.*, 2003). Desta forma, mesmo sabendo a importância destes parâmetros para a variabilidade fenotípica da pressão arterial, fez-se necessário a sua validação para a população em estudo. Por este motivo, mensuramos o impacto destas variáveis na pressão arterial e verificamos que o sobrepeso e a etnia negra favorecem a elevação tanto da PAS quanto da PAD, enquanto que a idade contribui apenas para o aumento da PAS. Resultados de estudos similares ao nosso já evidenciaram que o aumento no IMC propicia uma elevação média de 7,4mmHg, na PAS, e de 6,0mmHg, na PAD (IRYOGEN *et al.*, 2003). Infelizmente, devido a carência de informações a respeito do impacto da etnia e idade sobre a variação da PA, não foi possível realizar comparações com os nossos resultados. Grande parte das publicações fazem menção à associação destes fatores com a PA, mas esses mesmos trabalhos não apresentam os dados correspondentes (GRIM *et al.*, 1995; LANDMAN & CRUICKSHANK, 2001).

Com base nos resultados obtidos nesta análise sugerimos que a presença do IMC alterado, etnia, gênero e idade estejam contribuindo para modulações hemodinâmicas que atuam no desenvolvimento da HA.

5.1.2. Avaliação Genética

Os resultados das análises comparativas dos perfis genotípicos e alélicos, entre normotensos e hipertensos mostraram a frequência elevada do genótipo 235T/235T e do alelo 235T do gene *AGT* entre os pacientes, corroborando relatos de outras populações (AGACHAN *et al.*, 2003; CASTELLANO *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2003). Posteriormente,

avaliamos o efeito quantitativo do genótipo 235T/235T na variação da PA, e constatamos que a presença deste genótipo favorece aumentos de até 6,3mmHg na PAS e de até 2,8mmHg na PAD. A análise da OR indicou que portadores deste genótipo de “risco” possuem uma suscetibilidade 6,5 vezes maior de desenvolver a hipertensão, quando comparados com os portadores dos demais genótipos. Como já é sabido, a presença do genótipo mutante *AGT*235T/235T* apresenta uma estreita relação com aumentos nos níveis plasmáticos de angiotensinogênio (WINKELMANN *et al.*, 1999). Como conseqüência, observa-se reações em cascata que se iniciam com o aumento na produção de angiotensina II e culminam com o aumento da pressão arterial (INOUE *et al.*, 1997). Agregando os resultados de nossas análises a este conjunto de informações, é possível sugerir que a presença do genótipo homozigoto mutante do polimorfismo *AGT*M235T* pode ser considerada como um marcador molecular para a hipertensão.

O estudo das freqüências genótípicas e alélicas do polimorfismo *ECAAlu/D*, realizado em nossas amostras, apresentaram resultados similares aos descritos em outras populações (DZIDA *et al.*, 2001; AGACHAN *et al.*, 2003). Apesar da variante polimórfica (deleção do segmento *Alu*) estar relacionada com o aumento da concentração plasmática da enzima conversora de angiotensina, os resultados dos estudos de genética epidemiológica têm sido conflitantes (IWAI *et al.*, 1994; SCHUNKERT *et al.*, 1994; TIRET *et al.*, 1998; VASKU *et al.*, 1998; KARIO *et al.*, 1999; GINER *et al.*, 2000; AGACHAN *et al.*, 2003; CASTELLANO *et al.*, 2003;). Em nossa amostra, não foi possível detectar diferenças significativas entre as populações de normotensos e hipertensos.

O gene do receptor tipo 1 de angiotensina II possui vários polimorfismos descritos, entretanto o mais estudado tem sido o A1166C. Desde a sua descoberta, este polimorfismo tem sido avaliado em diferentes populações, muitas das quais a presença da variante polimórfica (1166C) tem sido relacionada com a HA (DZIDA *et al.*, 2001; POCH *et al.*, 2001; AGACHAN *et al.*, 2003; HENDERSON *et al.*, 2004). No presente estudo verificamos que as freqüências genótípicas e alélicas diferiram significativamente das freqüências relatadas em outras populações. As nossas análises mostraram que 81% dos hipertensos avaliados apresentavam o alelo selvagem (1166A). Deste total, 64% eram homozigotos (1166A/1166A) e 34% heterozigotos (1166A/1166C). Por outro lado, a freqüência do homozigoto mutante (1166C/1166C) só foi observada em cerca de 2% dos pacientes, contrastando com os 11% observados entre os normotensos. O impacto dos

genótipos 1166A/1166A e 1166A/1166C na pressão arterial, quantificado pela regressão linear, mostrou que estes podem contribuir para o aumento em até 4,3 mmHg na PAS e de até 2,1mmHg na PAD. Verificamos ainda que o risco de desenvolver a hipertensão é cinco vezes maior para os portadores dos genótipos 1166A/1166A e 1166A/1166C. Relatos semelhantes foram observados em populações italianas (CASTELLANO *et al.*, 1996; SIANI *et al.*, 2001; CASTELLANO *et al.*, 2003). Apesar dos nossos resultados estarem em concordância com os achados nas populações italianas, faz-se necessário a elucidação do distúrbio fisiológico causado por este polimorfismo para que os nossos resultados sejam confirmados.

Em relação ao gene da aldosterona sintetase, as freqüências genótípicas e alélicas do polimorfismo C344T foram similares às observadas em outras populações (FARDELLA *et al.*, 1996; BRAND *et al.*, 1998; LIM *et al.*, 2002). Resultados provenientes das análises comparativas das freqüências dos alelos e genótipos, entre as amostras de pacientes e controles, mostraram diferenças significativas. Sendo esta causada pelo incremento da freqüência da variante mutante entre os pacientes. Com o auxílio do teste de regressão linear foi possível determinar o efeito do homozigoto 344T/344T na pressão arterial. A partir de tal análise foi possível verificar que este genótipo provoca um aumento de 3,4mmHg na PAS e de 2,6mmHg na PAD. Verificamos ainda que os portadores deste genótipo duplo-mutante possuem um risco 2,8 vezes maior de desenvolver a hipertensão, quando comparado com os que possuem os outros genótipos.

O gene responsável pelo receptor de mineralocorticóide vem sendo exaustivamente estudado, com a finalidade de rastrear variações que possam contribuir para o desenvolvimento de formas monogênicas de hipertensão. Apesar do destaque que este gene possui, pouco se sabe sobre polimorfismos relacionados com a hipertensão arterial primária. POCH e colaboradores (2001) foram os primeiros a descrever polimorfismos no gene do *RM* e tentaram relacioná-los com a hipertensão arterial. Entretanto, os resultados obtidos foram negativos, e poucos relatos podem ser encontrados na literatura sobre este aspecto. Como consequência, o conhecimento sobre mecanismos genéticos e fisiológicos relacionados com este polimorfismo é restrito. Diante deste cenário e com a necessidade de avaliar variantes genéticas em diferentes genes do SRAA, escolhemos dois polimorfismos, o *RM**G3514C e o *RM**A4582C para serem estudados em nossas amostras. Os resultados de nossas análises mostraram que 54% dos pacientes apresentaram o alelo mutante

*RM*3514C*, enquanto que 44% dos normotensos o possuíam. Para o alelo selvagem, os resultados foram praticamente o inverso. A princípio, estes dados apontavam para uma possível associação entre a presença da variante mutante *MR*3514C* e a hipertensão arterial. Entretanto, as análises de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg mostraram um decréscimo significativamente pronunciado tanto na amostra de pacientes como no grupo controle; portanto esses resultados devem ser vistos com muita cautela e precisam de uma análise muito mais apurada, incluindo o aumento do tamanho amostral e a genotipagem através de sequenciamento direto para certificar-nos da inexistência de erro de identificação. Assim, este polimorfismo foi excluído das análises subsequentes.

Quanto ao polimorfismo *RM*A4582C* observamos que 36% dos pacientes eram portadores do alelo 4582C contra 24% dos normotensos. A mensuração do efeito desta variante na pressão arterial, estimada através da análise de regressão linear, mostrou que o genótipo *RM*4582C/4582C* produz um incremento de 2,1mmHg na PAS. Esta análise não apontou interferência deste polimorfismo na PAD. Em seguida, avaliou-se a presença dos genótipos de maior frequência entre os pacientes e o risco de desenvolver a hipertensão. Os resultados da OR mostraram claramente que portadores do genótipo *RM*4582C/4582C* possuem um risco três vezes maior de desenvolver a hipertensão, quando comparados com os que não o possuem. Com base nestes resultados, verificamos que a presença de variantes mutantes no gene do *RM* pode contribuir para o aumento da pressão arterial e conseqüentemente a instalação da hipertensão arterial. Entretanto para maior robustez de nossos resultados faz-se necessário a investigação dos distúrbios fisiológicos relacionados a tais polimorfismos, bem como a sua reprodução em outras populações.

A análise de ORs mostrou que a presença dos genótipos de risco dos genes do *AGT*, *AGTR₁*, *CYP11B2* e *RM* atuam individualmente na homeostase pressórica. Além disso, a combinação destes aumenta gradativamente a suscetibilidade para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Este fato indica que quanto maior o número de genótipos de risco que indivíduo possui, maior será a chance de desenvolver a hipertensão arterial. Como a amostra estudada foi formada por pacientes com hipertensão refratária, especulamos que a presença de múltiplos fatores genéticos, bem como a presença de variáveis antropométricas, não só estão favorecendo o aumento da suscetibilidade à doença, como também contribuem para gravidade da HA.

5.1.3. Avaliação Multifatorial

As análises prévias mostraram associações de fatores antropométricos e genéticos com a hipertensão arterial. Entretanto, sabe-se que tais fatores estão atuando simultaneamente na modulação da pressão arterial, e por isso é fundamental mensurar a contribuição destes para a variação da PA. Este procedimento apresentou resultados similares aos das análises anteriormente, mesmo sendo verificado uma discreta diminuição no efeito das variáveis IMC, etnia, gênero, idade, *AGT**M235T, *AGTR*₁*A1166C, *CYP11B2**C344T e *RM**A4582C na PAS. Este decréscimo pode ser justificado pela diluição dos efeitos devido ao incremento de variáveis.

Os resultados da análise multifatorial constataram que a presença de fatores genéticos, bem como parâmetros antropométricos estão contribuindo para a variação da pressão arterial, podendo assim favorecer o desenvolvimento da hipertensão arterial. É válido ressaltar que grande parte dos trabalhos publicados abordam apenas o impacto que os fatores ambientais (BARRETO *et al.*, 1993; IRIGOYEN *et al.*, 2003) ou fatores genéticos (DZIDA *et al.*, 2001; AGACHAN *et al.*, 2003) podem trazer para a pressão arterial. Entretanto, a pressão arterial é um fenótipo composto pelo conjunto de fatores ambientais/antropométricos e genéticos. Portanto, a abordagem metodológica empregada em nosso estudo é mais abrangente, podendo ser considerada de melhor acurácia.

5.2. ESTUDO MULTIFATORIAL REALIZADA NAS AMOSTRAS DE NORMOTENSOS E HIPERTENSOS DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO

A frequência da hipertensão arterial no Estado do Amazonas é desconhecida. Entretanto, relatos dos profissionais do laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ), que trabalham na região, apontam para uma baixa frequência da HA não só na população de Santa Isabel, mas em todas as comunidades ribeirinhas. Este fato refletiu-se na dificuldade que a equipe teve em encontrar indivíduos hipertensos. Além da escassez de casos, não foram encontrados indivíduos com hipertensão de nível moderado ou grave. Para melhor entender a epidemiologia da hipertensão arterial nesta população, investigamos a contribuição de marcadores genéticos e de fatores antropométricos para o desenvolvimento desta doença.

5.2.1. Avaliação Clínica e Antropométrica

A análise comparativa do perfil antropométrico entre as amostras mostrou que o consumo de bebidas alcoólicas, idade avançada e tabagismo foram mais freqüentes em hipertensos do que em normotensos. Esses resultados são corroborados por estudos anteriores, que demonstraram que o consumo de álcool contribui para o desenvolvimento de hipertensão arterial ao estimular o sistema nervoso simpático e aumentar a produção de hormônios adrenocorticóides (PERRY, 1994), enquanto idade avançada e tabagismo atuam como co-fatores que, em associação com sensibilidade ao sal ou obesidade, colaboram para o surgimento dessa doença (KORNITZER & DRAMAIX, 1999). A obesidade também é um importante fator de risco clínico para hipertensão, mas sua freqüência não diferiu significativamente entre os grupos. Além disso, o perfil de etnia observado na população amazônica (onde um grande número de indivíduos de ambos os grupos são índio-descendentes ou mestiços e poucos são negróides ou caucasóides) foi bastante semelhante entre normotensos e hipertensos. As análises de regressão linear revelaram que estas variáveis apresentam um importante efeito na variação da pressão arterial. Assim, o aumento da PAS é influenciado pelo incremento do IMC e a idade, enquanto que a elevação da PAD é condicionado não só por estes fatores como também pelo consumo de bebidas alcoólicas.

5.2.2. Avaliação Genética

O estudo comparativo das freqüências genótípicas e alélicas, entre normotensos e hipertensos, detectou diferenças significativas nos perfis dos polimorfismos *ECA*AluI/D* e *RM*A4582C*. Estas diferenças, ocasionadas pela freqüência aumentada dos genótipos *ECA*AluD/AluD* e *4582C/4582C*, indicam que a presença de tais genótipos possam estar relacionados com a HA. Este achado foi confirmado pelos resultados das análises subseqüentes, nas quais verificou-se que a presença destes genótipos de “risco” contribuem para elevações da PAS e PAD, aumentando a chance de desenvolver a hipertensão arterial. Desta forma, os resultados observados sugerem que a presença concomitante dos genótipos de risco dos polimorfismos *ECA*AluI/D* e *RM*A4582C* atuam de maneira aditiva, ou sinérgica, elevando a suscetibilidade para HA.

Atualmente, debate-se o papel do polimorfismo *ECA*AluI/D* para a suscetibilidade a hipertensão arterial. O motivo primordial dessa discussão é devida ao fato deste polimorfismo apresentar resultados conflitantes entre as populações. Apesar disso, a análise de um grande número de trabalhos mostra a existência de estudos que tentam traçar correlações entre a HA e apenas este polimorfismo. Conseqüentemente, esta visão monogênica pode tanto apresentar resultados positivos (FERNÁNDEZ-LLAMA *et al.*, 1998; YUKIKO *et al.*, 1998), quanto resultados negativos (CHIANG *et al.*, 1997; TABATABAEI *et al.*, 2006). Por conta deste cenário, e sabendo que a HA é um caráter complexo, julgamos que a abordagem de análise multigênica possa melhor indicar os polimorfismos que estão contribuindo para esta doença em uma dada população.

Com relação ao polimorfismo A4582C no gene *RM*, verificou-se uma expressiva prevalência do genótipo 4582C/4582C entre os pacientes. Estes resultados foram similares aos observados nas amostras do Rio de Janeiro. Apesar destes achados, torna-se necessário a sua validação em outras populações, bem como o reconhecimento de sua atuação fisiológica. Com estas informações adicionais poderemos compreender melhor os mecanismos genéticos envolvidos na fisiopatologia da HA.

5.2.3. Avaliação Multifatorial

Nas análises anteriores foram detectadas associações de fatores antropométricos e genéticos com a hipertensão arterial. Como estes fatores estão atuando simultaneamente na modulação da pressão arterial, é importante mensurar a contribuição destes para a variação da PA. Este procedimento apresentou resultados similares aos das análises anteriormente, mesmo sendo verificado uma discreta diminuição nos efeitos das variáveis idade, *ECA*AluI/D* e *RM*4582C* na PAS. Apesar disso, os resultados obtidos por nossas análises somam-se com os de outros estudos, que observaram que a idade, bem como o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabagismo e IMC alterado, quando associada ao genótipo *ECA*AluI/D/AluI/D* contribuem aditivamente a elevação da PAS (METTIMANO *et al.*, 2001; REF88). Em vistas de nossos achados, sugerimos que a presença dos genótipos *ECA*AluI/D/AluI/D* e *RM*4582C/4582C* e a idade devem contribuir, em parte, para a elevação da PAS.

Observamos também que a variação na PAD está associada ao consumo de álcool e à idade avançada. Neste caso, a análise de regressão mostrou que o consumo de bebidas alcoólicas produz um aumento médio de 4,3mmHg na PAD, enquanto que a idade provoca um aumento na PAD de 0,21mmHg por ano. Nossas observações somam-se aos relatos publicados anteriormente de que consumidores freqüentes de bebida alcoólica têm menor absorção de cálcio, o que poderia levar ao desenvolvimento de HA (KEAVNEY *et al.*, 1998). 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 adrenocorticóides (CLARK, 1984). Segundo KEAVNEY *et al.*, (1998), o consumo de cerca de 30g de etanol por dia aumenta a PA e, conseqüentemente, dobra a hipertensão (PAS > 160mmHg ou PAD > 95mmHg).

5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos em ambas as populações analisadas enfatizam a necessidade de ampliar o número de genes envolvidos em sistemas fisiológicos de controle da PA, bem como fatores antropométricos, para a obtenção de resultados mais acurados. Assim, a realização de estudos de epidemiologia genética mais abrangente permitirá o aprimoramento do conhecimento relacionado com os mecanismos patogênicos associados a HA. Estes conhecimentos possibilitarão utilizar marcadores genéticos no estudo da hipertensão para avaliar a potencialidade de um indivíduo desenvolver esta doença e inferir quanto a sua morbidade.

6 - CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÕES DAS ANÁLISES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DO RIO DE JANEIRO:

Baseados nos resultados obtidos, concluímos que:

- ❖ Fatores clínicos/antropométricos como IMC, etnia, gênero e idade contribuem para a elevação da pressão arterial. Conseqüentemente, a presença de tais parâmetros pode contribuir para o desenvolvimento da HA;
- ❖ A presença dos genótipos de risco presentes nos genes *AGT* (*AGT**235T/235T), *AGTR₁* (*AGTR₁**1166A/1166A), *CYP11B2* (*CYP11B2**344T/344T) e *RM* (*RM**4582C/4582C) aumentam as chances de desenvolver hipertensão arterial;
- ❖ A gravidade da doença pode estar relacionada a presença de múltiplos fatores clínicos/antropométricos e de genótipos de risco.

6.2. CONCLUSÕES DAS ANÁLISES REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO:

Em vistas dos resultados obtidos, concluímos que:

- ❖ O consumo de bebidas alcoólicas e a idade avançada foram os únicos parâmetros antropológicos associados com a elevação da PA;
- ❖ A análise do perfil genético indicou que a presença dos genótipos *ECA***AluD*/*AluD* e *RM**4582C/4582C contribuem para do risco de desenvolver a HA;
- ❖ A identificação de poucos fatores clínicos/antropométricos e genéticos de risco sugere que a baixa freqüência da hipertensão arterial primária observada nesta população, seja um reflexo do número reduzido de fatores de risco.

7 - BIBLIOGRAFIA

- 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.**, v.35, p.545–549, 2003.
- AGARWAL, A.; WILLIAMS, O.H.; FISHER, N.D.L. Genetics of human hypertension. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.16, n.3, p.127-133, 2005.
- AGERHOLM-LARSEN, B.; NORDESTGAARD, B.G; TYBJÆRG-HANSEN, A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, n.2, p.484-492, 2000.
- AIRES, M.M. **Mecanismos de transporte no néfron distal**. In: Fisiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- ALFAKIH, K.; MAQBOOL, A.; SIVANANTHAN, M.; WALTERS, K.; BAINBRIDGE, G.; RIDGWAY, J.; BALMFORTH, A.J.; HALL, A.S. Left ventricle mass index and the common, functional, X-linked angiotensin II type-2 receptor gene polymorphism (–1332 G/A) in patients with systemic hypertension. **Hypertension**, v.43, p.1189–1194, 2004.
- AMANT, C.; HAMON, M.; BAUTERS, C.; RICHARD, F.; HELBECQUE, N.; MCFADDEN, E.P.; ESCUDERO, X.; LABLANCHE, J-M.; AMOUYEL, P.; BERTRAND, M.E. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.29, p.486-490, 1997.
- ANDREOLLI, T.E.; BENNET, J.C.; CARPEUTER, C.C.J.; PLEUM, F.; SMITH, L.H. **Hipertensão e distúrbios vasculares do rim**. In: Medicina Interna Básica. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993.
- ARAI, K.; SHIBASAKI, T.; CHROUSOS, G.P. **Aldosterone deficiency and resistance**. In: Aldosterone deficiency and resistance. Adrenal physiology and diseases [on-line]. March, 2002. [Arquivo capturado em 03 de junho de 2006]. Disponível Internet via WWW:<URL: <http://www.endotext.org/adrenal/index.htm>.

- ARDAILLOU, R.; CHANSEL, D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. **Kidney Int.**, v.52, p.1458-1468, 1997.
- ARRIZA, J.L.; WEINBERGER, C.; CERELLI, G.; HANDELIN, B.L.; HOUSEMAN, B.L.; EVANS, R.M. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. **Science**, v.17, n.237(4812), p.268-275, 1987.
- AUGUST, P.; OPARIL, S. Hypertension in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, p.1862-1866, 1999.
- BANG, L.E.; BUTTENSCHON, L.; KRISTENSEN, K.S.; SVENDSEN, T.L. Do we undertreat hypertensive smokers? A comparison between smoking and non-smoking hypertensives. **Blood Press. Monit.**, v.5, n.5-6, p.271-274, 2000.
- BARON, A.D.; STEINBERG, H.O.; CHAKER, H. Insulin mediated skeletal muscle vasodilation contributed to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p.786-792, 1995.
- BARRETO, N.D.M.; PACHECO, J.R.B.; MARINS, S.R.; MAGALHAES, C.F.; CARDOSO, G.P.; HOUAISS, M. Prevalencia da hipertensão arterial nos indivíduos de raça negra. **Arq. Bras. Med.**, v.67, n.6, p. 449-451, 1993.
- BENETOS, A.; CAMBIEN, F.; GAUTIER, S.; RICARD, S.; SAFAR, M.; LAURENT, S.; LACOLLEY, P.; POIRIER, O; TOPOUCHIAN, J.; ASMAR, R. Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive individuals. **Hypertension**, v.28, p. 1081-1084, 1996.
- BENJAFIELD, A.V.; WANG, W.Y.S.; MORRIS, A.J. No association of Angiotensin-Converting enzyme 2 gene (ACE2) polymorphisms with essential hypertension. **Am J Hypertension**, v.17, n.7, p. 624-628, 2004.
- BENOWITZ, N.L.; JUYT, F.; JACOB, P. Influence of nicotine on cardiovascular and hormonal effects of cigarette smoking. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.36, p.76-81, 1984.

- BENOWITZ, N.; HANSSON, A.; JACOB, P. Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking. **Hypertension**, v.39, n.6, p.1107-1112, 2002.
- BONNARDEAUX, A.; DAVIES, E.; JEUNMAITRE, X.; FERRY, I.; CHARRU, A.; CLAUSER, E.; TIRET, L.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. **Hypertension**, v.24, p.63-69, 1994.
- BOUTHIER, J.D.; DE LUCA, N.; SAFAR, M.E.; SIMON, A.C.H. Cardiac hypertrophy and arterial distensibility in essential hypertension. **Am. Heart J.**, v.109, p.1345-1352, 1985.
- BRAND, E.; CHATELAIN, N.; MULATERO, P.; FÉRY, I.; CURNOW, K.; JEUNEMAITRE, X.; CORVOL, P.; PASCOE, L.; SOUBRIER, F. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. **Hypertension**, v.32, p.198-204, 1998.
- BRANDÃO, A.P.; BRANDÃO, A.A.; MAGALHÃES, M.E.C.; POZZAN, R. Epidemiologia da hipertensão arterial. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.1, p.7-19, 2003.
- BRUM, P.C.; DA SILVA, G.J.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v.36, p.1018-1022, 2000.
- BRUNNER, H.R.; LARAGH, J.H.; BAER, L.; NEWTON, M.A.; GOODWIN, F.T.; KRAKOFF, L.R.; BARD, R.H.; BUHLER, F.R. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. **N. Engl. J. Med.**, v.2, n.286(9), p.441-449, 1972.
- BURREL, L.M.; JOHNSTON, C.I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **TRENDS Endocrinol. Metabol.**, v.15, n.4, p.166-169, 2004.

- BURT, V. L., WHELTON, P., ROCELLA, E. J., BROWN, C., CUTLER, J. A., HIGGENS, M., HORAN, M. J. LABARTHE D. Prevalence of hypertension in the US adult population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1991. **Hypertension**, v. 25, p.305–313, 1998.
- CABELLO, P.; KRIEGER, H. GENIOC: **Sistema para análises de dados de genética**. Publicação técnica. Departamento de Genética. Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 1997.
- CAREY, R.M.; WANG, Z.Q.; SIRAGY, H.M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. **Hypertension**, v.35, n.2 p. 155-63, 2000.
- CAREY, R.M.; HOWELL, N.L.; JIN, X.H.; SIRAGY, H.M. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. **Hypertension**, v.1, n. 38(6), p.1272-1277, 2001.
- CASTELLANO, M.; MUIESAN, M.L.; BESCHI, M.; RIZZONI, D.; CINELLI, A.; SALVETTI, M.; PASINI, G.; PORTERI, E.; BETTONI, G.; ZULLI, R.; AGABITI-ROSEI, E. Angiotensin II type 1 receptor A/C¹¹⁶⁶ polymorphism. Relationship with blood pressure and cardiovascular structure. **Hypertension**, v.2, p.1076-1080, 1996.
- CASTELLANO, M.; GLORIOSO, N.; CUSI, D.; SARZANI, R.; FABRIS, B.; OPOCHER, G.; ZOCCALI, C.; GOLIN, R.; VEGLIO, F.; VOLPE, M.; MANTERO, F.; FALLO, F.; ROSSI, G.P.; BARLASSINA, C.; TIZZONI, L.; FILIGHEDDU, F.; GIACCHE, M.; ROSSI, F. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. **J. Hypertens.**, v. 21, p.1853–1860, 2003.
- CHEN, S.; PATEL, J.M.; BLOCK, E.R. Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release. **Am. J. Physiol.**, v.279, p.849-856, 2000.
- CHEN, W.; SRINIVASAN, S.R.; ELKASABANY, A.; ELLSWORTH, D.L.; BOERWINKLE, E.; BERENSON, G.S. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene Polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure

and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study. **Am. J. Hypertens.**, v.14, p.1046-1052, 2001.

CHIANG, T-T.; LAI, Z-P.; CHERN, T-H.; TSENG, C-D.; HSU, K-L.; LO, H-M.; TSENG, Y-Z. Lack of association of the angiotensina converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. **Am. J. Hyperten.**; v.10, p.197-201, 1997.

CHIU, R.W.; TANG, N.L.; HUI, D.S.; CHUNG,G.T.; CHIM, S.S.; CHAN, K.S.; SUNG, Y.M.; CHAN, L.Y.; TONG, Y.K.; LEE, W.S.; CHAN, P.K.; LO, Y.M. ACE2 gene polymorphisms do not affect outcome of severe acute respiratory syndrome. **Clin. Chem.**, v.50, p.1683-1686, 2004;

CHUA, S.C.; SZABO, P.; VITEK, A.; GRZESCHIK, K.H.; JOHN, M.; WHITE, P.C. Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P450c11). **Proc, Natl. Acad. Sci.**, v.84, p.7193–7197, 1987.

CLARK, L. Alcohol use and hypertension: clinical considerations and implications. **Postgrad. Med.**, v.75, n.8, p.273-276, 1984.

CLAUSER, E.; CURNOW, K.M.; DAVIES, E.; CONCHON, S.; TEUTSCH, B.; VIANELLO, B.; MONNOT, C.; CORVOL, P. Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. **Eur. J. Endocrinol.**, v.134, n.4, p.403-411, 1996.

COLEMAN, T.G.; GYTOON, A.C. Hypertension caused by salt loading in the dog – III. onset transient of cardiac output and other circulation variables. **Cir. Res.**, v.25, p.153-160, 1969.

COLEMAN, J.K.; KREBS, L.T.; HAMILTON, T.A.; ONG, B.; LAWRENCE, K.A.; SARDINIA, M.F.; HARDING, J.W.; WRIGHT, J.W. Autoradiographic identification of kidney angiotensin I-induced renal cortical blood flow changes in rats. **Peptides**, v.19, p.269-277, 1998.

- CORVOL, P.; SOUBRIER, F.; JEUNEMAITRE, X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. **Pathol. Biol.**, v.45, n.3, p.229-39, 1997.
- CUSHMAN, W.C. Alcohol consumption and hypertension. **J. Clin. Hypertens.**, v.3, n.3, p.166-170, 2001.
- DATA, J.L.; GERBER, J.G.; CRUMP, W.J.; FROLICH, J.C.; HOLLIFIELD, J.W.; NIES, A.S. The prostaglandin system. A role in canine control of renin release. **Circ. Res.**, v.42, p.454-458, 1978.
- DAVIES E., HOLLOWAY, C.D.; INGRAM, M.C.; INGLIS, G.C.; FRIEL, E.C; MORRISON, C.; ANDERSON, N.H.; FRASER, R.; CONNELL, J.M.C. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. **Hypertension**, v.33, p. 703–707, 1999.
- DAVIES, E.; KENYON, C.J. CYP11B2 polymorphisms and cardiovascular risk factors. **J. Hypertens.**, v.21, n.7, p.1249-1253, 2003.
- DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M.S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr. Rev.**, v.19, p.269-301, 1998.
- DE WARDENER, H.E.; MACGREGOR, G.A. Harmful effects of dietary salt in addition to hypertension. **J. Hum. Hypertens.**, v.16, p.213-223, 2002.
- DEINUM, J.; VAN GOOL, J.; KOFFLARD, M.; TEN-KATE, F.; JAN-DANSER, A.H. Angiotensin II type 2 receptors and cardiac hypertrophy in women with hypertrophic cardiomyopathy. **Hypertension**, v.38, p.1278–1281, 2001.
- DENGEL, D.R.; BROWN, M.D.; FERRELL, R.E.; REYNOLDS, T.H.; SUPIANO, M.A. Exercise-induced changes in insulin action are associated with ACE gene polymorphisms in older adults. **Physiol. Genomics**, v.11, p.73-80, 2002.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R.E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related

- carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ. Res.**, v.87, p. E1–E9, 2000.
- DORIA, A.; JI, L.; WARRAM, J.H.; KROLEWSKI, A.S. DdeI polymorphism in the AGTR1 gene. **Hum. Mol. Genet.**, v.3, n.8, p.1444, 1994.
- DZIDA, G.; SOBSTYL, J.; PUZNIAK, A; GOLON, P.; MOSIEWICZ, J.; HANZLIK, J. polymorphisms of angiotensina-converting enzyme and angiotensina II receptor type 1 in essential hypertension in Polish population. **Med. Sci. Monit.**, v.7, n.6, p.1236-1241, 2001.
- EL-DORRY, H.A.; PICKETT, C.B.; MACGREGOR, J.S.; SOFFER, R.L. Tissue-specific expression of RMNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.79, p.4295– 4297, 1982.
- ERIKSSON, U.; DANILCZYK, U.; PENNINGER, J.M. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. **Curr. Biol.**, v.12, p. R745–R752, 2002.
- FANG, J.; WYLIE-ROSETT, A.; ALDERMAN, M.H. Exercise and cardiovascular outcomes by hypertension status: NHANES I Epidemiological follow-up study, 1971-1992. **Am. J. Hypertens.**, v.18, p.751-758, 2005.
- FARDELLA, C.E.; RODRÍGUEZ, H.; MONTERO, J.; ZHANG, G.; VIGNOLO, P.; ROJAS, A.; VILLARROEL, P.; MILLER, W.L. Genetic variation in P450c11AS in Chilean patients with low renin hypertension. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.81, n.12, p.4347-4351, 1996.
- FARRAR, D.J.; BOND, M.G.; RILEY, W.A.; SAWYER, J.K. Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. **Circulation**, v.83, p.1754-1763, 1991.
- FERÁNDEZ-LLAMA, P.; POCH, E.; ORIOLA, J.; BOTEY, A.; COLL, E.; DARNELL, A.; RIVIERA, F.; REVERT, J. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in essential hipertensión and nephroangiosclerosis. **Kidney Inter.**, v.53, p. 1743-1747, 1998.

- FERRARIO, C.M.; CHAPPELL, M.C.; TALLANT, E.A.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I. Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). **Hypertension**, v.30, p.535-541, 1997.
- FERRARIO, C.M.; CHAPPEL, M.C.; DEAN, R.H.; IYER, S.N. Novel angiotensina peptides regulate blood pressure, endothelial function and natriuresis. **J. Am. Soc. Nephrol.** v.9, p.1716-1722, 1998.
- FLIER, J.S. Clinical review: what's in a name? In search of leptin's physiologic role. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, p.1407-1413, 1998.
- FREDERICH, J.R.; KAHN, B.B.; PEACH, M.J.; FLIER, J.S. Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. **Hypertension**, v.19, p.339-344, 1992.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v.18, p.499-502, 1972.
- FRIEDMAN, J.J. **Circulação sistêmica.** In: Fisiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979.
- FUCHS, F.D.; MOREIRA, W.D.; RIBEIRO, J.P. Efeitos do exercício físico na prevenção e tratamento da hipertensão arterial: avaliação por ensaios clínicos randomizados. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.4, p.91-93, 2001a.
- FUCHS, F.D.; CHAMBLESS, L.E.; WHELTON, P.K.; NIETO, F.J.; HEISS, G. Alcohol Consumption and the Incidence of Hypertension. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Hypertension**, n.37, p.1242-1250, 2001b
- FUCHS, S.C.; GUIMARÃES, S.M.; SORTICA, C.; WAINBERG, F.; DIAS, K.O.; UGHINI, M.; CASTRO, J.A.S.; FUCHS, F.D. Reliability of race assessment based on the race of the ascendants: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v.2, n.1, p. 2002. Arquivo disponível na Internet. Capturado em 01/2003. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=65507&blobtype=pdf>

- GAILLARD-SANCHEZ, I.; MATTERI, M.G.; CLAUSER, E.; CORVOL, P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. **Hum. Genet.**, v.84, n.4, p.341-343, 1990.
- GAVA, N.S.; VÉRAS-SILVA, A.S.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.26, p.1129-1133, 1995.
- GELLER, D.S.; FARHI, A.; PINKERTON, N.; FRADLEY, M.; MORITZ, M.; SPITZER, A.; MEINKE, G.; TSAI, F.T.; SIGLER, P.B.; LIFTON, R.P. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. **Science**, v.289, p.119-23, 2000.
- GIGANTE, B.; PIRAS, O.; DE PAOLIS, P.; PORCELLINI, A.; NATALE, A.; VOLPE, M. Role of the angiotensin II AT2-subtype receptors in the blood pressure lowering effect of losartan in salt-restricted rats. **J. Hypertens.**, v.16, n.12 (Pt 2), p.2039-2043, 1998.
- GINER, V.; POCH, E.; BRAGULAT, E.; ORIOLA, J.; GONZALEZ, D.; COCA, A.; DE LA SIERRA, A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. **Hypertension**, v.35, p.512-517, 2000.
- GORDON, N.F.; SCOTT, C.B.; LEVINE, B.D. Comparison of single versus multiple lifestyle interventions: are the antihypertensive effects of exercise training and diet-induced weight loss additive? **Am. J. Cardiol.**, v.79, p.763-767, 1997.
- GOUDET, J.A.; RAYMOND, M.; DE MEEUS, T.; ROUSSET, F. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v.144, v.4, p.1993-1940, 1996.
- GRIM, C.E.; HENRY, J.P.; MYERS, H. **High blood pressure in blacks: salt, slavery, survival, stress, and racism.** In: Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2.ed. New York, Raven Press, 1995.
- GROBEE, D.E. **Electrolyte intake and human hypertension.** In: Sodium and potassium. Textbook of hypertension. Oxford, Blackwell Sci. Publ., 1994.

- GUI-YAN, W.; YAN-HUA, W.; QUN, X.; WEI-JUN, T.; MING-LING, G.; JIAN, W.; MING-WU, F.; YONG-HONG, Z. Associations between RAS Gene polymorphisms, environmental factors and hypertension in Mongolian people. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 21, n.4, p.287-292, 2006.
- HAGBERG, J.M.; MONTAIN, S.J.; MARTIN, W.H.; EHSANI, A.A. Effect of exercise training in 60-to-69-yearsold persons with essential hypertension. **Am. J. Cardiol.**, v.64, p.348-353, 1989.
- HAJJAR, I.; KOTCHEN, J.M.; KOTCHEN, T.A. Hypertension: Trends in Prevalence, Incidence, and Control. **Annual Review Public Health**, v.27, p.465-490, 2006.
- HALIMI, J.M.; GIRAUDEAU, B.; VOL, S.; CACES, E.; NIVET, H.; TICHET, J. The risk of hypertension in men: direct and indirect effects of chronic smoking. **J. Hypertens.**, v.20, n.2, p.187-193, 2002.
- HALL, J.E.; BRANDS, M.W.; HENEGAR, J.R.; SHEK, E.W. Abnormal kidney function as a cause and a consequence of obesity hypertension. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.25, p.58-56, 1998.
- HAMILTON, T.A.; HANDA, R.K.; HARDING, J.W.; WRIGHT, J.W. A role of the angiotensin IV-AT4 system in mediating natriuresis in the rat. **Peptides**, v.22, p.935-944, 2001.
- HARMER, D.; GILBERT, M.; BORMAN, R.; CLARK, K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. **FEBS Lett**, v.532, p.107-110, 2002.
- HARRAP, S.B.; DAVIDISON, H.R.; CONNOR, J.M.; SOUBRIER, F.; CORVOL, P.; FRASER, R.; FOY, C.J.; WATT, C.G. The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. **Hypertension**, v.21, n.4, p.455-460, 1993.
- HASIMU, B.; NAKAYAMA, T.; MIZUTANI, Y.; IZUMI, Y.; ASAI, S.; SOMA, M.; KOKUBUN, S.; OZAWA, Y. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. **Hypertension**, v.41, n.2, p.308-312, 2003.

- HENDERSON, S.O.; HAIMAN, C.A.; 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.**, v.328, n.5, p.266-273, 2004.
- HENSKENS, L.H.; SPIERING, W.; STOFFERS, E.; SOOMERS, F.L.; VLIETNCK, R.F.; DE LEEUW, P.W.; KRON, A.A. Effects of ACE I/D and AT₁R-A¹¹⁶⁶C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocrates study. **J. Hypertens.**, v.21, p.81-86, 2003.
- HOWARD, T.E.; SHAI, S.Y.; 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, H.B.; FEINLEIB, M.; MCNAMARA, P.M.; CASTELLI, W.P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up participants in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v.96, p.968-977, 1983.
- INOUE, I.; NAKAJIMA, T.; WILLIAMS, C.S.; QUACKENBUSH, J.; PURYEAR, R.; POWERS, M.; CHENG, T.; LUDWING, E.H.; SHARMA, A.M.; HATA, A.; JEUNEMAITRE, X.; LALOUEL, J.M. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. **J. Clin. Invest.**, v.1, n.99 (7), p.1786-1797, 1997.
- IRIGOYEN, M.V.; LACCHINI, S.; DE ANGELIS, K.; MICHELINI, L.C. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.1, p.20-45, 2003.
- ISA, M.N.; BOYD, E.; MORRISON, N.; HARRAP, S.; CLAUSER, E.; CONNOR, J.M. Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization. **Genomics**, v.8, n.3, p.598-600, 1990.
- IWAI, N.; OHMACHI, N.; NAKAMURA, Y.; KINOSHITA, M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. **Circulation**, v.90, p.2622-2628, 1994.

- JACKSON, E.; BRANCH, R.; OATES, J. **Participation of prostaglandins in the control of renin release.** In: Prostaglandins and cardiovascular system. New York, Raven press, 1982.
- JACKSON, E.K.; GARRISON, J.C. **Renin and angiotensina.** In: The pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill, 1995.
- JENNINGS, G.; NELSON, L.; DEWAR, E.; KORNER, P.; ESLER, M.; LAUFER, E. Antihypertensive and hemodynamic effects of one year's regular exercise. **J. Hypertens.**, v.4 (supl), p.S659-S661, 1986.
- JEUNEMAITRE, X.; SOUBRIER, F.; KOTELEVTSSEV, Y.V.; LIFTON, R.P.; WILLIAMS, C.S.; CHARRU, A.; HUNT, S.C.; HOPKINS, P.N.; WILLIAMS, R.R.; LALOUEL, J-M.; CORVOL, P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**, v.71, p.169-180, 1992a.
- JEUNEMAITRE, X.; LIFTON, R.P.; HUNT, S.C.; WILLIAMS, R.R.; LALOUEL, J.M. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. **Nat. Genet.**, v.1, p.72-75, 1992b.
- KAINULAINEN, K.; PEROLA, M.; TERWILLIGER, J.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; SYYANEN, A.C.; VARTIAINEN, E.; PELTONEN, L.; KONTULA, K. Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. **Hypertension**, v.33, p.844-849, 1999.
- KARIO, K.; HOSHIDE, S.; UMEDA, Y.; SATO, Y.; IKEDA, U.; NISHIUMA, S.; MATSUO, M.; SHIMADA, K. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. **Hypertens. Res.**, v.22, p.95-103, 1999.
- KARLSSON, C.; LINDELL, K.; OTTOSSON, M.; SJOSTROM, L.; CARLSSON, B.; CARLSSON, L.M. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, p.3925-3929, 1998.

- KASSILIKIOTI, S.; DOUMAS, M.; DOUMA, S.; PETIDIS, K.; KARAGIANNIS, A.; BALASKA, K.; VYZANTIADIS, A.; ZAMBOULIS, C. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. **Am. J. Hypertens.**, v.9, p.700–702, 1996.
- KAUFMAN, J.; BARKLEY, N. Hypertension in Africa: an overview of prevalence rates and causal risk factors. **Ethn. Dis.**, v.3 (supl.), p.S83–S101, 1993.
- KAYSEN, G.; NORTH, R.H. Efeitos do álcool sobre a pressão arterial e os eletrólitos. **Clin. Med. Am. Norte**, v.68, n.1, p.235-261, 1984.
- KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.
- KEAVNEY, B.; MCKENZIE, C.A.; CONNELL, J.M.; JULIER, C.; RATCLIFFE, P.J.; SOBEL, E.; LATHROP, M.; FARRALL, M. Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. **Hum. Mol. Genet.**, v.7, n.1745-1751, 1998.
- KINOSHITA, A.; KOGA, M.; MATSUSAKI, M.; IKEDA, M.; TANAKA, H.; SHINDO, M.; ARAKAWA, K. Changes of dopamine and atrial natriuretic factor by mild exercise for hypertensives. **Clin. Exp. Hypertens.**, v.13, p.1275-1290, 1991.
- KOIKE, G.; HORIUCHI, M.; YAMADA, T.; SZPIRER, C.; JACOB, H.J.; DZAU, V.J. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.203, p.1842-1850, 1994.
- KOMIYA, I.; YAMADA, T.; TAKARA, M.; ASAWA, T.; SHIMABUKURU, M.; NISHIMORI, T.; TAKASU, N. Lys(173)Arg and -344T/C variants of CYP11B2 in Japanese patients with low-renin hypertension. **Hypertension**, v.35, n.3, p.699-703, 2000.
- KOMIYAMAY, Y.; KIMURAY, Y.; NISHIMURA, N.; HARA, K.; MORI, T.; OKUDA, K.; MUNAKATA, M.; MASUDA, M.; MURAKAMI, T.; TAKAHASHI, H. Vasodepressor effects of exercise are accompanied by reduced circulating

ouabainlike immunoreactivity and normalization of nitric oxide synthesis. **Clin. Exp. Hyper.**, v.19, p.363-372, 1997.

KORNITZER M, DRAMAIX M. Epidemiology of risk factors for hypertension. Implications for prevention and therapy. **Drugs**, v.57, n.5, p.695-712, 1999.

KRIEGER, J.E.; DRAGER, L.F.; PEREIRA, A.C.; KRIEGER, E.M. Genética e hipertensão arterial. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.3, p.499-507, 2004.

KUMAR, N.N.; BENJAFIELD, A.V.; LIN, R.C.; WANG, W.Y.; STOWASSER, M.; MORRIS, B.J. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. **J. Hypertens.**, v.21, n.7, p.1331-1337, 2003.

LANDMAN, J.; CRUICKSHANK, J. K. A review of ethnicity, health and nutrition related diseases in relation to migration in the United Kingdom. **Public Health Nutr.**, v.4, p.647-657, 2001.

LEE, Y.J.; TSAI, J.C. ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.25, p.1002-1008, 2002.

LIEB, W.; GRAF, J.; GOTZ, A.; KONING, I.R.; MAYER, B.; FISCHER, M.; STRITZKE, J.; HENGSTENBERG, C.; HOLMER, S.R.; DORING, A.; LOWEL, H.; SCHUNKERT, H.; ERDMANN, J. Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. **J. Mol. Med.**, v.84, n.1, p.88-96, 2006.

LIFTON, R.P.; GHARAVI, A.G.; GELLER, D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell**, v.104, p.545-556, 2001.

LIM, P.O.; MACDONALD, T.M.; HOLLOWAY, C.; FRIEL, E.; ANDERSON, N.H.; DOW, E.; JUNG, R.T.; DAVIES, E.; FRASER, R.; CONNELL, J.M. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, n.9, p.4398-4402, 2002.

- LIMA, C.T.S.; CARVALHO, F.M.; QUADROS, C.A.; GONÇALVES, H.R.; JÚNIOR, J.; PIRES, M.F.T.; BONFIM, M.S. Hipertensão arterial e alcoolismo em trabalhadores de uma refinaria de petróleo. **Rev. Pana. Salud. Publica**, v.6, n.3, p.185-191, 1999.
- LINAS, S.L. Role of prostaglandins in renin secretion in the isolates kidney. **Am. J. Physiol.**, v.246, p.F811-818, 1984.
- LIU, T.B.; SHANG, H.P.; ZHANH, K.X.; CHEN, L.H.; ZHU, X.L.; ZHANG, Y.; ZHU, D.L.; HUANG, W. Association of angiotensin I converting enzyme 2 gene polymorphism with essential hypertension in Chinese. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**. v.22, n.5, p.569-571, 2005 (Abstract).
- LONDON, G.M.; MARCHAIS, S.J.; SAFAR, M.E.; GENEST, A.F.; GUERIN, A.P.; METIVIR, F.; CHEDID, K.; LONDON, A.M Aortic and large artery compliance in end-stage renal failure. **Kidney Int.**, v.37, p.137-142, 1990.
- LUDWIG, M.; BOLKENIUS, L.; WICKERT, L.; BIDLINGMAIER, F. Common polymorphisms in genes encoding the huma mineralocorticoid receptor and the human amiloride-sensitive sodium channel. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.64, n.5-6, p.227-230, 1998.
- LUFT, F.C. Present status of genetic mechanisms in hypertension. **Med. Clin. North Am.**, v.88, n.1, p.1-18, 2004.
- LUNDGREN, C.H.; BROWN, S.L.; NORDT, T.K.; SOBEL, B.E.; FUJII, S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from Adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. **Circulation**, v.93, p.106-110, 1996.
- MACMAHON, S.; MACDONALD, G. Treatment of high blood pressure in overweight patients. **Nephron**, v.47, p.8-12, 1987.
- MARTIN, M.M.; ELTON, T.S. The sequence and genetic organization of the human type 2 angiotensin II receptor. **Biophys. Res. Commun.**, v.209, p.554-562, 1995.

- METTIMANO, M.; LANNI, A.; MIGNECO, A.; SPECCHIA, M.L.; ROMANO-SPICA, V.; SAVI, L. Angiotensin-related genes involved in essential hypertension: allelic distribution in an Italian population sample. **Ital. Heart J.**, v.2, n.8, p.589-593, 2001.
- MIGLIORINI, R.H. AS GLÂNDULAS RENAS. In: Fisiologia. Rio de Janeiro, Guarnabara Koogan, 1999.
- MIKHAIL, N.; GOLUB, M.S.; TUCK, M.L. Obesity and hypertension. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v.42, p.39-58, 1999.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.3, p.1215, 1998.
- MIYAZAKI, H.; FUKAMIZU, A.; HIROSE, S.; HAYASHI, T.; HORI, H.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S.; MURAKAMI, K. Structure of the human renin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, n.19, p.5999-6003, 1984.
- MORNET, E.; DUPONT, J.; VITEK, A.; WHITE, P.C. Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-450_{11 β}). **J. Biol. Chem.**, v.264, p.20961-20967, 1989.
- MORRISON, N.; HARRAP, S.B.; ARRIZA, J.L.; BOYD, E.; CONNOR, J.M. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. **Hum. Genet.**, v.85, p.130-132, 1990.
- NALOGOWSKA-GLOSNIKA, K.; LACKA, B.I.; ZYCHMA, M.J.; GRZESZCZAK, W.; ŪUKOWSKA-SZCZCHOWSKA, E.; PORBA, R.; MICHALSKI, B.; KNIAŹEWSKI, B.; RZEMPOUCH, J. Angiotensin II type 1 receptor gene A166C polymorphism associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. **Med. Sci. Monitor.**, v.6, p.523-529, 2000.
- NEGRÃO, C.E.; URBANA, M.; RONDON, B. Exercise, hypertension and baroreflex control of blood pressure. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.8, p.89-95, 2001.
- NICOD, J.; BRUHIN, D.; AUER, L.; VOGT, B.; FREY, F.J.; FERRARI, P. A biallelic gene polymorphism of CYP11B2 predicts increased aldosterone to renin ratio in

- selected hypertensive patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, n.6, p.2495-2500, 2003.
- OIKE, Y.; HATA, A.; OGATA, Y.; NUMATA, Y.; SHIDO, K.; KONDO, K. Angiotensin converting enzyme as a genetic risk factor for coronary artery spasm: implication in the pathogenesis of myocardial infarction. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.2975-2979, 1995.
- O'SULLIVAN, S.E.; BELL, C. The effects of exercise and training on human cardiovascular reflex control. **J. Auton. Nerv. System**, v.81, p.16-24, 2000.
- PERRY, I.J.; WHINCUP, P.H.; SHARPER, A.G. Environmental factors in the development of essential hypertension. **Br. Med. Bull.**, v.50, n.2, p.246-259, 1994.
- PITT, B. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.217, p.53-58, 2004.
- POCH, E.; GONZALEZ, D.; GINER, V.; BRAGULAT, E.; COCA, A.; DE LA SIERRA, A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. **Hypertension**, v.38, n.5, p.1204-1209, 2001.
- POJOGA, L.; GAUTIER, S.; BLANC, H.; GUYENE, T.T.; POIRIER, O.; CAMBIEN, F.; BENETOS, A. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.11, n.7, p.856-860, 1998.
- RAYMOND, M.; ROUSSER, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-1283, 1995.
- REAVEN, G.M.; LITHELL, H.; LANDSBERG, L. Hypertension and associated metabolic abnormalities— the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. **N. Eng. J. Med.**, v.334, p.374-381, 1996.
- 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 the variance of serum enzyme levels. **J. Clin. Invest.**, v.86, p.1343-1346, 1990.

- ROCCHINI, A.P. Obesity hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.15 (supl), p.50s-52s, 2002.
- ROCCHINI, A.P.; MOOREHEAD, C.; DEREMER, S.; GOODFRIEND, T.L.; BALL, D.L. Hyperinsulinemia and the aldosterone and pressor responses to angiotensin II. **Hypertension**, v.15, p.861-866, 1990.
- RODDERSON, F.M.; FULLER, P.J. Mineralocorticoid action. **Steroids**, v.65, n.2, p61-73, 2000.
- RUSS, A.P.; 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.**, v.2, n.5, p.609-610, 1993
- SABHA, M.; TANUS-SANTOS, J.E.; TOLEDO, J.C.; CITTADINO, M.; ROCHA, J.C.; MORENO, H. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.68, p.167-174, 2000.
- SAMAD, F.; UYSAL, K.T.; WIESBROCK, S.M.; PANDEY, M.; HOTAMISLIGIL, G.S.; LOSKUTOFF, D.T. Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.6902-6907, 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol.** In: Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAYED-TABATABAEI, F.A.; OOSTRA, B.A.; ISAACS, A.; VAN DUIJN, C.M.; WITTEMAN, J.C. ACE polymorphisms. **Circ. Res.**, v.2, n.98(9), p.1123-1133, 2006.
- SCHMIDT, S.; VAN HOOFT, I.M.; GROBBEE, D.E.; GANTEN, D.; RITZ, E.; Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. **J. Hypertens.**, v.11, p.345-348, 1993.

- SCHMIDT, S.; BEIGE, J.; WALLA-FRIEDEL, M.; MICHEL, M.M.; SHARMA, A.M.; RITZ, E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. **J. Hypertens.**, v.15, p.1385-1388, 1997.
- SCHUNKERT, H.; HENSE, H.W.; HOLMER, S.R.; STENDER, M.; PERZ, S.; KEIL, U.; LORELL, B.H.; RIEGGER, G.A. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. **N. Engl. J. Med.**, v.330, p.1634–1638, 1994.
- SECHI, L.A.; GRIFFIN, C.A.; GRADY, E.F.; KALINYAK, J.E.; SCHAMBELAN, M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. **Circ. Res.**, v.11, p.1482-1489, 1992.
- SHANMUGAM, S.; LLORENS-CORTES, C.; CLAUSER, E.; CORVOL, P.; GASE, J.M. Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of the rat kidney and adrenal gland. **Am. J. Physiol.**, v.268, p.F922-F930, 1995.
- SHANMUGAM, S.; CORVOL, P.; GASE, J.M. Angiotensin II type-2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. **Hypertension**, v.28, p.91-97, 1996.
- SHINE, J.; HARDMAN, J.A.; HORT, Y.J.; TELLAM, J.T.; CATANZARO, D.F.; MORRIS, B.J.; BAXTER, J.D. Structure of the human renin gene. **Trans. Assoc. Am. Physicians.**, v.97, p.63-69, 1884.
- SHINTANI, M.; IKEGAMI, H.; FUJISAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; OHISHI, M.; KATSUYA, T.; HIGAT, J.; SHIMAMOTO, K.; OGIHARA, Y. Leptin gene polymorphism is associated with hypertension independent of obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.2909-2912, 2002.
- SIANI, A.; IACOVIELLO, L. Interaction between hipertensión candidate genes of the Oliveti Heart Study. 11th European Meeting on Hypertension [resumo]. **J. Hypertens.**, v.19, p.S85, 2001.
- SIRAGY, H.M.; CAREY, R.M. Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. **Hypertension**, v.33, p.1237-1242, 1999.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77, sup.III, p.1-48, 2001.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Campos do Jordão, Brasil: SBC. 2002 [Arquivo capturado em 2 de novembro de 2002]. Disponível na Internet via WWW: <URL: <http://departamentos.cardiol.br/dha/ivdiretriz/ivdiretriz.asp>
- SOUBRIER, F.; ALHENC-GELAS, F.; HUBERT, C.; ALLEGRINI, J.; JOHN, M.; TREGGAR, G.; CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, n.24, p.9386-9390, 1988.
- STAESSEN, J.A.; GINNOCHIO, G.; THIJS, L.; FAGARD, R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. **J. Hum. Hypertens.**, v.11, p.507-514, 1997.
- STAMLER, J.; STAMLER, R.; RIEDLINGER, W.F.; ALGERA, G.; ROBERTS, R.H. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) Program, 1973-1975. **J. Am. Med. Assoc.**, v.235, p.2299-2306, 1976.
- STEVENS, J.; CAI, J.; PAMUK, E.R.; WILLIAMSON, D.F.; THUN, M.J.; WOOD, J.L. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. **N. Engl. J. Med.**, v.338, p.1-7, 1998.
- STRAZZULLO, P.; IACONE, R.; SIANE, A.; CAPPUCCIO, F.P.; RUSSO, O.; BARBA, G.; BARBATO, A.; D'ELIA, L.; TRVISAN, M.; FARINARO, E. Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. **J. Hypertens.**, v.19, p.399-406, 2001.
- TABATABAEI, F.A.S.; OOSTRA, A.I.; VAN DUJIN, C.M.; WITTEMAN, J.C.M. ACE polymorphisms. **Circ Res.**, v.98, p. 1123-1133, 2006.

- TALLEC, L.P.; LOMBÈS, M. The Mineralocorticoid Receptor: A Journey Exploring its Diversity and Specificity of Action. **Mol. Endocr.**, v.19, p.9, p.2211-2221, 2005.
- TANUS-SANTOS, J.E.; TOLEDO, J.C.; CITTADINO, M.; SABHA, M.; ROCHA, J.C.; MORENO, H. JR. Cardiovascular effects of transdermal nicotine in mildly hypertensive smokers. **Am. J. Hypertens.**, v.14, n.7 (Pt 1), p.610-614, 2001.
- TIRET, L.; BLANC, H.; RUIDAVETS, J.B.; ARVEILER, D.; LUC, G.; JEUNEMAITRE, X.; TICHET, J.; MALLET, C.; POIRIER, O.; PLOUIN, P.F.; CAMBIEN, F. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. **J. Hypertens.**, v.16, p.37-44, 1998.
- TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.33238-33243, 2000.
- TSAI, C-H.; FALLIN, D.; CHIANG, F-T.; HWANG, J-J.; LAI, L-P.; HSU, K-L.; TSENG, C-D.; LIAU, C-S.; TSENG, Y-Z. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension. Interaction with ACE gene I allele. **Hypertension**, v.41, p. 9-15, 2003.
- TSUTSUMI, Y.; MATSUBARA, H.; MASAKI, H.; KURIHARA, T.; MURASAWA, S.; TAKAI, S.; MIYAZAKI, M.; NOZAWA, Y.; OZONO, R.; NAKAGAWA, K.; MIWA, T.; KAWADA, N.; MORI, Y.; SHIBASAKI, Y.; TANAKA, Y.; FUJIYAMA, S.; KOYAMA, Y.; FUJIYAMA, A.; TAKAHASHI, H.; IWASAKA, T. Vascular smooth muscle-targeted over expression of angiotensin II type 2 receptor causes endothelium- dependent depressor and vasodilative effects via activation of the vascular kinin system. **J. Clin. Invest.**, v.104, p.855-864, 1999.
- VASKU, A.; SOUCEK, M.; ZNOJIL, V.; RIHACEK, I.; TSCHOPLOVA, S.; STRELCOVA, L.; CIDL, K.; BLAZKOVA, M.; HAJEK, D.; HOLLA, L.; VACHA, J. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. **Kidney Int.**, v.53, p.1479-1482, 1998.

- VERAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p.H2627-H2631, 1997.
- WARNECKE, C.; WILLICH, T.; HOLZMEISTER, J.; BOTTARI, S.; FLECK, E.; REGITZ-ZAGROSEK, V. Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements. **Biochem. J.**, v.340, p.17-24, 1999.
- WHELTON, S.P.; CHIN, A.; XIN, A.; HE, J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Ann. Intern. Med.**, v.136, p.493-503, 2002.
- WHITE, P.C.; SLUTSKER, L. Haplotype analysis of CYP11B2. **Endocrinol. Res.**, v.21, p.437-442, 1995.
- WINKELMANN, B.R.; RUSS, A.P.; NAUCK, M.; KLEIN, B.; BOHN, B.O.; MAIER, V.; ZOTZ, R.; MATHESIS, G.; WOLF, A.; WIELAND, H.; GROSS, W.; GALTON, D.; MARZ, W. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. **Am. Heart J.**, v.137, p.698-705, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
- WOLF-MAIER, K.; COOPER, R.S.; BANEGAS, J.R.; GIAMPAOLI, S.; HENSE, H-W.; JOFFRES, M.; KASTARINEN, M.; POULTER, N.; PRIMATESTA, P.; RODRÍGUEZ-ARTALEJO, F.; STEGMAYR, B.; THAMM, M.; TUOMILEHTO, J.; VANUZZO, D.; VESCIO, F. Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. **JAMA**, v.289. p.2363-2369, 2003.
- YANG, W.; HUANG, W.; SU, S.; LI, B.; ZHAO, W.; CHEN, S.; GU, D. Association study of angiotensin I converting enzyme 2 gene polymorphisms with coronary heart

disease and myocardial infarction in Chinese Han population. **Clin. Sci.**, v.6, p.233-235, 2006.

YUKIKO, N.; OSHIMA, T.; HIRAGA, H.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G.; KAMBE, M. **J. Lab. Clin. Med.**, v.131, n. 6, p.502-506, 1998.

ZENNARO, M.C.; KEIGHTLEY, M.C.; KOTELEVTSSEV, Y.; CONWAY, G.S.; SOUBRIER, F.; FULLER, P.J. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.21016-21020, 1995.

ZENNARO, M.C.; FARMAN, N.; BONVALET, J.P.; LOMBES, M. Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, p.1345-1352, 1997.

ZENNARO, M.C.; LOMBES, M. Mineralocorticoid resistance. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.15, p.264-270, 2004.

ZHANG, Y.; ZHANG, K.X.; WANG, G.L.; HUANG, W.; ZHU, D.L. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms and essential hypertension. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.24, p.1089-1093, 2003.

8 - ANEXOS

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA LARANJEIRAS.




**MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA A SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA LARANJEIRAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CARTA DE APROVAÇÃO

Prezados Senhores:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras, reuniu-se em 30 de Outubro de 2003 e aprovou por unanimidade o Projeto "Influência de Mutações no Sistema Renina-Angiotensina e no Receptor de Mineralocorticóide, na Hipertensão Arterial", assim como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ambos com versão de 2 de Outubro de 2003 sob a responsabilidade da Investigadora Principal Dra. Sílvia Regina Sampaio Freitas, sendo registrado neste CEP sob o n.º 0016/14.10.03.

Rio de Janeiro, 30 de Outubro de 2003.


Dr. José Geraldo de Castro Amino
Vice-Coordenador do CEP

ANEXO 3: DECLARAÇÃO DE LIVRE ESCLARECIDO.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em participar do teste genético para _____, utilizando tecnologias baseadas na molécula de DNA. Eu entendo que a amostra de sangue a ser coletada de mim, é um procedimento necessário para a realização do teste genético e não acarreta riscos. Eu compreendo que as amostras de sangue serão utilizadas para determinar se eu e/ou membros de minha família somos portadores de um gene modificado, ou de um polimorfismo genético, que determine que somos afetados ou possuímos um risco aumentado de ser afetado por esta doença genética. Eu autorizo a coleta de sangue de mim, e que a amostra de sangue possa ser utilizada para testes genéticos para a doença acima relacionada.

Eu compreendo que:

1. O teste pelo DNA, neste caso específico, detecta diretamente uma anormalidade no gene, chamada de mutação, ou um polimorfismo genético, responsável pela doença em questão.
2. Estes testes são relativamente novos e tem sido melhorados e aperfeiçoados continuamente. São os melhores e mais novos testes laboratoriais complementares que podem ser oferecidos.
3. Meu material genético receberá um código e qualquer atividade de pesquisa somente terá acesso ao código.
4. Devido à complexidade dos testes de DNA e a importância dos resultados, estes serão relatados somente a mim por meu médico particular. Os resultados são confidenciais e somente poderão ser liberados para outro profissional médico ou para outras partes envolvidas com meu consentimento.

Local: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Declaração do profissional: Eu expliquei o teste pelo DNA a esta pessoa e respondi a todas as suas perguntas.

B9 - Etnia

1 – Branco

2 – Negro

3-Pardo

C - HISTÓRIA FAMILIAR**C1 - Doenças na Família**

1 – Sim

2 – Não

9- Sem Dados

C2 - Caso Sim, Qual?

- 1- Diabetes
- 2- Hipertensão Arterial
- 3- Cardiopatias sem Definição
- 4- HVE ou Cariomegalia
- 5- Angina
- 6- Infarto
- 7- Insuficiência Cardíaca
- 8- Aneurisma de Aorta
- 9- Insuficiência Vascular Periférica
- 10- AVC
- 11- Insuficiência Renal
- 12- Dislipidemia

D – HISTÓRIA REPRODUTIVA (SÓ PARA MULHERES)**D1 – Uso de Contraceptivo**

1 – Faz uso

2 – Já fez uso

3 – Nunca usou

D2 – Complicações na Gravidez:

1 – Sim

2 – Não

9- Sem Dados

E - MEDICAMENTOS**F1 – Medicamentos Anti-Hipertensivos Utilizados Atualmente**

	Nome do Medicamento	Dose Diária
F1.1	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.2	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.3	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.4	<input type="text"/>	<input type="text"/>

RESPONSÁVEL: _____

DATA: _____

B8 - Prática de Exercícios

1 – Sim 2 – Não

B9 - Etnia

1 – Branco 2 – Negro 3-caboclo 4- Indígena-descendente

C - HISTÓRIA FAMILIAR**C1 - Doenças na Família**

1 – Sim 2 – Não 9- Sem Dados

C2 - Caso Sim, Qual?

- 13- Diabetes
- 14- Hipertensão Arterial
- 15- Cariopatias sem Definição
- 16- HVE ou Cariomegalia
- 17- Angina
- 18- Infarto
- 19- Insuficiência Cardíaca
- 20- Aneurisma de Aorta
- 21- Insuficiência Vascular Periférica
- 22- AVC
- 23- Insuficiência Renal
- 24- Dislipidemia

D – HISTÓRIA REPRODUTIVA (SÓ PARA MULHERES)**D1 – Uso de Contraceptivo**

1 – Faz uso 2 – Já fez uso 3 – Nunca usou

D2 – Complicações na Gravidez:

1 – Sim 2 – Não 9- Sem Dados

E - EXAMES COMPLEMENTARES

	Data								Valor				
E1 – Glicemia *			.		.							.	
E2 – Creatinina*			.		.							.	
E3 – Colesterol Total*			.		.							.	
E4 – Colesterol HDL			.		.							.	
E5 – Colesterol LDL			.		.							.	
E6 – Ureia			.		.							.	
E7 – Triglicérides			.		.							.	

- Valores em miligrama

F - MEDICAMENTOS**F1 – Medicamentos Anti-Hipertensivos Utilizados Atualmente**

	Nome do Medicamento	Dose Diária
F1.1	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.2	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.3	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.4	<input type="text"/>	<input type="text"/>
F1.5	<input type="text"/>	<input type="text"/>

G - OUTRAS INFORMAÇÕES

RESPONSÁVEL: _____ DATA: _____

ANEXO 6: TRABALHOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO**6.1. Manuscrito 1: Combined Analysis of Genetic and Environmental Factors on Essential Hypertension in a Brazilian Rural Population in the Amazon region.****SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC
ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA**

Carlos Vicente Serrano Jr.
Diretor de Comunicação

Fábio Vilas Boas
Editor-Chefe

Fernando Bacal
Editor Executivo

São Paulo, 07 de julho de 2006.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o artigo intitulado "Combined Analysis of Genetics and Environmental Factors on Essential Hypertension in Brazilian county population from the Amazon region", registrado sob o nº 1263, da autora Silvia Regina Sampaio Freitas, foi aceito para publicação na Revista *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*.

Considerando nossa programação anual de artigos, o referido trabalho será publicado oportunamente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Bacal', is positioned above the printed name of the signatory.

Fernando Bacal
Editor Executivo

Rua: Beira Rio, 45 – 3º andar – 04548-050 – São Paulo – SP – Brasil – Fone/Fax (11) 3849-6438

ORIGINAL ARTICLE: COMBINED ANALYSIS OF GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON ESSENTIAL HYPERTENSION IN A BRAZILIAN RURAL POPULATION IN THE AMAZON REGION.

Silvia Regina Sampaio de Freitas¹, Pedro Hernan Cabello¹, Rodrigo Soares Moura-Neto², Luciana Cresta Dolinsky³, Marcio Neves Bóia¹

- 1- Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ,
- 2- Instituto de Biologia – UFRJ,
- 3- Instituto de Biociências – UNIGRANRIO

Author Address:

Silvia Regina Sampaio de Freitas - Avenida Adhemar Bebianos, 4800 Bl 07 apto 508 – 20766-721
– Rio de Janeiro, RJ – E-mail: sroig@ioc.fiocruz.br

Received for publication May 8, 2006

Accepted on July 3, 2006

Abbreviated title:

Essential hypertension multifactorial analysis.

Keywords:

- Polymorphisms,
- Essential Hypertension,
- Environmental Risks,
- Genetic.

ABSTRACT

Background: Essential hypertension (EH) is a multifactorial disease triggered by several genetic and multiple environmental factors in conjunct. 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.

INTRODUCTION:

Essential hypertension (EH) is a multifactorial disease triggered by several genetic and multiple environmental factors in conjunct. Epidemiological studies have suggested that genetic variants, including those of the genes for angiotensinogen (AGT) (1), renin (REN) (2), angiotensin-converting enzyme (ACE) (3), angiotensin II receptor type 1 (AGTR1) (4, 5), and aldosterone synthase (CYP11B2) (6) increase the risk for EH. However, the influence of polymorphic forms of these genes has shown conflicting results in different populations (7, 8). This scenario might be reflecting the variable impact of the genetic background of populations and the interaction of environmental factors, which, in turn, might be modulating this molecular background. Recent literature data have shown that unfavorable genotype/allele alone might indicate a minor or nonsignificant association with EH. However, the co-occurrence of different unfavorable genotypes and clinical risk factors can increase the risk of hypertension. Data indicate that the most important environmental risk factors are advanced age, alcohol intake, smoking and body size. The relationship of those factors with unfavorable genotype such as ACE-DD and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677-TT can greatly increase the EH risk, when compared with patients who do not present the clinical risks (9).

In this work, we aimed at investigating the association among AGT-M235T, REN-G1051A, ACE-I/D, AGTR1-A1166C, CYP11B2-C344T genetic markers and common

anthropometrical factors with essential hypertension, in an isolated community in the Amazon region in Brazil.

MATERIAL AND METHODS:

The municipality of Santa Isabel do Rio Negro lies in the northwest of Amazonas State (0° 28' S and 65° 32' W), in the region of the Alto Rio Negro. Santa Isabel do Rio Negro occupies an area of 62, 846 Km² (IBGE, 2003), 90% of which is covered by the Amazonian Rain Forest. The majority of the population of 10, 561 inhabitants is of indigenous ancestry; 4220 of them reside in the municipality's seat and 6341 in riverine communities in the municipality's territory, including the Yanomami Indigenous Territory (10).

Subjects chosen for this study were obtained using the Conglomerate Systematic Sampling Technique, in which each residence was considered a unit sample. One hundred and fifteen residences were visited, and one adult from each residence was chosen. A total of eighty-two individuals were classified as hypertensive according to the following criteria: 1) blood pressure (BP) \geq 140/90 mmHg (derived from repeated measurements performed in accordance with international guidelines) (11; 2) absence of antihypertensive, and 3) exclusion of secondary forms of hypertension. The normotensive controls consisted of 78 individuals, characterized by no family history of EH or other cardiovascular disorder and BP < 140/90 mmHg.

All participants were submitted to a complete physical and routine biochemical analyses and provided written informed consent.

Participants were classified as Caucasian, Negroid, Indigenous or racially mixed (Mestizo) according to a set of phenotypic characteristics (12). Individuals who had ever smoked more than five cigarettes per day for at least a year were classified as smokers and the ones who drank 30-40 ml of alcohol or more per day were considered drinkers.

Genotyping ACE I/D (3), AGT M235T (13), REN G1051A (2), AGTR1 A1166C (4), and C344T (6) were assessed by the PCR-restriction fragment length polymorphisms method. Quality control for these assays was assessed by randomly selecting samples from hypertensive and normotensive groups to be genotyped again.

Anthropometrical and clinical data were compared by the t-Student for quantitative data, and by χ^2 test for qualitative data. The genotypic frequencies were computed using the SPSS statistical program (version 10.0), and allelic frequencies were calculated by direct gene counting. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for distribution of the genotypes was tested by χ^2 test, using the GENIOC program (14). We also performed a stepwise linear regression (SPSS program, version 12.0) to explore the effects of genotypes and anthropometrical factors on hypertension. In

this analysis, the dependent variables were systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), while independent variables included age, body mass index (BMI), gender (0 = female, 1 = male), smoking status (0 = non-smoker, 1 = smoker), alcohol consumption (0 = non-drinker, 1 = drinker), Diabetes mellitus (0 if glucose <100mg/dl, 1 to else), ethnicity (ethny_1 [African descendant], ethny_2 [Caucasian], ethny_3 [Indigenous]; ethny_4 [Mestizo]). Values 0 and 1 were attributed if ethnicity was absent or present, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION:

Age, alcohol consumption, and smoking weighed more frequently among hypertensives than in normotensives (Table 1). These results are supported by previous studies that demonstrated that alcohol consumption contributes to EH development by stimulation of the sympathetic nervous system and increased production of adrenocorticoid hormones (15), while age and smoking act as co-factors that, in association with salt sensitivity, alcohol consumption or obesity, collaborate to the development of this disease (16). Diabetes mellitus and obesity are also important clinical risk factors for hypertension, but their frequencies were not significantly different between the groups, even among patients that exhibit a slightly high BMI. Moreover, the ethnicity profile observed in this Amazon population (where a great number of individuals from both groups are Indigenous descendants or Mestizo, and a lesser number are Negroid or Caucasoid) was quite similar between normotensives and hypertensives.

Genotypic distribution of each polymorphism was in agreement with HWE expectations ($p > 0.05$) in both groups. Allelic frequencies of all polymorphisms did not show any difference between normotensives and hypertensives (Table 2). However, the genotypic distributions of ACE I/D differed between the groups: 9.76% hypertensives versus 5.1% normotensives had ACE-DD genotype; and 57.32% hypertensive versus 78.2% normotensives had ACE-II genotypes. It was observed that postulated “worse” ACE (DD) genotype was slightly more frequent in hypertensives than in normotensives. These unfavorable alleles/genotypes are associated with physiological changes that can lead to hypertension development. Yet, worldwide results have been controversial and, consequently, the frequencies of ACE genotypes vary widely (7, 17, 18). Genotypic frequencies of M235T, G1051A, A1166C and C344T failed to show any difference in either group ($p > 0.05$).

To investigate which genetic polymorphism and/or clinical variant is associated with high BP variation, we analyzed the genetic and clinical profile of normotensives and hypertensives simultaneously. Stepwise linear regression showed that ACE I/D polymorphism (D allele) and age contributed to SBP variation ($F = 12.958$, $p = 0.000$). The *D* allele supports an increase of 7.8

mmHg in SBP ($b = 7.829$, $p = 0.006$), while advanced age contributes to a 0.471 mmHg increase in SBP, with each additional year ($b = 0.471$, $p = 0.000$). This polymorphism is responsible for half the variance in plasma ACE levels, which results in a large / in wide inter-individual variability (19). It was observed that homozygotes for the *D* allele display serum ACE levels were almost twice as high as *I* allele homozygotes. However, specific haplotypes constituted by I/D and single nucleotide polymorphisms within the ACE gene were more accurate in determining ACE plasma levels. According to Keavney et al. (19), the use of ACE haplotype analysis was able to determine 36% of the phenotype variance of ACE levels. Despite the physiological damage caused by ACE I/D polymorphism, recent studies have demonstrated that clinical risk factors can raise ACE gene susceptibility. Several studies have shown that advanced age, drinking, smoking and body size are important clinical risk factors for EH, especially when they occur simultaneously with the ACE-DD genotype (7). In accordance with literature reports, our findings also suggest that ACE I/D polymorphism and a specific clinical risk factor collaborate to EH. Stepwise linear regression indicated that individuals who carry *D* allele have an increase of 7.8 mmHg in SBP when compared with those who have only *I* allele. In addition to I/D polymorphism, aging also contributes to the unfavorable effects of *D* allele, causing a progressive increase of SBP. In light of our findings, we believe that high variation of SBP may be, in part, determined by a genetic (ACE-D allele) predisposition and advanced age. Therefore, an unfavorable genotype associated with a clinical risk factor might be acting in hypertension development. We also observed that DBP variation is dependent on alcohol consumption and advanced age ($F = 4.305$, $p = 0.016$). Statistical analysis suggested that consumption of alcohol (more than 3 drinks per day) could contribute to an increase of 4781 mmHg in DBP. Advanced age also supports DBP increase by 0.140 mmHg per year. Our observation corroborates previous reports whose authors showed that heavy drinkers have a reduction in calcium absorption that could lead to the development of EH (19). Moreover, presence of alcohol in an organism disturbs the renin-angiotensin system function, stimulates the sympathetic nervous system (possibly due to fluctuating blood alcohol levels), and increases production of adrenocorticoid hormones (20). Literature reports also relate that consumption of about 40 ml of alcohol, per day, results in BP increase and, consequently, in a doubling of hypertension (SBP > 160mm Hg or DBP > 95mmHg) (19). In this Amazon population, continuous alcohol consumption down the years contributed to the increase of DBP and, consequently, raised the number of hypertension cases.

CONCLUSIONS:

Multifactorial analysis of genetic polymorphisms and clinical-antropometrical factors suggested that combinations of ACE *D* allele with advanced age and alcohol consumption, along

with aging contributes to SBP and DBP high variation, respectively, in the Santa Isabel do Rio Negro population.

COMPETING INTERESTS:

The authors declare that they have no competing interests.

LITERATURE CITED:

- 1 - Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt CS, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel J-M, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992; 71(1): 169-180.
- 2 - Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, Kokubun S, Ozawa Y. Hasimu B, Mizutani Y. Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension*. 2003; 41(2): 308-312.
- 3 - Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 24: 63-69.
- 4 - Nalogowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukwaska-Szczechowska E, Poreba R, Michalski B, Kniazewski B, Rzempoluch J. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med Sci Monit*. 2000; 6(3):523-529.
- 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 Bra Cardiol*. 2004; 83 (5): 404-408.
- 6 - Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Cornel JM. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension*. 1999; 33(2): 703-707.
- 7 - Mettimano M, Ianni Andrea, 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): 589-593.
- 8 - Agachan B, Isbir T, Yilmaz H, Akoglu E. 2003. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. *Exp Mol Med* 35(6): 545-549.

- 9 - Arias-Vásquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AFC, Bertolli-Avella AM, Vergeer JM, Aulchenko JCM, Witteman JCM, Duijn CM. Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study. *Eur J Clin Invest*. 2005; 35:444-449.
- 10 - IBGE [homepage na Internet]. 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 Htpertens*. 1999; 17: 151-183.
- 12 - McKenzie K. Ethnicity, race and culture: guidelines for research, audit and publication. *BMC*. 1996; 312:1094-1098.
- 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): 609-610.
- 14 - Cabello PH, Krieger H. GENIOC: Sistema para análises de dados de genética. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. 1977;139 p.
- 15 - Perry IJ, Whincup PH, Sharper AG. Environmental factors in the development of essential hypertension. *Br Med Bull*. 1994; 50 (2): 246-259.
- 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): 545-549
- 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): 266-273.
- 19 - Keavney B, McKenzie CA, Connell JM, Julier C, Ratcliffe PJ, Sobel E, Lathrop M, Farrall M. Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. *Hum Mol Genet*. 1998; 7:1745-1751.
- 20 - Clark LT. 1984. Alcohol use and hypertension: clinical considerations and implications. *Postgrad Med*. 1984; 75(8):273-276.

Table 1: Anthropometrical and Clinical Characteristics.

		Normotensives (n = 78)	Hypertensives (n = 82)	P*
Gender	Female/Male	47/31	49/33	Nonsignificant
Age (year)		36.27 ± 12.46	49.27 ± 18.58	< 0.05
Ethnicity (%)				
	Negroid	1.3	0.0	
	Caucasoid	5.1	9.1	Nonsignificant
	Indigenous	32.1	40.9	
	Mestizo	61.5	50.0	
Smoking (%)		26.9	50.0	< 0.05
Alcohol Consumption (%)		33.3	45.5	< 0.05
Diabetes mellitus (%)		9.0	9.1	Nonsignificant
BMI (kg/m ²)		24.62 ± 3.69	26.07 ± 3.43	Nonsignificant
SBP (mmHg)		111.73 ± 12.05	149.37 ± 11.81	< 0.05
DBP (mmHg)		70.76 ± 8.64	92.31 ± 4.38	< 0.05

Data presented as mean ± standard error of the mean. * = T-test.

Table 2: Genotypic and allelic frequencies.

RAAS polymorphisms	Normotensives	Hypertensives	P*
AGT M235T genotypes			

MM	08 (10%)	07 (8.54%)	
MT	56 (72.5%)	50 (60.97%)	0.154
TT	14 (17.5%)	25 (30.49%)	
AGT alleles			
M	72 (46%)	64 (39%)	
T	84 (54%)	100 (61%)	0.0197
REN G1051A genotypes			
AA	40 (51.3%)	44 (53.66%)	
GA	22 (28.2%)	30 (36.59%)	0.136
GG	16 (20.5%)	08 (9.76%)	
REN alleles			
A	51 (65%)	59 (71.95%)	
G	27 (35%)	23 (23.05%)	0.370
ACE I/D genotypes			
II	59 (77%)	47 (57%)	
ID	16 (21%)	27 (33%)	0.022
DD	2 (3%)	08 (10%)	
ACE alleles			
I	134 (87%)	121 (74%)	
D	20 (13%)	43 (26%)	0.003
AGTR1 A1166C genotypes			
AA	55 (70%)	46 (56%)	
AC	20 (26%)	30 (37%)	0.157
CC	3 (4%)	06 (7%)	
AGTR1 alleles			
A	130 (83%)	122 (74%)	
C	26 (17%)	42 (26%)	0.050
CYP11B2 C344T genotypes			
CC	14 (17%)	12 (14%)	
TC	36 (46%)	48 (60%)	0.881
TT	28 (35%)	22 (26%)	
CYP11B2 alleles			
C	64 (41%)	72 (44%)	
T	94 (59%)	92 (56%)	0.602

* P value from χ^2 test for genotype and allele distribution comparison.

6.2. Manuscrito 2: Personalized diagnosis by cached solutions with hypertension as a study model



Ribeirão Preto, 05 de junho de 2006

Prezado Dr Paulo Costa Carvalho,

O artigo " **Personalized diagnosis by cached solutions with hypertension as a study model** ", GMR 243, foi **aceito para publicação** na *Genetics and Molecular Research*. Contudo, foi realizada, por nosso editor técnico, uma minuciosa revisão de inglês afim de manter a qualidade de nossa revista.

Peço, neste momento, que reveja cuidadosamente o texto (arquivo anexo) e incorpore as modificações sugeridas. Caso não aceite alguma, informe-nos em folha separada.

Por favor, nos devolva o mais rápido possível a nova versão do artigo.

Aproveito a oportunidade para **solicitar o pagamento da taxa de R\$500,00** referente aos custos de publicação do respectivo artigo (GMR 243). Ratifico que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Seguem as informações para pagamento via depósito bancário:

Banco do Brasil

ag. 3312-x

c/c 160.314-0

a favor de Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto

Assim que o depósito for feito, favor nos mandar um comprovante de pagamento.

Se necessário, emitiremos nota fiscal. Para tal, favor nos envie os dados necessários. Nome, Endereço, CPF/CNPJ, Inscrição Estadual (empresa).

Contando com sua compreensão, agradecemos.

Atenciosamente,

Francine Muniz

Coordenadora editorial (016-44.300)
Genetics and Molecular Biology

**PERSONALIZED DIAGNOSIS BY CACHED SOLUTIONS WITH HYPERTENSION
AS A STUDY MODEL**

* Paulo Costa Carvalho^{1,4}, *Silvia Sampaio Freitas², Ana Beatriz Lima³, Marcelo Barros³, Iara Bittencourt³, Wim Degrave⁴, Ivan Cordovil³, Raul Fonseca⁵, Maria da Gloria da Costa Carvalho⁶, Rodrigo Soares de Moura Neto⁷, Pedro H. Cabello²

* Both authors contributed equally to this paper.

Addresses

1. Programa de Engenharia de Sistemas e Computação / COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
2. Departamento de Genética Humana, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
3. Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras, Rio de Janeiro, Brazil.
4. Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
5. Departamento de Ciência da Computação - Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil.
6. Laboratório do Controle da Expressão Genica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
7. Departamento de Genética Humana, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

Paulo Costa Carvalho

Av. Atlântica, 3628 APT. 901 – Copacabana – Rio de Janeiro – RJ Brazil –

ZIP 22070-001

ABSTRACT

Introduction: Statistical modeling of links between genetic profiles with environmental and clinical data to aid in medical diagnosis is a challenge. Here, we present a computational approach for rapidly selecting important clinical data to assist in medical decisions based on personalized genetic profiles. What could take hours or days of computing is available on-the-fly, making this strategy feasible to implement as a routine without demanding great computing power.

Methods: The key to rapidly obtaining an optimal / nearly optimal mathematical function that can evaluate the “disease stage” by combining information of genetic profiles with personal clinical data is done by querying a precomputed solution database. The database is previously generated by a new hybrid feature selection method that makes use of support vector machines, recursive feature elimination and random sub space search. Here, to evaluate the method, data from polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) genes together with clinical data was obtained from patients with hypertension and control subjects. The disease “risk” was determined by classifying the patients’ data with a support vector machine model based on the optimized feature; then measuring the Euclidian distance to the hyperplane decision function.

Results and discussion: Our results showed the association of RAAS gene haplotypes with hypertension. The association of polymorphism patterns with different ethnic groups was also tracked by the feature selection process. A demonstration of this method is also available online on the project’s web site.

1. INTRODUCTION

Understanding links between genetic profiles with environmental / clinical data in pathogenesis, follow-up or diagnosis is a challenge. Population heterogeneity and genetic and innumerable external factors all hold information with potential aid for medical decisions. A computational approach able to select important medical features for an individual genetic profile is a path for personalized diagnosis and treatment.

The search for these combination patterns can quickly become computationally unfeasible depending on the number of parameters to inquire. Classical feature selection approaches can rapidly find a good solution, but it is not guaranteed to be the best, nor possess a good generalization performance.

Here we present a method for rapidly obtaining an optimal / nearly optimal mathematical function that can evaluate the “disease stage” by combining information about genetic profiles with

personal clinical data. The former queries a database of pre-computed optimal feature sets that best apply to a specific genetic profile. The database is previously generated by a new hybrid feature selection method that makes use of support vector machines, recursive feature elimination and random sub space search. Thus, this approach could assist doctors during medical routine without needing great computing power, offering immediate access to optimized cached solutions. What could take hours or days of computing time, thanks to this approach, is made available on-the-fly. Here, we exemplify this methodology by using hypertension as a study model. We search for diagnosis patterns linking polymorphisms in renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) genes with clinical data. A demonstration program for personalized diagnosis is available online (“Diagnostic SVM”) taking advantage of the constructed database to promptly execute personalized diagnosis. Such a program is also an efficient tool to show trends in the dataset.

1.1 Hypertension and the RAAS system

In the last decade, the renin-angiotensin-aldosterone system has received increasing attention in the field of cardiovascular diseases because of its relation to blood pressure maintenance and salt homeostasis. Polymorphisms in RAAS genes have already been associated with angiotensinogen concentration in plasma (Inoue *et al.*, 1997;Ishigami *et al.*, 1997;Jeunemaitre *et al.*, 1997), cardiovascular diseases (Alvarez *et al.*, 2001;Lindpaintner *et al.*, 1995;Pontremoli *et al.*, 2000), blood pressure regulation (Baudin, 2002), vascular stiffness, and increased risk of pregnancy-induced hypertension development (Benetos *et al.*, 1995), amongst others. Having genetic predisposition to a certain disease does not mean that one will eventually have it; its pathogenesis is believed to be the result of a number of complex factors, including ethnic background and, external and clinical factors combined with genetic predisposition.

In the present work, information on six RAAS polymorphic genes are studied together with patient clinical data to further verify the combinatory effect of RAAS polymorphisms in essential hypertension (EH). This is primarily achieved by generating a database of feature subsets having optimal solutions for a given classifier and training set. The feature subsets are characterized by a new hybrid machine learning method that combines support vector machines (SVM) / recursive feature elimination (RFE) and random sub space search (RSS). RAAS polymorphic genes are listed below:

1. M235T, polymorphism characterized by substitution of a methionine (M) for a threonine (T) at codon 235 of the angiotensinogen (AGT) gene (Jeunemaitre *et al.*, 1992);
2. I/D, a polymorphism characterized by an insertion/deletion (I/D) of an Alu fragment in intron 16 of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene; (Baudin, 2000),

3. A1166C, corresponding to an A to C substitution, at nucleotide position 1166 of the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) mRNA sequence (Bonnardeaux *et al.*, 1994);
4. C344T, polymorphism caused by the substitution of T for C at the locus -344 in the promoter region of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) (Stella *et al.*, 2004);
5. A4582C, an A to C transversion, and G3514C, a G to C transition; both being polymorphisms in the mineralocorticoid receptor gene (MR) (Poch *et al.*, 2001).

1.2 Support Vector Machines

SVM is a supervised learning method based on statistical learning theory and the principle of structural risk minimization, developed by Vapnik (Vapnik, 1995). This method has been successfully used in a number of applications ranging from particle and face identification, text categorization, data base marketing, and extensively in bioinformatics. An SVM model is evaluated using the most informative patterns in the data (the support vectors) and is capable of separating classes by finding an optimal hyperplane of maximum margin between both datasets. For cases when data is not linearly separable, the use of a kernel-induced feature space can be applied so data can be mapped to a higher dimension space and then classified by a hyperplane or a linear discriminate function (Boser *et al.*, 1992).

1.3 Feature Selection

A feature selection is executed on a dataset to choose reduced subsets that best perform under a determined classification system and also reduce the pattern recognition cost. Various feature selection methods are described in the literature; among them are the genetic algorithms with decision trees (Shan S C. and Kusiak A, 2004), beam search, branch-and-bound, Pearson correlation coefficients, Fisher criterion scores, floating search, and recently recursive feature elimination with SVM. According to Cover and Van Campenhout, no non-exhaustive sequential feature selection procedure is guaranteed to produce the optimal subset, nor does any ordering of the error probabilities (T.M.Cover and J.M.Van Campenhout, 1977). Since the number of subset possibilities grows exponentially with the amount of features, exhaustive searching quickly becomes unfeasible, even for a moderate number of features. Bearing this in mind, a hybrid sub-optimal feature selection method was applied to the hypertension dataset and its performance compared to SVM RFE and random sub space searching.

2. METHODS

2.1 Hypertension evaluation of the study population and RAAS genotyping

A total of 91 hypertensive patients from the Hypertension Division of the National Institute of Cardiology Laranjeiras (Rio de Janeiro - Brazil) and 32 normotensive control subjects were genetically investigated for RAAS gene polymorphisms at the Fiocruz Genetics Department. Blood pressure was determined using a conventional mercury sphygmomanometer on the left arm in the sitting position on three different occasions, by the same observer. Hypertension was defined as subjects with a systolic blood pressure (SBP) ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 mm Hg. The possibility of secondary hypertension was excluded after complete clinical, laboratorial and radiological investigation. The normotensive group was characterized by the absence of family history of hypertension, renal insufficiency, hepatic disease, or apparent coronary artery disease and a blood pressure $< 140 / 90$ mmHg. All participants were submitted to complete physical and routine biochemical analyses.

Genomic DNA from patients and controls was extracted by a standard salting out method. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism were used to detect AGT M235T, ACE I/D (Nalogowska-Glosnicka *et al.*, 2000b), AGTR1 A1166C (Nalogowska-Glosnicka *et al.*, 2000a), CYP11B2 C344T (Stella *et al.*, 2004), MR A4582C and MR G3514C polymorphisms according to published procedures.

Assay quality control was performed by randomly selecting samples to be genotyped again. This study was approved by the Institutional Ethics Review Board from Fiocruz, and the participants provided written consent.

2.2 Input vector construction for SVM modeling

The input vector can have a total of 33 dimensions. The input vectors were constructed having each vector representing a subject. Dimensions 1 – 18 are AGT0, AGT1 AGT2, ECA0, ECA1, ECA2, AGTR0, AGTR1, AGTR2, CYB11B2_0, CYB11B2_1, CYB11B2_2, MRA0, MRA1, MRA2, MRG0, MRG1 and MRG2. The number ending each variable indicates whether 0, 1 or 2 risk alleles are present in the gene. Their values were “1” if present in the genome, otherwise “0”. The remaining dimensions are indicated in **Table 1**.

2.3 Support vector machine analysis

The SVM approach is described as follows. Given a linearly separable training sample: $S = ((x_1, y_1), \dots (x_n, y_n))$ that produces the equation of a linear classifier: $w^T x + b$, where w is the normal

vector, and \mathbf{b} the bias of the hyperplane of maximum margin separating both classes, an unknown sample or input vector \mathbf{x} is classified as +1 if: $\langle w, x \rangle + b \geq 0$, and classified as -1 if: $\langle w, x \rangle + b < 0$ as seen in **Figure 1**.

The primal formulation (Boser *et al.*, 1992) consists in minimizing the Euclidian norm of the vector w subject to the classification constraints:

$$\text{Minimize: } \frac{1}{2} \langle w^T \bullet w \rangle \quad (1)$$

$$\text{Subject to: } y_i (\langle w \bullet x_i \rangle + b) \geq 1 \quad (2)$$

The algorithm searches the space of w 's and b 's to find the widest margin to place a hyperplane. A straight forward approach is reducing it to a convex optimization problem by minimizing a quadratic function under linear inequality constraints. SVM has become a standard in statistical modeling, and further details are thus beyond the scope of this manuscript and can be easily found in the literature (Vapnik V., 1995),

SVM analysis was carried out using the *SVMlight* (Joachims T., 1998) libraries programmed in C, interfacing with scripts programmed in *Perl* 5.8 using the linear kernel and a cost parameter of 100 to ensure numerical stability. To compensate for having more hypertensive than normotensive subjects in the dataset, two methods were considered: the first by applying a cost factor where training errors on the positive samples (normotensive) outweigh errors on the negative samples (Joachims T., 2002); the second by using flexible margins with different control parameters.

2.4 Model evaluation

The Leave-One-Out (LOO) approach, also known as jackknife, is performed by excluding one feature vector from the subjects pool, and using the remaining as a training set. The algorithm builds a support vector model based on the training set and then tries to properly classify the excluded feature vector by establishing what side of the hyperplane it is to be placed. The process is repeated until all feature vectors from the pool have gone through this process (Joachims T., 2000).

2.5 Feature selection and ranking:

2.5.1 SVM - recursive feature elimination

Given the training sample S , a SVM model is built and the weight vector w of dimension length d is calculated as described above. The feature k having the smallest ranking criteria where $k = \text{Arg min}_i \{(w_i)^2\}$ has the least influence in the hyperplane solution and is eliminated. The remaining set of top ranked features should be taken into account as a group, so that a new SVM model is built in a dimension space $d-1$. This process is repeated until a desired dimension is obtained. Since features are removed one at the time, an importance ranking can also be established (Guyon *et al.*, 2002).

2.5.2 Random sub space search (RSS).

A script written in *Perl* 5.8.6 that later interfaced with *SVMlight* generated 230,000 random feature combinations originating from the initial set of 33 features. For each combination in the list, SVM LOO error, number of support vectors contained in the model, and the tested combination were stored in a MySQL database.

2.5.3 Computing RSS scores

One of the methods used to rank the features by order of importance was by querying the RSS database to retrieve results having LOO error $\leq 2\%$ ordered by LOO error and then by number of support vectors and grouped according to these variables. A quadratic group ranking function having the ordinate value decrease from 1 to 0.1 while its abscissa value ranges from 1 to the number of groups retrieved was used to score the features. An example of this ranking method is shown in Table 2.

2.5.3 Hybrid RFE-RSFS

RFE is initially applied to reduce the feature numbers from 33 to 20. Then RSS performed a semi-exhaustive search generating 230,000 feature set combinations. This method is referred to as hybrid.

2.5.4 Online demonstration of the method and script / data availability

An online version of the software called “Diagnostic SVM” is available at <http://www.dbbm.fiocruz.br/labwim/bioinfoteam/> by clicking on the software tab. The hybrid recursive feature elimination - Random Subspace Feature scripts and data used for this study are available upon request.

Given a genetic profile, Diagnostic SVM queries the MySQL feature solution database to obtain the optimal feature set to the given profile. The optimal feature set is considered to be the one having a best match with the individual's genetic profile, a low LOO error, and a reduced number of support vectors. Clinical data is then entered and a new SVM training is performed to predict whether the input data belongs to a hypertensive or normotensive subject. By no means should "Diagnostic SVM" substitute for normal diagnostic procedures; it is currently a simplified model to further study SVM and combinatory effects of RAAS with clinical data in hypertension.

Note: All analyses were carried out on a Pentium IV with 256MB of RAM and a 2.0 GHz clock frequency.

3. RESULTS

Results 3.1 – feature selection and ranking

Genetic and clinical data of 91 hypertensive patients and 31 control subjects were analyzed in order to find correlations with diagnostic value. An initial SVM analysis was able to classify with a 13.11% LOO error among subjects when using the complete (33) feature set, making it evident that further refinements in the methodology are needed.

The RSS was able to identify subsets having 1 perfect solution, 4 solutions with a 0.82 % LOO error, 153 solutions with a 1.64% LOO error and 703 solutions with a 2.46% LOO error. The majority of solutions (17436) had a 9.02% LOO error.

The hybrid search narrowed the number of features to 20 using RFE and then searched for solutions using the RSS. The hybrid approach identified subsets having 1 perfect solution, 22 subsets with a 0.82% LOO error, 598 solutions with a 1.64% LOO error and 1855 solutions with a 2.46% LOO error. The majority of solutions (21895) contained a 6.65% LOO error. A more detailed distribution of error occurrence vs. LOO error for both the RSS and hybrid methods can be seen in **Figure 2**. All solutions were stored in a MySQL database.

When comparing only the top ten ranked features selected by the three methods, SBP, Ethny_0, Ethny_1, CYP11B2_1 are shared among all. The hybrid also shared LDL and Ethny_2 with RFE and BNP with RSS. ECA_0 and ECA_1 were also shared between RFE and RSS. The predominant presence of ethnicity among solutions can easily be explained because hypertension is not a monogenetic disorder, but a polygenic trait (Dominiczak *et al.*, 2004) meaning that a gene may be responsible for the disorder in one population, but not necessarily in another.

3.2 – “Diagnostic SVM” analysis

“Diagnostic. SVM” is an efficient tool to search for trends in data. After entering the genetic profile and clinical data in “Diagnostic SVM,” it predicts whether a subject is hypertensive and returns the dot product of $\langle w.x \rangle$ summed with the bias \mathbf{b} . By varying entry values, it is easy to see whether the change favors normotensive classification or not, by the dot product result. When compensating for normotensive in the unbalanced dataset, better results seemed to be obtained when using flexible margins than when applying a cost factor where training errors on the positive samples outweigh errors on the negative samples.

In general, the results show that AGT0, ECA0, AS1, MRA0, MRG0, MRG1, Glucose, Ethny_0, and Ethny_1 favor normotensive classification while ECA1, MRA1, MRA2, LDL, Trig, Urea, and BNP favor hypertensive classification. As expected, wild type genes favor SVM classification for normotensive. Some unexpected results were also obtained such as high LDL favoring normotensive in a profile having Ethny_1 and AGT0. Glucose favoring normotensive classification could be a consequence of the relatively young age in normotensive subjects (average = 48 yr); the high glucose index could act as a diuretic, making the body eliminate fluids consequently lowering its pressure. In the long-run, glucose attacks the kidney and favors the development of hypertension.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Hypertension is one of the most important risk factors for cardiovascular diseases. Although its pathogenesis is not well elucidated, it is known that high blood pressure is influenced by a complex interaction between environmental and genetic factors. In the current study, hypertension is used as a model for the methods employed which, in accordance with other works, yield strong evidence of a genetic association between the polymorphic RAAS genes and essential hypertension (Benetos *et al.*, 1996; Isa *et al.*, 1990). Our aim was not to demonstrate a new method for diagnosing hypertension, but to use it as a study model since it can be easily diagnosed. The same strategy presented here could be used for other hypertension cases such as predicting medication for a combined genetic / clinical profile, or even be applied to other pathologies.

The feature ranking strategy was based on RFE and/or grouping results obtained from RSS and sorting them by LOO error followed by number of support vectors. The number of support vectors is related to the capability of generalization of a model: a model with less support vectors is expected to generalize best. It was also observed that, in general, the expected LOO error is proportional to the number of support vectors. We did not use a higher order k-fold cross validation technique due to the limited and unbalanced dataset. For more complex models, other

parameters could also be used to efficiently estimate the SVM generalization performance such as the geometrical margin between classes or even the $\xi\alpha$ -estimators (Joachims T., 2000). When dealing with an extremely large number of features, after using RFE, the random sub space search could also be substituted by other methods.

The complex combination of a genetic profile with environmental / clinical data in pathogenesis, follow-up or diagnosis is a challenge. Population heterogeneity and innumerable external factors greatly influence a classifier decision; knowing which ones to choose is a key for improved diagnosis. Poorly chosen features may add noise and degrade classifier performance. Increasing the number of features can quickly make exhaustive feature search impossible. Classical feature selection approaches can rapidly find a good solution, but it is not guaranteed to be the best, nor possess a good generalization performance for a desired genetic profile.

Obtaining optimal pre-computed feature selected subsets to inquire for important clinical data, followed by SVM analysis, is a solution that can assist doctors in personalized medical diagnosis and that can also reveal trends in the dataset. The hybrid method outperformed RFE and RSS when used in their isolated forms, e.g., finding good solutions faster. The construction of such databases can be very time-consuming: the database for this work took up to 5 days. “Diagnostic SVM” justifies the importance of such databases because it can instantly retrieve a set of clinical features that, combined with the genetic profile, performs best, followed by SVM classification. What could take hours or days of computing is available on-the-fly making this strategy feasible to implement as a routine without the demand of great computing power. The functional value of the classification process ($\langle w, x \rangle + b$) can also be an indicator to measure the “degree of risk or disease stage” of hypertension, or of other pathologies in future studies.

The optimal and near optimal solutions generated here are of great importance, especially when used for the design of systems based on heuristics and rules in a knowledge-specific domain that can advice or make recommendations, much like a human expert would. These approaches applied to expert systems, can result in a great performance, especially where a good deal of training and specialized knowledge is required to assist doctors in future personalized diagnosis.

Acknowledgements: We thank Instituto Oswaldo Cruz (IOC), CNPq, FAPERJ and Fiocruz PDTIS for financial support.

References

- Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S *et al.* (2001). Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric. Oxide.* 5: 343-348.
- Baudin B (2002). Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. *Pharmacogenomics* 3: 65-73.
- Baudin B (2000). Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38: 853-856.
- Benetos A, Cambien F, Gautier S, Ricard S *et al.* (1996). Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive individuals. *Hypertension* 28: 1081-1084.
- Benetos A, Topouchian J, Ricard S, Gautier S *et al.* (1995). Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 26: 44-47.
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E *et al.* (1994). Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69.
- Boser BE, Guyon I, Vapnik VN (1992). A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers. *Proceedings of the 5th Workshop on Computational Learning Theory*, Pittsburgh, PA, USA, July 27-29, pp.144-152.
- Cover TM, Van Campenhout JM (1977). On the possible orderings in the measurement selection problem. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9: 657-661.
- Dominiczak AF, Brain N, Charchar F, McBride M *et al.* (2004). Genetics of hypertension: lessons learnt from mendelian and polygenic syndromes. *Clin. Exp. Hypertens.* 26: 611-620.
- Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik VN (2002). Gene Selection for Cancer Classification using Support Vector Machines. *Mach. Learning.* 46: 389-422.
- Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J *et al.* (1997). A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J. Clin. Invest.* 99: 1786-1797.
- Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S *et al.* (1990). Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 8: 598-600.
- Ishigami T, Umemura S, Tamura K, Hibi K *et al.* (1997). Essential hypertension and 5' upstream core promoter region of human angiotensinogen gene. *Hypertension* 30: 1325-1330.

- Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A *et al.* (1997). Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1448-1460.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP *et al.* (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71: 169-180.
- Joachims T (1998). *Making large-Scale SVM Learning Practical. Advances in Kernel Methods - Support Vector Learning.* 1 st edn. MIT-Press, Cambridge, MA, USA.
- Joachims T (2000). Estimating the Generalization Performance of a SVM Efficiently. *Proceedings of the International Conference on Machine Learning.* San Francisco, CA, USA, June 29 - July 2, pp. 431-438.
- Joachims T (2002). *Learning to Classify Text Using Support Vector Machines: Methods, Theory and Algorithms.* 1 st edn. Kluwer Academic Publishers. Norwell, MA, USA.
- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ *et al.* (1995). A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 332: 706-711.
- Nalogowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W *et al.* (2000b). Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med. Sci. Monit.* 6: 523-529.
- Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E *et al.* (2001). Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension* 38: 1204-1209.
- Pontremoli R, Ravera M, Viazzi F, Nicoletta C *et al.* (2000). Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension. *Kidney Int.* 57: 561-569.
- Shan SC, Kusiak A (2004). Data mining and genetic algorithm based gene/SNP selection. *Artificial Intelligence in Medicine* 31: 183-196.
- Stella P, Bigatti G, Tizzoni L, Barlassina C *et al.* (2004). Association between aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphism and left ventricular mass in human essential hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43: 265-270.
- Vapnik VN (1995). *The nature of statistical learning theory.* 1 st edn. Springer-Verlag, New York, NY, USA.

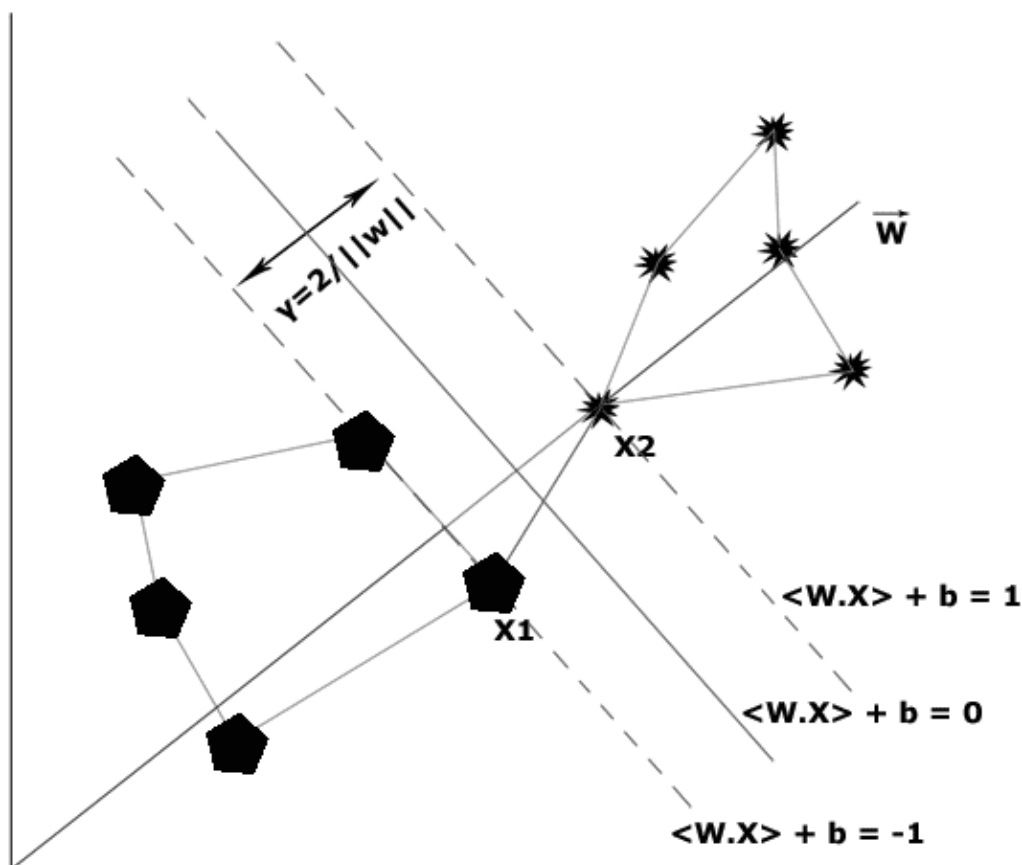


Figure 1: The hyperplane of maximum margin that separates the two classes is orthogonal to the shortest line connecting the convex hulls of both classes, and intersects it in its midpoint. The margin is obtained by calculating the difference of points x_1 , x_2 and projecting them on the hyperplane normal vector w . Once the hyperplane is built, classification determines what side of the hyperplane a sample is to be placed.

Table 1: The columns represent the dimension number, variable name and value for the input vector construction respectively.

Dim	Variable	Value
19	Gender	1 = male; 0 = female
20	Age	Normalized from 1 to 0
21	SBP	Normalized from 1 to 0
22	DBP	Normalized from 1 to 0
23	Glucose	0 if ≤ 100 ; else 1
24	Total Cholesterol	0 if ≤ 200 mg/dl; else 1
25	HDL-Cholesterol	If (male) {0 if ≥ 40 mg/dl; else 1} If (female) {0 if ≥ 50 mg/dl; else 1 }
26	LDL-Cholesterol	0 if ≥ 130 mg/dl; else 1
27	Triglycerides	0 if ≥ 150 mg/dl; else 1
28	Urea	1 if ≥ 41 mg/dl; else 0
29	Body Mass Index (BMI)	0.00 = 18,5 – 24,9 0.25 = 25.0 – 29.9 0.50 = 30.0 - 34.9 0.75 = 35.0 - 39.9 1.00 = ≥ 40
30	Brain Natriuretic Peptide (BNP)	1 if ≥ 100 pg/ml; else 0
31	Ethny_0	1 if Caucasian; else 0
32	Ethny_1	1 if African descendant; else 0
33	Ethny_2	1 if Mestizo; else 0

Table 2: Example of feature ranking. The features (F) are first grouped by decreasing LOO error coupled with number of support vectors (SV). Each group of features used in the solution is represented by a vector of 0's and 1's where 0 indicates that the respective feature was not used for the given solution. The score (S) is calculated by summing the product of the feature column with the ranking function applied to the group rank. In the above example the features listed by order of importance are F1, F2, F3.

LOO Error	No. SV	F	S F1	F 2	S F2	F 3	S F3
		1					
0.2%	17	1	1	1	1	0	0
0.2%	17	1	1	0	0	1	1
1.8%	18	1	0.6	1	0.6	1	0.6
1.8%	19	0	0.1	1	0.1	0	0
	Total		2.7		1.7		1.6
	Score						

ANEXO 7: TRABALHOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO**7.1. Manuscrito 1: Genetic investigation of Renin-Angiotensin-Aldosterone System gene polymorphisms in resistant hypertensive patients.**

To: sroig@ioc.fiocruz.br

Sent: Wednesday, August 16, 2006 12:13 PM

Subject: MS6486

Dra. Silvia R. S. Freitas
Laboratório de Genética
Departamento de Genética
FIOCRUZ
Pavilhão Leonidas Deane, sala 615
Av Brasil, 4365 - Manguinhos
21045-900 Rio de Janeiro, RJ

Ref.: MS6486 Genetic investigation of Renin-Angiotensin-Aldosterone System gene polymorphisms in resistant hypertensive patients. SRS Freitas, PH Cabello, RS Moura-Neto, LC Dolinsky, AB Lima, M Barros, I Bittencourt, IL Cordovil

Prezada Dra. Silvia:

O trabalho acima referido foi analisado pela assessoria da revista. Com base nos pareceres emitidos (em anexo), os Editores decidiram que o trabalho, em sua presente forma, não pode ser recomendado para publicação. No entanto, se os autores responderem às questões e sugestões da assessoria e modificarem o trabalho adequadamente, os Editores terão prazer em reconsiderar esta decisão.

A decisão final sobre aceitação da versão revisada do trabalho somente será tomada após sua reanálise pela editoria da Revista.

Aproveitamos a oportunidade para expressar nossos agradecimentos por submeter seu trabalho ao Brazilian Journal of Medical and Biological Research e solicitamos, para nossa tranquilidade, que V.Sa. acuse o recebimento deste e-mail.

Atenciosamente,

Prof.Dr. Luiz Juliano
Editor Seção de Bioquímica e Biologia Molecular
Brazilian Journal of Medical and Biological Research
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP
14049-900 Ribeirão Preto, SP
Tel/Fax: (16) 633 3825
e-mail: bjournal@fmrp.usp.br
On Line Version - <http://www.scielo.br/bjmb>

**RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM GENE POLYMORPHISMS
ANALYSIS IN RESISTANT HYPERTENSION**

SRS Freitas¹, PH Cabello¹, RS Moura-Neto² LC Dolinsky³, AB Lima⁴, M Barros⁴, I Bittencourt⁴,
IL Cordovil⁴

1 – Departamento de Genética, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

2 – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

3 – Instituto de Biociências, UNIGRANRIO, Rio de Janeiro, Brasil.

4 – Divisão de Hipertensão, Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras, Rio de Janeiro, Brasil.

RUNNING TITLE:

Polymorphism investigations in hypertensive patients.

CORRESPONDENCE TO:

*Silvia R. S. Freitas, M.SC

Laboratório de Genética, Departamento de Genética, FIOCRUZ. Pavilhão Leonidas Deane, sala 615. Av Brasil, 4365 – Manguinhos. Rio de Janeiro, RJ/ Brazil. Post Office Box: 21045-900. Telephone Number: (+55 21) 3865-8192. FAX: (+55 21) 2260-4282. E-mail: sroig@ioc.fiocruz.br

KEYWORDS:

Essential hypertension, RAAS, Polymorphisms, Genetics.

ABSTRACT

Essential hypertension (EH) is disease triggered multifactorially by genetic and environmental factors. Herein, we evaluate the contribution of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and clinical risk factors regarding the development of resistant hypertension in patients living in Southwestern Brazil. Ninety resistant hypertensive patients and 115 normotensive individuals were evaluated. Genotyping for insertion/deletion of angiotensin-converting enzyme (ACE I/D), angiotensinogen (AGT) M235T, angiotensin II type 1 receptor (AT1R) A1166C, aldosterone synthase (CYP11B2) C344T and mineralocorticoid receptor (MR) A4582C polymorphisms was performed using polymerase chain reaction, with further restriction analysis when required. The influence of genetic polymorphisms on blood pressure variation was assessed by analysis of Odds Ratio, while clinical risk factors were evaluated by logistic regression. Our analysis indicated that individuals who carry alleles 235-T, 1166-A, 344-T or 4582-C had a significant risk for resistant hypertension ($p < 0.05$). Surprisingly, when we tested individuals who carried the presumed risk genotypes A1166C, C344T and A4582C they were not associated with resistant hypertension. However a gradual increase in risk for resistant hypertension was detected when 235-MT and TT genotypes were combined with one, two or three of the supposed more vulnerable genotypes - A1166C (AC/AA), C344T (TC/TT) and A4582C (AC/CC). Analysis of clinical parameters indicated that age, body mass index and gender contribute to blood pressure increase ($p < 0.05$). In conclusion, our findings suggest that unfavourable genetic patterns of RAAS and clinical variables at risk may contribute to increased risk for the development of resistant hypertension, in a sample of Brazilian population.

1. INTRODUCTION:

Essential hypertension (EH), a complex syndrome determined by both genetic and environmental factors, affects approximately 25% of the world's population and consequently is considered one of the most common conditions for which individuals seek health care. According to "National Health Nutrition Education Survey" (1) most of hypertensive patients are considered resistant because the blood pressure (BP) cannot be reduced to $<140/90$ mmHg with an appropriate triple-drug regimen, including an oral diuretic with all agents administered at or near maximal dosages. Moreover, careful elimination of patient- and physician-related reasons of inadequate blood pressure control should lead to the diagnosis of truly resistant hypertension. Causes for refractory hypertension are multifactorial, so a better understanding of physiological systems that contributes to this uncontrolled blood pressure and drugs metabolism may help in identifying the causative factors.

In the past several years, genetic polymorphisms in candidate genes from physiological systems involved in blood pressure control have been extensively tested. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is one of the mechanisms that play key roles in the regulation of blood pressure. Consequently, genes that encode components of the RAAS are in turn thought to play a role in determining genetic susceptibility to essential hypertension and have been intensively scrutinized. Some of the polymorphisms that have been associated with hypertension forms are: the methionine (M) → threonine (T) variation at the amino acid positions 235 of angiotensinogen gene (AGT) (2), an insertion/deletion of *Alu* fragment in the 16th intron of the a angiotensin-converting enzyme (ACE) (3), an A to C transversion at the nucleotide position 1166 of the angiotensinogen II receptor type 1 (AGTR1) (4) and the T → C substitution at the -344 locus in the promoter region of the aldosterone synthase (CYP11B2) (5). Most of these polymorphisms are involved with specific physiological imbalance (6-8). However, contradictory findings have been observed among different populations (9-14). The inconsistencies presented in RAAS gene-association studies exemplify the challenges of distinguishing among complex multifactorial traits, such as hypertension, by single-locus analysis. These inconsistencies might arise from population structure, varying effects of several disease-predisposition variants or gene-environment interactions. Each of these factors can hinder the detection of a modest contribution of an individual locus to a trait such as hypertension. Subsequently, the screening of innumerable molecular variations combined with environmental-clinical factors may help to elucidate what the most important parameters that contribute to disease development in a particular population are.

Assuming that hypertension is a result of a complex summation of external and clinical factors combined with genetic predisposition, we investigated whether or not multiple polymorphisms in the RAAS pathway genes, as well as environmental-clinical risk factors, contributed to the development of resistant hypertension in a sample of Brazilian patients.

2. METHODS:

2.1. Study Subjects:

Two hundred and five Brazilians (90 hypertensives and 115 normotensives) from Rio de Janeiro city with similar anthropometrical backgrounds were selected from the Hypertension Division of Laranjeiras National Institute of Cardiology. Hypertensive patients recruited had a diagnosis of uncontrolled hypertension on the basis of conventional BP measurements (SBP \geq 140 mm Hg or DBP \geq 90 mm Hg) (15-17) and under treatment for \geq 3 months with a stable scheme consisting of \geq 3 antihypertensive drugs (including a diuretic), with the adequate combination and dose (15). In patients with type 2 diabetes (15 individuals) the hypertension definition was BP \geq 130/80 mmHg. Hypertension secondary form cases were excluded. Normotensive controls were defined as those without family history of hypertension or other cardiovascular disorders and BP < 140/90mmHg.

Blood pressure was measured using a conventional mercury sphygmomanometer on the left arm, in the sitting position, at three different occasions, by the same observer (15).

This study was approved by the Committee for Research on Human Subjects of the Laranjeiras National Institute of Cardiology, and all participants signed written consent forms.

2.2. Genotyping protocols:

Genomic DNA was extracted by a standard salting out method (18). Genotyping was performed by means of the polymerase chain reaction (PCR) technique, complemented with further restriction enzyme analysis when required. The ACE gene I/D polymorphism was detected by PCR as described elsewhere (19) and the expected I and D alleles were separated on a 2.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The polymorphisms AGT M235T (20), AGTR1 A1166C (21), CYP11B2 C344T (22) and mineralocorticoid receptor (MR) A4582C (23) were detected by PCR-restriction fragment length polymorphisms (RFLP) method, as previously reported. The fragments appeared after electrophoresis on 3.0% agarose gel and ethidium bromide staining.

Quality control for these assays was assessed by randomly selecting samples from the hypertensive and normotensive groups for re-genotyping.

2.3. Statistical Analysis:

Clinical data were compared by the Student unpaired t-test, for quantitative data, and by χ^2 test, for qualitative data. The genotype frequencies among study participants were calculated by the SPSS statistical program (version 10.0), and allele frequencies were calculated based on the observed genotypes. The estimation of acceptable minor allelic frequency for RAAS polymorphisms was calculated by the following function: $P_{\min} = 1 - \left[1 - (1 - \alpha)^{1/C} \right]^{1/2n}$, where α = 5% confidence interval; C = numbers of alleles; n = number of individuals (24). The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for the distribution of the genotypes was estimated using χ^2 test, by the GENIOC program (25). Allele and genotype frequencies were compared using χ^2 test, by GENIOC. The influence of each RAAS polymorphism on blood pressure variation was assessed by analysis of Odds Ratio (OR) (EpiInfo statistical program, version 3.2.2). Later, we selected the genotypes whose association with arterial hypertension had already been established in previous studies were selected, searching for the presence of additive effects of different RAAS polymorphisms by OR analysis. Logistic regression analysis that allowed for gender, age, glucose, body mass index (BMI), triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol investigated the association between the anthropometrical profile and hypertension risk. Regression analyses were calculated by the SPSS statistical program.

3. RESULTS:

Clinical parameters from normotensive and hypertensive groups are summarized in Table 1. These data are expressed as means \pm standard deviation (SD). A statistically significant difference was observed with respect to age, blood pressure level and lipid profile between the two groups ($p < 0.05$).

The minimal allelic frequencies calculated for the hypertensive group and the normotensive group were 0.020 and 0.042, respectively. All allelic frequencies in both samples were higher than the predetermined minimum.

Genotypic and allelic frequency data from hypertensive and normotensive groups are summarized in Table 2. Tests for HWE were carried out for all *loci* among the hypertensives and normotensives separately. All polymorphisms analyzed were in Hardy-Weinberg equilibrium not only patients (M235T: $\chi^2 = 0.730$, $p = 0.392$; I/D: $\chi^2 = 0.378$, $p = 0.586$; A1166C: $\chi^2 = 0.130$, $p = 0.716$; C-344T: $\chi^2 = 0.001$, $p = 0.975$; A4582C: $\chi^2 = 0.858$, $p = 0.354$) but in normotensives (M235T: $\chi^2 = 0.004$, $p = 0.998$; I/D: $\chi^2 = 0.360$, $p = 0.982$; A1166C: $\chi^2 = 0.537$, $p = 0.7645$; C-344T: $\chi^2 = 0.829$, $p = 0.365$; A4582C: $\chi^2 = 0.413$, $p = 0.813$) as well.

Allelic frequencies of M235T ($\chi^2 = 15.24$, $p = 0.000$) and C-344T ($\chi^2 = 11.12$, $p = 0.003$) were statistically different between normotensive and hypertensive groups. In both cases, we found that 235-T and 344-T alleles (considered to be at increased risk for hypertension in this population) are expressively high in hypertensive patients (235-T allele = 51.6%; 344-T allele = 61.5%) when compared with controls (235-T allele = 25.2%; 344-T allele = 38%). Comparative analyses of allelic frequencies from I/D, A1166C and A4582C failed to display variation between the samples ($p > 0.05$). Although, a significant difference in allele frequency was not detected, the 4582-C allele exhibited a discrete increased frequency in patients (38.5%) as compared to normotensive individuals (26.9%).

Genotypic frequencies for M235T ($\chi^2 = 28.25$, $p = 0.000$), A1166C ($\chi^2 = 9.899$, $p = 0.007$), C344T ($\chi^2 = 11.12$, $p = 0.003$) and A4582C ($\chi^2 = 6.024$, $p = 0.0492$) differed significantly between the groups. These differences were caused by low frequency of at risk alleles from the polymorphisms M235T (235-MM genotype), A1166C (1166-CC genotype), C344T (344-CC genotype) and A4582C (4582-AA genotype) in normotensives. The frequency of I/D polymorphisms did not demonstrate any difference between the groups ($p > 0.05$).

To investigate the genetic susceptibility for resistant hypertension development, we performed the odds ratio analysis for RAAS *loci* (Table 3). The results suggested an increased hypertension risk or genetic susceptibility for this disease associated with the 235-MT/TT (OR = 3.20), 1166-AC/AA (OR = 5.13), 344-TC/TT (OR = 2.21) and 4582-AC/CC (OR = 1.92). Intriguingly, when we join the A1166C, C344T and A4582C genotypes of a postulated worse

genotype (Table 3), we verified that combinations among them did not have an influence on risk of resistant hypertension. But, haplotypes with 235-TT/MT (M235T-A1166C [MT/TT + AC/AA; OR = 8.67], M235T-C344T [MT/TT; OR = 8.90], M235T-A4582C [MT/TT + AC/CC; OR = 8.10]) display a substantial, statistical risk for hypertension ($p < 0.05$). The triplet combinations of M235T-A1166C-C344T, M235T-A1166C-A4582C and M235T-C344T-A4582C resulted in an increased odd ratio (OR = 10.93, 10.10 and 10.52, respectively). And finally, the M235T-A1166C-C344T-A4582C genotypic combination raises the OR concerning the chance of resistant hypertension to 12.49. These results not only show that specific hypertension risk alleles contributed for resistant hypertension development but also, and even more important, the presence of 235-MT/TT genotypes associated with other unfavorable patterns of RAAS genes potentially increase the chance of developing this morbid disease.

To identify the clinical-anthropometrical parameters (age, gender, glucose, BMI and lipidic profile) that contribute for BP phenotypes, logistic regression was applied. This method did not reveal significant effects on BP with reference to glucose (SBP: $p=0.734$; DBP: $p=0.448$), total cholesterol (SBP: $p=0.859$; DBP: $p=0.798$), HDL cholesterol (SBP: $p=0.999$; DBP: $p=0.997$), LDL cholesterol (SBP: $p=0.150$; DBP: $p=0.172$) and triglycerides (SBP: $p=0.285$; DBP: $p=0.335$). The variables which had significant effects on BP were age (SBP: $b=0.077$, $p=0.000$, OR=1.08; DBP: $b=0.057$, $p=0.001$, OR=1.06), BMI (SBP: $b=0.212$, $p=0.000$, OR=1.24; DBP: $b=0.195$, $p=0.000$, OR=1.22) and gender (SBP: $b=-1.033$, $p=0.008$, OR=2.81; DBP: $b=-0.730$, $p=0.051$, OR=2.08). The predominant influences of age, BMI and sex (female) are in accordance with previous epidemiological studies stating that these parameters are important risk factors for hypertension.

4. DISCUSSION:

Arterial hypertension involves interactions among genetic, environmental, demographic, vascular and neuroendocrine factors. Essential hypertension is the most frequent diagnosis in this syndrome, indicating that the etiology has not been identified. However, a number of risk factors underlying EH have also been identified, including age, sex and genetics. In some cases, the control of environmental risk factors associated with an appropriate drug/dose can normalize BP. However, patients with resistant hypertension probably have a genetic background that interferes with BP maintenance or in pharmacokinetic/pharmacodynamic drug response. Previous studies have already demonstrated that polymorphisms in RAAS genes are related to several physiological changes (21-23, 26, 27). So, the combined action of multiple genes and environmental factors may contribute to disease severity. With the purpose of verifying this hypothesis, we investigate the genetic and anthropometrical profile of resistant hypertensive patients and normotensive individuals.

The comparative analysis of allelic and genotypic frequencies established that A1166C polymorphism is differently expressed in normotensive and hypertensive groups. The 1166-A allele, considered to be protective against hypertension according to Benetos et al. (28) and Nalogowska-Glosnicka et al. (21), was associated with resistant hypertension in our sample population. Almost 85% of patients have the 1166-A allele. Our results are not in agreement with these studies that suggest the 1166-C allele is related to aortic stiffness (28) and increased risk of pregnancy-induced hypertension (21). However, data obtained in this study reinforce the report of Siani et al. (27), where the 1166-A allele was associated with a significant alteration in proximal renal sodium handling, thus with hypertension risk. These controversial results may be a sign of the relationship between 1166-A and C alleles describing a different origin of hypertension. For this correlation to be confirmed, the physiological damage caused by this nucleotide alteration must be elucidated. The comparative analysis also showed an increased frequency of 235-T and 344-T alleles as well as 235-TT and 344-TT genotypes in hypertensive individuals, as encountered in gene-disease comparative analysis (2, 8) or population studies (11-14). The A4582C polymorphism has failed to reveal any correlation with hypertension in previous studies (23). In contrast with general previous belief, we detected a positive correlation between 4582-CC genotype and hypertension in Brazilian samples. However, the physiological damage caused by this genetic variant must be elucidated in order to validate our results.

Odds ratio analysis suggested that M235T, A1166C, C344T and A4582C, tested individually, increased the risk for resistant hypertension. Intriguingly, combinations between A1166C, C344T and A4582C were not associated with high blood pressure phenotypes. However, it is very interesting to point out a gradual risk increase towards resistant hypertension when AGT-MT and TT genotypes are combined with A1166C, C344T and A4582C genotypes in the following sequence: M235T-A1166C (MT/TT + AC/AA), M235T-C344T (MT/TT + TC/TT), M235T-A4582C (MT/TT + AC/CC), M235T-A1166C-C344T (MT/TT + AC/AA + TC/TT), M235T-A1166C-A4582C (MT/TT + AC/AA + AC/CC), M235T-C344T-A4582C (MT/TT + TC/TT + AC/CC) and M235T-A1166C-C344T-A4582C (MT/TT + AC/AA + TC/TT + AC/CC). This implies that the AGT-M235T plays an important role in resistant hypertension since this gene seems to amplify the effects of specific genotypes of other RAAS genes.

Association analysis between the anthropometrical profile and hypertension risk indicated that age, BMI and sex were the most important risk factors for resistant hypertension development in Brazilian patients. Our results support previous clinical and epidemiological studies which proven that sedentary life style, the presence of physical inactivity, smoking, dyslipidemia, alcohol and sodium intake are also external influences for hypertension development (29-31).

Finally, the M235T-A1166C-C344T-A4582C risk haplotype and clinical risk factors (sex, BMI, age) are collaborating for the development of resistant hypertension, observed in Brazilian

patients. This data emphasizes the need for testing an extensive set of genetic and clinical biomarkers, in cases of multifactorial diseases, in order to obtain accurate results. Nowadays, the use of hypertension biomarkers may represent useful information on pathogenetic mechanisms and subsequent therapeutic approaches in selected individuals. Furthermore, the genetic evaluation of RAAS molecular variants associated with clinical analysis may help in personalized diagnosis of severe forms of hypertension in the future.

5. REFERENCES:

- 1 - Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, et al. Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*, 1995;25(3):305-313.
- 2 - Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Willians CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*,1992; 71(1):169-180.
- 3 - Marrre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene TT, Hallab M, et al. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes*, 1994; 43(3): 384-388.
- 4 - Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru E, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*,1994; 24: 63-69.
- 5 - Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol*, 1991; 5:1513–1522.
- 6 - Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest*,1995; 95: 948–953.
- 7 - Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA et al. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet*, 2001; 68: 1139–1148.
- 8 - Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, et al. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 1998; 11:856–860.
- 9- Schmidt S, van Hooft IM, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure. Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens*, 1993; 11: 345–348.

- 10 - Kassilikioti S, Doumas M, Douma S, Petidis K, Karagiannis A, Balaska K, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. *Am J Hypertens*, 1996; 9: 700–702.
- 11 - Mettimano M, Ianni 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): 589-593.
- 12 - Castellano M, Glorioso N, Cusi D, Sarzani R, Fabris B, Opocher G, et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in Italian population: GENIPER Project. *J Hypertens*, 2003; 21: 1853-1860.
- 13 - 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): 545-549.
- 14 - 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): 266-273.
- 15 – Guidelines Committee. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*, 2003; 21:1011-1053.
- 16 - Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. National High Blood Pressure Education Coordinating Committee: The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *J Am Med Assoc*, 2003; 289: 2560-2571.
- 17 - Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves J, Hill MN, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1: Blood pressure measurement in humans. *Hypertension*, 2005; 45: 142-161.
- 18 - Lahiri DK and Nurnemberg JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acid Res*, 1991; 19(19): 5444.
- 19 – 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 the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 1990; 86:1343–1346.
- 20 - 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): 609-610.

- 21- Nalogowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukwaska-Szczechowaska 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): 523-529.
- 22 – Hautanena A, Lankinen L, Kupari M, Jane OA, Adlercreutz H, Nikkila H, et al. Associations between aldosterone synthase gene polymorphism and the adrenocortical function in males. *J Intern Med*, 1998; 244: 11-18.
- 23 - Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de la Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension*, 2001; 38(5): 1204-1409.
- 24 – Budowle B, Monson KL, Chakraborty R.. Estimating minimum allele frequencies for DNA profile frequency estimates for PCR-based loci. *Int J Legal Med*, 1996; 108(4):173-176.
- 25 - Cabello PH, Krieger H. GENIOC: Sistema para analises de dados de genética. Publicação técnica. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 1977.
- 26 - Kupiari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H et al. Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and left ventricular size, mass, and function. *Circulation*, 1998; 97: 569-575.
- 27 - Siani A, Russo P, Capucino P, Iacone R, Venezia A, Russo O, et al. Combination of renin-angiotensin system polymorphisms is associated with altered renal sodium handling and hypertension. *Hypertension*, 2004; 43(3): 598-602.
- 28 - Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirer O et al. Influence of angiotensina II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation*, 1996; 94: 698-603.
- 29 – Perry I, Whincup P, Shaper A. Environmental factors in the development of essential hypertension. *Brit Med Bull*, 1994; 50 (2): 246-259.
- 30 – Benetos A, Waeber B, Izzo J, Mitchell G, Resnick L, Asmar R, et al. Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. *Am J Hypertens*, 2002; 15: 1101-1108.
- 31 – LaRosa J and Brown C. Cardiovascular risk factors in minorities. *Am J Med*, 2005;118: 1314-1322.

Table 1: Anthropometrical and Clinical Characteristics of hypertensive patients and normotensive individuals from Rio de Janeiro city.

		Normotensives (n = 115)	Hypertensives (n = 90)	p*
Gender	Female/Male	57/59	41/49	Not significant
Age (year)		51.85 ± 8.57	56.74 ± 11.10	< 0.05
Glucose		109.39 ± 26.14	112.09 ± 51.11	Not significant
BMI (kg/m ²)		28.92 ± 5.21	30.11 ± 4.78	Not significant
SBP ^a (mmHg)		120.08 ± 7.02	163.60 ± 24.46	< 0.05
DBP ^a (mmHg)		78.11 ± 5.28	100.08 ± 16.08	< 0.05
Total Cholesterol (mg/dl)		204.600 ± 46.79	200.64 ± 38.36	Not significant
Triglyceride (mg/dl)		135.11 ± 97.11	147.96 ± 71.76	< 0.05
HDL- (mg/dl)	Cholesterol	48.30 ± 14.03	49.44 ± 14.57	Not significant
LDL- (mg/dl)	Cholesterol	135.95 ± 93.35	117.03 ± 56.26	< 0.05

* = *t* - test

Table 2: Genotype and allele frequency of RAAS gene polymorphisms.

RAAS polymorphisms	Normotensives	Hypertensives	P*
AGT M235T genotype			
MM	64 (55.7%)	26 (28.6%)	0.000
MT	43 (37.4%)	35 (38.5%)	
TT	7 (6.9%)	30 (33%)	
AGT alleles			
M	86 (74.8%)	44 (48.4%)	0.000
T	29 (25.2%)	47 (51.6%)	
ACE I/D genotypes			
II	12 (10.5%)	13 (14.3%)	0.321
ID	52 (45.2%)	46 (50.5%)	
DD	51 (44.3%)	31 (34.1%)	
ACE alleles			
I	38 (38%)	36 (39.6%)	0.820
D	62 (62%)	55 (60.4%)	
AGTR1 A1166C genotype			
AA	58 (50.4%)	60 (68.6%)	0.007
AC	45 (30.1%)	29 (32.2%)	
CC	12 (10.5%)	1 (1.1%)	
AGTR1 alleles			
A	81 (81%)	76 (83.5%)	0.649
C	19 (19%)	15 (16.5%)	
CYP11B2 C344T genotype			
CC	31 (27%)	13 (14.3%)	0.003
TC	62 (53.9%)	43 (47.3%)	
TT	22 (19.1%)	35 (38.5%)	
CYP11B2 alleles			
C	62 (62%)	35 (38.5%)	0.001
T	38 (38%)	56 (61.5%)	
MR A4582C genotype			
AA	60 (52.2%)	33 (36.3%)	0.049
AC	48 (41.7%)	47 (51.6%)	
CC	7 (6.1%)	11 (12.1%)	
A4582C alleles			
A	84 (73.1%)	56 (61.5%)	0.078
C	31 (26.9%)	35 (38.5%)	

P value from χ^2 test for the comparison of genotypic and allelic distributions.

Table 3: Odds Ratio Analysis of RASS polymorphisms.

Polymorphisms (genotypes at risk)	Odd Ratio (95%, CI)	P value
M235T (MT + TT)	3.20 (1.71 – 6.01)	0.000
I/D (ID + DD)	0.70 (0.28 - 1.75)	0.542
A1166C (AC + AA)	5.13 (1.05 – 34.13)	0.041
C344T (TC + TT)	2.21 (1.03 – 4.84)	0.042
A4582C (AC + CC)	1.92 (1.05 – 3.50)	0.032
M234T-A1166C (MT/TT + AC/CC)	8.67 (1.09 – 185.76)	0.030
M235T-C344T (MT/TT + TC/TT)	9.80 (1.32 – 235.33)	0.040
M235T-A4582C (MT/TT + AC/CC)	8.10 (1.83 – 101.34)	0.017
A1166C-C344T (AC/AA + TC/TT)	1.61 (0.83 – 3.11)	0.170
A1166C-A4582C (AC/AA + AC/CC)	8.80 (1.32 – 232.15)	0.134
C-344T-A4582C (TC/TT + AC/CC)	2.10 (0.54 – 8.49)	0.366
M234T-A1166C-C344T (MT/TT + AC/AA + TC/TT)	10.93 (1.36 – 235.63)	0.015
M235T- A1166-A4582C (MT/TT + AC/AA + AC/CC)	10.10 (1.05 – 351.36)	0.012
M235T-C344T-A4582C (MT/TT + TC/TT + AC/CC)	10.50 (1.10 – 300.23)	0.020
A1166C-C344T-A4582C (AC/AA + TC/TT + AC/CC)	3.10 (0.81 – 2.10)	0.144
M234T-A1166C-C344T-A4582C (MT/TT+AC/AA+TC/TT+AC/CC)	12.49 (1.83 – 210.41)	0.009

7.2. Manuscrito 2: “Correlação entre polimorfismos moleculares em genes do sistema renina-angiotensina e a hipertensão arterial na população do município de Santa Izabel do Rio Negro / Amazonas”

----- Original Message -----

From: [Cadernos de Saúde Pública](#)

To: sroig@ioc.fiocruz.br

Sent: Friday, June 23, 2006 10:59 AM

Subject: Aviso de Recebimento - 545/06

Prezada Dra. Freitas:

Seu trabalho “*Correlação entre polimorfismos moleculares em genes do sistema renina-angiotensina e a hipertensão arterial na população do município de Santa Izabel do Rio Negro / Amazonas*” encaminhado para *Cadernos de Saúde Pública* foi recebido e aguarda parecer do Conselho Editorial. O número de seu artigo é: MS-545/06.

Atenciosamente,
Carlos E. A. Coimbra Jr.
Editor

--

CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA/REPORTS IN PUBLIC HEALTH

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz

Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Manguinhos

CEP 21041-210 - Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Tel: (55 21) 2598-2511 / Fax: (55 21) 2598-2737

Secretaria: cadernos@ensp.fiocruz.br

Assinaturas: csp@ensp.fiocruz.br

<http://www.ensp.fiocruz.br/csp>

CORRELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS MOLECULARES EM GENES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A HIPERTENSÃO ARTERIAL NA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SANTA IZABEL DO RIO NEGRO/AMAZONAS.

CORRELATION BETWEEN GENETIC POLYMORHISMS IN RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM GENES AND ARTERIAL HYPERTENSION IN SANTA IZABEL DO RIO NEGRO POPULATION/AMAZON.

Silvia Regina Sampaio Freitas¹, Marcelo Baeta Tavares¹, Pedro Hernan Cabello¹, Rodrigo Soares Moura-Neto², Marcio Neves Bóia³, Giselda Maria Kalil de Cabello¹

ENDEREÇOS DOS AUTORES:

- 1 - Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.
- 2 - Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do rio de Janeiro.
- 3 - Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Silvia Regina Sampaio Freitas, MSc.

Laboratório de Genética, Departamento de Genética, Fundação Oswaldo Cruz

Pavilhão Leonidas Deane, sala 615. Av Brasil, 4365 – Manguinhos. Rio de Janeiro, RJ/ CEP: 21045-900. Telefone: (+55 21) 3865-8192. FAX: (+55 21) 2260-4282. E-mail: sroig@ioc.fiocruz.br

TÍTULO ABREVIADO:

Correlação entre polimorfismos genéticos e a hipertensão arterial.

RESUMO

Este trabalho teve como propósito investigar a contribuição dos polimorfismos genéticos AGT-M235T e ECA-I/D e de fatores antropométricos para o desenvolvimento da hipertensão arterial primária. Para este estudo, foram selecionados 219 indivíduos (113 hipertensos e 106 normotensos) provenientes do município de Santa Izabel do Rio Negro/Amazonas. Todos os participantes foram avaliados clinicamente para os parâmetros: idade, sexo, etnia e pressão arterial. Os dados obtidos mostraram que a elevação da pressão arterial sistólica é favorecida pelo alelo ECA-D e pelo aumento da idade ($F = 5,147$; $p = 0,007$), enquanto que a elevação da pressão arterial foi favorecida alelos ECA-D e AGT-T, e idade ($F = 27,005$; $p = 0,000$). Nossos resultados evidenciaram que a presença dos marcadores para ECA e AGT contribuem para os fenótipos alterados de pressão arterial, entretanto o fator idade atua de forma expressiva sobre estes polimorfismos. Este estudo pioneiro realizado numa amostra da população de Santa Izabel do Rio Negro mostrou a importância da análises simultânea de fatores genéticos e antropométrico para o melhor entendimento de doenças multifatoriais.

PALAVRAS-CHAVE:

Sistema renina angiotensina; angiotensinogênio; enzima conversora de angiotensina I; hipertensão; polimorfismo

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the contribution of AGT-M235T and ACE-I/D genetic polymorphisms and clinical risk factors to development of essential hypertension in Brazilian population from the Amazon region. Two hundred and nineteen individuals (113 hypertensives patients and 106 normotensive individuals) from Santa Izabel do Rio Negro/Amazon were evaluated. All participants were clinically evaluated through age, gender, ethnical profile and blood pressure. Our results indicated that increase of systolic blood pressure was favoured by ACE I/D- D allele and advanced age ($F = 5,147$; $p = 0,007$), while AGT-T allele, ACE-D allele and aging were associated with high diastolic blood pressure ($F = 27,005$; $p = 0,000$). These findings suggest that individuals who carry ACE-D allele or/and AGT-T allele present higher values of SBP and DBP, with pasting years. This study indicated the importance of simultaneous analysis of genetic and anthropometrical factor to a better know about multifatorial disease.

KEYWORDS:

Renin-angiotensin system; Angiotensinogen; Angiotensin-converting enzyme; Hypertension, Polymorphism

1. INTRODUÇÃO:

A hipertensão é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e contribui, de maneira expressiva, para um grande número de mortes anuais devido ao infarto do miocárdio, a acidente vascular cerebral e a doença renal crônica. A hipertensão arterial é multigênica, na qual influências ambientais têm importância na determinação do fenótipo. Estima-se que 30- 40% da variação da pressão arterial em uma população seja devido a fatores genéticos¹. Portanto, a identificação dos fatores genéticos determinantes da hipertensão arterial será fundamental para esclarecer o processo fisiopatológico da doença. A característica multifatorial e a heterogeneidade etiológica representam os maiores obstáculos para a identificação das alterações genéticas específicas.

Neste cenário, torna-se importante o estudo das variantes fenotípicas associado à avaliação dos componentes de importância fisiológica no controle da regulação da pressão arterial para avaliar mecanismos genéticos de variação da pressão sanguínea entre humanos. O sistema renina-angiotensina (SRA) é um dos mecanismos que atuam na manutenção da homeostase cardiovascular, e conseqüentemente, seus genes são alvos em potencial para o rastreamento de polimorfismos de suscetibilidade para a hipertensão. Duas variantes alélicas presentes em genes dos componentes do SRA têm mostrado forte associação com fenótipos particulares que podem ajudar a explicar alguns dos distúrbios fisiopatológicos observados na homeostasia cardiovascular. A primeira está localizada no gene do angiotensinogênio, e é caracterizada pela substituição de uma metionina (M) por uma treonina (T) no codon 235 da proteína². Esta variação apresenta uma forte associação com níveis alterados da concentração de angiotensinogênio (AGT) no plasma e com elevados níveis tensóricos em pacientes (2). O segundo polimorfismo é caracterizado pela deleção (alelo D) ou inserção (alelo I) de um fragmento *Alu* de 287 pares de base no intron 16 do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA)³. A análise dos níveis de ECA no plasma circulante mostrou uma associação direta entre os genótipos relativos ao polimorfismo e os níveis da enzima. Assim, indivíduos que apresentam o genótipo D/D exibem aproximadamente o dobro da concentração de ECA circulante em relação àqueles com o genótipo I/I, enquanto que o genótipo D/I apresenta níveis intermediários de ECA³. Além disso, inúmeros trabalhos evidenciaram a correlação entre o polimorfismo I/D *Alu* com o infarto do miocárdio⁴, morte súbita⁵ e hipertrofia ventricular esquerda⁶.

A proposta do presente estudo foi investigar a contribuição dos polimorfismos M235T e *Alu* I/D e fatores antropométricos para o aumento da pressão arterial em indivíduos do município de Santa Izabel do Rio Negro/Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. Descrição da Amostra de Estudo:

O município de Santa Izabel do Rio Negro está situado na região noroeste do Estado do Amazonas (0° 28' S e 65° 32' O), na região do Alto do Rio Negro. Este município ocupa uma área de 62.846 Km² ⁷, sendo 90% coberto pela floresta amazônica. A sua população é de 10.561 habitantes, na qual a etnia de maior prevalência é a indígena. Cerca de 4.220 indivíduos residem no centro do município, enquanto a maioria da população está distribuída pelas comunidades ribeirinhas.

Duzentos e dezenove indivíduos adultos, residentes no centro do município de Santa Izabel do Rio Negro, foram convidados a participar deste trabalho. Essa amostra foi selecionada utilizando-se a Técnica de Amostragem Sistemática por Conglomerado, tendo o domicílio como unidade amostral. Foram visitados 219 domicílios, nos quais a cada cinco casas, uma era visitada. Em cada domicílio o primeiro morador examinado, maior de 18 anos, que preenchesse o critério de hipertensão arterial era convidado a participar do estudo. Na próxima casa selecionada da amostra era convidado a participar o primeiro morador examinado não hipertenso que preenchesse os demais critérios do estudo.

O grupo controle foi formado por 106 indivíduos normotensos, não-relacionados, com valores pressóricos inferiores a 140/90 mmHg, e sem histórico familiar para hipertensão ou outros distúrbios cardiovasculares. Cento e treze indivíduos foram classificados como hipertensos, seguindo os seguintes critérios: 1) pressão sanguínea (PA) \geq 140/90 mmHg em três mensurações em períodos distintos, 2) ausência de tratamento antihipertensivo, e 3) exclusão de formas secundárias de hipertensão.

Os participantes foram classificados como, de acordo com características fenotípicas⁸, como caucasóide, negróide, indígena-descendente e caboclo amazônico (mistura de branco e indígena), por um único entrevistador.

A pesquisa foi autorizada pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz. Todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para a participação na pesquisa.

2.2. Análise dos Polimorfismos Genéticos:

A análise dos polimorfismos M235T⁹ e *Alu* I/D¹⁰ foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase de acordo com protocolos pré-estabelecidos.

2.3. Análise Estatística:

Os parâmetros antropométricos foram comparados com o propósito de averiguar diferenças e similaridades entre os controles e os pacientes. Os valores das variáveis contínuas, como idade, pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), foram expressos como média e desvio-padrão, e as diferenças entre as amostras de controles e pacientes foram testadas pela prova de T-Student (programa SPSS, versão 12.0). As variáveis qualitativas (sexo e etnia) foram comparadas pelo teste de qui-quadrado (programa Stat-Xact, versão 3.0).

As frequências genóticas de cada loco do SRA foram determinadas pelo programa estatístico SPSS e as frequências alélicas foram calculadas a partir dos valores genóticos observados.

A influência de variáveis genéticas e antropométricas na variação da pressão arterial foi medida por regressão linear múltipla (programa SPSS). Nesta análise, as variáveis dependentes foram a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica. As variáveis independentes foram: AGT (MM = 0, MT = 1, TT = 2), ECA (II = 0, ID = 1, DD = 2), idade, sexo (0 = feminino, 1 = masculino), e etnia (etnia1 = negra, etnia2 = caucasiana, etnia3 = indígena, etnia4 = mestiça). Valores 0 e 1 foram atribuídos para a ausência ou presença da etnia, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise descritiva das características antropométricas (tabela 1) mostrou que os pacientes hipertensos e os indivíduos normotensos diferem significativamente em relação à pressão arterial (PAS: $t = 16.383$, $p = 0.0000$; PAD: $t = 11.173$, $p = 0.0000$), idade ($t = 6,3149$; $p = 0.0000$) e sexo ($\chi^2 = 40,42$; $p = 0.0000$). O perfil étnico foi similar entre os grupos analisados ($\chi^2 = 1.112$; $p = 0.7741$). Este resultado já era esperado, uma vez que a população do município de Santa Izabel do Rio Negro/AM é etnicamente caracterizada pela alta frequência de indivíduos de origem indígena e mestiça.

A análise comparativa das frequências genóticas não detectou diferenças significativas na distribuição do polimorfismo AGT entre os grupos avaliados ($\chi^2 = 0,7111$; $p = 0,7008$), enquanto que o polimorfismo da ECA apresentou distribuição genótica diferente entre as amostras ($\chi^2 = 9,8010$; $p = 0,0074$). Neste polimorfismo, o genótipo DD, que confere suscetibilidade ao desenvolvimento da hipertensão, foi observado em maior frequência entre os pacientes hipertensos.

Para avaliar quais parâmetros clínico-antropométricos e genéticos contribuem para o aumento da pressão arterial, submetemos os dados à análise de regressão linear múltipla (stepwise).

Esta análise evidenciou que, na amostra da população do município de Santa Izabel do Rio Negro, a presença do alelo ECA-D e idade contribuem para o incremento dos valores da PAS ($F = 5,147$; $p = 0,007$). Em indivíduos portadores do alelo ECA-D verificamos um aumento de 7,8 mmHg ($t = 2,498$; $p = 0,013$) na pressão arterial sistólica quando comparados com os portadores do alelo ECA-I. A idade também contribui para os efeitos desfavoráveis do alelo ECA-D, proporcionando um aumento de 0,160 mmHg na pressão arterial sistólica por ano ($t = 2,142$; $p = 0,033$). O aumento na PAD mostrou relacionado com a presença dos alelos ECA-D e AGT-T, e pela idade ($F = 27,005$; $p = 0,000$). Portadores dos alelos ECA-D e AGT-T exibiram, respectivamente, um incremento de 6,8 mmHg ($t = 4,254$; $p = 0,000$) e 5,6 mmHg ($t = 2,915$; $p = 0,000$) na pressão arterial diastólica, enquanto que o fator idade representou um incremento de 0,140 mmHg ($t = 7,063$; $p = 0,000$), por ano de vida.

Já são conhecidos os efeitos clínicos causados pelos polimorfismos nos genes da ECA e do AGT, entretanto devido a presença de resultados conflitantes sobre a influência destes marcadores para o desenvolvimento da hipertensão arterial, torna-se importante a sua análise em nossa população. Logo, este estudo realizado numa amostra da população de Santa Izabel do Rio Negro mostrou que a presença de mutantes nos genes ECA e AGT contribuem para os fenótipos alterados de pressão arterial. Além disso, como esperado, a idade foi o fator entropométrico associado com um aumento gradual da pressão arterial.

4. CONCLUSÕES:

A análise multifatorial mostrou que numa população da Amazônia, a associação do alelo ECA-D e a idade contribuem para o aumento da pressão arterial sistólica, enquanto que a associação do haplótipo AGT-T/ECA-D e a idade atuam para a elevação da pressão arterial sistólica.

5. COLABORADORES:

S.R.S. Freitas contribui para a elaboração do projeto, execução metodológica, digitação dos dados, análise dos dados e redação do artigo. M.B. Tavares contribui para a execução metodológica do trabalho. P.H. Cabello, R.S. Moura-Neto M.N. Bóia e G.M.K Cabello orientaram a pesquisa e contribuíram para a redação do manuscrito.

6. REFERÊNCIAS:

- 1 – Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. New York: Raven Press, pp 67-88, 1995.

- 2- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al.. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71(1): 169-180.
- 3 – Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion-deletion polymorphism the angiotensin-I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
- 4 – Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensina converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644.
- 5 – Evans AE, Poirier O, Kee F, Lecerf L, McCrum E, Falconer T, et al. Polmorphisms of the angiotensina-converting-enzyme gene in subjects who died from coronary heart disease. *Q J Med* 1994; 87: 211-214.
- 6 – Schunker H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensina-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634-1638.
- 7 - IBGE, 2002. Sinopse preliminar do censo demográfico de 2000 – Malha municipal digital do Brasil, 1997. <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php2000> (acessado em 16/11/2006)
- 8 - McKenzie K. Ethnicity, race and culture: guidelines for research, audit and publication. *BMC* 1996; 312:1094-1098.
- 9 - 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): 609-610.
- 10 - Rigat C, 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 Acid Research* 1992; 20(1433).

Tabela 1: Descrição antropométrica dos grupos de hipertensos e normotensos provenientes da cidade de Santa Izabel do Rio Negro/Amazonas.

Características		Normotensos	Hipertensos	p
		(n = 106)	(n = 113)	
Pressão Arterial Sistólica		113,35 ± 16,901	150,54 ± 19,597	0,0000 ^a
Pressão Arterial Diastólica		71,60 ± 11,242	87,40 ± 11,162	0,0000 ^a
Idade		40,87 ± 14,542	51,36 ± 17,109	0,0000 ^a
Sexo	Masculino/Feminino	42/64	64/49	0,0000 ^b
	Branco	5	6	
Etnia	Negro	1	0	0,7741 ^b
	Mestiço	52	55	
	Índio	48	52	

Legenda: a – valor de p calculado pelo teste de T-Student.

b – valor de p calculado pelo teste de χ^2 .

Tabela 2: Descrição das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos M235T e Alu I/D observadas nos grupos hipertensos e normotensos do município de Santa Izabel do Rio Negro/Amazonas.

Polimorfismos	Normotensos	Hipertensos	P*
AGT-M235T			
Alelo M	0,4205	0,4081	
Alelo T	0,5579	0,5918	0,3200
Genótipo MM	0,1338	0,0747	
Genótipo MT	0,6326	0,6715	0,7008
Genótipo TT	0,2336	0,2538	
ACE ALU I/D			
Alelo I	0,8773	0,7321	0,0000
Alelo D	0,1226	0,2678	
Genótipo II	0,7924	0,5446	0,0074
Genótipo ID	0,1696	0,375	
Genótipo DD	0,0377	0,0803	

* valor de p calculado pelo teste de χ^2