



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCIANA DE JESUS ARAÚJO

**ESTUDO SOBRE ASPECTOS GENÉTICOS DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM AFRO
DESCENDENTES DO SUDOESTE DO ESTADO DA BAHIA**

Feira de Santana, BA
2010

LUCIANA DE JESUS ARAÚJO

**ESTUDO SOBRE ASPECTOS GENÉTICOS DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM AFRO
DESCENDENTES DO SUDOESTE DO ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Lázaro Souza Rios
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Ana Angélica Leal Barbosa

Feira de Santana, BA
2010

A Deus, farol da minha travessia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me conduzido e sustentado até aqui, sem Ele nada teria acontecido.

A minha mãe Maria José e a minha querida avó Milú (in memorian), meus alicerces. Por todo o amor, carinho e por me ensinar valores que eu jamais aprenderia nas Universidades.

Aos meus irmãos Rose e Rildo pelo carinho e companheirismo e ao pequeno Arthur, fonte de intensa alegria.

Ao meu namorado Jovaldo, por estar sempre ao meu lado, acrescentando razão e beleza aos meus dias. Obrigada pelo amor, apoio, companheirismo e dedicação oferecida.

Aos meus amigos, todos eles, pelo carinho, apoio, incentivo, compreensão e acima de tudo por suas amizades que tanto me honram.

A minha amiga e colega de curso Jaqueline Fagundes, pela verdadeira amizade, pelo companheirismo, por todo o apoio nos diversos momentos e pelas experiências inesquecíveis compartilhadas ao longo destes dois anos.

Ao querido amigo e colega de curso Getúlio Bomfim, pelo companheirismo e todo apoio fundamental ao longo do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Domingos Lázaro Souza Rios pela oportunidade concedida, pela confiança creditada no meu desempenho, pela disponibilidade e pela orientação.

A minha co-orientadora Prof.^a Dra. Ana Angélica Leal Barbosa, por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade, pela orientação e pela amizade.

A Prof.^a Dra. Sandra Mara Bispo Sousa pelo apoio e colaboração essenciais ao longo deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Genética Molecular da UESB, em especial ao Prof. Dr Paulo Roberto Affonso, Prof.^a Dra. Ana Maria Waldschmidt e ao Prof. Dr Paulo Carneiro, por todo o apoio nos momentos em que precisei.

A todos os colegas da UESB e companheiros do Laboratório de Genética Molecular, pelo apoio, agradável convívio e pela amizade; em especial a amiga e colega, Jamile Oliveira.

Aos enfermeiros das Unidades de Saúde, em especial ao Enf^o Anderson Leone; a Enf^a Gabriela Araújo e a Enf^a Karla Bispo; pelo imprescindível apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao HEMOBA, por me conceder a oportunidade de coleta e contato com os doadores, meu agradecimento especial a Enf^a Gildásia, coordenadora do HEMOBA em Jequié.

A Enf^a Odete, e a Téc. Ivonélia pelo apoio e colaboração nas inúmeras coletas realizadas.

A todos os pacientes incluídos neste estudo que tão gentilmente aceitaram participar deste trabalho, proporcionando o desenvolvimento do mesmo.

A CAPES, meu agradecimento especial pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

*“Costumávamos pensar que nosso futuro
estava nas estrelas. Agora sabemos que
ele está nos nossos genes...”*

James Watson

RESUMO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença comum e multifatorial. O Sistema Renina-Angiotensina (RAS) possui relação íntima com o processo da HAS. Nosso objetivo foi investigar a associação dos polimorfismos do RAS: M235T no Angiotensinogênio (AGT), C-344T no Aldosterona Sintetase (CYP11B2), A1166C no Receptor Tipo 1 da Angiotensina II (AT1R), I/D na Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), e G2646A na Renina (REN) com a HAS em uma amostra de 505 indivíduos Afro-descendentes do estado da Bahia. Foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP). A frequência do alelo 235T no AGT foi maior nos hipertensos (60%), comparados aos normotensos (53%; $p=0,05$). A frequência do alelo -344T no CYP11B2 também foi maior nos hipertensos (63%) comparados aos normotensos (54%; $p=0,006$). Não houve diferenças significantes nas frequências dos polimorfismos A1166C no AT1R, I/D na ECA e G2646A no REN entre hipertensos e normotensos Afro-descendentes. A análise de regressão logística multivariada mostrou que os indivíduos homocigotos para o alelo 235T no AGT apresentavam um risco cerca de 1,8 vezes maior de terem hipertensão (*Odds ratio*= 1,848; $p=0,013$) quando comparados aos portadores do alelo 235M. Todos os demais polimorfismos estudados, inclusive o C-344T no CYP11B2 não se mantiveram como preditores significantes do risco para a HAS. O genótipo homocigoto 235TT no gene do AGT está associado a um aumento no risco de HAS entre os Afro-descendentes. Os polimorfismos; C-344T no CYP11B2, A1166C no AT1R, I/D no ECA, G2646A no REN não foram associados a HAS entre os Afro-descendentes.

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Sistêmica. Genes. Polimorfismo. Sistema Renina-Angiotensina. Afro-descendentes.

ABSTRACT

Hypertension (HBP) is a common and multifactorial disease. The Renin-Angiotensin System (RAS) has close relationship with the process of hypertension. The aim of this study was to investigate the association of RAS polymorphisms following: the M235T angiotensinogen (AGT), the C-344T aldosterone synthase (CYP11B2), A1166C in Receptor Type 1 Angiotensin II (AT1R), I/D in-Converting Enzyme (ACE) and G2646A in Renin (REN) with hypertension in a sample of 505 individuals of African descent of Bahia state. The amplification of the sample was done with polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results shown that the frequency of the 235T allele in AGT was higher in hypertensive (60%), compared to normotensive (53%, $p = 0.05$). The frequency of -344T allele in CYP11B2 was also higher in hypertensive (63%) compared to normotensive (54%, $p = 0.006$). Otherwise, there were no significant differences in the frequencies of A1166C polymorphisms in the AT1R, I/D ACE and G2646A in the REN between hypertensive and normotensive Afro-descendants. A logistic regression analysis showed that individuals homozygous for the AGT 235T allele had a risk about 1.8 times more likely to have hypertension (odds ratio = 1.848, $p = 0.013$) when compared with carriers of the allele 235M, and the homozygous 235TT genotype in the AGT gene is associated with an increased risk of hypertension among Afro-descendants. All other polymorphisms studied, including the C-344T in CYP11B2 did not remain as significant predictors of risk for hypertension, and, were not associated with hypertension among African-Americans.

Keywords: Hypertension. Genes. Polymorphism. Renin-Angiotensin System. Afro-descendants.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio
AT1R	Receptor Tipo 1 da Angiotensina II
AT2R	Receptor Tipo 2 da Angiotensina II
DAC	Doença Arterial Coronariana
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina I
HDL	High Density Lipoprotein
HAS	Hipertensão Arterial Sistólica
LDL	Low Density Lipoprotein
OR	Odds Ratio
RAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
REN	Renina

ALELOS

A	Adenina
I	Inserção
D	Deleção
M	Metionina
T	Treonina
C	Citosina
G	Guanina

MEDIDAS

μl	Microlítro
kb	Kilo bases
KDa	Kilo Daltons
pb	Pares de bases
mg/dl	Miligrama por decilitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona.....	17
Figura 2: Negros no fundo do porão do navio (1835).....	21
Figura 3: Representação esquemática da organização do gene da ECA.....	23
Figura 4: Representação esquemática da organização do gene do Angiotensinogênio.....	25
Figura 5: Representação esquemática da organização do gene da Renina e o polimorfismo G2646A.....	27
Figura 6: Representação esquemática da organização do gene da Aldosterona Sintetase e o polimorfismo C -344T.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos de associação entre a variante I/D do gene da ECA e a Hipertensão Arterial Sistêmica.....	24
Tabela 2: Estudos de associação entre a variante M235T do gene do AGT e a Hipertensão Arterial Sistêmica.....	26
Tabela 3: Estudos de associação entre o polimorfismo G2646A do gene da Renina com a Hipertensão Arterial Sistêmica.....	28
Tabela 4: Estudos de associação entre o polimorfismo A1166C no gene do AT1R com a Hipertensão Arterial Sistêmica.....	30
Tabela 5: Estudos de associação entre o polimorfismo -344C/T no gene CYP11B2 com a Hipertensão Arterial.....	32
Tabela 6: Genes, polimorfismos, primers e enzimas dos respectivos polimorfismos que foram utilizados no estudo.....	36
Tabela 7: Característica Clínica e Demográficas dos pacientes e controles para a HAS.....	37
Tabela 8: Frequências dos polimorfismos nos genes do AGT, CYP11B2 e AT1R em Afro-descendentes hipertensos e normotensos.....	39
Tabela 9: Frequências dos polimorfismos nos genes ECA e RENINA em Afro-descendentes casos e controles para a HAS.....	40
Tabela 10: Regressão logística multivariada para o risco de hipertensão arterial sistêmica em Afro-descendentes do Estado da Bahia: Efeito do polimorfismo M235T no gene AGT.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 ASPECTOS GERAIS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	15
2.2 FATORES DE RISCO PARA A HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	16
2.3 FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (RAS).....	17
2.4 ETNIA E HIPERTENSÃO.....	19
2.5 ASPECTOS GENÉTICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	21
2.5.1 Enzima Conversora da Angiotensina I (ECA) e Polimorfismo de Inserção/Deleção.....	22
2.5.2 Angiotensinogênio (AGT) e o Polimorfismo M235T.....	24
2.5.3 A Renina e o Polimorfismo G2646A.....	26
2.5.4 Receptor Tipo 1 da Angiotensina II (ATR1) e o Polimorfismo A1166C.....	28
2.5.5 Aldosterona Sintetase (CYP11B2) e o Polimorfismo C-344T.....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 GERAIS.....	32
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Amostras.....	33
4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS:.....	34
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS.....	34
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE CASOS E CONTROLES PARA A HAS.....	37
5.2 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DO AGT, CYP11B2 E AT1R EM AFRO-DESCENDENTES HIPERTENSOS E NORMOTENSOS.....	38
5.3 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS NOS GENES ECA E REN EM AFRO- DESCENDENTES CASOS E CONTROLES PARA A HIPERTENSÃO.....	40
5.4 REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA.....	41
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXO I.....	58

ANEXO II.....	60
ANEXO IV.....	64
ANEXO V.....	65
ANEXO VI.....	67
ANEXO VII.....	69

1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença comum e possui alta incidência na população mundial. No Brasil, estima-se que 15% a 20% da população adulta urbana sejam acometidos por HAS (III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial, 1998). A HAS é uma doença relevante para a saúde pública brasileira, possuindo custo médico elevado, uma vez que representa um fator de risco com expressiva força de determinação para doenças cardiovasculares (DÓREA & LOTUFO, 2006). Vários fatores de risco já foram identificados para o desenvolvimento da HAS, entre eles está a etnia (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006). Estudos demonstram que a hipertensão é mais comum entre os Afro-descendentes comparados aos Euro-descendentes (SAUNDERS, 1995; GOLDENBERG *et al.*, 2006).

O Sistema Renina-Angiotensina (RAS) influencia a homeostase do sal e da água e o tônus vascular (RIGATTO *et al.*, 2004) e é constituído por quatro proteínas principais: Renina (REN), Angiotensinogênio (AGT), Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) e o Receptor para a Angiotensina II (AT1R). A angiotensina II estimula a produção de aldosterona que tem efeito direto na excreção renal, levando a retenção de sódio e água no sangue (GUYTON, 1988) e é sintetizada pela enzima Aldosterona Sintetase (CYP11B2) (LIFTON *et al.*, 2001). A contribuição desses efeitos tem sido estudada, com relação ao desenvolvimento e progressão da HAS (UNGER, 2002).

O objetivo deste estudo foi investigar o papel dos polimorfismos nos genes do sistema RAS e suas associações com a hipertensão arterial mediante de um estudo caso-controle em uma amostra da população Afro-descendente do estado da Bahia.

O estudo de polimorfismos em genes relacionados ao sistema RAS vem merecendo uma avaliação mais criteriosa, já que os resultados de diversas pesquisas têm sido díspares (HIGAKI *et al.*, 2000; MONDORF *et al.*, 1998; AHMAD *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 1997) em apontar associação clara entre a HAS, e a presença desses polimorfismos genéticos. Como a HAS é mais comum entre os Afro-descendentes é imprescindível a melhor caracterização da hipertensão neste grupo étnico. A melhor caracterização das bases genéticas da hipertensão poderá

reduzir os impactos desta doença na saúde pública, além de abrir caminhos para novos e específicos medicamentos no tratamento desta doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial é uma doença comum no Brasil e com forte impacto na saúde pública, decorrente do seu custo médico social, isto, devido ao seu papel no risco de outras doenças como, doença cérebro-vascular, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença arterial coronariana (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

Como outras características humanas multifatoriais, a hipertensão é causada pela ação de múltiplos fatores ambientais e pela interação de vários genes, estima-se que de 30 a 40% da variação da pressão arterial em uma população seja devido a fatores genéticos (WARD, 1995). Esta doença na maioria das vezes é assintomática e os sintomas aparecem tardiamente devido ao comprometimento dos órgãos alvos, apresentando assim custos médicos e socioeconômicos elevados (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

Há dois tipos de hipertensão: a primária, a mais freqüente, na maioria das vezes não tem causa geralmente estabelecida, mas vem sendo atribuída em parte, a alterações intrínsecas no manuseio renal de sódio, e a hipertensão secundária, quando a causa é conhecida, podendo ser desencadeada através, por exemplo, por problemas na artéria aorta, tumores, algumas doenças endocrinológicas e, mais comumente, por doenças renais (PASCOAL & MION JUNIOR, 1998).

A hipertensão arterial em adultos é definida como Pressão Arterial Sistólica \geq 140mmHg e/ou Pressão Arterial Diastólica \geq 90 mmHg (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2004 e o VII Joint National Committee- CHOBANIAN et al., 2003). Esses valores foram definidos após estudos epidemiológicos, onde se observou que o nível de pressão arterial acima desses valores tem relação direta e progressiva com a maior incidência de eventos cardiovasculares (AMODEO, 1995).

Entre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão arterial explica 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana. Estudos mostram que a mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

No Brasil, em 2003, 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares, sendo que a principal causa de morte em todas as regiões do país é o acidente vascular cerebral, acometendo as mulheres em maior proporção (LOTUFO, 2005).

2.2 FATORES DE RISCO PARA A HIPERTENSÃO ARTERIAL

Dentre os fatores de risco para a hipertensão arterial estão:

Idade: A pressão arterial aumenta linearmente com a idade (VASAN *et al.*, 2001). Estudos realizados no Brasil em indivíduos idosos da cidade de Bambuí, MG, 61,5% apresentavam hipertensão arterial (FIRMO *et al.*, 2003). Além disso, o risco de desenvolver doença cardiovascular associado ao aumento da pressão arterial aumenta marcadamente com o avançar da idade (LEWINGTON *et al.*, 2002).

Sexo e etnia: A prevalência global de hipertensão entre homens (26,6%; IC 95% 26,0-27,2%) e mulheres (26,1%; IC 95% 25,5-26,6%) indica que sexo não é um fator de risco para hipertensão (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006). Porém, estudos realizados no Brasil, em uma amostra da população da cidade de São Paulo, SP, indicam que a prevalência de hipertensão é maior no sexo masculino (32,0%) do que no feminino (25,3%) com tendência crescente com o avançar da idade, até os 49 anos (homens) e até os 59 (mulheres) (LOLIO *et al.*, 1993). Com relação à etnia a hipertensão é mais prevalente em mulheres Afro-descendentes com excesso de risco de hipertensão de até 130% em relação às mulheres brancas (LESSA, 2001).

Fatores socioeconômicos; menor acesso aos cuidados de saúde e nível educacional: estudos mostram que, nível socioeconômico mais baixo está associado a maior prevalência de hipertensão arterial e de fatores de risco para elevação da

pressão arterial, além de maior risco de lesão em órgãos-alvo e eventos cardiovasculares (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006) (DRUMOND *et al.*, 1999).

Hábitos dietéticos incluindo o excesso do consumo de sódio: O excesso do consumo de sódio contribui para a ocorrência de hipertensão arterial (JAMA, 1992). Estudos observaram que, povos que consomem dieta com reduzido conteúdo sal têm menor prevalência de hipertensão e a pressão arterial não se eleva com a idade. Entre os índios Yanomami, que têm baixa ingestão de sal, não foram observados casos de hipertensão arterial (MANCILHA-CARVALHO & SOUZA, 2003).

Índice de massa corpórea aumentado, sedentarismo e ingestão de álcool: O aumento da massa corporal (obesidade) é um fator predisponente para a hipertensão e estudos observacionais mostraram que o ganho de peso e o aumento da circunferência da cintura são índices prognósticos importantes de hipertensão arterial, sendo a obesidade central um importante indicador de risco cardiovascular aumentado. Indivíduos sedentários também apresentam risco aumentado de cerca de 30% de desenvolver hipertensão quando comparados aos que praticam alguma atividade física. Com relação ao álcool, estudos indicam que o consumo excessivo de bebida alcoólica aumenta o risco de hipertensão (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (RAS)

O sistema renina-angiotensina-aldosterona tem sido identificado como uma via crítica para o controle da pressão sangüínea e funções renais (DANILCZYK & PENNINGER, 2006). Este sistema possui um papel importante na regulação da pressão sangüínea, influenciando a homeostase sal/água (PAILLARD *et al.*, 1999) e conseqüentemente possuindo relação íntima com o processo da hipertensão. Uma

vez que a hipertensão surge como fator de risco para as doenças cardiovasculares, o RAS também está relacionado com estas doenças.

Quando a pressão arterial cai abaixo do normal, os rins secretam a substância renina que cai na circulação sanguínea. A renina é uma enzima que atua convertendo o angiotensinogênio, que é uma proteína plasmática produzida pelo fígado, em angiotensina I, esta angiotensina I tem efeito relativamente pouco intenso sobre a circulação. À medida que o sangue flui pelos pulmões este hormônio é rapidamente convertido em angiotensina II por meio da ação da enzima conversora da angiotensina (ECA). A angiotensina II tem ação vasoconstritora nas arteríolas através de sua ligação aos receptores de membrana, levando assim a elevação da pressão arterial (GUYTON, 1988) (Figura 1). A ação da angiotensina II é mediada por sua ligação a receptores específicos no endotélio arteriolar. Duas isoformas de receptores endoteliais para a angiotensina II são conhecidas até o momento: o receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R) e receptor tipo 2 da angiotensina II (AT2R). A maioria dos efeitos fisiológicos da angiotensina II é mediada pelo AT1R, que pertence a uma família de receptores acoplados a proteína G (LIFTON et al., 2001).

Quando a pressão arterial cai a níveis muito baixos, os córtices da supra-renal secretam aldosterona. Um dos fatores que levam a esse efeito é a estimulação destas glândulas pela angiotensina II. A aldosterona é sintetizada pela enzima aldosterona sintetase (CYP11B2) e tem efeito direto na excreção renal, o que leva a retenção de sódio e de água no sangue, aumentando o volume sanguíneo e a pressão arterial (LIFTON et al., 2001; UNGER, 2002). Portanto, qualquer disfunção neste sistema, ocasiona uma desregulação. Neste caso, o aumento na síntese dos componentes desta cascata, faz com que a pressão arterial aumente além do normal, causando o estado patológico de hipertensão.

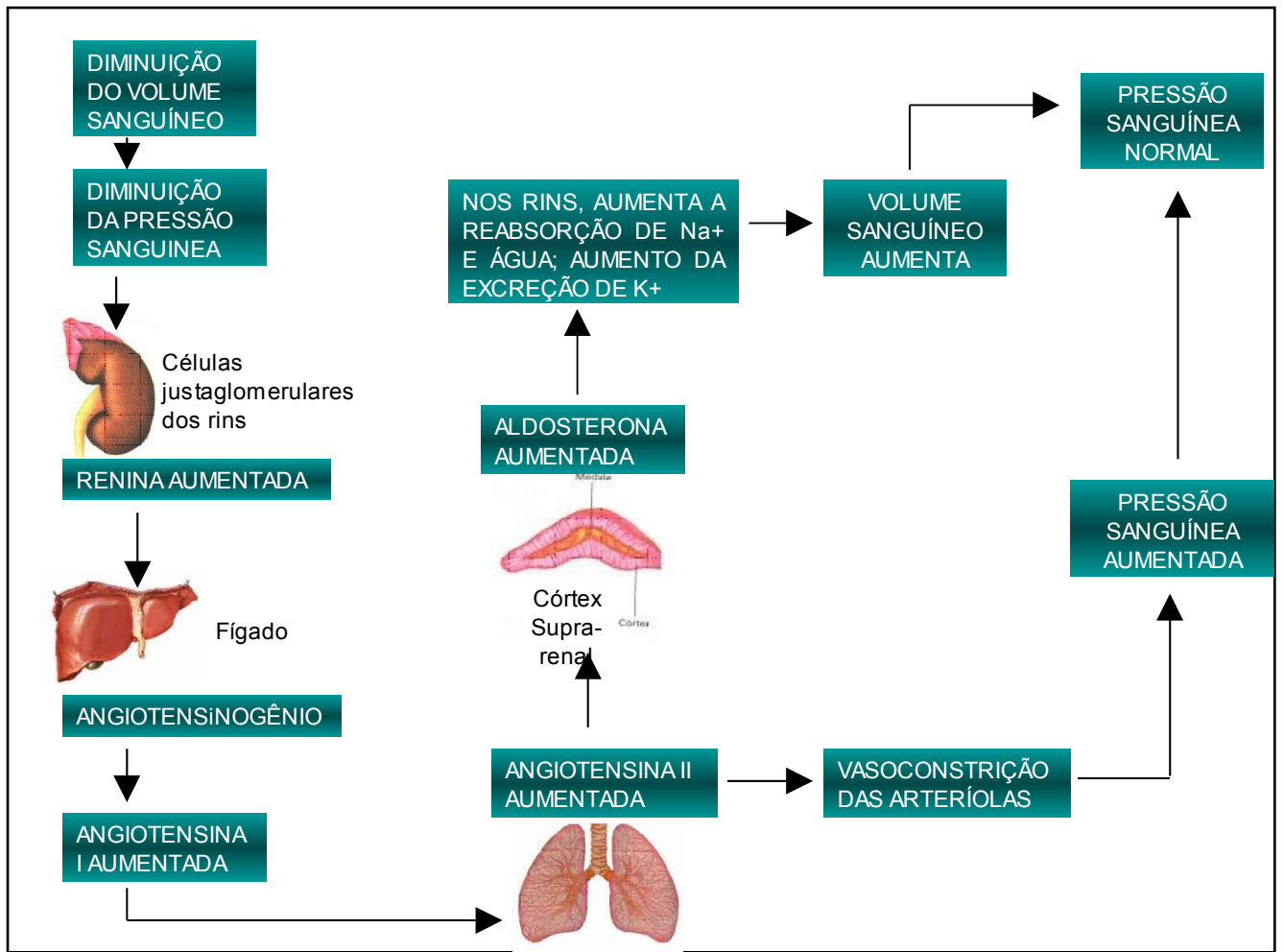


Figura 1: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Fonte: A autora.

2.4 ETNIA E HIPERTENSÃO

A grande prevalência da hipertensão em populações de ancestralidade africana e observações das altas taxas de complicações nos órgãos, em termos de derrame cerebral e doenças renais, têm gerado especulações em relação à possibilidade de haver diferenças nas bases genéticas para a hipertensão entre os diferentes grupos étnicos (CAULFIELD *et al.*, 1995).

De acordo com Saunders (1995), a hipertensão é aproximadamente 33% a 50% mais freqüente em Afro-descendentes que em Caucasóides. Assim, danos ao coração, rins, e à estrutura cerebral podem ocorrer 3 a 7 vezes mais freqüentemente em Afro-descendentes do que na população em geral, acarretando maior mortalidade em indivíduos deste grupo étnico.

A origem africana e as condições históricas da colonização das Américas têm servido de substrato para o surgimento de hipóteses genéticas que expliquem esta maior prevalência da hipertensão entre as populações Afro-descendentes. Estudos mostram que a prevalência da hipertensão parece ser maior em Afro-descendentes do que em Caucasóides (GILLUM, 1979). Entretanto, esta diferença parece ser restrita aos Afro-descendentes, pois em Africanos nativos este aumento na prevalência de hipertensão não foi observado por COOPER *et al.* (1997). De fato este autor demonstra que em Africanos nativos (Nigéria e Camarões) a prevalência de hipertensão foi de apenas 16%, enquanto que em Afro-descendentes Caribenhos (Jamaica, Santa Lúcia e Barbados – 26%) e Afro-Americanos (33%).

O papel preponderante que o metabolismo do sódio desempenha na regulação do volume sanguíneo e no equilíbrio tensional sugere que os negros seriam mais propensos a apresentarem uma mutação genética que afetaria a sua natriurese. Segundo a Hipótese dos Sobreviventes, os escravos antepassados dos atuais Afro-descendentes estiveram sujeitos à diarreia e desidratação além de privação de água e sal durante a viagem de travessia do Atlântico nos porões dos navios negreiros em direção as Américas (Figura 2). Aqueles que sobreviveram a travessia teriam sido selecionados por apresentarem uma resposta adaptativa para retenção de sódio e água em seus corpos permitindo a sua sobrevivência durante a travessia. A exposição abrupta, no novo continente, a uma dieta de baixa qualidade

e rica em sal teria um efeito negativo, tornando-os mais sensíveis ao sal e conseqüentemente mais susceptíveis à hipertensão (LAGUARDIA, 2005).

Assim sendo, o estudo de polimorfismos em genes relacionados ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) vem merecendo avaliação mais criteriosa quanto à associação da Hipertensão Arterial Sistêmica. Além disso, é de suma importância à verificação do papel destes polimorfismos nas populações Afro-descendentes para uma melhor caracterização da hipertensão neste grupo étnico, dada a maior prevalência da doença nestas populações.



Figura 2: Negros no fundo do porão do navio, 1835

Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/ea/v16n46/46a15f1.jpg>

2.5 ASPECTOS GENÉTICOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A característica mais importante do gene é a sua capacidade de ser reproduzido de modo idêntico de geração a geração. Entretanto, a evolução nunca teria sido possível se alterações no material genético não tivessem ocorrido. Tais alterações são chamadas de mutações (VOGEL & MOTULSKY, 2000).

Uma hipótese freqüentemente proposta é a de que mutações individuais ocorreram em algum lugar no mundo, em um indivíduo ou indivíduos em algum momento da história da humanidade. Estas mutações, juntamente com os *loci* vizinhos nos cromossomos afetados, foram então mantidas como um fragmento ancestral através de muitas gerações (KATO, 2002). As mutações que ocorrem numa freqüência $\geq 1\%$ na população são chamadas de polimorfismos (LEWIS, 2004).

A maioria das doenças humanas são poligênicas e multifatoriais, ou seja, são governadas por muitos genes e são causadas por um conjunto de fatores que agem conjunta e simultaneamente. Genes individuais têm papel sutil na expressão de qualquer patologia poligênica. Além disso, existem variáveis não genéticas, quer individuais (gênero, origem, etnia, entre outras) ou ambientais (tabagismo, consumo de álcool, entre outras), que são de grande importância nos estudos de associação entre fatores genéticos e o risco destas patologias (KATO, 2002).

Devido a grande relação já citada do SRAA com a hipertensão, polimorfismos em genes candidatos deste sistema têm sido extensivamente analisados como determinantes genéticos destas doenças.

2.5.1 Enzima Conversora da Angiotensina I (ECA) e Polimorfismo de Inserção/Deleção

A enzima conversora da angiotensina I (ECA) é uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais, principalmente dos pulmões, e que faz parte do SRAA. A ECA possui a função de clivar o decapeptídeo angiotensina I, excluindo dois aminoácidos da porção carboxi-terminal, e liberando o octapeptídeo

angiotensina II, um potente vasoconstritor e estimulador da aldosterona (HARRAP *et al.*, 1993). Na maioria das espécies de mamíferos a forma predominante parece ter um peso molecular de 140-160 kDa (HARRAP *et al.*, 1993; EHLERS & RIORDAN, 1989). A ECA está envolvida em muitas condições patológicas incluindo vasoconstrição, trombose coronariana e parada cardíaca (ACARTÜRK *et al.*, 2005).

O gene da ECA está localizado no cromossomo 17q23, possui 17kb, 26 éxons e 25 íntrons (CRISAN & CARR, 2000) (Figura 3). A clonagem e seqüenciamento do gene da ECA revelaram um polimorfismo de Inserção/Deleção de 287pb no íntron 16 (NAKAI *et al.*, 1994), que parece afetar as atividades séricas da enzima (SCHUNKERT *et al.*, 1994). Alguns estudos já publicados indicam uma associação deste polimorfismo com a hipertensão arterial, outros estudos também revelam uma associação deste polimorfismo com a DAC, por outro lado, há vários estudos que não demonstram associação alguma com estas doenças (Tabela 1).

Sendo o mais importante gene do SRAA associado com hipertensão arterial na maioria da população (PROCOPCIUC *et al.*, 2002), a indústria farmacêutica estudou extensiva e detalhadamente esta enzima e, drogas que inibem a ECA são usadas para abaixar a pressão sanguínea em pacientes com hipertensão arterial (HARRAP *et al.*, 1993).

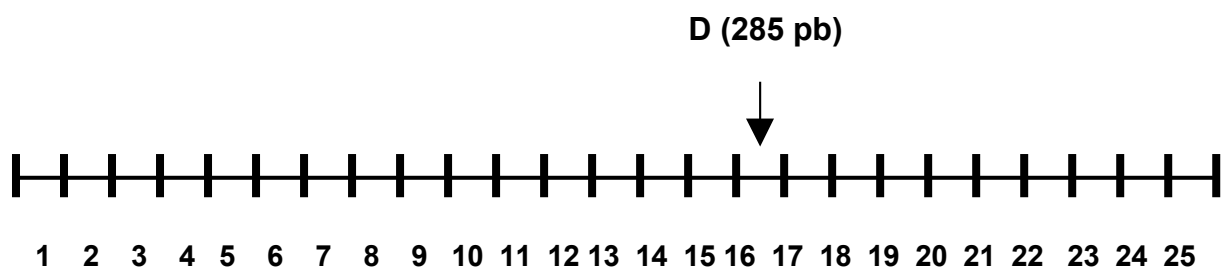


Figura 3: Representação esquemática da organização do gene da ECA. Os retângulos representam as regiões exônicas e as linhas (horizontais) representam as regiões intrônicas. No íntron 16 pode ocorrer a ausência de 287 pares de bases nucleicas, determinando o genótipo D. **Fonte:** Adaptado pela autora, de: Tavares A., 2000.

Tabela 1: Estudos de associação entre a variante I/D do gene da ECA e a Hipertensão Arterial Sistêmica.

GENE/ VARIANTE	POP.	N CASOS/CONT.	RESULTADOS	AUTOR/ANO
ECA I/D	Eslovênia	413/404	Não encontrou associação	Glavinik & Petrovic, 2007
ECA I/D	Japão	1200/3814	Frequência aumentada de homozigotos DD entre os hipertensos, apenas no sexo masculino	Higaki <i>et al.</i> , 2000
ECA I/D	Escócia	170	Não encontrou associação	Harrap <i>et al.</i> , 1993
ECA I/D	Framingham Heart Study	3045	Frequência aumentada de homozigotos DD entre os hipertensos, apenas no sexo masculino	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
ECA I/D	México	848	O alelo D foi associado à doença	Thameem <i>et al.</i> , 2008
ECA I/D	Alemanha	121/125	Não encontrou associação	Mondorf <i>et al.</i> , 1998
ECA I/D	Turquia	109/86	Frequência aumentada de homozigotos DD entre os hipertensos	Agachan <i>et al.</i> , 2003

2.5.2 Angiotensinogênio (AGT) e o Polimorfismo M235T

O angiotensinogênio é uma glicoproteína globular com massa molecular entre 55 e 65kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Em sua forma madura consiste de 452 resíduos de aminoácidos. O cérebro, grandes artérias, coração, rins, e tecidos adiposos são sítios de síntese do AGT, entretanto, ele é principalmente sintetizado pelo fígado sob o controle positivo de estrógenos, glucocorticóides, hormônios da tireóide e angiotensina II (PROCOPCIUC *et al.*, 2002). O AGT é um dos metabólitos do SRAA, sua função é servir de substrato para a enzima renina, uma aspartil protease produzida pelo rim, levando a produção de um decapeptídeo, conhecido como angiotensina I (CORVOL & JEUNEMAITRE, 1997).

O gene do angiotensinogênio humano foi localizado no cromossomo 1q42-3 e é composto por cinco éxons e quatro íntrons distribuídos em 13kb de seqüências genômicas (Figura 4). Um polimorfismo dentro do éxon 2 leva a troca de uma metionina por uma treonina na posição 235 (M235T), essa mutação foi significativamente associado com o risco de hipertensão (NIU *et al.*, 1998) (Tabela 2).

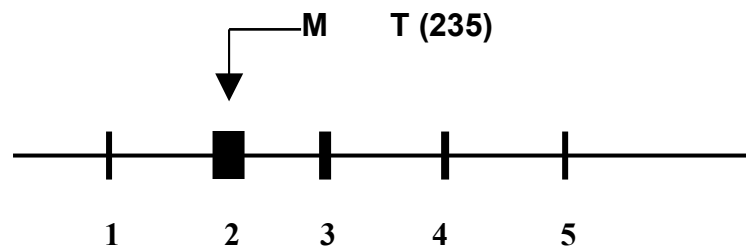


Figura 4: Representação esquemática da organização do gene do Angiotensinogênio. Os retângulos representam as regiões exônicas e as linhas (horizontais) representam as intrônicas. No éxon 2 pode ocorrer a troca um aminoácido Metionina (M) por uma Treonina (T) na posição 235. **Fonte:** Adaptado pela autora, de: Tavares A., 2000.

Tabela 2: Estudos de associação entre a variante M235T do gene do AGT e a Hipertensão Arterial Sistêmica.

GENE	POP.	N CASOS/CONT.	RESULTADOS	AUTOR/ANO
AGT M235T	Alemanha	638/720	Freqüência aumentada do alelo T apenas nos hipertensos	Mondry <i>et al.</i> , 2005
AGT M235T	Alemanha	121/125	Não encontrou associação	Mondorf <i>et al.</i> , 1998
AGT M235T	Malásia	101/87	Freqüência aumentada do alelo T e de homocigotos para o respectivo alelo no grupo dos hipertensos	Say <i>et al.</i> , 2005
AGT M235T	Eslovênia	413/404	Não encontrou associação	Glavnik & Petrovic, 2007
AGT M235T	Turquia	109/86	Freqüência aumentada do alelo T e de homocigotos para o respectivo alelo no grupo dos hipertensos	Agachan <i>et al.</i> , 2003
AGT M235T	México	848	O alelo 235T foi associado a doença	Thameem <i>et al.</i> , 2008
AGT M235T	Romênia	38/21	Freqüência aumentada do alelo T e de homocigotos para o respectivo alelo no grupo dos hipertensos	Procopciuc <i>et al.</i> , 2002
AGT M235T	Chile	64/62	Aumento da freqüência de homocigotos TT no grupo dos hipertensos	Fardella <i>et al.</i> , 1998

2.5.3 A Renina e o Polimorfismo G2646A

O gene da renina está localizado no cromossomo 1q32 e é composto por seis éxons e quatro íntrons (SUNDER-PLASSMANN *et al*, 2002). O polimorfismo G2646A no gene da renina está situado no íntron nove do gene e leva a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 2646 (FROSSARD *et al*, 1998) (Figura 5). O termo Mbo I se refere a enzima de restrição obtida da bactéria *Micobacterium bovis* (Mbo) e que é usada na técnica para detecção da troca de nucleotídeos (descrita em detalhes mais a frente). Segundo Frossard (1999) a presença do alelo A (MboI +) está associada com o aumento no risco da HAS numa população de Árabes.

Alguns estudos indicam associação entre o polimorfismo G2646A no gene da Renina com a HAS, por outro lado, há também estudos que não demonstraram associação com esta doença (Tabela 3).



Figura 5: Representação esquemática da organização do gene da Renina e o polimorfismo G2646A. Os retângulos representam as regiões exônicas e as linhas (horizontais) as intrônicas. Fonte: Adaptado pela autora, de: Frossard *et al.*, 1998.

Tabela 3. Estudos de associação entre o polimorfismo G2646A no gene da Renina com a Hipertensão Arterial Sistêmica.

GENE	POP.	N CASOS/CONT.	RESULTADOS	AUTOR/ANO
REN MBOI	Japonesa	45	Frequência aumentada do alelo A no grupo dos hipertensos	Okura <i>et al.</i> , 1993.
REN MBOI	Caucasóides Americanos EUA	122/227	Frequência aumentada do alelo A no grupo dos hipertensos	Frossard <i>et al.</i> , 1999.
REN MBOI	Japoneses	235/510	Não houve associação	Fu <i>et al.</i> , 2001.
REN MBOI	Estados Unidos	140/141	Associação do genótipo 2646AA	Frossard <i>et al.</i> , 2001
REN MBOI	Emirados Árabes	331/279	Associação do genótipo 2646 AA	Frossard <i>et al.</i> , 1998
REN MBOI	Paris	102/120	Não encontrou associação	Soubrier <i>et al.</i> , 1990
REN MBOI	Austrália	231	Não houve associação	Morris & Griffiths, 1988
REN MBOI	Austríaco	182/148	Não houve associação	Sunder-Plassmann <i>et al.</i> , 2002.
REN MBOI	Emirados Árabes	326/363	Frequência aumentada do alelo A no grupo dos hipertensos	Ahmad <i>et al.</i> , 2005

2.5.4 Receptor Tipo 1 da Angiotensina II (ATR1) e o Polimorfismo A1166C

A angiotensina II age nos receptores AT1 e AT2. A estimulação dos receptores AT1 está associada à disfunção endotelial, principalmente, como consequência do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição e ativação plaquetária. Já a estimulação dos receptores AT2 pode atenuar os efeitos proliferativos da estimulação dos receptores AT1. Os efeitos do bloqueio dos receptores AT1 da angiotensina II têm sido alvo de grande investigação (FONSECA & IZAR, 2004).

O gene que codifica o receptor tipo 1 da angiotensina II está situado no cromossomo 3, é composto por 5 éxons distribuídos em 45 kb (SCHMIDT *et al.*, 1997; ERDMANN *et al.*, 1999) e correlaciona-se a hipertensão arterial (PIROLA, 2000), provavelmente por uma interação epistática com o polimorfismo I/D do gene da ECA e, possivelmente, associe-se também à doenças coronarianas (TIRET *et al.*, 1994).

Com a clonagem do cDNA do receptor de AT1R foi identificado um polimorfismo na região 3' não traduzida (A1166C) e correspondente a uma transversoão A→C (substituição da Adenina por Citosina) na posição do nucleotídeo 1166 da seqüência do mRNA, resultando em dois genótipos homozigotos (CC e AA) e o heterozigoto AC (BONNARDEAUX *et al.*, 1994).

Variados estudos indicam associação entre o polimorfismo A1166C do gene do AT1R com a HAS (com o aumento da freqüência do alelo 1166C nos hipertensos), no entanto, há também estudos que não demonstraram nenhuma associação (Tabela 4).

Tabela 4. Estudos de associação entre o polimorfismo A1166C no gene do AT1R com a Hipertensão Arterial Sistêmica.

GENE/ POLIM.	POP.	N CASOS/CONT.	RESULTADOS	AUTOR/ANO
AT1R A1166C	Turquia	109/186	Frequência aumentada do alelo C (AC+CC) no grupo dos hipertensos	Agachan <i>et al.</i> , 2003.
AT1R A1166C	Sérvia	100/198	O alelo C e o genótipo CC foi significativamente mais freqüente no grupo dos hipertensos masculinos.	Stankovic' <i>et al.</i> , 2003.
AT1R A1166C	Malásia	402	Não houve associação	Rehman A, 2007.
AT1R A1166C	Germania	414/172	Não houve associação	Schmidt <i>et al.</i> , 1997.
AT1R A1166C	Japão	1087	Não houve associação	Sugimoto <i>et al.</i> , 2004.
AT1R A1166C	China	125/103	O genótipo heterozigoto AC foi associado com a Hipertensão	Jiang <i>et al.</i> , 2001
AT1R A1166C	Tibetanos e Chineses	446/302	Os níveis de pressão sanguínea foi maior entre os Tibetanos portadores do genótipo AA	Liu <i>et al.</i> , 2002
AT1R A1166C	Polônia	250/150	O alelo C foi associado a Hipertensão. O alelo A em associação com o DD da ECA parece ser um fator de proteção	Dzida <i>et al.</i> , 2001
AT1R A1166C	México	848	O alelo C foi associado a hipertensão.	Thameem <i>et al.</i> , 2008

2.5.5 Aldosterona Sintetase (CYP11B2) e o Polimorfismo C-344T

O gene CYP11B2 situa-se no cromossomo 8q24 e possui um tamanho de 7.3 kb. Alguns polimorfismos têm sido recentemente identificados neste gene, entre eles o polimorfismo bialelico de nucleotídeo único, -344C→T, ou seja, a transição de uma Citosina por uma Timina, situado na região promotora deste gene (WHITE & SLUTSKER, 1995) (Figura 6). Estudos de prevalência de hipertensão arterial realizados com a população italiana sugerem associação entre o polimorfismo -344 C/T do CYP11B2 com a hipertensão arterial idiopática; na população hipertensa estudada foi encontrada uma frequência elevada do alelo -344T e do genótipo homozigoto para este alelo nos pacientes quando comparados aos controles normais (ROSSI *et al.*, 2001), o mesmo foi observado em um estudo de Cohort multiétnico com afro-americanos e latinos (HENDERSON *et al.*, 2004). Variados estudos indicam associação entre o polimorfismo C -344T do gene CYP11B2 com a HAS, no entanto, há também estudos que não demonstraram nenhuma associação (Tabela 5).

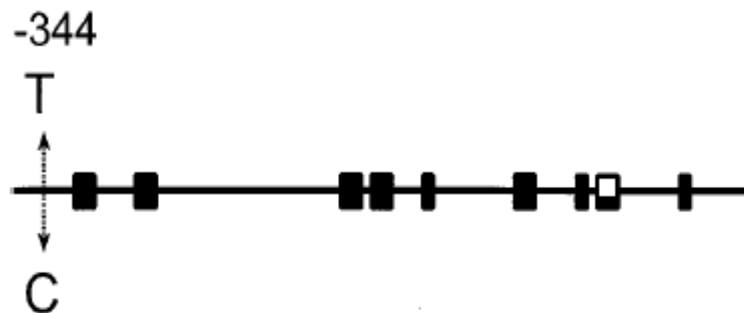


Figura 6: Representação esquemática do gene da Aldosterona Sintetase e o polimorfismo C -344T. Os retângulos representam às regiões exônicas e as linhas (horizontais) as intrônicas. **Fonte:** Adaptado pela autora, de: Kupari *et al.*, 1998.

Tabela 5: Estudos de associação entre o polimorfismo -344C/T no gene CYP11B2 com a Hipertensão Arterial.

GENE/ POLIM.	POP.	N CASOS/CONT.	RESULTADOS	AUTOR/ANO
CYP11B2 -344C/T	Afro-americanos e Latinos de Los Angeles	82.180	O polimorfismo pode aumentar o risco para a hipertensão entre os Afro- americanos	Henderson <i>et al.</i> , 2004.
CYP11B2 -344C/T	Japão	250/221	Freqüência do alelo C maior mos hipertensos	Tsukada <i>et al.</i> , 2002
CYP11B2 -344C/T	Multi-étnica (Africanos.,Branços e Sul Asiáticos)	1.313	A freqüência do alelo C foi menor nos Africanos comparados aos outros grupos. O genótipo TT foi associado a hipertensão	Barbato <i>et al.</i> , 2004
CYP11B2 -344C/T	Polônia	68	Não encontrou associação	Wrona <i>et al.</i> , 2004
CYP11B2 -344C/T	Cohort (estudo multi- étnico em UK)	542/500	Não encontrou associação	Patel <i>et al.</i> , 2000
CYP11B2 -344C/T	Japão	802	Não encontrou associação	Matsubara <i>et al.</i> , 2001
CYP11B2 -344C/T	Japão	14.200	Genótipo TT associado à hipertensão	Iwai <i>et al.</i> , 2007
CYP11B2 -344C/T	Estados Unidos	354	O alelo C associado à hipertensão	Dennis <i>et al.</i> , 2006

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- Investigar o papel de polimorfismos nos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e suas associações com a hipertensão arterial sistêmica através de estudo caso-controle em amostra da população Afro-descendente da região urbana de Jequié-BA.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a associação com a hipertensão arterial sistêmica em Afro-descendentes da população urbana de Jequié-BA, dos seguintes polimorfismos:
 - ✓ M235T no gene da Angiotensina (AGT),
 - ✓ Inserção/Deleção (286 pb) no gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA),
 - ✓ C-344T no gene Sintetase de Aldosterona (CYP11B2),
 - ✓ A1166C no gene do Receptor Tipo 1 da Angiotensina II (AT1R),
 - ✓ G2646A no gene da Renina (REN).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

A cada paciente incluído neste projeto foram feitos esclarecimentos sobre os objetivos deste estudo e suas implicações para o sujeito da pesquisa e para a comunidade. Também foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). O referido projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética da UESB.

A amostra de casos de hipertensão é constituída por cerca de 284 indivíduos afro-descendentes, avaliados segundo critérios morfológicos faciais e de cor de pele (Azevêdo, 1980), cujos níveis de Pressão Arterial Sistólica foram ≥ 140 mmHg e/ou Diastólica ≥ 90 mmHg em três medidas independentes (JNC-VI, 1997) e/ou que estiverem em uso de medicações anti-hipertensivas. Estes indivíduos foram contatados entre os pacientes cadastrados nos postos de saúde do município de Jequié. Outros 221 indivíduos afro-descendentes provenientes da mesma população, cujos níveis tensionais foram normais ($>140 \times 90$ mmHg) em três medidas independentes e que não faziam tratamento com medicações anti-hipertensivas, foram sendo incluídos na amostra de controles. Esta amostra foi pareada com os casos quanto à idade e sexo.

Indivíduos com história de hipertensão arterial secundária, gestante e usuárias de estrógenos foram excluídos do estudo. Foi feita avaliação médica dos indivíduos incluídos neste estudo. Dados sobre a história clínica, medidas tensionais (três medidas independentes), medidas antropométricas (peso, altura, pregas cutâneas e circunferência da cintura e quadril), fatores de risco cardiovasculares, e exames laboratoriais complementares foram anotados em questionário específico (Anexo II).

4.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS:

Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa usando tubos vacuntainer com e sem EDTA para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Uréia, creatinina, sódio e potássio plasmático, glicemia e colesterol total, colesterol HDL e triglicérides foram medidos através de métodos de rotina em analisador automatizado utilizando kits comerciais (parceria com o Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva – PIEJ).

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

O DNA foi extraído a partir do sangue total coletado com EDTA através de método de extração salina (LAHIRI & NURNBERGER, 1991). Os polimorfismos nos genes envolvidos no sistema RAS foram investigados após amplificação da seqüência de interesse mediante reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando primers (iniciadores) descritos na literatura (Tabela 6); maiores detalhes das técnicas e condições de amplificação estão nos anexos III, IV, V, VI, VII. Exceto para o polimorfismo de inserção/deleção no gene da ECA, o material amplificado por PCR foi digerido pelas respectivas enzimas de restrição descritas previamente e resumidas na tabela 6. Os genótipos foram determinados após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corados com brometo de etídio. A visualização das bandas formadas foi feita através de luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio.

Tabela 6: Genes, polimorfismos, primers e enzimas dos respectivos polimorfismos que foram utilizados no estudo.

Gene	Variantes	Primers	Enzima	Referência
RENINA	G2646A	5' - TGAGGTTTCGAGTCGGCCCCC - 3' 5' -TGCCCAAACATGGCCACACA - 3'	<i>Mbo I</i>	Fu <i>et al.</i> (2001)
AGT	M235T	5' -CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT - 3' 5' - CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC - 3'	<i>Tth 111I</i>	Mondry <i>et al.</i> (2005)
ECA	<i>Ins/Del 287pb</i>	5' - GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT - 3' 5' - CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT - 3'	-----	Mondry <i>et al.</i> (2005)
CYP11B2	C -344T	5' - CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC - 3' 5' - CCT CCA CCC TGT TCA GCC C - 3'	<i>Hae III</i>	Rossi <i>et al.</i> (2001)
AT1R	A1166C	5' - AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT - 3' 5' - GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG - 3'	<i>Dde I</i>	Tiret <i>et al.</i> (1994)

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi montado um banco de dados no pacote de programas para análise estatística SPSS. As frequências gênicas e genóticas foram comparadas entre os grupos utilizando teste do qui-quadrado. Uma análise de regressão logística multivariada foi utilizada para estimativas dos odds ratios associados aos genótipos e correção para os efeitos das variáveis ambientais avaliadas no presente estudo. As variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos e os genótipos usando ANOVA ou teste T.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE CASOS E CONTROLES PARA A HAS

As características clínicas e demográficas para casos e controles de HAS estão apresentadas na tabela 7. Os casos de HAS apresentaram médias de idade maiores que os controles. Não houve diferenças significantes na frequência do gênero masculino entre casos e controles. A prevalência de Diabetes Mellitus foi maior nos casos quando comparados aos controles. Foi encontrado um maior predomínio de fumantes nos casos de HAS. Entretanto, não foram observadas diferenças na prevalência de obesidade e atividade física entre casos e controles.

Tabela 7: Características Clínicas e Demográficas dos pacientes e controles para a HAS.

Variável	Afro-descendentes		
	Casos HAS	Controles HAS	<i>p</i>
Número	284	221	
Idade	61,2±13,90	43,38±14,78	<0,001
Sexo masculino	26,1%	29,9%	0,396
Diabetes Mellitus	9,5%	0,9%	<0,001
Tabagismo	22,5%	4,5%	<0,001
Obesidade	5,6%	2,3%	0,097
Atividade física	27,8%	26,2%	0,769

5.2 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DO AGT, CYP11B2 E AT1R EM AFRO-DESCENDENTES HIPERTENSOS E NORMOTENSOS

O número total da amostra estudada foi de 505 indivíduos, no entanto, devido a problemas técnicos nas genotipagens (tais como: erros técnicos no processo de eletroforese, problemas com os termocicladores, dificuldade na leitura de gel ocasionado provavelmente por má qualidade do DNA, e principalmente falta de material de consumo como enzimas de restrição, etc.) o número real de pacientes genotipados para cada gene foi: CYP11B2, 430 indivíduos; AGT, 459 indivíduos; AT1R, 458 indivíduos; ECA, 461 indivíduos e REN, 377 indivíduos. As frequências genotípicas observadas dos polimorfismos nos genes do AGT, CYP11B2 e AT1R estavam de acordo com as esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do alelo 235 T no gene do AGT foi maior nos pacientes hipertensos (60%) quando comparados aos normotensos (53%; $p=0,05$). Foi também observada frequência aumentada do alelo -344 T do gene CYP11B2 entre os hipertensos (63%), quando comparados aos indivíduos normotensos (54%; $p=0,006$). Não houve diferenças significantes nas frequências do polimorfismo A 1166 C no gene do AT1R entre os casos e controles para hipertensão (Tabela 8).

Tabela 8: Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos nos genes do AGT, CYP11B2 e AT1R em Afro-descendentes hipertensos e normotensos

Polimorfismo	Afro-descendentes		<i>p</i>
	Casos	Controles	
AGT			
M235T			
Genótipo			
MM	55 (20,4%)	48 (25,3%)	0,05
MT	106 (39,4%)	82 (43,2%)	
TT	108 (40,1%)	60 (31,6%)	
Alelo			
M	40%	47%	
T	60%	53%	
CYP11B2			
C-344T			
Genótipo			
CC	44 (17,6%)	44 (24,4%)	0,006
CT	98 (39,2%)	79 (43,9%)	
TT	108 (43,2%)	57 (31,7%)	
Alelo			
C	37%	46%	
T	63%	54%	
AT1R			
A1166C			
Genótipo			
AA	135 (51,9%)	100 (50,5%)	0,616
AC	117 (45,0%)	88 (44,4%)	
CC	8 (3,1%)	10 (5,1%)	
Alelo			
A	74%	73%	
C	26%	27%	

5.3 FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS NOS GENES ECA E REN EM AFRO-DESCENDENTES CASOS E CONTROLES PARA A HIPERTENSÃO

Não houve diferenças significantes nas frequências dos polimorfismos I/D no gene ECA e G2646A no gene REN entre casos e controles para a Hipertensão (Tabela 9). As frequências genótípicas observadas dos polimorfismos nos genes da ECA e REN também estavam de acordo com as esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9: Frequências dos polimorfismos nos genes ECA e RENINA em Afro-descendentes casos e controles para a HAS.

Polimorfismo	Afro-descendentes		P
	Casos	Controles	
ECA			
I/D			
Genótipo			
II	44 (17,3%)	30 (14,6%)	
ID	117 (45,9%)	106 (51,5%)	
DD	94 (36,9%)	70 (34,0%)	
Alelo			
I	40%	40%	
D	60%	60%	1,000
REN			
G2646A			
Genótipo			
GG	65 (26,1%)	33 (25,8%)	
GA	129 (51,8%)	66 (51,6%)	
AA	55 (22,1%)	29 (22,7%)	
Alelo			
G	52%	52%	
A	48%	48%	0,969

5.4 REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA

A análise de regressão logística multivariada demonstrou que os indivíduos homozigotos para o alelo 235T no gene AGT apresentavam um risco cerca de 1,8 vezes maior de terem hipertensão (*Odds ratio*= 1,848; $p=0,013$) quando comparados aos portadores do alelo 235M. Este efeito foi corrigido para o efeito da idade, diabetes mellitus, tabagismo e atividade física. Todos os demais polimorfismos estudados inclusive o polimorfismo C-344T no gene CYP11B2 não se mantiveram como preditores significantes do risco para hipertensão.

Tabela 10: Regressão logística multivariada para o risco de hipertensão arterial sistêmica amostra da população Afro-descendente do Estado da Bahia: Efeito do polimorfismo M235T no gene AGT.

Variável	Afro-descendentes		
	OR	IC 95%	P
<i>Idade (anos)</i>	1,085	1,066-1,104	<0,001
<i>Diabetes Mellitus</i>	8,251	1,707-39,888	0,009
<i>Tabagismo</i>	2,134	0,957-4,759	0,064
<i>Atividade física</i>	1,904	1,134-3,197	0,015
Genótipo 235TT AGT	1,848	1,138-3,000	0,013

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a associação entre polimorfismos M235T no gene do AGT, C -344T no gene CYP11B2, A1166C no gene AT1R, I/D no gene da ECA e G2646A no gene REN e suas associações com a Hipertensão Arterial Sistêmica em amostra de Afro-descendentes da população do Estado da Bahia.

Foi encontrada maior frequência do alelo 235T no gene do AGT entre os hipertensos (60%) quando comparados aos normotensos (53%). Este resultado foi similar a estudos anteriormente descritos na literatura (AGACHAN *et al.*, 2003) que demonstraram um aumento da frequência do alelo 235T no grupo dos hipertensos quando comparados aos normotensos e em estudos de meta-análise que também observaram uma maior frequência do alelo 235T e/ou do genótipo TT entre hipertensos (KUNZ *et al.*, 1997, T vs. M: OR=1,20; SETHI *et al.*, 2003, TT vs. MM: OR=1,19; STAESSEN *et al.*, 1999, TT vs. MM: OR=1,31).

As frequências do alelo -344T do gene CYP11B2 no presente estudo foram significativamente maiores no grupo dos hipertensos (63%) quando comparados aos normotensos (54%). Este achado é corroborado por estudo anterior (HENDERSON *et al.*, 2004) que observou uma frequência maior do alelo -344T nos Afro-americanos hipertensos quando comparados aos normotensos.

As frequências do alelo 1166C no gene do AT1R foram de 26% nos hipertensos e de 27% nos normotensos, não sendo estatisticamente significante esta diferença. Este resultado é similar a estudos já descritos na literatura que não observaram associação deste polimorfismo com a hipertensão arterial (REHMAN *et al.*, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2004).

A frequência aumentada do alelo 235T no gene do AGT em hipertensos (60%) quando comparada às observadas nos normotensos (53%) no presente trabalho é corroborada por estudo anterior realizado no Brasil (FREITAS *et al.*, 2007a) com amostra da população da região Amazônica onde foi observado uma frequência aumentada do alelo 235T entre os hipertensos (51,6%) comparada aos normotensos (25,2%) e um aumento significativo dos genótipos MT e TT entre hipertensos (OR:3,2; IC 95%: 1,71-6,01; $p < 0,05$). Resultado similar ao apresentado

em nosso estudo também foi descrito por Goldenberg *et al.*, (2006) em um amostra com Afro-americanos, Latinos e Brancos dos E.U.A, que observou uma freqüência aumentada do alelo 235T entre os Afro-americanos quando comparados aos Brancos e observou também que pacientes homozigotos para o alelo T (235TT) tinham um risco aumentado para o desenvolvimento de HAS e eventos coronarianos comparados com os homozigotos para o alelo M (235MM), estes autores observaram uma freqüência aumentada do genótipo 235TT entre Afro-americanos hipertensos (32%) (OR:3,28; IC 95%: 1,15-9,41) quando comparados aos normotensos (16%) (OR:0,82; IC 95%: 0,45-1,50). Resultados semelhantes foram descritos em brancos (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992) e Japoneses (HATA *et al.*, 1994; NISHIUMA *et al.*, 1995). Outro estudo, no entanto, não demonstrou nenhum tipo de associação do polimorfismo M235T no gene do AGT com as pressões sanguíneas sistólica e diastólica, e a severidade da hipertensão nos Afro-descendentes (TIAGO *et al.*, 2003). Há também estudos europeus que não demonstraram associação do polimorfismo M235T com a HAS (MONDORF *et al.*, 1998 e GLAVNIK & PETROVIC, 2007).

O aumento na freqüência do alelo -344T no gene CYP11B2 nos indivíduos hipertensos em nosso estudo, também foi observado em estudo anterior com a população Brasileira (FREITAS *et al.*, 2007b), que observou a freqüência aumentada do alelo -344T (61,5%) nos hipertensos quando comparados aos normotensos (38%). Resultados semelhantes foram descritos também em estudo Multi-étnico (Africanos, Brancos e Sul-Asiáticos) em que foi observada associação do genótipo -344TT com a HAS e se observou também que o alelo -344C foi menos freqüente entre os Africanos quando comparados aos outros grupos (BARBATO *et al.*, 2004). Resultado contraditório, porém, foi descrito por Dennis *et al.*, (2006) que relataram que o alelo -344C e não o T está envolvido com o risco da HAS em Afro-descendentes e em Japoneses (TSUKADA *et al.*, 2002). Outros estudos, no entanto, não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo C -344T no CYP11B2 com a hipertensão arterial em Euro-descendentes (WRONA *et al.*, 2004) e em também em Japoneses (MATSUBARA *et al.*, 2001).

No presente estudo não foi encontrado associação do polimorfismo A1166C no gene do AT1R com a HAS. Este resultado é corroborado por Sugimoto *et al.*

(2004) e Freitas *et al.*, (2007a) que demonstraram ausência de associação do polimorfismo com a hipertensão. No entanto o mesmo autor (FREITAS *et al.*, 2007b) em estudo posterior encontrou associação positiva do polimorfismo A1166C no gene AT1R com a HAS, com os genótipos 1166AC e 1166AA mais frequentes entre Brasileiros hipertensos. Resultado similar também foi descrito para a população Japonesa (KOBASHI, 2006) e Polonesa (DZIDA *et al.*, 2001). No nosso estudo não foi encontrada associação significativa da variante A1166C no gene AT1R com a HAS, diferentes padrões de ligação com outras variantes genéticas funcionais, diferenças na exposição a fatores ambientais, e diferenças nos tamanhos amostrais e critérios de amostragem podem explicar estes resultados contraditórios entre diferentes populações e estudos.

Não foi observada diferenças significantes na frequência do polimorfismo I/D no gene da ECA entre hipertensos e normotensos no presente estudo. Resultado similar foi descrito anteriormente para a população brasileira (FREITAS *et al.*, 2007b), e num estudo multiétnico, incluindo Afro-descendentes Cubanos (NÁPOLES, 2007). Resultados semelhantes foram relatados na Alemanha (MONDRY *et al.*, 2005) e na Europa (GLAVINIK *et al.*, 2007; HARRAP *et al.*, 1993 e MONDORF *et al.*, 1998). Por outro lado, há estudos em Japoneses (HIGAKI *et al.*, 2000) e em Turcos (AGACHAN *et al.*, 2003) que demonstraram associação do polimorfismo I/D no gene da ECA com a HAS. No presente estudo não foi detectada diferenças na frequência do polimorfismo G2646A no gene REN entre casos e controles Afro-descendentes para HAS. Fu *et al.* (2001), numa amostra de Japoneses, e Sunder-Plassmann *et al* (2002), numa amostra de Austríacos, também não detectaram associação entre esse polimorfismo e a HAS. Porém outros estudos em japoneses (OKURA *et al.*, 1993), caucasóides americanos (FROSSARD *et al.*, 1999) e Árabes (AHMAD *et al.*, 2005) demonstraram associação entre o polimorfismo Mbo I no gene da Renina com a HAS. Não há estudos em Afro-descendentes para comparação com os resultados obtidos em nosso estudo.

Na presente investigação somente os genes AGT e CYP11B2 se mostraram associados a HAS, porém, quando foi feita a análise de regressão logística multivariada, a associação encontrada para o gene CYP11B2 perdeu a significância após a correção para as co-variáveis incluídas no modelo de regressão. No entanto,

a associação do polimorfismo no gene AGT foi mantida nesta análise. Os indivíduos homozigotos para o alelo 235T no gene do AGT apresentaram risco cerca de 1,8 vezes maior de terem hipertensão (Odds ratio= 1,848) quando comparados aos portadores do alelo 235M, sendo este efeito corrigido para a idade, diabetes mellitus, tabagismo e atividade física.

Estudos demonstram (INOUE *et al.*, 1997) que o alelo 235T no gene do AGT está em desequilíbrio de ligação com uma variante na região promotora do gene, que consiste na substituição de uma Adenina por uma Guanina no nucleotídeo 6 (A-6G). Tem sido sugerido que essa mutação, A-6G, afeta a interação de fatores de transcrição com o promotor do AGT, influenciando assim a taxa basal de transcrição do gene (INOUE *et al.*, 1997). Um aumento da expressão do gene AGT pode elevar a produção de angiotensina II pelo RAS resultando na expansão do volume sanguíneo que, por sua vez, aumentaria a pressão arterial (INOUE *et al.*, 1997). O polimorfismo M235T pode ser considerado um marcador para a co-existência do polimorfismo A-6G (KOBASHI G., 2006).

O gene aldosterona sintetase (CYP11B2) possui uma região de ligação para o fator de transcrição SF-1 (proteína regulatória esteroideogênica transcricional) situado na região promotora do gene, o polimorfismo C-344T parece influenciar a afinidade deste fator de transcrição para a ligação na região promotora do gene (HENDERSON *et al.*, 2004). Estudos sugerem que este fator de transcrição se liga e permanece associado ao promotor com uma afinidade 4 vezes maior quando o alelo -344C está presente (WHITE *et al.*, 1998). A menor afinidade associada ao alelo T permitiria uma maior rotatividade de ligação dos fatores de transcrição ao sítio funcional do promotor aumentando a taxa de transcrição do gene e a produção da enzima (WHITE & SLUTSKER, 1995). Assim, uma maior atividade da enzima aldosterona sintetase seria esperada, produzindo-se assim uma síntese maior de aldosterona, levando a hipertensão (HENDERSON *et al.*, 2004). De fato, múltiplos estudos têm examinando o polimorfismo C-344T e têm mostrado que o alelo T está associado com maiores níveis de aldosterona e hipertensão (BRAND *et al.*, 1998 e TAKAI *et al.*, 2002). No entanto, estudos *in vitro* com genes repórteres não mostraram nenhum efeito detectável do polimorfismo sobre a transcrição do gene (BASSETT *et al.*, 2002).

O polimorfismo A1166C ocorre na região 3' não traduzida do gene AT1R e não caracteriza qualquer diversidade funcional no gene (SUGIMOTO *et al.*, 2004). Plumb *et al.*, (1989) relataram que o polimorfismo A1166C possui ligação significativa com o polimorfismo T-810A e estaria em desequilíbrio de ligação com este último, situado na região promotora do gene, sugerindo assim que o polimorfismo A1166C estaria associado com a expressão do gene AT1R. Assim o polimorfismo A1166C vem sendo considerado um marcador genético em desequilíbrio de ligação com outras variantes genéticas funcionalmente relevantes que afetam a estrutura ou função do AT1R, porém, não se pode concluir que o polimorfismo A1166C possui um papel principal na predisposição genética para a HAS (SUGIMOTO *et al.*, 2004).

A enzima conversora de angiotensina, codificada pelo gene ECA, situado no cromossomo 17q23. Além de aumentar a produção da Angiotensina II, a ECA é também responsável pela degradação da bradicinina, uma substância vasodilatadora e natriurética (SANTOS *et al.*, 2006). O polimorfismo I/D da ECA está associado a 47% da variabilidade fenotípica das concentrações da ECA sérica, sendo as concentrações mais elevadas associadas à presença do alelo D (RIGAT *et al.*, 1990). O polimorfismo I/D está localizado dentro de um segmento não codificante (intron) do gene, portanto, para explicar a funcionalidade deste polimorfismo e sua repercussão na expressão do produto final (enzima), algumas hipóteses têm sido levantadas: (I) Considerando que ela seja uma mutação silenciosa (intrônica), sua repercussão fenotípica ocorreria por supostamente estar a inserção (alelo I) ligada a uma outra mutação, esta sim afetando a expressão final do gene, ou seja, o polimorfismo I/D estaria em desequilíbrio de ligação com uma outra mutação que seria a verdadeira responsável pela alteração da atividade da ECA (SAMANI *et al.*, 1996); (II) A inserção (alelo I) pode ter alterado o mecanismo de *splicing*, afetando, pelo menos em parte, a maquinaria de transcrição da ECA, ou ainda apresentar um papel regulador na expressão do gene ECA (MATTICK, 2003; YELIN *et al.*, 2003).

A proteína Renina, na maioria das espécies, é codificada por um único gene, o gene REN; o RNA mensageiro é traduzido em uma proteína inativa denominada pré-prorenina, com 401 resíduos de aminoácidos, posteriormente clivados até formar a renina ativa (LIMA *et al.*, 2007). O gene da Renina foi o primeiro gene do RAS a ser estudado e associado a hipertensão, no entanto, uma cuidadosa análise do

polimorfismo G2646A em uma grande população de irmãos, com alta prevalência de hipertensão arterial primária, foi incapaz de demonstrar alguma associação desta variante com a hipertensão (SOUBRIER *et al.*, 1990). Outros trabalhos, conduzidos em vários países, também encontraram ausência de associação deste polimorfismo com a hipertensão humana (NAFTILAN *et al.*, 1989). Os estudos que relataram associação sugerem que esta variante intrônica pode está ligada a uma outra variante em alguma região do gene com efeito direto sobre a funcionalidade da enzima e/ou expressão gênica (WEEKS & LATHROP, 1995; SCHORK, 1997). É possível que esta ligação entre o polimorfismo Mbo I e esta outra variante funcional esteja presente em algumas populações e/ou etnias e em outras não, justificando os resultados contraditórios citados anteriormente na literatura (SOUBRIER *et al.*, 1990; ATLAS *et al.*, 1986).

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se notar que muitos trabalhos apontam para o papel dos genes do Sistema Renina-Angiotensina na regulação genética da HAS, porém, ainda existem muitos questionamentos na compreensão desta rota como um todo.

A complexidade do estudo dos determinantes moleculares da HAS não se deve apenas à interação gene-ambiente, mas à própria interferência conjunta de múltiplos alelos que individualmente podem ter pouca influência no fenótipo final, mas em associação podem ter efeito aditivo significativo.

A maioria dos estudos em HAS têm sido enfocados em populações homogeneamente brancas, com pouca ou nenhuma informação disponível em populações Afro-americanas e Latinas.

Portanto, baseado na alta prevalência de HAS na população mundial, na complexidade etiológica desta doença, sabendo-se que vários genes e múltiplos fatores ambientais estão contribuindo para a sua patogênese, e considerando o alto número de estudos controversos relacionados a associações entre polimorfismos nos genes do sistema RAS e a Hipertensão Arterial é imprescindível maiores investigações nos genes relacionados a esta rota.

Além disso, é necessário também um maior número de investigações no grupo étnico dos Afro-descendentes, uma vez que a HAS possui uma maior prevalência neste grupo étnico. A nossa contribuição para este estudo foi demonstrar que Afro-descendentes homozigotos para o alelo *235T* no gene *AGT* apresentam um aumento no risco de hipertensão. Os polimorfismos *C-344T* no *CYP11B2*, *A1166C* no *AT1R*, *I/D* na *ECA* e o *G2646A* no gene *REN* por sua vez não foram associados à HAS entre os Afro-descendentes em nosso estudo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACARTÜRK, E.; *et al.* Insertion/Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in coronary artery disease in southern turkey. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.4, p.486-489, 2005.
- AGACHAN B., *et al.* Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. **Experimental and Molecular Medicine**. Dec, Vol. 35, No. 6, 545-549 2003.
- AHMAD, U., *at al.* Strong association of a renin intronic dimorphism with essential hypertension In. **Hypertens Res.** p. 339-44 Apr, 2005.
- AMODEO C. Hipertensão Arterial. **Revista . Bras. Med.** 52:193-200. 1995
- ARAUJO M.A., *et al.* The A1166C polymorphism of the angiotensin II type-1 receptor in acute myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol.**; 83(5):409-13, 2004.
- ATLAS S.A., *et al.* The renin gene is an informative marker for chromosome 1. **Am J Hum Genet.** 39 (Suppl): 430, A146, 1986.
- AZEVEDO E. S. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. **Annals of Human Genetics**, v.44, p.55-60, 1980.
- BARBATO A., *et al.* Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C_344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. **J Hypertens.** 22:1895-901, 2004.
- BASSET E.A., *et al.*, Berthoux P, Cecillon S, Deprle C, Thibaudin D, De Filippis JP, *et al.* Hypertension after renal transplantation and polymorphism of genes involved in essential hypertension: ACE, AGT, AT1 R and ecNOS. **Clin Nephrol.**; 57 (3): 192-200, 2002.
- BONNADEAUX A., *et al.* Angiotensin II type-1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. **Hypertension.** 24:63-9, 1994.
- BRAND *et al.* Structural analyses and evaluation of the aldosterona synthase gene in hypertension. **Hypertension.** 32:198-204, 1998.
- CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, CUSHMAN WC, GREEN LA, IZZO JL JR, JONES DW, MATERSON BJ, OPARIL S, WRIGHT JT JR, ROCCELLA EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **JAMA.**;289(19):2560-72, 2003.

- CAULFIELD, M.; *et al.* Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in african caribbeans. **Hypertension**, v.96, p.687-692, 1995.
- COOPER R., *et al.* The prevalence of hypertension in seven populations of west African origin. **Am J Public Health**.; 87(2):160-8. 1997.
- CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. **Endocrine Reviews**, v.18, n.5, p.662-677, 1997.
- CRISAN, D.; CARR, J. Angiotensin I-Converting Enzyme. **Journal of Molecular Diagnostic**, v.2, n.3, p.105-115, 2000.
- DANILCZYK, U; PENNINGER, JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. **Circulation Reserch**, v. 98, n.4, p.463-471, 2006.
- DENNIS M.; McNAMARA M.D., *et al.* Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism Predicts Outcome in African Americans With Heart Failure. **J Am Coll Cardiol**.;48:1277– 82. 2006.
- DÓREA E.L.; LOTUFO P.A. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil. In: Brandão AA, Amodeo C, Nobre F, Fuchs FD. **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier;. p. 3-13. 2006.
- DRUMMOND M.; BARROS M.B.A. Social Inequalities in Adult Mortality in Sao Paulo city. **Rev Bras Epidemiol**; 2(1/2):34-49. 1999.
- DZIDA G. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor type 1 genes in essential hypertension in a Polish population. **Med Sci Monit**. Nov-Dec;7(6):1236-41. 2001.
- EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-Converting Enzyme: New concepts concerning its biological role. **Biochemistry**, v.28, n.13, p.5311-5318, 1989.
- ERDMANN J, *et al.* Characterization of polymorphisms in the promoter of the human angiotensin II subtype 1 (AT1) receptor gene. **Ann Hum Genet**.; 63 (pt 4): 369-74. 1999.
- FARDELLA C. E.; *et al.* T235 variant of the angiotensinogen gene and blood pressure in the Chilean population. **Journal of Hypertension**, v.16, n.6, p.829-833, 1998..
- FIRMO J.O.A.; BARRETO S.M.; LIMA-COSTA M.F. The Bambui Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community. **Cad. Saúde Pública**;19:817-27. 2003
- FONSECA, Francisco Antonio Helfenstein, IZAR, Maria Cristina de Oliveira São Paulo, SP. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** – V. 83, n. 5, Nov. 2004

FREITAS S.R.S. *et al.* Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em município da Região Amazônica. **Arq Bras Cardiol.** 88 (4): 447-51. 2007 (a).

FREITAS S.R.S.; *et al.* Analysis of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in resistant hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 40: 309-316. 2007 (b).

FROSSARD, P.M., *at al.*, An Mbol two-allele polymorphism may implicate the human renin gene in primary hypertension **Hypertens Res**, p. 221- 5, sep. 1998.

FROSSARD, P.M.. KANE, J.; MALLOY, M. Renin Gene Mbol Dimorphism Is a Discriminator for Hypertension in Hyperlipidaemic Subjects. **Hypertens Res** v. 22 p. 285-289. june/ 1999.

FROSSARD PM, *et al.* Haplotypes of the human renin gene associated with essential hypertension and stroke. **J Hum Hypertens**; 15: 49-55. 2001.

FU Y., *et al.* Lack of Correlation between *Mbo* I Restriction Fragment Length Polymorphism of Renin gene Hypertension in Japanese. **Hypertension Res.**; 24: 295-298. 2001.

GILLUM R.F. Pathophysiology of hypertension in blacks and whites. A review of the basis of racial blood pressure differences. **Hypertension**;1(5):468-75. 1979.

GLAVNIK, N.; PETROVIC, D. M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-1 converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians. **Folia Biologica (Praha)**, v.53, p.69-70, 2007.

GOLDENBERG, I.; *et al.* Polymorphism in the angiotensinogen gene, hypertension, and ethnic differences in the risk of recurrent coronary events. **Hypertension**, v.48, p.693-699, 2006.

GUYTON, AC. **Fisiologia Humana.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-Converting Enzyme: New concepts concerning its biological role. **Biochemistry**, v.28, n.13, p.5311-5318, 1989.

HARRAP, S. B.; *et al.* The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. **Hypertension**, v.21, p.455-460, 1993.

HATA A. *et al.* Angiotensinogen as a risk factor foessential hypertension in Japan. **J Clin Invest**; 93:1285-7. 1994

HENDERSON SO, HAIMAN CA, MACK W. **Am. J. Med. Sci.** Nov:328(5):266-73. 2004.

HIGAKI, J.; *et al.* Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men : The Suita Study. **Circulation**, v.101, p.206-2065, 2000.

INOUE *et al.* A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and effects basal transcription in vitro. **J Clin Invest**. 99 (7): 1786-97. 1997.

IWAI N. *et al.* Polymorphism of CYP11B2 Determines Salt Sensitivity in Japanese. **Hypertension**. 49:1-7, 2007.

JAMA. The effects of nonpharmacologic interventions on blood pressure of persons with high normal levels. **Results of the Trials of Hypertension Prevention, Phase I**. 267:1213-20. 1992.

JEUNEMAITRE X. *et al.* Sib pair linkage analysis of renin gene haplotypes in human essential hypertension. **Hum Genet**. 88 (3): 301-6, 1992.

JIANG *et al.* Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. **Chin Med J (Engl)**. Dec;114(12):1249-51, 2001

KATO, N. Genetics analysis in human hypertension. **Hypertension Research**, v.25, p.319-327, 2002.

KOBASHI G. Genetic and environmental factors associated with the development of hypertension in pregnancy. **J Epidemiol**. 16:1-8. 2006.

KUNZ, R.; *et al.* Association between the angiotensinogen 235t-variant and essential hypertension in whites. **Hypertension**, v.30, p.1331-1337, 1997.

KUPARI M. *et al.* Associations Between Human Aldosterone Synthase (CYP11B2) Gene Polymorphisms and Left Ventricular Size, Mass, and Function. **Circulation**. 97:569-575, 1998.

LAGUARDIA, J. Raça, genética e hipertensão: nova genética ou velha Eugenia? **História, Ciências, Saúde**, v.12, n.2, p.371-393, 2005.

LAHIRI DK, NURNBERGER JI JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. 19(19):5444. 1991.

LESSA I. Epidemiologia Insuficiência Cardíaca e da Hipertensão Arterial Sistêmica no Brasil. **Rev Bras de Hipertensão**. 8:383-392. 2001.

LEWINGTON S., *et al*, for the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**. 360:1903–13. 2002.

LEWIS, R. **Genética Humana** – Conceitos e Aplicações. 5 ed. Trad. Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004

LIFTON RP, GHARAVI AG, GELLER DS. Molecular mechanisms of human hypertension. **Cell**. 104(4):545-56. 2001.

LIU *et al.* A1166C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and essential hypertension in Han, Tibetan and Yi populations. **Hypertens Res**. Jul;25(4):515-21, 2002.

LIMA S.G. *et al.* Sistema Renina-Angiotensina: é Possível Identificar Genes de Suscetibilidade à Hipertensão? **Arq Bras Cardiol**; 89(6) : 427-433, 2007.

LOLIO CA, PEREIRA JCR, LOTUFO PA, SOUZA JMP. Hipertensão arterial e possíveis fatores de risco. **Rev. Saúde Pública**, Vol.27, nº 05, SP – 1993.

LOTUFO P.A. Stroke in Brazil: a neglected disease. Sao Paulo **Med J**. 123(1):3-4. 2005.

MANCILHA-CARVALHO J.J.; SOUZA E.S.N. A. The Yanomami Indians in the INTERSALT Study. **Arq Bras Cardiol**. 80:289-300, 2003.

MATTICK J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **Bioessays**, 25: 930-939, 2003.

MATSUBARA M., *et al.*, Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study. **J Hypertens**. Dec;19(12):2179-84. 2001.

MONDORF, U. F.; *et al.* Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. **Am J of Hypertens**, v.11, p.174-183, 1998.

MONDRY A.; *et al.* Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. **BMC Nephrology**, v.6, n.1, p.1-11, 2005.

MORRIS B.J.; GRIFFITHS L.R. Frequency in hypertensives of alleles for a RFLP associated with the renin gene. **Biochem Biophys Res Commun**. 150: 219-224. 1988.

NAFTILAN A.J., *et al.* A lack of genetic linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. **Hypertension** 14: 614-8, 1989.

NAKAI, K.; *et al.* Deletion polymorphism of the angiotensin i-converting enzyme gene is associated with serum ace concentration and increased risk for cad in the japanese. **Circulation**, v.90, p.2199-2202, 1994.

NÁPOLES, O. C.; *et al.* ACE I/D polymorphism study in a Cuban hypertensive population. **Clinica Chimica Acta**, v.378, p.112-116, 2007.

NISHIUMA S. *et al.* Effect of the angiotensinogen gene Met235→Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese populations. **J Hypertens**, 13:717-22. 1995.

NIU, T.; *et al.* Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.1, p.188-194, 1998.

O'DONELL, C. J.; *et al.* Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v.97, p.1766-1772, 1998.

OKURA T, KITAMI Y, HIWADA K: Restriction fragment length polymorphisms of the human renin gene: association study with a family history of essential hypertension. **J Hum Hypertens**, p. 457-461, 1993.

PAILLARD F., *et al.* Genotype-phenotype relationships for the renin-aldosterone system in a normal population. **Hypertension**. 34:423–9.,1999.

PASCOAL, I. F.; MION JUNIOR, D. Rim e Hipertensão. **Medicina On line - Revista Virtual de Medicina**, v.01, n.3, 1998. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/rimehipert.htm>. Acesso em: 07 Nov. 2008.

PATEL S., *et al.* Analysis of promoter region polymorphism in the aldosterone synthase gene (CYP11B2) as a risk factor for myocardial infarction. **Am J Hypertens**. feb;13(2):134-9, 2000.

PERDIGÃO C. **Revista da FML**. Vol.04.Supl.5:7-17. Out.1999.

PIROLA CJ. Molecular genetics of essential hypertension. Suceptibility and resistance genes. **Medicina**.;60:59-66. 2000.

PLUMB M., *et al.* GATAAG; a cis-control region binding an erythroid-specific nuclear factor with a role in globin and non-globin gene expression. **Nucleic Acids Re**. 17: 73–92. 1989.

POJOGA L., *et al.* Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. **Am J Hypertens**.11: 856–60. 1998.

PROCOPCIUC, L.; *et al.* Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, V.6, N.2, P.245-250, 2002.

REHMAN A., *et al.* Influence of the angiotensin II type I receptor gene 1166a/c polymorphism on bp and aortic pulse wave velocity among Malays. **Annals of Human Genetics**. 71, 86–95. 2007.

RIGAT B., *et al.* Na insertion-deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. **J. Clin. Invest.**, 86: 1343-1346, 1990.

RIGATTO K.V.; *et al.* Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento. **Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul**. 3: 1-5. 2004.

ROSSI E., *et al.* -344C/T polymorphism of CYP11B2 gene in Italian patients with idiopathic low renin hypertension. **Am J Hypertens**. 14(9 Pt 1):934-41. 2001.

SAMANI N.J., *et al.* A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. **Circulation** 94(4), 708-712, 1996.

SANTOS R.A.S., *et al.* **Hipertensão**. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 66-75. 2006.

SAUNDERS, E. Hypertension in minorities: blacks. **American Journal of Hypertension: Journal of the American Society of Hypertension**, v.8, n.12pt2, p.115s-119-s, 1995.

SAY, Y. H.; *et al.* Angiotensinogen M235T gene variants and its association with essential hypertension and plasma renin activity in Malaysian subjects: A case control study. **BMC Cardiovascular Disorders**, v.5, n.7, p.1-10, 2005.

SCHUNKERT, H.; *et al.* Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. **The New England Journal of Medicine**, v.330, n.23, p.1634-1638, 1994.

SCHMIDT S., *et al.* A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. **J Hypertens**;15:1385–8. 1997.

SCHORK N. Genetically complex cardiovascular traits: origins, problems, and potential solutions. **Hypertension**. 29 (Part 2): 145-149. 1997

SETHI, A. A.; NORDESTGAARD B. G.; TYBJAERG-HANSEN A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, n.7, p.1269-1275, 2003.

SOUBRIER F. *et al.* Similar frequencies of renin gene restriction fragment length polymorphisms in hypertensive and normotensive subjects. **Hypertension**. 16: 712–717. 1990.

STAESSEN, J. A.; *et al.* M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. **Journal of Hypertension**, v.17, n.1, p.9-17, 1999.

STANKOVIC' A. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and essential hypertension in Serbian population. **Clinica Chimica Acta**. 327: 181–185, 2003.

SUGIMOTO K., *et al.* Association between Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Polymorphism and Essential Hypertension: the Ohasama Study. **Hypertens Res**. 27:551-556. 2004.

SUNDER-PLASSMANN, G., *et al.* Angiotensin converting enzyme DDgenotype is associated with hypertensive crisis. **Crit Care Med**, Vol. 30, No. 10, 2002.

TAKAI E.; *et al.* Association between aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and left ventricular volume in patients with dilated cardiomyopathy. **Heart**. 88:649–50, 2002.

TAVARES A. Polimorfismos dos genes do sistema reninaangiotensina- aldosterona e as moléstias cardiovasculares. **Rev Bras Hipertens**. 3: 237-42, 2000.

THOMAS, M.F. *et al.* Genetic variants in the renin-angiotensin system genes are associated with cardiovascular-renal-related risk factors in Mexican Americans. **Hum Genet**. 124:557–559. 2008.

TIAGO, A. D.; *et al.* Impact of renin-angiotensin-aldosterone system gene variants on the severity of hypertension in patients with newly diagnosed hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.16, n.12, p.1006-1010, 2003.

TIRET L., *et al.* Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. **Lancet**. 344(8927):910-3. 1994.

TSUKADA K, SHIMITSU T, TERANISHI M. Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. **J Hum Hypertens**. Nov;16(11):789-93. 2002.

UNGER T. The role of renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **Am J Cardiol**. 89 (2A):3A-9A. 2002.

VASAN R.S., *et al* Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. **Lancet**. 358:1682-86. 2001.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A. G. **Genética Humana – Problemas e Abordagens**. 3 ed. Trad. Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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.

WEEKS D.E.; LATHROP G.M. Polygenic disease: method for mapping complex disease traits. **Trends Genet**. 11: 513-519. 1995.

WHITE PC, HAUTANEN A, KUPARI M. Aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphisms and cardiovascular function. **Endocr Res**. Aug-Nov;24(3-4):797-804, 1998.

WHITE PC, SLUTSKER L. Haplotype analysis of CYP11B2. **Endocr Res**.;21:437–42, 1995.

WRONA A, .Promoter variants of aldosterone synthase gene (CYP11B2) and salt-sensitivity of blood pressure. **Pol Arch Med Wewn**. Feb;111(2):191-7. 2004.

YELIN R., *et al*. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. **Nat. Biotech**., 21: 379-386, 2003

III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Rev Bras Clin Ter**. 24 (6): 231-72. 1998.

IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**. Vol. 82, (suplemento IV), 2004.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertens**. vol.13(4): 256-312, 2006.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DO PROJETO: Estudo sobre aspectos ambientais e genéticos da Hipertensão Arterial Sistêmica em populações afro-descendentes da Bahia e suas implicações na doença aterosclerótica coronariana

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: DOMINGOS LÁZARO SOUZA RIOS

CRM BA Nº: 15073

DESCREVER ABAIXO AS INFORMAÇÕES DADAS AOS PACIENTES SOBRE:

- 1) A justificativa e o objetivo da pesquisa;
- 2) Os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que são experimentais;
- 3) Os desconfortos e riscos esperados;
- 4) Os benefícios que se pode obter.

AS INFORMAÇÕES SUPRA CITADOS DEVEM SER REDIGIDAS EM TERMOS SIMPLES CONHECIDOS PELOS PACIENTES E DE FORMA QUE POSSAM ENTENDER:

Queremos realizar uma consulta médica geral com cardiologista e coleta de dados clínicos, medidas e peso dos pacientes. Este médico também acompanhará os pacientes indicando o tratamento correto para as doenças detectadas.

Serão solicitadas amostras de sangue (10 ml) para dosagens de colesterol, triglicérides, glicose, sódio, potássio, uréia, creatinina, ácido úrico. Além disso, este sangue será utilizado para obtenção do material genético (DNA) para o estudo das variantes em genes envolvidos com a hipertensão e outras doenças cardiovasculares. O sangue será obtido por punção de veia no braço usando agulhas e seringas descartáveis. O incomodo que o sujeito da pesquisa sofrerá será a picada da agulha para a coleta do sangue.

Entre os pacientes com pressão alta, serão feitas três entrevistas em ocasiões diferentes com uma nutricionista. Serão solicitadas informações a respeito dos alimentos ingeridos nas últimas 24 horas. Além disso, será solicitado que se guarde amostras das urinas feitas nas últimas 24 horas para verificar a quantidade de sal na urina.

Para estudar se a dieta com pouco sal diminui os níveis de pressão arterial, eu serei aconselhado a comer alimentos com menos sal. Uma nutricionista irá orientar-me e a minha família sobre como cozinhar alimentos com menos sal. Depois de dois meses fazendo esta dieta levarei novamente amostras das urinas feitas nas últimas 24 horas para verificar a quantidade de sal que tenho na urina.

Durante esta segunda visita, passarei por uma nova consulta com o médico cardiologista que verificará minha pressão arterial e, caso necessário, prescreverá as medicações adequadas para controle da minha pressão (para o caso da dieta não resolver o problema).

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Domingos Lázaro Souza Rios

Doutor em Genética

Departamento de Ciências Biológicas - UESB

Eu _____

abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, concordo em participar e estou ciente:

- 1) Da garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
- 2) Da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- 3) Da segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
- 4) Do compromisso de me proporcionarem informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
- 5) Da disponibilidade de tratamento médico e do direito à indenização legal por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
- 6) De que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Jequié (BA), ____ de _____ de _____

Assinatura do doador

12. Tabagismo:
 ex-fumante: nunca fumou: fuma atualmente: não
 sabe informar: : se fuma atualmente:
 Maços/dia: Anos como fumante:
 se ex-fumante há quanto tempo abstêmio:
13. História familiar de hipertensão em parentes de 1º grau:
 sim não não sabe informar
 Em caso afirmativo quais parentes em primeiro grau tiveram infarto ou
 angina e em que idade
 Pai: idade Mãe: idade: Irmãos: idade:
14. História de doença renal?
 sim não não sabe informar
15. uréia: mg/dl creatinina: mg/dl
16. Medicações em uso, dosagem e tempo de uso:
17. Faz uso de estrogênio (anticoncepcional ou terapia de reposição hormonal)?
18. Faz ingestão de bebida alcoólica regularmente?
 sim não não sabe informar
 1. Qual o tipo?
 2. Qual a quantidade por semana em copos de 200ml
 3.
19. Praticava alguma atividade física no lazer ou no trabalho?
 sim não não sabe informar
 Qual? Qual a duração em minutos e a periodicidade durante a semana?
20. Apresenta alguma outra doença crônica? Qual?
21. Outras dosagens bioquímicas:
 Colesterol total: HDL: Triglicerídeos:
 LDL: ac. Úrico:
 Sódio: Potássio:
22. Sumário de Urina (descrever as alterações observadas):
23. Eletrocardiograma (descrever as alterações observadas):

ANEXO III**GENE DO ANGIOTENSINOGENO (AGT)**

Técnica para detecção da variante M235T descrita por Mondry *et al.* (2005).

PRIMERS:

Sense: 5' – CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT - 3'

Antisense: 5' – CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC - 3'

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (V=25µL):

	Quantidade (µl)
Água	17,1
Tampão	2,5
MgCl ²	2,0
Primer sense	0,5
Primer antisense	0,5
dNTPs	0,2
Taq (DNA polimerase)	0,2
DNA	2,0

PROGRAMA UTILIZADO:

Temp. (°C)	Tempo (min)	Quant. de ciclos
94	5 min	1
94	1 min	35
63	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1

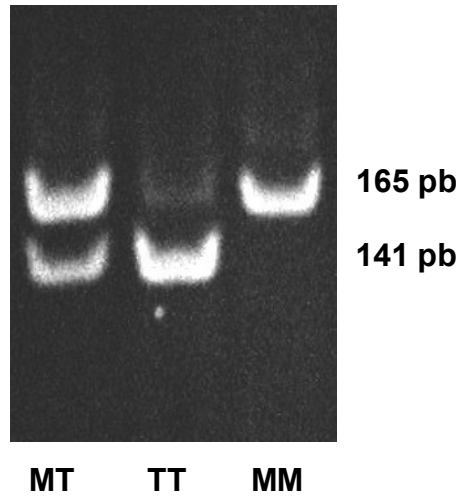
CLIVAGEM

ENZIMA: *Tth* 111I (10U/ μ l)

	Quantidade (μ l)
Enzima	0,5
Tampão	1,0
Amplificado	5,0
Água	3,5

Incubação em banho-maria à 37°C
"overnight"

GENÓTIPOS APÓS CLIVAGEM



ANEXO IV**GENE DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA I (ECA):**

Técnica para detecção da variante de inserção/deleção descrita por Mondry *et al.* (2005).

PRIMERS:

Sense: 5' – GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT - 3'

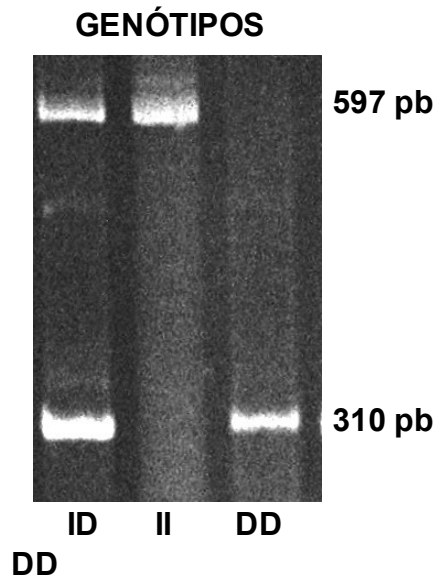
Antisense: 5' – CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT - 3'

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (V=25µL):

	Quantidade (µl)
Água	16,1
Tampão	2,5
MgCl ²	2,0
Primer sense	1,0
Primer antisense	1,0
dNTPs	0,2
Taq (DNA polimerase)	0,2
DNA	2,0

PROGRAMA UTILIZADO:

Temp. (°C)	Tempo (min)	Quant. de ciclos
94	5 min	1
94	1 min	35
58	1 min	
72	1 min	
72	10 min	1



ANEXO V

GENE SINTETASE DE ALDOSTERONA (CYP11B2)

Técnica para detecção da variante C-344T na região promotora do gene CYP11B2 descrita por Rossi e cols. (2001).

Primers:

Sense: 5' – CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC - 3'

Antisense: 5' – CCT CCA CCC TGT TCA GCC C - 3'

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (V=25µL):

	Quantidade (µl)
Água	16,1
Tampão	2,5
MgCl ²	2,0
Primer sense	1,0
Primer antisense	1,0
dNTPs	0,2

Taq (DNA polimerase)	0,2
DNA	2,0

PROGRAMA UTILIZADO:

Temp. (°C)	Tempo (min/seg)	Quant. de ciclos
94	5 min	1
94	1 min	35
64	30seg	
72	1 min	
72	10 min	1

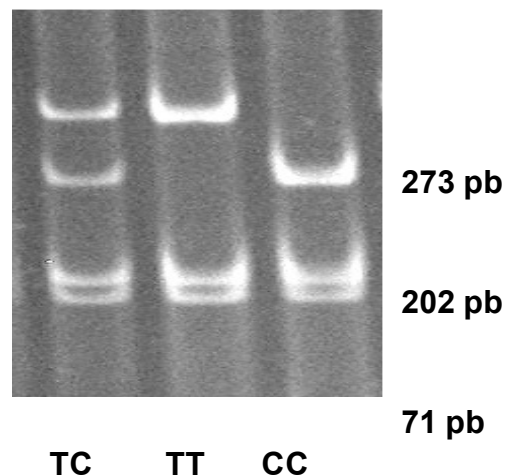
CLIVAGEM

ENZIMA: *Hae III* (10U/ μ l)

	Quantidade (μ l)
Enzima	1.0
Tampão	1,0
Amplificado	8.0
Água	0

Incubação em banho-maria à 37°C por 2 horas.

GENÓTIPOS APÓS CLIVAG



ANEXO VI**GENE DO RECEPTOR TIPO 1 DA ANGIOTENSINA II (AT1R)**

Técnica para detecção da variante A1166C descrita por Turet e cols. (1994), e Araújo e cols. (2004).

Primers:

Sense: 5' – AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT - 3'

Antisense: 5' – GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG - 3'

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (V=25µL):

	Quantidade (µl)
Água	15,26
Tampão	2,5
MgCl ²	2,0
Primer sense	1.5
Primer antisense	1.5
dNTPs	0,2
Taq (DNA polimerase)	0,2
DNA	2,0

PROGRAMA UTILIZADO:

Temp. (°C)	Tempo (min)	Quant. de ciclos
94	5 min	1
94	1 min	35
60	30 seg	
72	1 min	
72	10 min	1

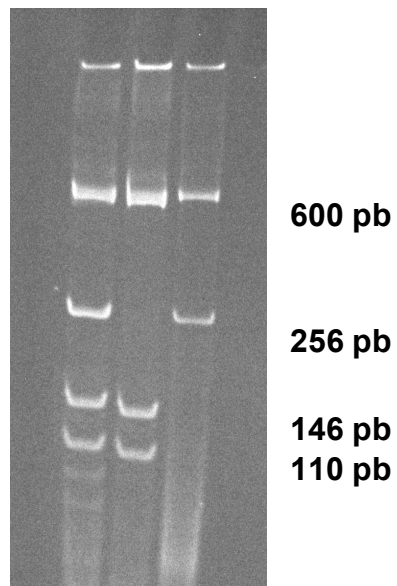
CLIVAGEM

ENZIMA: *Dde I* (5U/ µl)

	Quantidade (μ l)
Enzima	0.5
Tampão	1.0
Amplificado	8.5
Água	

Incubação em banho-maria à 37°C por 5 horas.

GENÓTIPOS APÓS CLIVAGEM



AC CC AA

ANEXO VII**GENE DA RENINA**

Técnica para detecção da variante reconhecida pela enzima Mbo I descrita por Fu e cols. (2001), Frossard e cols. (1998).

Primers:

Sense: 5' - TGAGGTTCGAGTCGGCCCCC - 3'

Antic sense: 5' -TGCCCAAACATGGCCACACA - 3'

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (V=25µL):

	Quantidade (µl)
Água	17,1
Tampão	2,5
MgCl ²	2,0
Primer sense	1.0
Primer antisense	1.0
dNTPs	0,2
Taq (DNA polimerase)	0,2
DNA	1,0

PROGRAMA UTILIZADO:

Temp. (°C)	Tempo (min)	Quant. de ciclos
94	5 min	1
94	30 seg	35
68	30 seg	
72	30 seg	
72	5 min	1

CLIVAGEM

ENZIMA: *Mbo* I (5U/ μ l)

	Quantidade (μ l)
Enzima	0,5
Tampão	1.0
Amplificado	6.0
Água	2,5

Incubação em banho-maria à 37°C por 3 horas

GENÓTIPOS APÓS CLIVAGEM

