

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências
ULisboa**

Suscetibilidade Genética para a Hipertensão

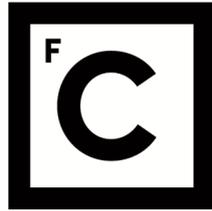
Ildegário Horold dos Santos Semente

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Deodália Dias
Doutora Paula Faustino

2018

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências
ULisboa**

Suscetibilidade Genética para a Hipertensão

Ildegário Horold dos Santos Semente

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Deodália Dias
Doutora Paula Faustino

2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa e no Instituto De Investigação Científica Bento Da Rocha Cabral, Lisboa

As referências bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas da revista
Journal of Hypertension

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio de várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do mesmo. Desta forma, quero expressar-lhes os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, de seguida agradeço ao Professor Doutor Manuel Bicho, Diretor do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL), por me ter concedido e confiado a oportunidade de efetuar este trabalho e por todos os esclarecimentos, conselhos e apoios dados ao longo da realização do mesmo e também por me ter proporcionado a elaboração deste trabalho no Laboratório de Genética da FMUL.

Agradeço à minha orientadora externa, a Doutora Paula Faustino, responsável pelo Grupo de Investigação e Desenvolvimento (I&D) em Hemoglobinopatias, metabolismo do ferro e patologias associadas do INSA, por ter aceitado orientar-me, pela sua disponibilidade em ajudar-me, pelo apoio, pelo incentivo e todos os conhecimentos transmitidos de ordem teórica e prática. Quero também agradecer ao Doutor João Lavinha, responsável pela Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética Humana do INSA, pela oportunidade de realização de uma parte deste trabalho neste Instituto. Agradeço também à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pelo suporte técnico prestado e aos investigadores que deram as formações iniciais no INSA. Quero agradecer também à Marta Nicolau, Marisa Silva e ao José Ferrão, do grupo de Investigação e Desenvolvimento (I&D) em Hemoglobinopatias, metabolismo do ferro e patologias associadas do INSA, por todo o apoio laboratorial, disponibilidade e ajuda.

Agradeço à Professora Doutora Deodália Dias, por ter aceitado ser a minha orientadora na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e por toda a disponibilidade que sempre demonstrou desde o início do mestrado. Agradeço também a todos os professores do mestrado pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos colaboradores do laboratório de genética da FMUL, nomeadamente à Dra. Joana Ferreira, pela disponibilidade demonstrada e informações transmitidas tanto na parte teórica como na parte laboratorial para execução deste trabalho, à Andreia Matos pelos dados/informações transmitidas, à Técnica de laboratório Conceição Afonso pelos conselhos dados e aos demais colaboradores que diretamente ou indiretamente ajudaram na conclusão deste trabalho.

Tendo consciência que sozinho nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento mais do que especial, eterno e imensurável aos meus amados pais/família, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade, e paciência demonstrados e total ajuda na superação de obstáculos que ao longo desta trajetória foram surgindo. Aos meus pais/família dedico este trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos/colegas pelas brincadeiras, pela amizade e também pela boa disposição que partilharam sempre comigo, nomeadamente, à Raquel Carrilo, à Daniela Brás, à Laura Aguiar, à Joana Dias, à Cláudia Cavacas e ao Gonçalo Fulgêncio. Deixo também um especial agradecimento a minha namorada, Jessica Agostinho, por todo amor, carinho e suporte.

RESUMO

A hipertensão é uma doença multicausal, multifatorial e poligénica, caracterizada pela presença de níveis elevados de tensão arterial e encontra-se frequentemente associada a distúrbios metabólicos e hormonais, com presença de hipertrofia cardíaca e elevação do tónus vascular. É também considerada uma síndrome por estar fortemente associada a um agregado de distúrbios metabólicos, tais como a obesidade, aumento da resistência à insulina, diabetes mellitus, e dislipidemias, que podem contribuir de forma significativa para o aumento da incidência da hipertensão e outras doenças cardiovasculares, bem como estarem na base do desenvolvimento das mesmas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade genética para o desenvolvimento de hipertensão na população portuguesa, mais especificamente pretendeu-se testar a associação de variantes nos genes *NOS3*, *HBA* e *G6PD* com a hipertensão (fenótipo distante) e com potenciais fatores de risco (fenótipos intermédios). Para tal foram analisadas amostras de sangue periférico de 377 indivíduos portugueses, com idade compreendida entre os 19 e 98 anos, dos quais 227 eram do sexo feminino e 144 do sexo masculino, sendo 243 hipertensos e 134 normotensos (população controlo). Foram ainda analisadas 22 amostras de uma população africana não hipertensa (Moçambique).

Para a pesquisa do número de repetições de 27 bp em *tandem* (VNTR) no intrão 4 do gene *NOS3* foi usada a PCR, para a pesquisa do SNP rs1050829 no gene *G6PD* foi usado a PCR-RFLP e para a pesquisa da deleção alfa-talassémica de -3,7kb no agrupamento génico da alfa-globina foi usada uma metodologia de Gap-PCR. Para a pesquisa de variantes no exão 2 dos genes *HBA1* e *HBA2* foi usada a PCR seguida de sequenciação de Sanger. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa estatístico SPSS 25.0, sendo o nível de significância estatístico estabelecido para $p\text{-value} < 0,05$. Dado que existia diferença entre os dois grupos analisados (hipertensos e normotensos) no que diz respeito à idade (mas não ao género), sempre que necessário foi realizado o ajuste para este fator de confundimento.

Os resultados deste estudo mostraram que a presença do alelo 4a em *NOS3* (em heterozigotia ou homozigotia) está associado a um maior risco de ser hipertenso [OR = 2,297; IC (95%) = (1,206 – 4,376); $p = 0,011$]. Observou-se também que o IMC e a glicémia apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre hipertensos e normotensos, respetivamente, $p = 0,008$ e $p = 0,036$. Além disso, foi observado que na ausência do alelo 4a o IMC, a glicémia e a uricémia estão associadas a hipertensão ($p = 0,005$; $p = 0,001$ e $p = 0,013$) e que poderão ser fatores de risco independentes. Não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas para a variante da *G6PD* e para a presença da alfa-talassémia entre os grupos (hipertensos e normotensos).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a presença do alelo 4a no gene *NOS3* é um fator de suscetibilidade genética para o desenvolvimento de hipertensão na população portuguesa. Este facto realça a importância do metabolismo do óxido nítrico nesta patologia. A identificação de variantes genéticas associadas ao fenótipo hipertenso, poderá permitir o reconhecimento de indivíduos suscetíveis e a classificação dos pacientes em subgrupos com distintas características genéticas, de maneira a serem delineadas as melhores estratégias preventivas e terapêuticas.

Palavras-Chave: Hipertensão, óxido nítrico, α -globina, glicose-6-fosfato-desidrogenase

ABSTRACT

Hypertension is a multicausal, multifactorial and polygenic disease, characterized by the presence of elevated arterial tension levels and is frequently found associated with metabolic and hormonal disturbances, with the presence of cardiac hypertrophy and elevation of the vascular toning. It is also considered a syndrome because it is strongly associated with an aggregate of metabolic disturbances, such as obesity, increased insulin resistance, diabetes mellitus and dyslipidemia, which may contribute significantly to increased incidence of hypertension and other cardiovascular diseases, as well as being at the basis for their development.

This project aimed to evaluate the genetic susceptibility to hypertension within the Portuguese population, more specifically to test the association of variants in genes *NOS3*, *HBA* and *G6PD* with hypertension (distant phenotype). Also, the contribution of some biochemical/clinical parameters as potential risk factors (intermediate phenotypes) were analysed. For that, peripheral blood samples of 377 Portuguese individuals being 243 hypertensives and 134 normotensives (population control) were investigated. The sample was composed by 227 females and 144 males with ages ranging between 19 and 98 years. Further, 22 samples of a non-hypertensives African population was analyzed (Mozambique).

The characterization of the number of repetitions of 27 bp in *tandem* (VNTR) in 4 intron of the gene *NOS3* was performed by PCR, the SNP rs1050829 in *G6PD* gene was analysed by PCR-RFLP and the study of -3,7kb alpha-thalassemic deletion in the alpha-globin cluster was performed by Gap-PCR. To search for variants in exon 2 of *HBA1* and *HBA2* genes PCR followed by Sanger sequencing. The statistical calculations were made using the statistics tool SPSS 25.0, with the statistical significance level set to *p-value* <0.05. As the two groups (hypertensive/normotensive) presented difference concerning age (but not gender) correction for this confounding factor was performed when appropriate.

The results of this study show that the presence of the allele with four repetitions (allele 4a) in *NOS3* (in heterozygosity or homozygosity) is associated with a higher risk of being hypertensive [OR = 2.297; CI (95%) = (1.206 - 4.376); *p* = 0.011]. Concerning intermediate phenotypes, it was also observed that the Body Mass Index (BMI) and glycemia showed statistical differences between hypertensives and normotensives groups, (*p* = 0.008 and *p* = 0.036, respectively). Moreover, we observed that in absence of allele 4a, BMI, glycemia and uricemia are associated with hypertension (*p* = 0.005; *p* = 0.001 and *p* = 0.013) which allowed to conclude that they are independent risk factors. No significant differences were verified for the *G6PD* variant or for the presence of the alpha-thalassemia deletion between the hypertensive and the normotensive groups.

We can conclude that the presence of the allele 4a in *NOS3* gene is a genetic susceptibility factor for the development of hypertension in the Portuguese population. This fact emphasizes the importance of nitric oxide metabolism in this pathology. The identification of contributing genetic variants for the susceptibility to hypertension may allow recognizing the vulnerable individuals and classifying patients in subgroups with distinct genetic characteristics in order to delineate the better prevention and therapeutic strategies.

Keywords: Hypertension, nitric oxide, α -globin, glucose-6-phosphate-dehydrogenase

ABREVIATURAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1	Angiotensinogénico do tipo 1
AT2	Angiotensinogénico do tipo 2
BH ₂	Dihidobiopterina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
CV	Cardiovascular
Cytb5r3	Citocromo b5 redutase 3
C ₄ H ₄ NH	Anel Tetrapirrónico de Protoporfina IX
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito Cardíaco
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crónica
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EUA	Estados Unidos da América
eNOS	Sintase Endotelial do Óxido Nítrico
ESC	Sociedade Europeia de Cardiologia
ESH	Sociedade Europeia de Hipertensão
FAD	Flavina Adenina dinucleótido
FMN	Flavina Mononucleótido
FR	Fator de Risco
GCa	Guanilato Ciclase Solúvel Ativa
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel Ativa
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
GTP	Guanosina Trifosfato
GSH	Glutationa Reduzida
GSHP	Glutationa Peroxidase
GSSG	Dissulfeto de Glutationa
GSSGR	Glutationa Redutase
G6PD	Glucose-6-fosfato-desidrogenase
Hb	Hemoglobina
Hb F	Hemoglobina Fetal
HDL-Colesterol	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
HTA	Hipertensão
<i>HBA1</i>	Gene α_1 -globina
<i>HBA2</i>	Gene α_2 - globina
IMC	Índice de Massa Corporal
IP ₃	Inositol Trifosfato
iNOS	Sintase Induzível do Óxido Nítrico
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LDL-Colesterol	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LDL-ox	<i>Low-Density-Lipoprotein</i> - oxidadas
LOA	Lesões em órgãos-alvo
MAPA	Monotorização Ambulatória da Pressão Arterial

MetHb	Metahemoglobina
MJEs	Junções Mioloendotélias
mmHg	Miligramas de Mercúrio
mRNA	Ácido Ribonucleico - mensageiro
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fostato Reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fostato
nNOS	Sintase Neuronal do Óxido Nítrico
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintases do Óxido Nítrico
<i>NOS3</i>	Gene da Sintase Endotelial do Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OR	<i>Odds Ratio</i>
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PHYSA	Estudo sobre a Prevalência, Tratamento, Controle, Conscientização e Ingestão de Sal em Portugal
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RP	Resistência Periférica
RU	Reino Unido
SiRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPH	Sociedade Portuguesa de Hipertensão
SRAA	Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona
TSH	Hormona Tiroestimulante ou Tirotropina
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
χ^2	Qui-quadrado

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Hipertensão - Nota Histórica.....	1
I.2. A Epidemiologia da Hipertensão.....	2
I.3. A Prevalência da Hipertensão	2
I.4. A Etiologia da Hipertensão	3
I.5. A Fisiopatologia da Hipertensão	4
I.6. Diagnóstico da Hipertensão.....	5
I.6.1. Definição e Classificação da Hipertensão	5
I.6.2. Medição da Pressão Arterial.....	6
I.7. Tratamento.....	6
I.8. Fatores Genéticos Associados à Hipertensão Arterial.....	7
I.8.1. Óxido Nítrico	7
I.8.1.1. Biossíntese do Óxido Nítrico.....	8
I.8.1.2. Mecanismo de Ativação/Ação da Sintase Endotelial do Óxido Nítrico (eNOS)	9
I.8.1.3. Óxido Nítrico e a Disfunção Endotelial.....	10
I.8.1.4. Stress Oxidativo e Biodisponibilidade do Óxido Nítrico	11
I.8.1.5. Óxido Nítrico e a Vasoproteção	11
I.8.1.6. O Gene da Sintase do Óxido Nítrico Endotelial e suas Variantes	12
I.8.1.7. Polimorfismos do Intrão 4 (VNTR) do Gene <i>NOS3</i>	12
I.8.2. Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD).....	13
I.8.2.1. Atividade Reduzida da Molécula de Glicose-6-fosfato-desidrogenase	13
I.8.2.2 Estrutura Genética da G6PD.....	14
I.8.2.3. Variantes Alélicas da G6PD	15
I.8.2.4 G6PD, Óxido Nítrico e a Hipertensão	16
I.8.3. Alfa-Globina e Alfa-Talassémia.....	16
I.8.3.1. A Hemoglobina e a sua Estrutura	16
I.8.3.2. Hemoglobinopatias	17

I.8.3.3. Alfa-Talassémia	17
I.8.3.5. Alfa-Talassémia, Óxido Nítrico e a Hipertensão.....	19
II. OBJETIVOS.....	21
III. METODOLOGIA	22
III.1. Amostra.....	22
III.2. Métodos	22
III.2.1. Extração e quantificação do DNA	22
III.2.2. Amplificação do DNA por PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	22
III.2.3. PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	22
III.2.4. Gap-PCR.....	22
III.2.5. Sequenciação de Sanger.....	23
III.3. Tratamento Estatístico	23
III.3.1. Análise Estatística.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
IV.1. Caracterização da Amostra.....	24
IV.2. Análise dos Polimorfismos no Intrão 4 do gene <i>NOS3</i> (VNTR) e Associação com as Variáveis Estudadas.....	28
IV.3. Análise do Polimorfismo do gene <i>Gd</i> (rs1050829) e Associação com as Variáveis Estudadas.	33
IV.4. Análise da Deleção α -Talassémica ($-\alpha^{3,7}$) no Agrupamento Génico da α -Globina e Associação com as Variáveis Estudadas.	36
IV.5. Caracterização Genotípica e Alélica dos genes <i>NOS3</i> , <i>G6PD</i> e <i>HBA</i> numa População Moçambicana Normotensa	38
V. DISCUSSÃO.....	41
VI. CONCLUSÃO	44
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
VIII. ANEXOS.....	55
VIII.1. Extração de DNA através do Método de <i>Salting-out</i>	55
VIII.2. Tampões usados para realização do PCR e Eletroforese em Gel de Agarose	57
VIII.3. Mistura Reacional e Condições de PCR (<i>NOS3</i>).....	58
VIII.4. Mistura Reacional e Condições para PCR-RFLP (<i>G6PD</i>)	59
VIII.5. Mistura Reacional e Condições para o Gap-PCR (Alfa-Talassémia).....	60
VIII.6. Mistura Reacional e Condições de PCR para Amplificação dos Genes Alfa.....	61
VIII.7. Protocolo de Purificação de produtos de PCR (Colunas JetQuick).....	62
VIII.8. Mistura Reacional e Condições de PCR para Sequenciação dos Genes Alfa.....	63
VIII.9. Valores de Referência para as Variáveis em Estudo.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1. Taxa de prevalência para a hipertensão a nível global entre 2000 e 2010, ajustada para a idade (≥ 20) e para o sexo.....	3
Figura I. 2. Fatores/mecanismos que alteram o calibre das arteríolas e conseqüentemente conduzem aos valores elevados de pressão arterial.....	4
Figura I. 3. Definições e classificações dos níveis de pressão arterial no consultório (mmHg)..	5
Figura I. 4. Recomendações para o início de mudanças no estilo de vida e tratamento anti-hipertensivo..	7
Figura I. 5. Ilustração do mecanismo de síntese do óxido nítrico no organismo, através da conversão da L-arginina em NO e L-citrulina na presença da NADH, FAD, FMN e BH ₄ .	8
Figura I. 6. Disfunção endotelial e a sinalização do óxido nítrico vascular..	10
Figura I. 7. Representação esquemática das diferentes variantes alélicas do gene NOS3..	12
Figura I. 8. Localização do gene da G6PD.	15
Figura I. 9. Ilustração representativa do mecanismo de recombinação desigual que conduz ao surgimento da deleção $-\alpha^{3,7}$..	18
Figura I. 10. Mecanismo de regulação do NO ao nível das junções mieloendoteliais através da Hb α ..	20
Figura IV. 1. Representação gráfica da frequência das faixas etárias na população hipertensa em ambos os sexos.....	25
Figura IV. 2. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genómica contendo o VNTR do intrão 4 do gene NOS3..	28
Figura IV. 3. Gráfico ilustrativo das frequências genotípicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene NOS3, na população hipertensa e na população normotensa.....	29
Figura IV. 4. Gráfico ilustrativo das frequências alélicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene NOS3, na população hipertensa e na população normotensa.....	29
Figura IV. 5. Gráfico ilustrativo das frequências genotípicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene NOS3, na população hipertensa e na população normotensa no que diz respeito ao sexo feminino. ...	30
Figura IV. 6. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo da amplificação de um fragmento da região do gene Gd (rs10500829).....	33
Figura IV. 7. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a endonuclease Fok I.....	34
Figura IV. 8. Perfil eletroforético em gel de agarose representativo da confirmação da detecção da deleção de 3,7kb no agrupamento génico da α -globina.	36
Figura IV. 9. Perfil eletroforético em gel de agarose representativo da amplificação dos genes α	36
Figura IV. 10. Imagem representativa do resultado obtido da sequenciação dos genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ por eletroforese capilar.....	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela IV. 1. Estatística descritiva dos variáveis idade, altura e peso, nos indivíduos hipertensos e normotensos.....	24
Tabela IV. 2. Avaliação da distribuição dos fenótipos intermédios e sua estatística descritiva na população hipertensa.	26
Tabela IV. 3. Avaliação da distribuição dos fenótipos intermédios e sua estatística descritiva na população normotensa.	27
Tabela IV. 4. Análise das diferenças observadas nos valores dos fenótipos intermédios entre indivíduos hipertensos e normotensos.....	28
Tabela IV. 5. Análise entre as variáveis estudadas e os genótipos (4b/4b, 4a/4b e 4a/4a) do gene NOS3 na população de indivíduos hipertensos e normotensos.....	31
Tabela IV. 6. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo 4a do intrão 4 do gene NOS3 (VNTR), entre indivíduos os indivíduos hipertensos e normotensos.	32
Tabela IV. 7. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo 4a do intrão 4 do gene NOS3 (VNTR), na população de indivíduos hipertensos.	33
Tabela IV. 8. Frequências genotípicas e alélicas para o gene da Gd (rs10500829) para ambas populações (hipertensos e normotensos).	34
Tabela IV. 9. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo G do gene G6PD (rs10500829), na população de indivíduos hipertensos.....	35
Tabela IV. 10. Frequências genotípicas para a alfa-talassémia em ambas populações (hipertensos e normotensos).....	37
Tabela IV. 11. Frequências alélicas para a alfa-talassémia em ambas populações (hipertensos e normotensos).....	38
Tabela IV. 12. Frequência genotípica para o gene NOS3 na população normotensa Moçambicana....	38
Tabela IV. 13. Frequência genotípica para o gene Gd na população normotensa Moçambicana.....	39
Tabela IV. 14. Frequência genotípica para o gene HBA na população normotensa Moçambicana.	39
Tabela IV. 15. Análise da frequência dos genótipos em estudo entre a população Moçambicana e duas populações africanas população Africana.	40
Tabela VIII. 1. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho dos fragmentos amplificados para o VNTR do intrão 4 do gene NOS3.....	58
Tabela VIII. 2. Condições de PCR para o VNTR do intrão 4 do gene NOS3.....	58
Tabela VIII. 3. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho do fragmento amplificado para o SNP rs1050829.	59
Tabela VIII. 4. Condições de PCR para o SNP rs1050829.	59
Tabela VIII. 5. Condições da reação de restrição para o SNP rs1050829. N (qualquer nucleótido). ...	59

Tabela VIII. 6. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho dos fragmentos amplificados para a detecção da deleção de -3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina.	60
Tabela VIII. 7. Condições de PCR para detecção da deleção de -3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina.	60
Tabela VIII. 8. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho do fragmento amplificado resultante da amplificação dos genes alfa.	61
Tabela VIII. 9. Condições de PCR para amplificação dos genes alfa.	61
Tabela VIII. 10. Especificação dos reagentes e primer da mistura de PCR para os genes alfa.....	63
Tabela VIII. 11. Condições do PCR para sequenciação dos genes alfa.	63
Tabela VIII. 12. Indicação dos valores de referência para as variáveis em estudo.	64

I. INTRODUÇÃO

I.1. Hipertensão - Nota Histórica

A história da hipertensão remonta aos tempos antes de cristo, sendo que os antigos egípcios já possuíam conhecimento sobre a origem da pulsação e sobre o processo de bombeamento do coração. A observação do pulso vascular é muito antiga, visto que, no sistema ancestral tradicional da medicina indiana e chinesa, a “qualidade do pulso” medida pelo apalpe e tato de “médicos treinados” era uma possível indicação do funcionamento do sistema cardiovascular. No entanto, somente em 1733 terá sido realizada a primeira medição da pressão arterial, efetuada pelo reverendo perpétuo de Teddington, Stephen Hales (1677-1761). O processo consistiu na introdução de um tubo de vidro na artéria crural esquerda de uma égua doente e ao soltar a ligadura da artéria observou que a força do ventrículo esquerdo elevava a coluna de sangue a 2,5m de altura e que, por sua vez, este oscilava de acordo com a sístole e a diástole, respiração e movimentos do animal. [1] [2].

Em 1896 Scipione Riva-Rocci (1863 – 1937) descreveu pela primeira vez um aparelho composto por duas partes, uma destinada a exercer compressão sobre a artéria e outra que permitia realizar a medição da pressão arterial exercida. O aparelho ficou mundialmente conhecido como o esfigmomanómetro de Riva – Rocci e foi considerado a evolução lógica e progressiva dos trabalhos iniciados por Stephen Hales [2]. O aparelho de Riva – Rocci definia de maneira inquestionável a medição da pressão sistólica e considerava a transição de amplas para pequenas oscilações como pressão diastólica, mas a detecção definitiva da pressão diastólica foi realizada em 1905 por Nicolai Korotkoff (1874 – 1920), que demonstrou que o pulso pode ser auscultado ao invés do apalpe durante os procedimentos para medição da pressão arterial, porque sob completa restrição a artéria não emite sons. Korotkoff sabia que o início do pulso palpável era a pressão arterial sistólica e analisou que possivelmente o momento do desaparecimento do som podia ser indicador do início do fluxo laminar, e, por conseguinte, do relaxamento da parede arterial, sendo assim, propôs que a pressão diastólica podia ser estimada através do desaparecimento de todos os sons. [3] [4] [5]. Mas uma breve nota histórica sobre a hipertensão fica incompleta, se não se fizer menção do médico Indiano/Irlandês Frederick Mahomed’s (1849 – 1884), que no final do século XIX descreveu pela primeira vez as condições de uma patologia que mais tarde passou a ser conhecida como a hipertensão essencial [6].

A hipertensão nem sempre foi considerada uma doença como nos dias de hoje, e a morte do presidente Franklin Roosevelt quando o mesmo apresentava um registo 162/98 mmHg (miligramas de mercúrio) de pressão arterial aos 54 anos de idade trouxe para cima da mesa a discussão de que a hipertensão podia ser vista como uma doença mortal [6] [7]. Neste sentido, muitos estudos sobre esta temática têm sido realizados e dentre eles destaca-se o *Framingham Heart Study*, que foi um dos primeiros estudos epidemiológicos que caracterizou a prevalência da hipertensão e suas consequências numa coorte de 4469 indivíduos americanos. O estudo mostrou de maneira consistente que a hipertensão estava associada a muitos eventos cardiovasculares que depois conduziam a mortes prematuras sendo que um dos fatores de risco identificado pelo estudo, era a pressão arterial elevada (sistólica e diastólica) [8] [9].

I.2. A Epidemiologia da Hipertensão

Num estudo recente envolvendo 5,4 milhões de participantes de 199 países para análise da pressão arterial (entre 1980 e 2008), observou-se que em média os valores da pressão arterial (PA) têm diminuído de maneira geral desde 1980. A pressão arterial sistólica (PAS) tem diminuído em cerca de 0,8mmHg por década nos homens e 1,0mmHg por década nas mulheres, mas esta tendência decrescente não é uniforme para todas as regiões do globo. Foi observado que em países de rendimento elevado, os valores médios de PA têm decrescido substancialmente, em contrapartida, nos países de médio e baixo rendimento a PA tem aumentado ao longo dos anos (0,8 – 1,6mmHg por década nos homens e 1,0 – 2,7mmHg por década nas mulheres) em regiões como a Oceânia, África e Ásia. Ainda no mesmo estudo verifica-se que a Coreia do Sul apresenta a PA (ajustada para a idade) com o valor mais baixo para as mulheres (116,9mmHg), sendo que São Tomé e Príncipe apresenta o valor mais elevado para as mulheres (136,3mmHg). Para os homens, o país com PAS ajustada para idade mais baixa é a Papua – Nova Guiné (122,6mmHg), sendo que o país com valores de PAS mais elevados ajustados para a idade nos homens é o Níger (139,4mmHg) [10] [11]. Embora seja atribuído aos países de médio e baixo rendimento a maior proporção (80%) dos valores elevados de pressão arterial, em contraste com os países de rendimento elevado (20%), os estudos epidemiológicos de maior relevância no que diz respeito a prevenção e atividade terapêutica continuam a ser conduzidos em países de alto rendimento [10] [12].

I.3. A Prevalência da Hipertensão

Estima-se que a prevalência mundial da hipertensão seja de mais mil milhões de indivíduos (aproximadamente 1,39 mil milhões), representando cerca de 31% de toda população adulta em 2010 (figura I.1) [13]. Esta patologia é considerada a nível global um dos maiores riscos de mortalidade e num total de 58,8 milhões de mortes a nível mundial em 2004, a hipertensão foi responsável por 7,5 milhões de mortes (12,8%). Em países de rendimento elevado foi responsável por 16,8% das mortes, em países de rendimento médio foi responsável por 17,2% e em países de rendimento baixo foi responsável por 7,5% das mortes. Em 2010 morreram cerca de 9,4 milhões de indivíduos por causa desta patologia. Aproximadamente um em cada quatro adultos é hipertenso, observando-se que cerca de 3,5 mil milhões de adultos apresentam valores de PAS e de pressão arterial diastólica (PAD) fora dos valores normais estabelecidos. Estima-se que cerca de 212 milhões de indivíduos anualmente têm a sua expectativa de vida útil reduzida por causa da hipertensão [11] [14] [15].

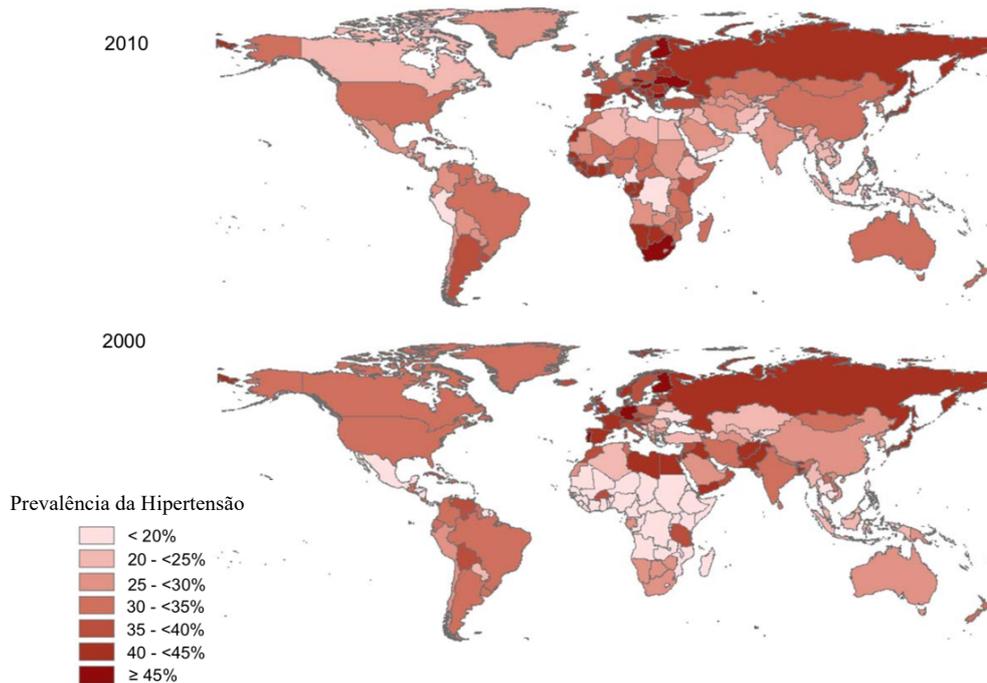


Figura I. 1. Taxa de prevalência para a hipertensão a nível global entre 2000 e 2010, ajustada para a idade (≥ 20) e para o sexo. Adaptado de [15].

É importante salientar que se estima que entre 2000 e 2025 a quantidade de pessoas afetadas por hipertensão a nível mundial irá aumentar em cerca de 30% para todas as regiões. Segundo o estudo PHYSA (estudo sobre a prevalência, tratamento, controle, conscientização e ingestão de sal em Portugal) a taxa de prevalência em Portugal para hipertensão é de cerca de 42,2% (44,4% nos indivíduos do sexo masculino e 42,1% nos indivíduos do sexo feminino). Verificou-se também que apenas na faixa etária acima dos 70 anos é que a taxa de prevalência da hipertensão na população portuguesa é maior nas mulheres do que nos homens [16].

I.4. A Etiologia da Hipertensão

A hipertensão é uma doença multicausal, multifatorial e poligénica, caracterizada pela presença de níveis elevados de tensão arterial e frequentemente associada a distúrbios metabólicos e hormonais, com presença de hipertrofia cardíaca e elevação do tónus vascular [17] [18]. A hipertensão arterial primária (quando não são identificados os fatores associados à patologia) representa aproximadamente 95% dos casos de hipertensão e a hipertensão arterial secundária (quando se identificam os fatores associados a patologia) representa 5% dos casos de indivíduos hipertensos [19], sendo que muitas diretrizes recomendam a investigação de fatores secundários para doentes hipertensos com idade inferior a 40 anos [20].

A hipertensão arterial é uma das causas mais comuns de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares [12] [21]. Esta multiplicidade de consequências caracteriza-a como uma das maiores causas de redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos, aumentando com o aumento da idade. Observa-se que os indivíduos da faixa etária abaixo dos 50 anos de idade, a (PAD) é um dos fatores de risco com maior preponderância, em contrapartida, em indivíduos com idade acima dos 50 anos, a PAS torna-se mais importante uma vez que a mesma vai aumentando à medida que o indivíduo envelhece [11] [12].

Esta patologia é também considerada uma síndrome por estar fortemente associada a um agregado de distúrbios metabólicos, tais como a obesidade, aumento da resistência à insulina, diabetes mellitus, e dislipidemias, que juntamente com outros fatores como o excesso de consumo de sódio, o consumo elevado de bebidas alcoólicas, o sedentarismo, o sexo e etnia, fatores genéticos, fatores socioeconómicos e a idade, podem contribuir de forma significativa para o aumento da incidência da hipertensão e outras doenças cardiovasculares, bem como estarem na base do desenvolvimento das mesmas [18] [22].

I.5. A Fisiopatologia da Hipertensão

A regulação e controle da pressão arterial é um dos processos fisiológicos mais complexos do organismo, que depende das ações coordenadas e integradas dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino [21], observando-se que a elevação da resistência periférica é tida como um dos principais fatores que contribuem para o aumento da pressão arterial, isto porque, a medida da pressão arterial é determinada pelo produto do batimento/débito cardíaco (frequência cardíaca e ejeção ventricular esquerda) e da resistência vascular periférica (explicada pela resistência das arteríolas, relacionada com o diâmetro do lúmen) [21]. Uma vez que a resistência das arteríolas está intrinsecamente relacionada com o seu calibre, a redução deste calibre é determinada pela combinação, em grau variado, de fatores estruturais e fatores funcionais. Observando-se que os principais fatores envolvidos no controle da pressão arterial sanguínea são regidos pela lei de Poiseuille – Hagen (figura I.2) [23] [24].

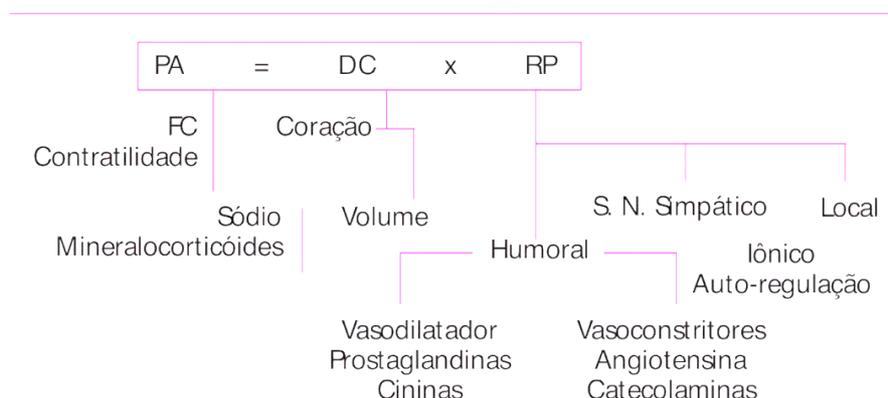


Figura I. 2. **Fatores/mecanismos que alteram o calibre das arteríolas e consequentemente conduzem aos valores elevados de pressão arterial.** PA (Pressão Arterial); DC (Batimento/débito Cardíaco); RP (Resistência Vascular Periférica). Adaptado de [24].

Assim, alterações do batimento/débito cardíaco (DC) e na resistência vascular periférica (RP), poderão conduzir ao desenvolvimento da hipertensão, verificando-se que apesar de existirem vários fatores envolvidos na regulação da PA, os principais mecanismos/eixos envolvem o sódio, a renina, a tonina, a calicreína, as prostaglandinas e o mecanismo/sistema adrenérgico, havendo inter-relação entre estes vários sistemas/mecanismos [24].

Salientando que o sistema renina - angiotensina - aldosterona desempenha um papel notório porque participa dos mecanismos fisiopatológicos que envolvem a remodelação vascular das artérias envolvidas na génese da hipertensão, uma vez que a angiotensina II é um péptido multifatorial com várias ações pleiotrópicas. Assim o sistema renina - angiotensina - aldosterona consegue elevar os valores da pressão arterial por intermédio de cinco mecanismos:

1. Contração direta da célula muscular lisa;
2. Estimulação dos centros vasomotores;
3. Aumento da secreção de catecolaminas;
4. Estimulação do sistema nervoso central promovendo uma maior sensação de sede;
5. Estimulação da secreção de aldosterona;

Na via clássica do sistema renina - angiotensina - aldosterona (SRAA), o angiotensinogénio é clivado pela enzima renina dando origem a angiotensina I (Ang I) que, por sua vez, sofre a ação da enzima da conversora da angiotensina (ECA) originando a angiotensina II (Ang II). Uma vez ativada, a Ang II estimula os recetores angiotensinogénicos do tipo 1 e tipo 2 (AT1 e AT2), o que conduz a ativação da enzima NADPH oxidase na sua forma reduzida e outras oxidases na parede das células endoteliais [23] [24].

I.6. Diagnóstico da Hipertensão

I.6.1. Definição e Classificação da Hipertensão

Na população em geral, os valores das pressões arteriais sistólicas e diastólicas têm uma distribuição unimodal, contudo, na prática diária, os valores de corte da pressão arterial são universalmente utilizados, tanto para simplificar o método de diagnóstico, como também para facilitar a decisão sobre o tratamento [48]. Deste modo, a classificação recomendada pela sociedade portuguesa de hipertensão (SPH) com base nas *guidelines* de 2013 da sociedade europeia para hipertensão e da sociedade europeia de cardiologia (ESH/ESC), não foi alterada e é idêntica às *guidelines* de 2003 e 2007 (figura I.3) [25] [26].

Categoria	Sistólica		Diastólica
Ótima	<120	e	<80
Normal	120–129	e/ou	80–84
Normal alta	130–139	e/ou	85–89
Hipertensão de Grau 1	140–159	e/ou	90–99
Hipertensão de Grau 2	160–179	e/ou	100–109
Hipertensão de Grau 3	≥180	e/ou	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	e	<90

Figura I. 3. **Definições e classificações dos níveis de pressão arterial no consultório (mmHg).** A categoria da pressão arterial (PA) é definida pelo nível mais elevado de (PA), sistólica ou diastólica. A hipertensão sistólica isolada deve ser classificada de grau 1, 2 ou 3, de acordo com os valores da PAS nos intervalos indicados. Adaptado de [25].

A hipertensão é definida pelos valores > 140mmHg de pressão arterial sistólica e/ou > 90mmHg de pressão arterial diastólica, tendo como base evidências que, em pacientes com estes valores de pressão arterial, foi demonstrado que a redução da pressão arterial induzida pelo tratamento é benéfica.

Esta mesma classificação é adotada para indivíduos jovens, de meia-idade e idosos, enquanto critérios diferentes que têm por bases percentis, são adotados para crianças e adolescentes, uma vez que para estes até à altura da publicação destas diretrizes não existiam dados disponíveis de estudos de intervenção [27] [28].

I.6.2. Medição da Pressão Arterial

A medida indireta da pressão arterial é o método de escolha para o diagnóstico da hipertensão arterial e geralmente os valores obtidos contribuem para decisão terapêutica [29]. Na prática clínica, o diagnóstico é realizado utilizando-se o esfigmomanômetro (de mercúrio ou semiautomáticos) com recursos a métodos auscultatórios (com o estetoscópio), oscilométricos ou aparelhos eletrônicos quando devidamente validados [19] [25].

Quando há necessidade de uma maior precisão é utilizada a monitorização ambulatória da pressão arterial (MAPA). A MAPA é um método que permite o registo indireto e intermitente da pressão arterial durante 24 horas, enquanto o paciente realiza suas atividades habituais fora do consultório ou ambiente hospitalar, o que representa uma avaliação mais fidedigna da pressão arterial real do que a pressão arterial medida no consultório, uma vez que a PA obtida no consultório é geralmente mais elevada do que a PA ambulatória ou em casa e a diferença aumenta à medida que a PA do consultório aumenta. Assim, valores de corte são estabelecidos para definição da hipertensão em casa e para a pressão arterial ambulatória. [30] [31] [32]. Deste modo, para a avaliação inicial de um paciente que se suspeita que seja hipertenso, deve-se confirmar o diagnóstico correto da hipertensão, detetar causas de hipertensão secundária, avaliar o risco cardiovascular, lesões nos órgãos afetados e doenças clínicas concomitantes, sendo que para tal é fundamental para além da análise dos valores medidos da PA, investigar-se o historial clínico, bem como o familiar, exames físicos, investigações laboratoriais e outros testes de diagnóstico [25] [33].

I.7. Tratamento

Para a prevenção da hipertensão dever-se-á adotar medidas que integram hábitos de vida saudáveis. As recomendações não-farmacológicas que estão atualmente em vigor para o controle da pressão arterial alta constam nas *guidelines* dos Estados Unidos da América (EUA), Reino Unido (RU) e Europa [14] [34] [35]. Outra componente do tratamento é a componente farmacológica sendo que muitas *guidelines* incluindo as da ESH/ESC, recomendam a utilização de anti-hipertensivos em pacientes com hipertensão de grau 1 (figura I.4), mesmo na ausência de outros fatores de risco ou lesões em órgãos-alvo (LOA), desde que a mudança de hábitos de vida (tratamento não-farmacológico) não se tenha revelado satisfatória [25].

Outros fatores de risco, lesão assintomática de órgão ou doença	Pressão Arterial (mmHg)			
	Normal alta P AS 130–139 ou PAD 85–89	HTA Grau 1 PAS 140–159 ou PAD 90–99	HTA Grau 2 PAS 160–179 ou PAD 100–109	HTA Grau 3 PAS ≥180 ou PAD ≥110
Sem outros FR	• Sem intervenção na PA	• Mudanças de estilo de vida durante vários meses • Depois acrescentar fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida durante várias semanas • Depois acrescentar fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Acrescentar imediatamente fármacos anti-HTA para atingir <140/90
1–2 FR	• Mudanças de estilo de vida • Sem intervenção na PA	• Mudanças de estilo de vida durante várias semanas • Depois acrescentar fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida durante várias semanas • Depois acrescentar fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Acrescentar imediatamente fármacos anti-HTA para atingir <140/90
≥3 FR	• Mudanças de estilo de vida • Sem intervenção na PA	• Mudanças de estilo de vida durante várias semanas • Depois acrescentar fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Acrescentar imediatamente fármacos anti-HTA para atingir <140/90
LOA, DRC estágio 3 ou diabetes	• Mudanças de estilo de vida • Sem intervenção na PA	• Mudanças de estilo de vida • Fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Acrescentar imediatamente fármacos anti-HTA para atingir <140/90
DCV sintomática, DRC estágio ≥ 4 ou diabetes com LOA/FR	• Mudanças de estilo de vida • Sem intervenção na PA	• Mudanças de estilo de vida • Fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Fármacos anti-HTA para atingir <140/90	• Mudanças de estilo de vida • Acrescentar imediatamente fármacos anti-HTA para atingir <140/90

Figura I. 4. **Recomendações para o início de mudanças no estilo de vida e tratamento anti-hipertensivo.** CV (Cardiovascular); DCV (Doença Cardiovascular); DRC (Doença Renal Crônica); FR (Fator de Risco); HTA (Hipertensos); LOA (Lesões em Órgãos-alvo); PA (Pressão Arterial); PAD (Pressão Arterial Diastólica); PAS (Pressão Arterial Sistólica). *Na linha da PA normal alta, o tratamento com medicamentos deve ser considerado na presença de uma elevada PA fora do consultório (hipertensão mascarada). Adaptado de [25].

Os fármacos podem ser diuréticos, inibidores adrenérgicos, betabloqueadores, vasodilatadores arteriais diretos, bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas da angiotensina II [14] [19].

I.8. Fatores Genéticos Associados à Hipertensão Arterial

I.8.1. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás inorgânico e incolor. Por apresentar na sua estrutura um eletrão desemparelhado, torna-se um agente químico com uma reatividade muito elevada, tendo sido até meados dos anos 80 apenas considerado um poluente ambiental com potencial carcinogénico. Atualmente é uma das mais versáteis moléculas conhecidas, produzidas pelo organismo, sendo considerado um dos maiores reguladores do sistema cardiovascular, atuando como mediador em muitas reações biológicas. As funções do NO são diversas, dada a quantidade de processos biológicos em que está envolvido, sendo nos últimos anos alvo de diversos estudos. De entre as suas ações destaca-se o papel de vasodilatador, o de controlo da adesão dos elementos sanguíneos ao endotélio, diminuindo a permeabilidade vascular, uma vez que as células endoteliais desempenham um relevante papel no controlo do tónus ou da tonicidade cardiovascular, regulando a vasomotricidade, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, a atividade plaquetária e leucocitária. Entretanto, a sua quantificação, *in vivo*, é difícil devido à sua curta meia-vida (4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos), isto porque rapidamente oxida em nitrito e nitrato [36] [37] [38].

No final da década de 80, o interesse pelas funções fisiológicas do NO aumentou e as primeiras linhas de investigação sobre esta molécula tiveram origem nos trabalhos de Furchgott e Zawadzki [39] que propuseram que o relaxamento do músculo liso da aorta era secundário à libertação de uma substância vasodilatadora pelo endotélio. Estes autores chegaram à conclusão de que os vasos só relaxavam se estivessem íntegros, pois eram as próprias células endoteliais que produziam uma substância vasodilatadora, conhecida como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), verificando-se que a acetilcolina promovia o relaxamento dos vasos somente na presença do EDRF, através da interação com os recetores muscarínicos da célula endotelial. Posteriormente estes dois autores descobriram que se tratava do NO, o que foi comprovado por outros estudos realizados na mesma época. [40] [41] [42].

I.8.1.1. Biossíntese do Óxido Nítrico

No organismo o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina (substrato), por uma família de enzimas (isoladas, purificadas e identificadas em 1990), as *nitric oxide synthases* (NOS, Sintases do óxido nítrico) que convertem a L-arginina em NO e L-citrulina, necessitando da presença de dois co-substratos, o oxigénio e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH, dadora de eletrões) e cofatores como flavina adenina dinucleótido (FAD), a flavina mononucleótido (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH₄), figura I.5 [43] [44] [45].

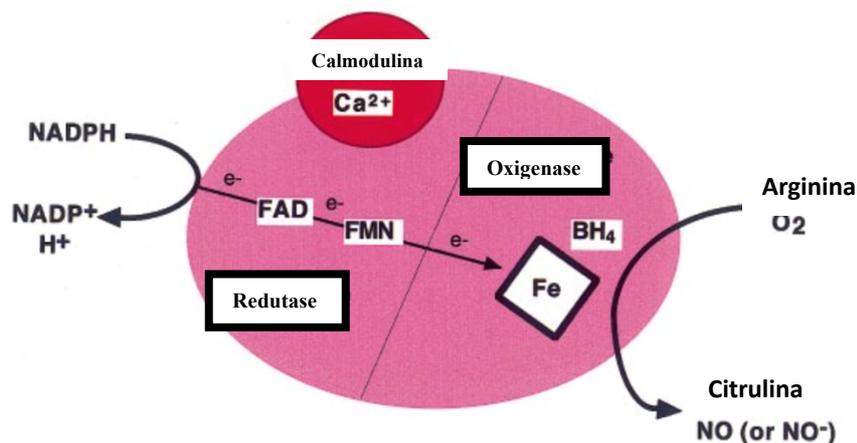


Figura I. 5. Ilustração do mecanismo de síntese do óxido nítrico no organismo, através da conversão da L-arginina em NO e L-citrulina na presença da NADH, FAD, FMN e BH₄. Adaptado de [38].

Existem três isoformas distintas da NOS (nomeadas tendo por base os tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas), que são codificadas por três diferentes genes que se localizam em cromossomas distintos (respetivamente 12, 17 e 7). Estas isoformas são classificadas como: isoforma I ou neuronal (nNOS ou NOS1), isoforma II ou induzível (iNOS ou NOS2) e isoforma III ou endotelial (eNOS ou NOS3). Também são agrupadas em duas categorias, a NOS induzível (iNOS) e a NOS constitutiva (c-NOS). Esta última é constituída pela nNOS e eNOS. Todas as isoformas apresentam uma estrutura com dois domínios, redutor e oxidante e com locais de ligação para o grupo heme, BH₄, FAD, FMN, NADPH e para a CaM (calmodulina) que se liga a L-arginina [46] [47] [48] [49] [50].

A nNOS é estimulada por N-metil-D-aspartato, insulina e trombina. É dependente do complexo cálcio-calmodulina. A iNOS é independente do complexo cálcio-calmodulina, não é habitualmente sintetizada/produzida no organismo e tem a sua expressão induzida e regulada por mediadores/citocinas

inflamatórios. A eNOS é a isoforma mais predominante, sendo responsável pela biossíntese e secreção contínua do NO na microcirculação, uma vez que, as células endoteliais a expressam constitutivamente. É estimulada por diversos fatores (acetilcolina, adenosina difosfato, trombina, fator de crescimento endotelial, alterações de forças no fluxo sanguíneo, etc.). A sua atividade é controlada pela concentração de cálcio livre intracelular e também pelo complexo cálcio-calmodulina [49] [50]. As isoformas constitutivas libertam pequenas quantidades (na ordem de nano ou picomoles) de NO em picos de curta duração. Em contraste, a isoforma induzível, após ser sintetizada, origina grandes e sustentadas quantidades (nanomoles) de NO [46] [51] [52].

I.8.1.2. Mecanismo de Ativação/Ação da Sintase Endotelial do Óxido Nítrico (eNOS)

O papel do óxido nítrico na regulação do tônus vascular e da função plaquetária é atribuído à atividade da eNOS. A eNOS apresenta o mecanismo mais elaborado/completo entre as três isoformas, o que reflete a complexidade do controlo fisiológico e regulação dos diferentes processos vasculares. A ativação da NOS e a consequente síntese pelas células endoteliais (eNOS) ocorre a partir de estímulos que podem ser químicos, provenientes da interação de compostos endógenos/exógenos com recetores específicos presentes nas células endoteliais (agonistas) ou por estímulos mecânicos provenientes da força que o sangue exerce ao nível da parede das artérias, denominada de força de cisalhamento do sangue (*shear stress*). A interação do agonista com o recetor, ou o *shear stress* na célula endotelial, promove a formação do inositol trifosfato (IP₃) a partir do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) e o diacilglicerol (DAG), o que induz a libertação de iões de cálcio do retículo endoplasmático, elevando os níveis de cálcio intracelular, formando desta forma, o complexo cálcio-calmodulina, o que conduz a fosforilação e ativação das enzimas NOS que irão atuar na L-arginina, levando a produção de NO pelo endotélio [41] [42] [45] [53].

Uma vez produzido o NO difunde-se rapidamente da célula endotelial para a musculatura lisa do vaso sanguíneo, isto porque, para além do pequeno tamanho e natureza lipofílica do NO, a eNOS encontra-se a nível da membrana da célula endotelial, o que promove a presença do NO próximo ao músculo da vasculatura e as células sanguíneas circulantes, permitindo uma maior e mais eficaz difusão para célula muscular ou para o lúmen vascular, sem a necessidade de canais ou de transportadores específicos. Ao nível da musculatura o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), tornando-a ativa (GCa) o que leva a formação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, a partir da guanosina trifosfato (GTP). A formação da GMPc leva a ativação de uma proteína da família das cinases G (acoplada a fosfolipase C), o que promove uma cascata de respostas que culmina com a diminuição da entrada de cálcio na célula e aumento da captura de cálcio ao nível do retículo endoplasmático - através de canais de cálcio tipo L (dependentes da voltagem) - promovendo assim a vasodilatação nas células musculares, isto porque a musculatura lisa não possui troponina (proteína reguladora existente na musculatura esquelética) que é ativada pelo iões de cálcio para promover a contração muscular, desta forma, a contração muscular ocorre por ação/combinção entre o cálcio e a calmodulina. Esta combinação ativa uma enzima fosforilativa (a miosina quinase), que tem por função fosforilar as cadeias leves de miosina, adquirindo capacidade de se fixar aos filamentos de actina e realizar a contração muscular. Neste sentido, a diminuição da concentração de cálcio impede a formação do complexo cálcio-calmodulina o que promove o relaxamento da musculatura lisa e a consequente vasodilatação (Figura I.6A) [41] [42] [45] [53].

O mecanismo pelo qual o NO é removido da GC após a vasodilatação ainda é desconhecido, mas sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase. Atualmente pensa-se que o motivo Serina-prolina (Ser/Thr-Pro) também possa estar

envolvido no mecanismo que regula a produção de NO pela eNOS através da interação com a proteína Pin1 [40] [51] [54]. Para além do aumento da concentração citoplasmática de cálcio e a fosforilação do aminoácido Serina na posição 1177, acredita-se que a eNOS pode também ser ativada pela via esfingolipídica [54].

I.8.1.3. Óxido Nítrico e a Disfunção Endotelial

Para além do NO são numerosas as moléculas que são sintetizadas ao nível do endotélio (células de adesão vascular, VEGF, TGF- β , t-PA) indicando uma multiplicidade funcional. O endotélio modula ativamente a manutenção da homeostase vascular, exercendo importante influência autócrina, parácrina e endógena, atuando localmente em células musculares lisas, plaquetas e leucócitos [51] [55] [56]. Neste contexto, a perda da integridade endotelial é um dos critérios para considerar uma placa vulnerável, isto porque desarranjos no metabolismo ou nos processos regulatórios do endotélio são associados a fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares. Tendo se verificado que, nas situações em que ocorre diminuição da expressão de eNOS e conseqüentemente diminuição dos níveis basais de NO, levando a formação do peroxinitrito (ONOO^- , figura I.6), instala-se um fenómeno que conduz a perda de integridade do endotélio (disfunção endotelial, figura I.6B). Este fenómeno promove uma maior produção de substâncias vasoconstritoras (como a angiotensina II, catecolaminas, tromboxanos, leucotrienos, endotelina) e conseqüentemente elevação da pressão arterial, o que intensifica as forças de cisalhamento do sangue. Quando este processo afeta os vasos pulmonares, ocorre uma série de alterações presentes em algumas condições patológicas, dentre elas a hipertensão [45] [47] [57] [58] [59].

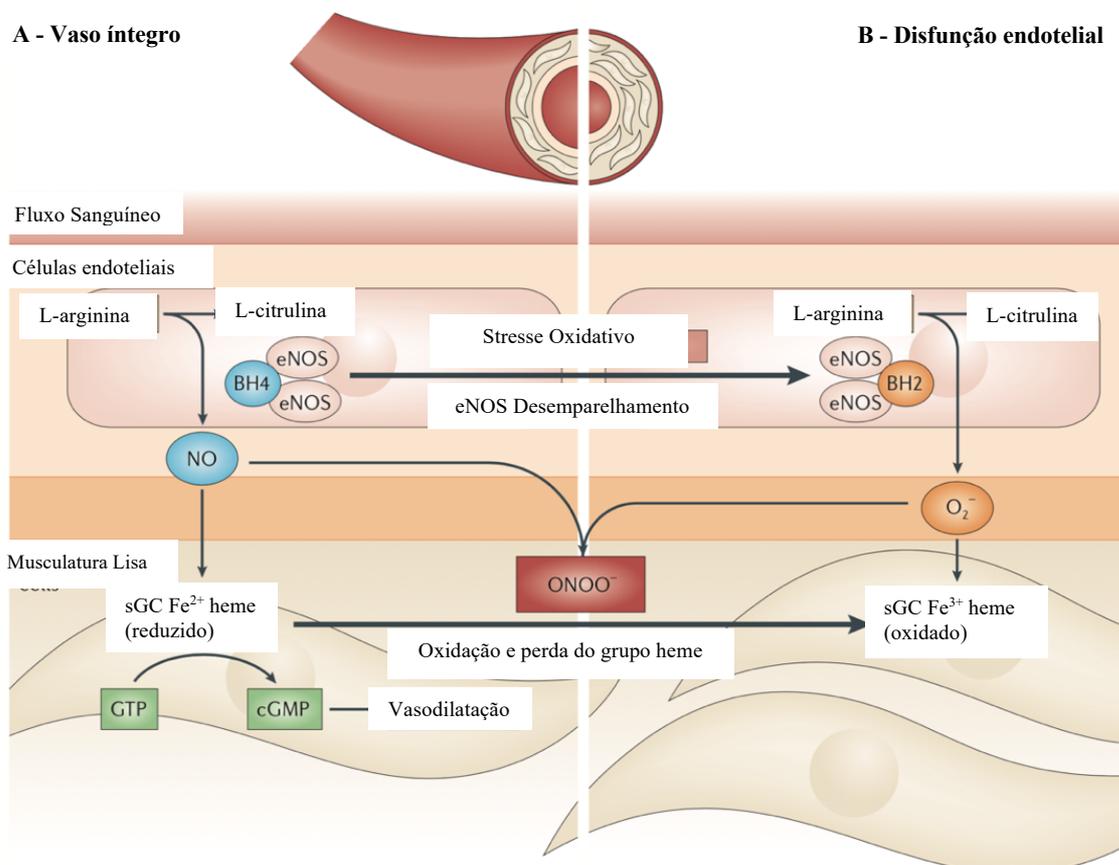


Figura I. 6. Disfunção endotelial e a sinalização do óxido nítrico vascular. Adaptado de [58].

I.8.1.4. Stress Oxidativo e a Biodisponibilidade do Óxido Nítrico

A redução dos níveis basais de NO está geralmente associado aos diversos fatores de risco que estão na base do desenvolvimento das doenças cardiovasculares como a hipertensão [93]. No entanto, inúmeros estudos demonstram que uma exposição elevada de ROS, resultante do desequilíbrio do estado redox (redução-oxidação) celular, desencadeia um processo comumente conhecido como stress oxidativo (presença em excesso de agentes oxidantes), que é considerado um dos principais, senão o principal mecanismo de redução da biodisponibilidade do NO. Isto porque para além de serem biomoléculas altamente reativas, possuem uma elevada afinidade para a molécula de NO inativando-o rapidamente. Desta forma o cofator BH₄ (dependente do sistema redox) desempenha um papel fundamental na regulação da atividade da eNOS, promovendo e estabilizando a estrutura em forma de dímero da eNOS, bem como, a ligação da L-arginina ao seu grupo heme catalítico. Quando a disponibilidade deste cofator está limitada a sua forma oxidada (dihidrobiopterina, BH₂), há um desemparelhamento da eNOS e dos eletrões do NADPH na L-arginina oxidada, o que promove o surgimento de ROS em vez de NO, e consequentemente diminuição da quantidade de NO disponível. É importante salientar que a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-ox), ao nível do endotélio, induzem também a formação do peroxinitrito por processos que levam a oxidação da BH₄ para BH₂ [15] [41] [42] [58].

O impedimento da formação do peroxinitrito que conduzirá a diminuição da incidência de qualquer disfunção endotelial pode ser alcançada através do aumento de antioxidantes, que podem ser químicos (glutaciona, vitaminas C e os β-carotenos) e enzimáticos (superóxido dismutase). Diversos estudos apontam o uso desta enzima (superóxido dismutase) como promissora para combate da disfunção endotelial induzida pelo aumento de ROS, isto porque, esta enzima apresenta também uma alta afinidade com os radicais livres de oxigénio e a reação entre estes dois compostos impediria a formação do peroxinitrito (levando ao aumento da biodisponibilidade do NO) [15] [41] [42] [58]. Desta forma, o aumento da atividade da superóxido dismutase não apenas contribui com o aumento da biodisponibilidade do NO (permitindo a vasodilatação e relaxamento do músculo) como também para o aumento do estímulo para a síntese do NO, fomentando conjuntamente com outros processos e estratégias terapêuticas, uma maior diminuição da incidência de indivíduos hipertensivos. Neste sentido, vários estudos mostram que a atividade física desempenha um papel importante no controle cardiovascular por ser um dos principais estímulos para o aumento da atividade do superóxido dismutase através do *shear stress* [41] [42] [58] [60].

I.8.1.5. Óxido Nítrico e a Vasoproteção

Grande parte da atividade da eNOS no sistema circulatório, é exercida ao longo das artérias, veias e capilares do miocárdio. Uma vez que em situações de perda da integridade do endotélio, as células endoteliais promovem a vasoconstrição e a proliferação de células musculares lisas, através de substâncias vasoconstritoras (tromboxano, endotelina-1), o NO resultante da eNOS parece ter um papel crucial na proteção dos vasos sanguíneos. Este irá atuar ao nível das células musculares ou no lúmen vascular, sendo esta ação associada a manutenção da tonicidade vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, efeito antiproliferativo e efeito antioxidativo [21] [40] [46] [61].

I.8.1.6. O Gene da Sintase do Óxido Nítrico Endotelial e suas Variantes

O gene *NOS3* é responsável pela síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS) e está localizado no cromossoma 7q35-7q36 com um comprimento genômico de 4,4kb. É constituído por 25 intrões e 26 exões que codificam para uma proteína contendo 1203 aminoácidos, com um peso molecular de 135kDa [62]. Desde que foi sequenciado pela primeira vez em 1990, muitas variantes deste gene (figura I.7) têm sido descritas/identificadas (na região promotora, em exões e intrões) e avaliadas quanto ao grau de associação a diferentes perturbações cardiovasculares. Alguns estudos têm associado a presença de polimorfismos (*single nucleotide polymorphism*, *variable number of tandem repeats*, etc.) neste gene com a gênese da hipertensão arterial. Entre estes polimorfismos, alguns têm suscitado um maior enfoque, como o polimorfismo do intrão 4 caracterizado por um número variável de repetições em tandem (VNTR) [63] [64] [65] [66].

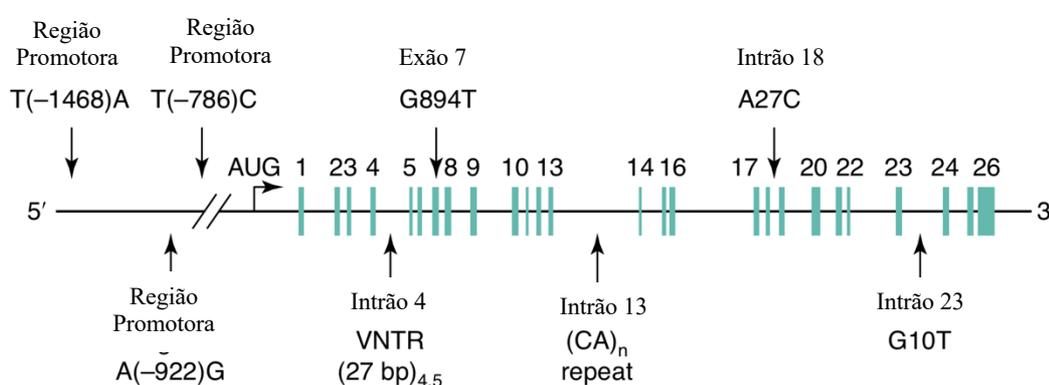


Figura I. 7. Representação esquemática das diferentes variantes alélicas do gene *NOS3*. Adaptado de [102].

No entanto, o SNP localizado no exão 7 do gene *NOS3* (rs179983), caracterizado por uma substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) levando a formação do ácido aspártico (alelo mais raro) em vez do ácido glutâmico (alelo mais comum) no aminoácido 298 da sequência proteica (variante Glu298Asp) e o SNP (rs2070744) localizado na região promotora do gene levando a substituição de uma timina (T) para uma citosina (C), têm sido muito analisados em estudos associados a hipertensão, pois têm como consequência, respetivamente, a diminuição da disponibilidade de NO através da redução da atividade transcricional (rs2070744) e interferência na ligação da eNOS à caveolina (rs179983) [62] [63] [64] [65].

I.8.1.7. Polimorfismos do Intrão 4 (VNTR) do Gene *NOS3*

Para o intrão 4 do gene *NOS3* foram identificados (inicialmente) dois alelos: o maior alelo (4b, o mais frequente), consiste em cinco repetições em *tandem* - da sequência GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/G)GGGGTGAG - sendo que as três primeiras repetições apresentam uma adenina e as duas últimas apresentam uma guanina na posição 19 da repetição (A/G). O menor alelo (4a, o menos frequente) - consiste em apenas quatro repetições em *tandem*, apresentando nas duas primeiras repetições uma adenina e nas últimas duas uma guanina [62] [63] [64].

O alelo 4a é associado a baixos níveis de nitrito/nitrato plasmáticos, sendo que indivíduos homocigóticos para esse alelo exibem uma redução de 20% na concentração dos compostos do NO quando comparados com indivíduos com genótipos 4b/4b, assim como a diminuição na expressão

proteica da eNOS [67]. Posteriormente, outras variantes polimórficas do intrão 4 foram descritas como a 4c e 4d (respetivamente com 6 e 7 repetições), mas apresentado uma frequência muito baixa [68].

I.8.2. Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)

A G6PD é uma enzima citoplasmática, existente em todas as células do organismo humano, mas apesar desta ampla distribuição é no metabolismo das hemácias que esta enzima apresenta uma função primordial. É responsável pela catálise da primeira etapa da via metabólica da hexose-monofosfato- que irá atuar no primeiro passo do ciclo das hexoses, participando na produção de NADPH. Esta via é responsável pelo catabolismo de apenas 10% do total de glicose consumida pelas hemácias, o que torna evidente não ser esta a via essencial no catabolismo da glicose como forma de obtenção de energia. [69] [70] [71]. Deste modo, o seu papel fundamental é a formação de NADPH, molécula que para além de ser um dador de eletrões de excelência para a biossíntese de diferentes processos, é essencial para a proteção das hemácias contra a ação de agentes oxidantes de origem endógena (peróxidos orgânicos, resultantes da formação da metahemoglobina) e exógena (fármacos, alimentos, elementos atmosféricos). Mantendo-se assim a integridade, estabilidade e viabilidade das hemácias e de outras proteínas celulares [72] [73].

A G6PD é desta forma, uma enzima *housekeeping* importante para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas da membrana das hemácias, sendo um dos processos biológicos para o controle da oxidação celular. Como já referido, a atividade enzimática da G6PD origina o NADPH, o qual, por sua vez, está estreitamente relacionado com o metabolismo da glutatona, mantendo esta no seu estado reduzido (GSH) o que permitirá restaurar a hemoglobina para a sua forma solúvel. O NADPH formado irá atuar no ciclo da glutatona, uma vez que, a eliminação do peróxido de hidrogénio para molécula de água é efetivada pelo glutatona peroxidase (GSHP): uma molécula de glutatona (GSH) é oxidada para GSSG (dissulfeto de glutatona), por cada molécula de peróxido de hidrogénio eliminada. Assim, a glutatona só pode desempenhar o seu papel funcional se for continuamente regenerado (de GSSG para GSH). Esta regeneração apenas pode ser efetuada nas hemácias, pela glutatona redutase (GSSGR), através do NADPH, sendo originado pela redução do NADP, por ação da G6PD e do *Shunt* de hexoses-monofosfato [69] [74] [75].

A glutatona é um fator chave em todas as células do organismo para a preservação dos grupos sulfidril de numerosas proteínas e para preservação das células em geral contra os danos oxidativos. Esta função é particularmente pertinente ao nível das hemácias dada a ação oxidativa dos radicais livres de oxigénio, produzidos em grandes quantidades nestas células [71].

I.8.2.1. Atividade Reduzida da Molécula de Glicose-6-fosfato-desidrogenase

A deficiente ou reduzida atividade da G6PD é provavelmente a patologia enzimática clinicamente significativa mais frequente a nível mundial, estimando-se que existem mais de 400 milhões de pessoas afetadas por esta enzimopatia. A atividade reduzida desta enzima pode ocorrer por deleções ou mutações [73] [76]. De acordo a variante alélica da G6PD, podemos ter uma variação entre os 10 e 60% da atividade normal da enzima. A prevalência em Portugal é baixa, calculando-se ser de 0,51% [69]. As frequências mais elevadas são detetadas em África, na Asia, na região do Mediterrâneo, no Médio Oriente, bem como, no Norte e Sul da América e nos países do Nordeste da Europa devido as recentes migrações, mas observa-se que os valores de prevalência mais elevados surgem em regiões que são ou foram endémicas para a malária, uma vez que estudos mostram que há uma vantagem seletiva

heterozigótica por conferir proteção a esta patologia. Mais 370 variantes da G6PD foram descritas, tendo como base a caracterização bioquímica, mas atualmente e através do uso de técnicas moleculares, aproximadamente mais de 140 mutações diferentes para a G6PD foram identificadas, sugerindo uma heterogeneidade genética [70] [74] [77] [78].

A necessidade da atividade normal da G6PD ao nível das hemácias para assegurar níveis suficientes de NADPH e glutatona reduzida fica provado pelo facto de indivíduos portadores de variantes com atividade reduzida sofrerem de episódios de hemólise intravascular (de intensidade variável) por ação de fármacos (anti-maláricos, sulfonamidas e sulfonas, nitrofuranos, acetanilida, aspirina) de alimentos (leguminosa *Vicia faba*, enlatados enriquecidos com nitritos) e por fatores do meio ambiente (nitritos voláteis, naftalina, azul de toluidina, etc.). Isto porque as hemácias que possuem moléculas da G6PD com atividade reduzida, nelas há uma diminuição do potencial redutor por diminuição da redução do NADP em NADPH, o que interfere com a capacidade metabólica oxidativa das hemácias (não conseguindo eliminar o peróxido de hidrogénio formado e as ROS), tornando-se desta forma vulnerável a hemólise por não proteger os grupos sulfidrilos da hemoglobina, o que possibilita a formação de corpúsculos de *Heinz*, e crises hemolíticas [73] [74] [79].

I.8.2.2 Estrutura Genética da G6PD

O gene determinante da G6PD (*Gd*) está localizado na região telomérica do braço longo do cromossoma X (banda Xq28), figura I.8. O gene foi clonado em 1986 e consiste em 13 exões e 12 intrões abrangido cerca de 20kb no total. A estrutura cristalina da G6PD nos seres humanos consiste num monómero de 515 aminoácidos com um peso molecular de 59kDa, tendo sido publicado em 1992 um modelo tridimensional da estrutura desta enzima. Na sua forma enzimaticamente ativa a G6PD é um dímero ou tetrâmero de uma só unidade polipeptídica, num equilíbrio dependente do pH. Cada monómero está constituído por dois domínios: um primeiro domínio N-terminal (aminoácidos 27-200) com um local de ligação dinucleótido β - α - β (aminoácidos 38-44) e um segundo e maior domínio (β + α) que consiste numa folha beta antiparalela de nove cadeias polipeptídicas. Os dois domínios apresentam-se ligados por uma hélice α , que contém um resíduo peptídico de 8 aminoácidos (que tem sido conservado ao longo do processo evolutivo) funcionando como local de ligação do substrato (aminoácidos 198-206). Para o normal funcionamento da G6PD é necessário a estabilização da ativa estrutura quaternária da proteína e tal é conseguido através dos locais de ligação para o NADP e G6P, isto porque, a G6PD possui um local de ligação alostérico para o NADP que funciona para manter a estabilidade e conformação ativa da proteína [70] [80] [81].

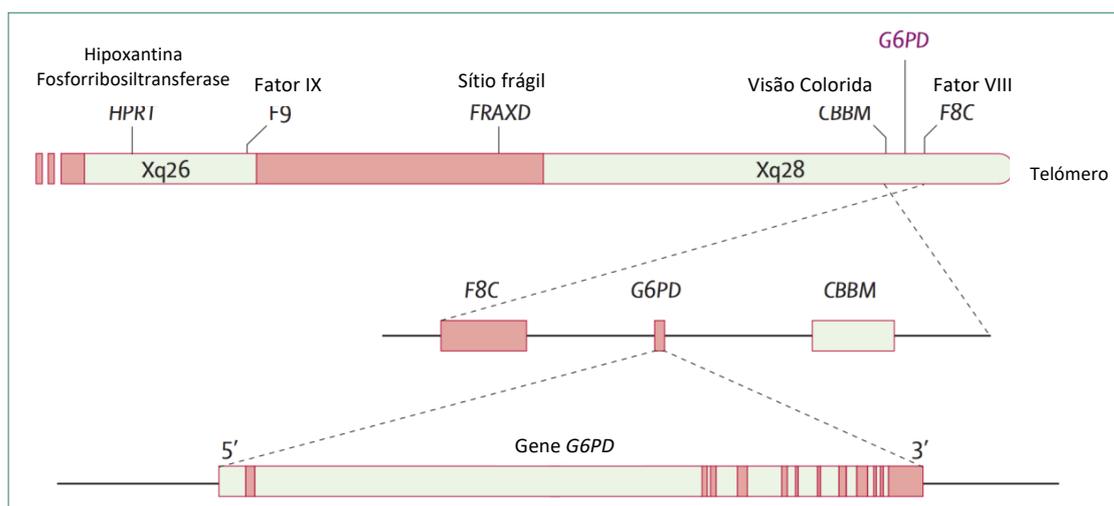


Figura I. 8. Localização do gene da G6PD. Adaptado de [70].

A localização do gene *Gd* tem duas consequências importantes, uma vez que as mutações do gene *Gd* mostram um comportamento típico da herança ligada ao sexo e como resultado da inativação do cromossoma X, as mulheres heterozigóticas (para dois alelos) exibem mosaicismos somáticos, ou seja, se um dos alelos apresenta atividade enzimática reduzida, existirão células Gd⁺ e células Gd⁻ (as primeiras com atividade enzimática normal e as últimas com atividade enzimática reduzida). Os homens podem ser hemizigóticos normais (Gd⁺) ou hemizigóticos deficientes (Gd⁻), e em relação as mulheres, elas podem ser normais (Gd⁺/Gd⁺), deficientes homozigóticas (Gd⁻/Gd⁻) ou deficientes heterozigóticas (Gd⁺/Gd⁻) [69].

I.8.2.3. Variantes Alélicas da G6PD

As diversas mutações no gene *Gd* (afetando a sequência codificante), resultam em diferentes variantes proteicas com níveis de atividade enzimática variáveis associados a um largo gradiente de fenótipos bioquímicos e clínicos. Verifica-se que a maior parte das mutações geram substituições de aminoácidos. As variantes mais frequentes são as Mediterrânicas (forma grave), Africanas A⁻ (A menos, forma moderada), Mahidol (forma moderada) e Canton (forma grave no sudeste asiático). Neste gene, a variante B corresponde ao alelo normal. Estudos mostram que a variante A⁻ é mais prevalente em África por estar associada a redução do risco de contrair uma forma mais severa de malária, 46% para os homens e 58% para as mulheres [69] [70] [74].

A organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as diferentes variantes da G6PD (em cinco classes, I a V) de acordo com a atividade enzimática e a severidade da hemólise. A classe IV e a classe V não têm significado clínico [82].

A variante A⁺ (mutação 376 A > G no exão 5, rs1050829), é uma variante polimórfica (Classe IV), apresentando uma atividade normal ou medianamente reduzida (cerca de 85 % da atividade normal) e é encontrada em 20 % dos indivíduos de ascendência africana [82] [83].

I.8.2.4 G6PD, Óxido Nítrico e a Hipertensão

Enzimas da G6PD com atividade reduzida diminuem a capacidade antioxidativa miocárdial, sendo que estudos mostram que isto poderá exacerbar os efeitos adversos provocados pelo stress oxidativo agudo. Foi observado num estudo, que em ratos selvagens com lesões isquémicas-reperusão agudas, havia um aumento da atividade da G6PD, enquanto que ratos que apresentavam enzimas com atividade reduzida da G6PD e conseqüentemente com capacidade antioxidante miocárdial reduzida, o miocárdio não conseguia de maneira eficiente compensar o aumento do stress oxidativo observado pela diminuição do rácio GSH/GSSG ao nível do coração. Foi verificado que apenas recorrendo a um tratamento antioxidativo e não através de suplementação com ribose, foi possível contrariar os efeitos adversos provocados pela stress oxidativo agudo, o que permitiu demonstrar que o problema estava relacionado com os mecanismos de defesa antioxidantes e não com a deficiência em ribose. Deste modo, moléculas da G6PD que apresentem atividade reduzida - aumentam a sensibilidade do miocárdio para ROS, o que conduz a uma exacerbação da disfunção contráctil na região do dano oxidativo [72] [77] [84] [85] [86] [87].

Neste contexto, o efeito pro e antioxidante da G6PD desempenha um papel importante na reatividade vascular e no equilíbrio vascular homeostático-redox, isto porque, para a síntese do NO é necessário NADPH como cofator, e a principal fonte do NADPH nas hemácias é a via das pentoses fosfato, cujo passo limitante é catalisado pela G6PD, conseqüentemente, mudanças na atividade desta enzima afetam a produção de NADPH, o que leva a diminuição da produção do NO. Para além do NADPH atuar como cofator para síntese do NO, também fornece poder redutor para eliminação de radicais hidroxilo que inativam o NO, ou seja, ao nível do endotélio vascular, moléculas da G6PD com atividade enzimática reduzida aumentam o stress oxidativo, o que reduz a biodisponibilidade do NO. Tanto estudos *ex-vivo* (ao nível de células da artéria coronária endotelial de seres humanos) como estudos *in vivo* (ratinhos) foi possível observar que esta redução ocorre por diminuição do rácio GSH/GSSG, provocado pelo aumento do stress oxidativo. Sendo que o possível mecanismo que relaciona a G6PD e a hipertensão esteja relacionado com o facto de que deficiências na atividade desta enzima devido a mutações, conduzam a redução da biodisponibilidade de NO o que poderá conduzir a disfunção vascular endotelial e conseqüentemente a hipertensão [72] [77] [84] [85] [86] [87].

I.8.3. Alfa-Globina e Alfa-Talassémia

I.8.3.1. A Hemoglobina e a sua Estrutura

A Hb é uma proteína tetramérica com cerca de 64000 Daltons, formada por dois pares de cadeia globínicas, duas do tipo α e duas do tipo β , sendo que cada uma está associada a um grupo heme, que consiste num anel tetrapirrólico (C_4H_4NH) de protoporfirina IX, contendo um átomo de ferro central no estado reduzido (Fe^{2+}). A este liga-se de forma reversível à molécula de oxigénio que é assim transportada dos pulmões aos tecidos. As cadeias α são constituídas por 141 aminoácidos e as cadeias do tipo β por 146. Observa-se que certos aminoácidos das globinas se encontram em zonas da molécula com particular importância, contribuindo desta forma decisivamente para a sua estabilidade e funcionalidade [88] [89] [90] [91].

Os genes das globinas humanas encontram-se localizados em dois agrupamentos génicos (*clusters*) presentes em cromossomas diferentes, sendo que, orientados da extremidade 5' para extremidade 3' temos as globinas do tipo α situadas próximas à extremidade do braço curto do

cromossoma 16 (16p13.3) e as do tipo β encontram-se numa região de aproximadamente 70kb (kilobases) no braço curto do cromossoma 11. Todos os genes globínicos apresentam uma organização do ponto de vista estrutural semelhante, ou seja, possuem três exões separados por dois intrões, sendo que o segundo exão codifica as zonas de ligação ao grupo heme (incluindo a bolsa apolar) e o terceiro exão é responsável pelos contactos das zonas α e não- α . Os genes globínicos estão sujeitas ao controle de sequências reguladoras, localizadas a alguma distância no sentido 5' da sequência, denominadas por LCR (*locus control region* ou regiões de controlo do *locus*) [89] [92] [93] [94] [95] [96].

A estrutura normal e funcional de uma molécula adulta de Hb, consiste em um par de subunidades α e β ($\alpha_2\beta_2$), designada por Hb A (97%). Existem ainda no adulto outros dois tipos de hemoglobina presentes: a Hb A₂, que representa cerca de 2% do total e é constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias delta ($\alpha_2\delta_2$), e uma fração residual (<1%) de hemoglobina fetal (Hb F), constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) [97].

I.8.3.2. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias fazem parte das doenças monogénicas mais conhecidas a nível mundial e estima-se que afetem cerca de 7% da população mundial, observando-se que a sua distribuição é extremamente heterogénea, existindo grandes diferenças entre países e inclusive entre regiões que do ponto de vista geográfico estejam próximas. Apresentavam uma maior prevalência em regiões tropicais, mas devido aos processos migratórios ao longo dos séculos, existem hoje em todo o mundo [98] [99] [100] [101]. Estima-se que a frequência de portadores em Portugal ronde os 0,5 – 1% da população total, chegando aos 5% na população de imigrantes [102].

I.8.3.3. Alfa-Talassémia

As talassémias apresentam como principal característica o desequilíbrio na síntese de determinado tipo de cadeia globínica, tendo como consequência uma síntese deficiente de hemoglobina, o que resulta em hemácias microcíticas e hipocrómicas e danos nas hemácias e nos seus precursores, devido ao excedente das subunidades dos outros tipos de globina que são sintetizadas. São classificadas de acordo com o tipo de cadeia cuja síntese se encontra afetada, sendo que as talassémias α e β são as que apresentam maior frequência e importância do ponto de vista clínico. Estima-se que a prevalência das variantes/mutações talassémicas possa variar entre os 10 e 20% em algumas regiões do continente africano, mais do que 40% em algumas regiões da China e do Sudeste Asiático e chegar até aos 80% no norte da Índia e na Papua Nova Guiné [103] [104] [105] [106] [107].

A α -talassémia é uma anemia hereditária de transmissão autossómica recessiva e é das doenças genéticas mais prevalentes a nível mundial. A incidência na população Portuguesa de portadores de α -talassémia foi estimada em 7% [108].

A cadeia da α -globina é codificada por dois genes localizados no cromossoma 16 (16p13.3): *HBA2* e *HBA1* [88]. A α -talassémia é causada pela produção reduzida ou ausente das cadeias de α -globina. O principal mecanismo molecular das α -talassémias consiste em deleções que removem um ou ambos os genes que codificam as cadeias α [109]. Estas cadeias α são compartilhadas tanto pelas hemoglobinas do indivíduo adulto (Hb A₁ e Hb A₂) como pela fetal (Hb F). Como consequência, a síntese deficiente de cadeias alfa é refletida em ambas as fases do desenvolvimento: no feto, observa-se que a síntese reduzida destas cadeias provoca um excesso na produção de cadeias γ que tendem a

tetramerizar (γ_4) conduzindo ao surgimento da Hb Bart's, no adulto, as cadeias beta que se encontram em excesso tendem a tetramerizar (β_4), dando origem a Hb H [110] [111]. Quando a síntese de uma globina é afetada/reduzida em pelo menos 25% dos valores normais, os pacientes acabam por desenvolver uma anemia hemolítica moderadamente grave [112].

Uma vez que existem dois genes alfa por genoma haploide, sendo quatro numa célula diploide normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), as α -talassémias são classificadas (genericamente) em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$) conforme o número de genes comprometidos/afetados no cromossoma [113]. Verifica-se que as formas mais frequentes de talassémia α^+ envolvem a deleção de um dos genes alfa e são provocadas fundamentalmente pelas deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$ [114] [115]. O grau elevado de homologia entre os subsegmentos duplicados no braço curto do cromossoma 16 proporciona emparelhamentos incorretos dos cromossomas durante a meiose o que conduz a uma recombinação desigual o que poderá resultar na deleção de um gene em um dos cromossomas ($-\alpha$) e na presença de genes triplicados no outro cromossoma ($\alpha\alpha\alpha$). Os genes α_1 e α_2 estão dentro de uma região homóloga de 4kb de comprimento, onde cada região é dividida em três subsegmentos homólogos, que se denominam por X, Y e Z, sendo separados por três segmentos que não apresentam homologia, denominados por I, II, III. Os segmentos duplicados Z distam entre si 3,7kb, desta forma, se o processo de recombinação acontecer entre os segmentos homólogos Z, os 3,7kb de DNA serão removidos, dando origem à deleção mais frequente no mundo, a $-\alpha^{3,7}$, referida também como a deleção à direita (*rightward deletion*). O resultado desta deleção é um gene α híbrido ($\alpha_2\alpha_1$) que corresponde à região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 (figura I.9) [95] [111] [116] [117].

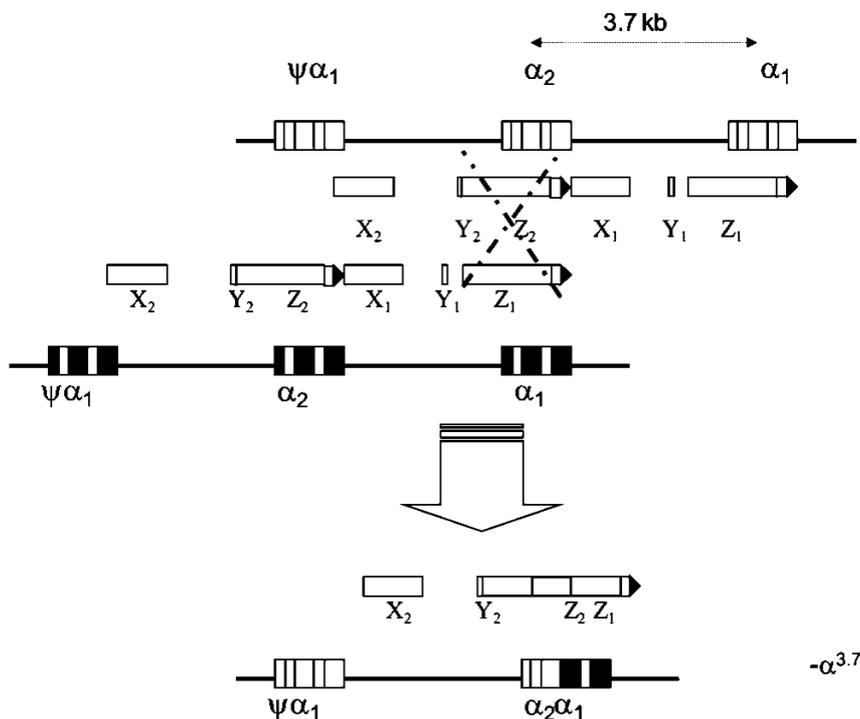


Figura I. 9. Ilustração representativa do mecanismo de recombinação desigual que conduz ao surgimento da deleção $-\alpha^{3,7}$. Adaptado de [117].

A base genética na origem da α -talassémia em pessoas de ascendência Africana (incluindo a população Portuguesa) é, geralmente, a heterozigotia ou homozigotia para a deleção $-\alpha^{3,7}$ [88]. A forma homozigótica para essa deleção ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$) poderá ter no período neonatal cerca de 5-10% de Hb

Bart's. Na fase adulta apresenta anemia microcitose, hipocromia e ferro sérico normal. Na forma heterozigótica os indivíduos podem ter 1-2% de Hb Bart's no período neonatal e na vida adulta podem apresentar ligeira hipocromia ou ser perfeitamente normal. Estes indivíduos somente podem ser diagnósticos por via de técnicas de biologia molecular ou pela medida da síntese das cadeias α/β . [118].

1.8.3.5. Alfa-Talassémia, Óxido Nítrico e a Hipertensão

A molécula de hemoglobina, para além do seu papel principal de transporte de oxigénio, também reage especificamente com o dióxido de carbono, monóxido de carbono (CO) e com o NO. Esta diversidade de funções não ligadas ao transporte da molécula de oxigénio tem sido cada vez mais analisada, especialmente a interação NO/hemoglobina. Este facto deve-se ao conhecimento que o NO possui uma elevada afinidade pela Hb e também por o NO ser uma molécula sinalizadora produzida pelas células, estando envolvida na regulação do tónus vascular, interações celulares e funções neurais [98]. Assim, é sabido que o principal papel da α -globina é, conjuntamente com as cadeias da β -globina, formar a molécula de hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$) nos precursores dos glóbulos vermelhos, tendo esta molécula a função primordial de transportar o oxigénio no organismo. No entanto, estudos recentes demonstraram que a α -globina, para além de ser expressa em alto nível nos glóbulos vermelhos, é também expressa nas células endoteliais das artérias e enriquecida ao nível das junções mieloendoteliais (MJEs), sendo co-localizada ao nível destas junções com a eNOS [119] [123]. As MJEs providenciam um microambiente distinto na interface entre a musculatura lisa e o endotélio, onde muitas proteínas são localizadas e enriquecidas para posteriormente atuarem em diferentes processos ao nível da parede arterial dos vasos sanguíneos, observando-se que a eNOS é polarizada ao longo destas junções. Nestas junções foi sugerido um potencial mecanismo de interação proteína-proteína entre a α -globina e a eNOS uma vez que formam um complexo macromolecular que poderá regular os efeitos do NO na reatividade vascular atuando de modo a balancear os processos de constrição com os processos de relaxamento de modo a assegurar a tonicidade vascular, que é maior em doentes hipertensos. Recentemente, foi verificado que a inativação da síntese da α -globina endotelial em artérias isoladas usando siRNA (*small interfering RNA*), conduziu a um aumento da difusão do NO ao longo da parede arterial. A interação entre a α -globina e a eNOS foi identificada na região com a seguinte sequência de aminoácidos "LSFPTTKTYFPHFDLSHGSA" da α -globina [38]. Esta sequência é codificada por parte do exão 2 dos respetivos genes *HBA* [53] [119] [120] [121] [122] [123]. Assim, parece haver a possibilidade de variantes da hemoglobina que possam existir devido a alterações nestes aminoácidos perturbem a referida interação entre a α -globina e a eNOS.

Por outro lado, foi também sugerido que a α -globina poderá regular a biodisponibilidade do NO através do estado de oxidação do grupo heme. Mecanicamente o grupo heme da α -globina com o ferro na forma oxidada Fe^{3+} (metHb, metahemoglobina) permite a sinalização do NO porque a taxa de dissociação do NO da metHb é bastante rápida, contudo este sinal é inibido quando o ferro é reduzido para forma Fe^{2+} pelo citocromo b5 redutase 3 (cytb5r3) endotelial (figura 1.10). Esta reação acontece porque o NO tem uma elevada afinidade pelo ferro na sua forma reduzida reagindo rapidamente com o mesmo e com a molécula de oxigénio acoplada (oxi-hemoglobina), numa reação conhecida como desoxigenação [121] [122] [123]. Deste modo, mutações pontuais ou deleções nos genes da α -globina, como o caso da deleção $-\alpha 3,7kb$, poderão exercer um papel importante na regulação do NO, e consequentemente na hipertensão [123].

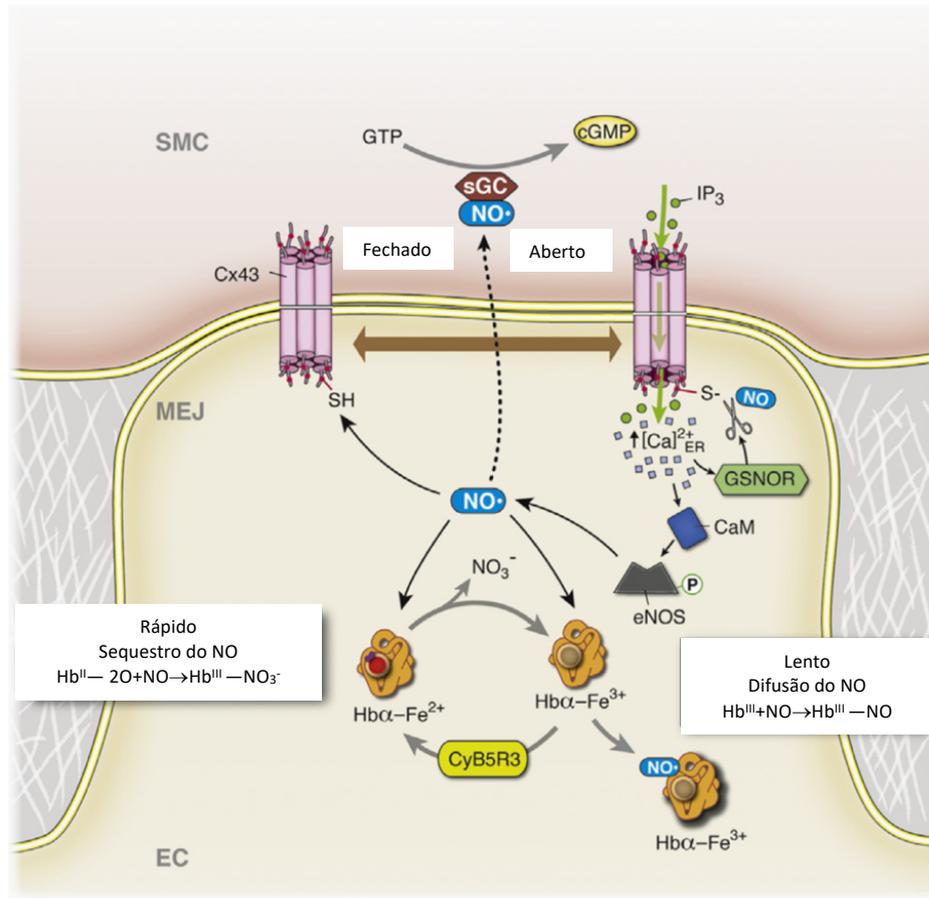


Figura I. 10. Mecanismo de regulação do NO ao nível das junções mioendoteliais através da α -globina. MEJ (junções mioendoteliais, EC (células endoteliais) SMC (células da musculatura lisa). Adaptado de [123].

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a suscetibilidade genética para a hipertensão na população portuguesa.

Mais especificamente pretende-se testar a associação de variantes nos genes *NOS3*, *HBA* e *G6PD* com a hipertensão arterial (fenótipo distante) e com potenciais fatores de risco (fenótipos intermédios), nomeadamente o Índice de Massa Corporal (IMC), a idade, o sexo, a glicémia, triglicéridos e outros fatores de risco.

Os estudos moleculares envolvem a pesquisa:

- ↪ Do polimorfismo de inserção/deleção no intrão 4 do gene *NOS3*, caracterizado por um número de repetições em *tandem* (VNTR);
- ↪ Da variante A⁺ (rs1050829) no exão 5 do gene da *G6PD*;
- ↪ Da deleção de 3,7kb do agrupamento génico da α -globina;
- ↪ De variantes polimórficas no exão 2 nos genes *HBA1* e *HBA2*.

III. METODOLOGIA

III.1. Amostra

Neste trabalho foram analisadas amostras (anonimizadas) de sangue periférico de 377 indivíduos portugueses (entre os 19 e 98 anos) dos quais 227 são do sexo feminino e 144 do sexo masculino, sendo 243 hipertensos (150 mulheres e 93 homens) e 134 (84 mulheres e 50 homens) normotensos (população controlo). Foram ainda analisadas 22 amostras de uma população africana não hipertensa (Moçambique), sendo 15 indivíduos do sexo feminino e 6 do sexo masculino. As amostras foram recolhidas no Centro Hospitalar Lisboa Norte (no Hospital de Santa Maria) e no Hospital Central de Maputo.

III.2. Métodos

O estudo dos possíveis fatores genéticos moduladores da hipertensão arterial foi realizado através dos seguintes passos:

III.2.1. Extração e quantificação do DNA

Para as 377 amostras a extração do DNA foi realizada através do método de extração não enzimático designado de *salting-out* (anexo VIII.2), sendo que para a quantificação e determinação do grau de pureza do DNA genómico (ng/μl) utilizou-se um método espectrofotométrico (Nanodrop, ND-1000, Thermo Scientific), usando as razões de absorvência entre os comprimentos de onda a 260 e 280nm (A260/280), bem como, entre os comprimentos de onda a 230 e 280nm (A230/280), salientando que, apenas foram utilizadas as amostras cujo resultado, em relação a concentração de DNA, foi superior a 10ng/μl.

III.2.2. Amplificação do DNA por PCR (*Polymerase chain reaction*)

Esta técnica foi usada para genotipar o polimorfismo do intrão 4 do gene *NOS3*. A sequência dos oligonucleótidos iniciadores, as condições de reação e o tamanho dos fragmentos amplificados, encontram-se explanados nas tabelas VIII.1 e VIII.2, anexo VIII.3.

III.2.3. PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica permite diferenciar polimorfismos através da análise dos padrões de restrição do fragmento de DNA amplificado (por PCR) [43]. Usou-se esta técnica para distinguir a variante A⁺ da B no gene da G6PD. A mutação da variante A⁺ cria um sítio de restrição para a enzima *Fok I*. A realização desta técnica seguiu as condições descritas no anexo VIII.4, tabelas VIII.3, VIII.4 e VIII.5.

III.2.4. Gap-PCR

Para pesquisa da deleção -3,7 Kb no agrupamento génico da α -globina foi utilizada uma variante do PCR que é o Gap-PCR [41]. Esta metodologia pode ser usada para determinar os pontos de quebra de deleções conhecidas utilizando oligonucleótidos iniciadores que se localizam externamente e o mais próximo possível dos pontos de quebra da deleção, usando dois oligonucleótidos iniciadores complementares das cadeias *sense* e *antisense* das regiões de DNA que flanqueiam externamente a

deleção. O par de oligonucleótidos iniciadores irá dar origem a dois fragmentos, sendo que o mais pequeno provém do alelo com a deleção [42]. Esta variante do PCR foi usada de acordo as condições estabelecidas/descritas nas tabelas VIII.6 e VIII.7, anexo VIII.5.

III.2.5. Sequenciação de Sanger

Para a sequenciação do exão 2 dos genes *HBA1* e *HBA2*, foi utilizada a técnica de sequenciação automática pela técnica de Sanger. Para a reação automatizada de sequenciação realizada utilizou-se o kit comercial *BigDye® Terminator V1.1. Cycle Kit (Applied Biosystems)* de acordo com as instruções do fabricante e utilizando um temociclador *Biometra® Thermocycler*. A discriminação dos sinais emitidos por fluorescência e dos tamanhos dos fragmentos foi feita por eletroforese capilar no sequenciador automático 3130XI *Genetic Analyser, AbiPrism (Applied Biosystems)*, e os resultados foram analisados usando o *software FinchTV v1.4.0 (Geospiza, Inc)*. As condições para realização da sequenciação, encontram-se descritas nos anexos VIII.6 (tabelas VIII.8 e VIII.9), VIII.7 e VIII.8 (VIII.10 e VIII.11)

Os tampões usados para o PCR, PCR-RFLP e Gap-PCR, encontram-se explanados no anexo 8.3. Os resultados obtidos através do uso destas técnicas (PCR, PCR-RFLP e Gap-PCR) foram visualizados após eletroforese dos produtos de PCR num gel de agarose, cuja concentração foi ajustada ao tamanho dos fragmentos que foram amplificados. O gel foi corado com brometo de etídeo numa concentração 3µl para 100mL de solução de TBE 10x (diluído 1:10). A subsequente visualização da eletroforese foi realizada com recurso a transiluminadores (GenoSmart, VWR e Uvitec Cambridge).

III.3. Tratamento Estatístico

Construiu-se uma base de dados para as duas populações (hipertensa e controlo), com as variantes genéticas estudadas e os potenciais fatores de risco (IMC, a idade, o sexo, a glicémia, triglicéridos e outros fatores de risco), que serviu de base para o tratamento estatístico.

III.3.1. Análise Estatística

Após obtenção dos dados obtidos decorrentes do trabalho laboratorial, para poder relacioná-los com os parâmetros clínicos que foram fornecidos, foi necessário um tratamento estatístico. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa estatístico SPSS 25.0, sendo o nível de significância estatístico estabelecido para $p\text{-value} < 0,05$.

Para cada polimorfismo foram comparadas as frequências genotípicas e alélicas observadas com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. A avaliação da normalidade da distribuição foi efetuada através dos testes de Kolmogorov – Smirnov e Shapiro-Wilk. Para as comparações entre doentes e população controlo (para os fatores de risco), foram utilizados os testes paramétricos T de *Student* ou não paramétricos de Mann-Witney. A pesquisa das associações entre os genótipos e os potenciais fatores de risco para ambas populações (hipertensos e normotensos) foram realizadas através do teste paramétrico T de *Student* ou pelo teste não paramétrico de Mann-Witney, por regressão logística linear e por Odds Ratio (OR) [95%].

IV. RESULTADOS

IV.1. Caracterização da Amostra

Para uma melhor compreensão da amostra em estudo, fez-se uma análise, recorrendo-se a estatística descritiva, de variáveis como idade, altura e o peso. Esta análise foi feita tanto para a população hipertensa (tabela IV.1) como para a população normotensa, avaliando-se também a distribuição das variáveis. Verificando-se que nos indivíduos normotensos, a idade, o peso, e a altura, e nos indivíduos hipertensos o peso, apresentam uma distribuição gaussiana ($p\text{-value} \geq 0,05$). As demais variáveis nos indivíduos hipertensos apresentam uma distribuição não gaussiana ($p\text{-value} < 0,05$).

Tabela IV. 1 Estatística descritiva dos variáveis idade, altura e peso, nos indivíduos hipertensos e normotensos

Hipertensos							
Variáveis	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	$p\text{-value}^1$
Idade (anos)	235	69	67,25	14,55	31	98	0,006*
Peso (kg)	90	80,25	80,10	13,88	49,20	114,50	0,076*
Altura (m)	89	1,60	1,59	0,09	1,37	1,96	0,200*
Normotensos							
Variáveis	N	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	$p\text{-value}^1$
Idade (anos)	134	44	43,83	11,88	20	74	0,200*
Peso (kg)	134	76,75	77,25	13,70	48,60	120,40	0,200*
Altura (m)	134	1,64	1,64	0,08	1,42	1,85	0,200*

¹Considera-se distribuição gaussiana quando $p\text{-value} \geq 0,05$ e não gaussiana quando $p\text{-value} < 0,05$. *Teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov; N = n° de indivíduos estudados para cada variável

Observou-se que as mulheres hipertensas (N=145) apresentam uma média de idade de 68,24 anos com um desvio padrão de 14,99, bem como a idade mínima de 31 anos e a máxima os 96 anos. Apresentam também um peso médio de 77,15kg (N=66). Comparativamente, os homens hipertensos (N=90) apresentam uma média de idade por volta dos 69,18 anos com um desvio padrão de 13,88, bem como a idade mínima de 37 anos e a máxima de 98 anos. O peso médio nos homens é de 88,79kg (N=24).

Verificou-se também que a faixa etária dos 89 anos é a mais frequente (4%) nas mulheres hipertensas, seguindo-se a faixa etária dos 85 e 81 anos, ambos com 3,4%. Nos homens hipertensos observa-se que a faixa etária mais frequente (5,6%) pertence aos indivíduos com 61 anos, seguindo-se a faixa etária dos 81 e 76 anos, ambos com 4,4%, como elucida a figura (IV.1) abaixo.

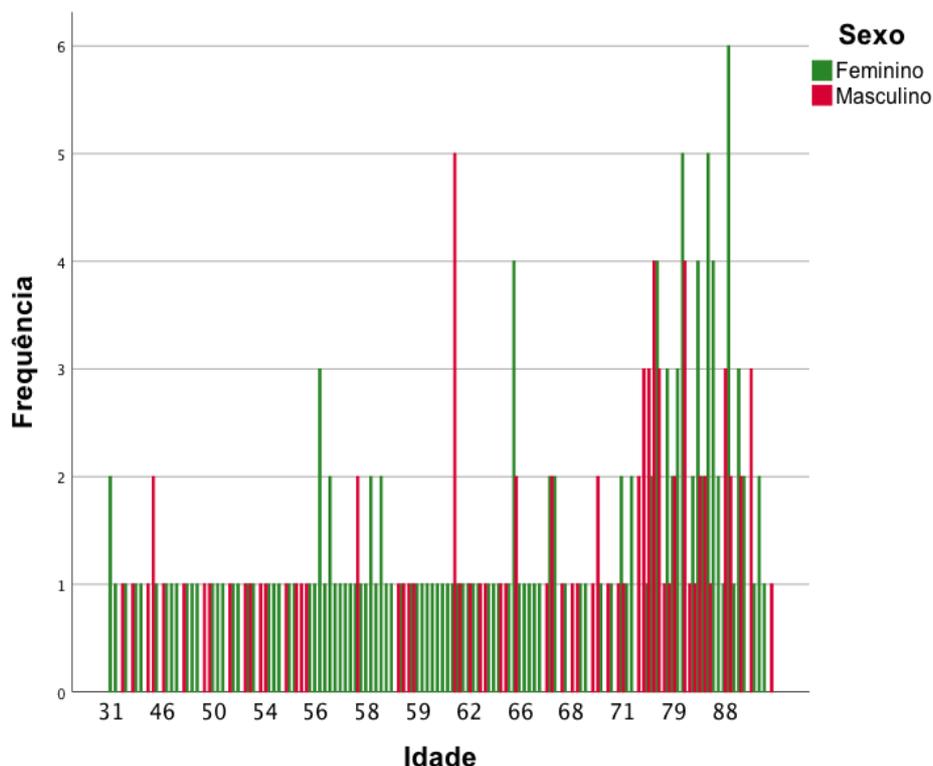


Figura IV. 1. Representação gráfica da frequência das faixas etárias na população hipertensa em ambos os sexos.

Não obstante os dados sobre o género e a idade na população hipertensa, verifica-se que, tanto na população hipertensa como na população normotensa, uma maior predominância do sexo feminino em ambas populações, respetivamente 61,7% e 62,7%. E a comparação dos dados entre as duas populações estudadas permitiu verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas na variável idade (Teste de Mann-Witney; $p\text{-value} < 0,001$) e o contrário na variável género ($\chi^2 = 0,034$, $p\text{-value} = 0,942$). Sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p\text{-value} < 0,05$ e não significativas quando $p\text{-value} \geq 0,05$. Dado as diferenças entre os dois grupos analisados (hipertensos e normotensos) no que diz respeito a idade (mas não ao género), sempre que necessário foi realizado o ajuste para este fator de confundimento.

Para além da idade, avaliou-se inicialmente nos indivíduos hipertensos a distribuição dos demais fenótipos intermédios (tabela IV.2), observando-se que apenas a hemoglobina glicosilada (HbA1c), o colesterol e o LDL-Colesterol apresentam distribuição gaussiana na população hipertensa, sendo que os valores de referência para os fenótipos intermédios estão descritos no anexo VIII. 8 (tabela VIII.12)

Tabela IV. 2. Avaliação da distribuição dos fenótipos intermédios e sua estatística descritiva na população hipertensa

Hipertensos							
Variáveis	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	<i>p-value</i> ¹
TSH (mcUI/ml)	79	2,16	1,50	0,02	17,60	2,35	0,000*
IMC (kg/m²)	125	30,42	30,28	19,5	44,6	113,17	0,200*
Glicémia (mg/dl)	85	103,75	91,00	63	215	33,71	0,000*
HbA1c (%)	36	5,36	4,85	3,1	9,2	1,84	0,075*
Colesterol (mg/dl)	83	199,71	197,00	134	330	38,70	0,159*
HDL-Colesterol (mg/dl)	83	54,34	52,00	30	98	14,57	0,007*
LDL-Colesterol (mg/dl)	83	121,64	116,00	60	217	32,25	0,066*
Triglicéridos (mg/dl)	81	121,57	106,00	47	404	58,50	0,000*
Uricémia (mg/dl)	58	6,37	5,30	2,9	65,0	7,91	0,000*

¹Considera-se distribuição gaussiana quando *p-value* ≥ 0,05 e não gaussiana quando *p-value* < 0,05. *Teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov. **Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Para a população normotensa, avaliou-se também a distribuição dos demais fenótipos intermédios (tabela IV.3), observando-se que para além da hemoglobina glicosilada (HbA1c), o colesterol e o LDL-Colesterol, a uricémia também apresenta distribuição gaussiana.

Tabela IV. 3. Avaliação da distribuição dos fenótipos intermédios e sua estatística descritiva na população normotensa

Normotensos							
Variáveis	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	<i>p-value</i> ¹
TSH (mcUI/ml)	112	2,06	1,75	0,01	18,40	2,15	0,000*
IMC (kg/m²)	134	28,55	28,34	17,3	44,5	113,11	0,037*
Glicémia (mg/dl)	112	86,65	82,50	60	178	19,54	0,000*
HbA1c (%)	13	4,63	4,10	2,8	7,8	1,79	0,095**
Colesterol (mg/dl)	106	196,76	196,00	126	334	41,67	0,200*
HDL-Colesterol (mg/dl)	103	56,80	54,00	31	101	14,97	0,005*
LDL-Colesterol (mg/dl)	106	120,57	119,80	28	246	37,46	0,200*
Triglicéridos (mg/dl)	103	108,07	91,00	33	323	56,530	0,000*
Uricémia (mg/dl)	79	4,98	4,80	2,6	7,9	1,29	0,200*

¹Considera-se distribuição gaussiana quando *p-value* \geq 0,05 e não gaussiana quando *p-value* $<$ 0,05. *Teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov. **Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Posteriormente, verificou-se que a análise dos fenótipos intermédios resultou na observação de que as diferenças nos valores entre indivíduos hipertensos e normotensos são estatisticamente significativas para o IMC, glicémia e os triglicéridos, sem o ajuste para a idade, e com ajuste apenas se verificam diferenças estatisticamente significativas para o IMC e glicémia (tabela IV.4). Usou-se o teste de Mann-Witney, para as variáveis com distribuição não gaussiana e o Test T de *Student* para variáveis com distribuição gaussiana.

Tabela IV. 4. Análise das diferenças observadas nos valores dos fenótipos intermédios entre indivíduos hipertensos e normotensos

Variável	Hipertensos (N)	Normotensos (N)	<i>p-value</i> ¹	<i>p-value</i> ²
TSH (mcUI/ml)	79	112	0,930*	
IMC (kg/m ²)	125	134	<0,004*	0,008
Glicémia (mg/dl)	85	112	<0,001*	0,036
HbA1c (%)	36	13	0,230**	
Colesterol (mg/dl)	83	106	0,616**	0,493
HDL-Colesterol (mg/dl)	83	103	0,252*	0,603
LDL-Colesterol (mg/dl)	83	106	0,833**	0,243
Triglicéridos (mg/dl)	81	106	0,039*	0,221
Uricémia (mg/dl)	58	79	0,064*	

*Teste de Mann-Witney. ** Test T de *Student*. Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos.

¹Sem ajuste para a idade. ²Ajustado para a idade

IV.2. Análise dos Polimorfismos no Intrão 4 do gene *NOS3* (VNTR) e Associação com as Variáveis Estudadas.

Em relação à genotipagem do gene *NOS3*, a figura (IV.2) abaixo representa os resultados obtidos para este gene, sendo que a análise do polimorfismo foi efetuada de acordo aos processos descritos nos materiais e métodos.

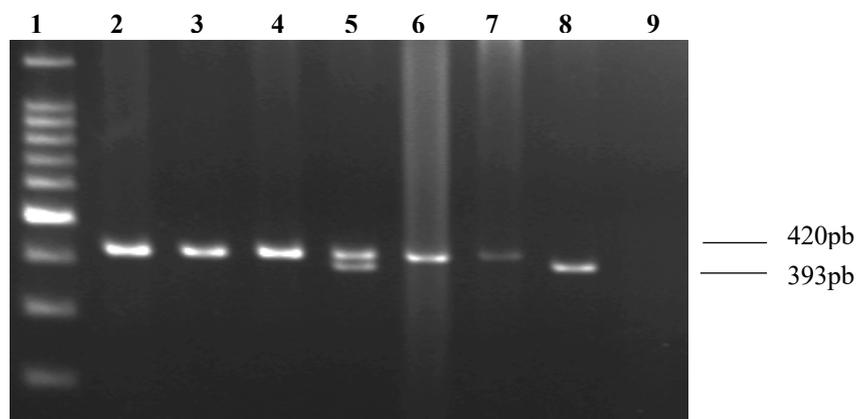


Figura IV. 2. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo de uma amplificação da região genômica contendo o VNTR do intrão 4 do gene *NOS3*. Canal 1: Marcador de peso molecular 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen). Canais 2, 3, 4, 6 e 7: Genótipo 4b/4b. Canal 5: Genótipo 4a/4b. Canal 8: Genótipo 4a/4a. Canal 9: Controle negativo.

Para o gene *NOS3*, foi observado que na população normotensa (N = 129) as frequências dos genótipos 4b/4b, 4a/4b e 4a/4a foram, respetivamente, 73,6%, 22,5% e 3,9%. Para a população hipertensa (N = 230) as frequências dos genótipos 4b/4b, 4a/4b e 4a/4a foram, respetivamente, 55,6%, 36,1% e 8,3% (como ilustra a figura abaixo, IV.3), sendo que as diferenças nestas duas populações são estatisticamente significativas ($\chi^2 = 11,588$, $p\text{-value} = 0,003$).

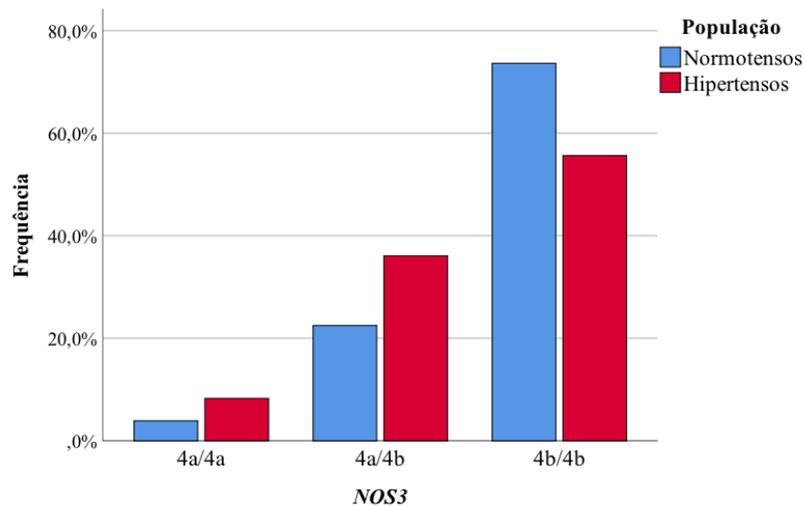


Figura IV. 3. Gráfico ilustrativo das frequências genotípicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3*, na população hipertensa e na população normotensa.

Para as frequências alélicas o mesmo foi observado, ou seja, as diferenças entre as frequências para ambos os alelos na população hipertensa (4a = 26,3%; 4b = 73,7%; N = 460) e na população normotensa (4a = 15,1%; 4b = 84,9%; N = 258, figura IV.4), são estatisticamente significativas ($\chi^2 = 11,947$, $p\text{-value} = 0,001$).

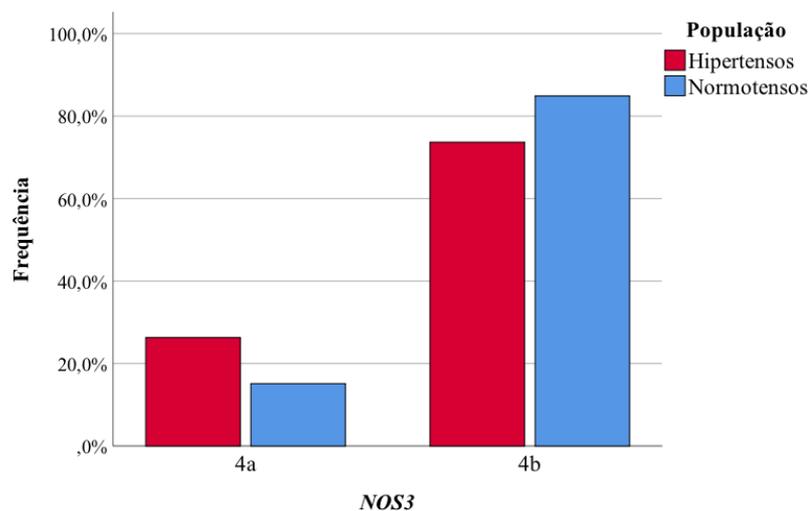


Figura IV. 4. Gráfico ilustrativo das frequências alélicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3*, na população hipertensa e na população normotensa.

E de acordo com estes dados, verifica-se que os para os indivíduos que apresentam o alelo 4a, o risco (relativo) de ser hipertenso é 1,2 vezes superior em comparação com os indivíduos que apresentam o alelo 4b. Quando o ajuste para idade é realizado, observa-se que a presença do alelo 4a

(em heterozigotia ou homozigotia) está associado a um maior risco de ser hipertenso [OR = 2,297; IC (95%) = (1,206 – 4,376); p -value = 0,011].

Após efetuada a separação por sexo, observou-se que para o sexo masculino as frequências dos genótipos 4b/4b, 4a/4b e 4a/4a para os indivíduos hipertensos (N = 91) foram, respetivamente, 60,4%, 30,8% e 8,8%. Para o mesmo sexo no que diz respeito aos indivíduos normotensos (N = 49), as frequências genótípicas foram: 75,5%, 18,4% e 6,1%.

Os hipertensos (N = 139) apresentaram (para o sexo feminino) para os genótipos 4b/4b, 4a/4b e 4a/4a, as seguintes frequências: 52,5%, 39,6% e 7,9%. Para o mesmo sexo as frequências para os normotensos (N = 80) foram: 72,5%, 25,0% e 2,5%, como ilustra a figura abaixo (IV.5).

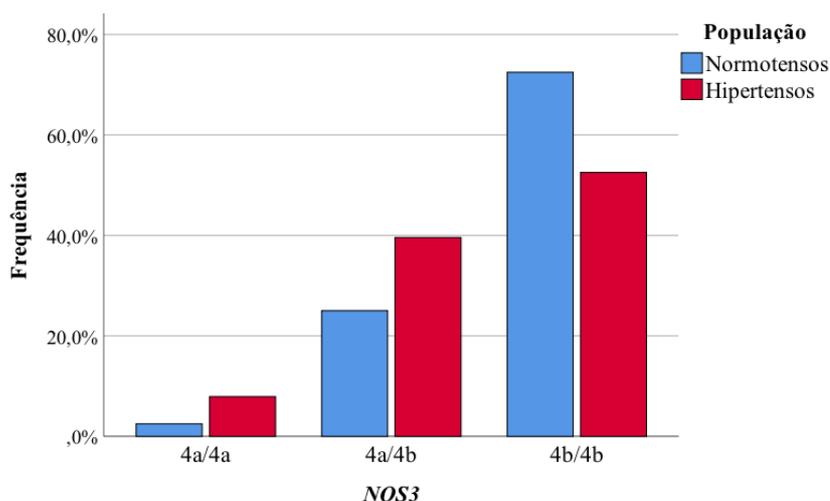


Figura IV. 5. Gráfico ilustrativo das frequências genótípicas dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3*, na população hipertensa e na população normotensa no que diz respeito ao sexo feminino.

Verificou-se que para o sexo feminino estas diferenças são estatisticamente significativas ($\chi^2 = 9,043$, p -value=0,011) e que a presença do alelo 4a (em heterozigotia ou homozigotia) está associada a um maior risco de ser hipertenso no sexo feminino [OR = 1,346; IC (95%) = (1,108 – 1,635); p -value = 0,004].

Tanto a população hipertensa como a população normotensa para este polimorfismo, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, respetivamente $\chi^2 = 1,1018 < 3,841_{gl(1)}$; p -value=0,05 e $\chi^2 = 1,9832 < 3,841_{gl(1)}$; p -value=0,05.

A análise entre a associação dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* e os fenótipos intermédios, mostrou que as diferenças para glicémia entre hipertensos e normotensos em relação aos genótipos 4a/4b e 4b/4b são estatisticamente significativas: O mesmo resultado é obtido para hemoglobina glicosilada (genótipo 4a/4b), triglicéridos (genótipo 4a/4b), uricémia (genótipo 4b/4b), IMC (4b/4b) e HDL-Colesterol (genótipo 4a/4a) entre hipertensos e normotensos (tabela IV.5). Usou-se o teste de Mann-Witney, para as variáveis com distribuição não gaussiana e o Test T de *Student* para variáveis com distribuição gaussiana.

Tabela IV. 5. Análise entre as variáveis estudadas e os genótipos (4b/4b, 4a/4b e 4a/4a) do gene *NOS3* na população de indivíduos hipertensos e normotensos

Variável	4b/4b (H)	<i>p-value</i>	4b/4b (N)	4a/4b (H)	<i>p-value</i>	4a/4b (N)	4a/4a (H)	<i>p-value</i>	4a/4a (N)
TSH (mcUI/ml)	1,7; 0,02-8,1 (39)	0,989*	1,9; 0,01-18,4 (79)	1,3; 0,05-7,1 (24)	0,718*	1,05; 0,01-9,7 (24)	1,7±0,6 (3)	0,627**	2±0,7 (5)
IMC (kg/m²)	30,3±5,6 (74)	0,005**	27,9±4,7 (95)	29,8±4,6 (35)	0,997**	29,8±5,7 (29)	30,1±4,4 (3)	0,674**	29,3±0,9 (5)
Glicemia (mg/dl)	92; 63-215 (45)	0,001*	82; 60-178 (79)	96; 71-208 (24)	0,038*	84; 66-167 (24)	117±31,4 (3)	0,495**	100,7±27,1 (4)
HbA1c (%)	5,0±1,8 (20)	0,688*	4,7±1,7 (9)	6,4±1,7 (11)	0,043**	3,5±0,8 (2)	5,90 (1)	0,930**	5,4±3,3 (2)
Colesterol (mg/dl)	197,5±36,2 (43)	0,883**	196,4±43,5 (78)	200,9±40,4 (24)	0,785*	198,9±38,5 (21)	242±31,2 (3)	0,109**	201±14,8 (3)
HDL-Colesterol (mg/dl)	52; 31-83 (43)	0,313*	54; 31-101 (75)	51; 32-98 (24)	0,466*	54; 35-78 (21)	68,3±6,4 (3)	0,029**	48±8,14 (3)
LDL-Colesterol (mg/dl)	121,4±29,5 (43)	0,833**	119,9±38,6 (78)	120,9±33,2 (24)	0,876**	122,5±36,6 (21)	146,9±34,8 (3)	0,513*	133,5±11,4 (3)
Triglicéridos (mg/dl)	105; 51-307 (41)	0,382*	98; 33-276 (75)	103; 47-404 (24)	0,044*	86; 45-323 (21)	134±33,1 (3)	0,196**	96±26,7 (3)
Uricemia (mg/dl)	5,5±0,9 (26)	0,013**	4,7±1,2 (59)	5,1; 2,9-65 (21)	0,830*	5,8; 2,6-7,2 (16)	5,4±0,7 (3)	0,165**	6,4±0,2 (2)

*Teste de Mann-Witney – as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; número total de indivíduos (n).

**Teste T de *Student* – as medidas estatísticas consideradas são: média±desvio padrão; número total de indivíduos (n). H (Hipertensos); N (Normotensos). Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos

Após os resultados obtidos na tabela acima, verificou-se por regressão logística linear a associação dos genótipos com as variáveis em estudo, e observou-se que apenas na presença do genótipo 4b/4b (ajustado para a idade) o IMC encontra-se associado à população hipertensa [OR = 1,150; IC (95%) = (1,052 – 1,257); *p-value* = 0,002]. O mesmo resultado foi obtido para a uricemia [OR = 1,867; IC (95%) = (1,123 – 3,106); *p-value* = 0,016]. Também se observou que apenas na presença dos genótipos 4b/4b/ e 4a/4b e sem o ajuste para a idade é que a glicemia encontra-se associada a população hipertensa, respectivamente, [OR = 1,032; IC (95%) = (1,002 – 1,062); *p-value* = 0,037] e [OR = 1,030; IC (95%) = (1,012 – 1,048); *p-value* = 0,001].

Observou-se que existem diferenças estatisticamente significativas para a glicemia entre hipertensos e normotensos, independentemente da presença ou ausência do alelo 4a. Também foi observado diferenças estatisticamente significativas para os triglicéridos na presença do alelo 4a entre hipertensos e normotensos. O mesmo foi observado para a ausência do alelo no que diz respeito aos valores de uricemia entre hipertensos e normotensos (tabela IV.6). Usou-se o teste de Mann-Witney, para as variáveis com distribuição não gaussiana e o Test T de *Student*, para variáveis com distribuição gaussiana.

Tabela IV. 6. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo 4a do intrão 4 do gene *NOS3* (VNTR), entre indivíduos hipertensos e normotensos

Variáveis	Presença do alelo 4a - Hipertensos	<i>p-value</i>	Presença do alelo 4a - Normotensos	Ausência do alelo 4a - Hipertensos	<i>p-value</i>	Ausência do alelo 4a - Normotensos
TSH (mcUI/ml)	1,5; 0,5-7,1 (27)	0,915*	1,2; 0,005-9,7 (29)	1,7; 0,20-8,1 (39)	0,989*	1,9; 0,005-18,4 (79)
IMC (kg/m²)	29,8±4,6 (38)	0,926**	29,7±5,4 (34)	30,3±5,7 (74)	0,005**	27,9±4,6 (95)
Glicémia (mg/dl)	99; 71-208 (27)	0,021*	84,5; 66-167 (28)	92; 63-215 (45) ¹	0,001*	82; 60-178 (79)
HbA1c (%)	6,4±1,6 (12)	0,087**	4,5±2,3 (4)	4,5; 3,1-9,2 (20)	0,688*	5; 2,8-7,2 (9)
Colesterol (mg/dl)	205,5±41,1 (27)	0,565**	199,1±36,1 (24)	197,5±36,2 (43)	0,883**	196,4±43,5 (78)
HDL-Colesterol (mg/dl)	57,3±17,5 (27)	0,634**	55,3±11,3 (24)	53,7±13,1 (43)	0,227**	57,2±16,2 (75)
LDL-Colesterol (mg/dl)	123,8±33,7 (27)	0,990**	123,9±34,5 (24)	121,4±29,5 (43)	0,833**	119,9±38,6 (78)
Triglicéridos (mg/dl)	105; 47-404 (27)	0,025*	86; 45-323 (24)	105; 51-307 (41)	0,382*	98; 33-276 (75)
Uricémia (mg/dl)	5,1; 2,9-65 (24)	0,525**	6,1; 2,6-7,2 (18)	5,5±0,9 (26)	0,013**	4,9±1,2 (59)

*Teste de Mann-Witney – as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; número total de indivíduos (n).
 **Teste T de *Student* – as medidas estatísticas consideradas são: média±desvio padrão; número total de indivíduos (n). Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos

Procedeu-se a análise por regressão logística linear para testar a associação da presença (em heterozigotia ou homozigotia) ou ausência do alelo 4a com as variáveis em estudo, tendo-se verificado que na ausência do alelo 4a (ajustado para a idade), o IMC e a uricémia estão associados a população hipertensa, respetivamente, [OR = 1,150; IC (95%) = (1,052 – 1,257); *p-value* = 0,002] e [OR = 1,1,867; IC (95%) = (1,123 – 3,106); *p-value* = 0,016]. Observou-se também que apenas sem o ajuste para a idade e na ausência do alelo 4a é que a glicémia está associada a população hipertensa [OR = 1,030; IC (95%) = (1,012 – 1,048); *p-value* = 0,001].

Foi também observado na população hipertensa que para presença ou ausência do alelo 4a apenas existem diferenças estatisticamente significativas para hemoglobina glicosilada (tabela IV.7). Usou-se o teste de Mann-Witney para as variáveis com distribuição não gaussiana e o Test T de *Student* para variáveis com distribuição gaussiana.

Tabela IV. 7. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo 4a do intrão 4 do gene *NOS3* (VNTR), na população de indivíduos hipertensos

Variáveis	Presença do alelo 4a	<i>p-value</i>	Ausência do alelo 4a
TSH (mcUI/ml)	1,5; 0,5-7,1 (27)	0,262*	1,7; 0,20-8,1 (39)
IMC (kg/m ²)	29,8±4,7 (38)	0,683**	30,3±5,7 (74)
Glicémia (mg/dl)	99; 71-208 (27)	0,467*	92; 63-215 (45)
HbA1c (%)	6,1; 3,8-8,6 (12)	0,031*	4,5; 3,1-9,2 (20)
Colesterol (mg/dl)	205,5±41,1 (27)	0,759**	197,5±36,2 (43)
HDL-Colesterol (mg/dl)	57,3±17,5 (27)	0,331**	53,7±13,1 (43)
LDL-Colesterol (mg/dl)	123,8±33,7 (27)	0,759**	121,4±29,5 (43)
Triglicéridos (mg/dl)	105; 47-404 (27)	0,940*	105; 51-307 (41)
Uricémia (mg/dl)	5,1; 2,9-65 (24)	0,525*	5,3; 4,0-7,4 (26)

*Teste de Mann-Witney – as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; número total de indivíduo (n).
 **Teste T de *Student* – as medidas estatísticas consideradas são: média±desvio padrão; número total de indivíduos (n). Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos

IV.3. Análise do Polimorfismo do gene *Gd* (rs1050829) e Associação com as Variáveis Estudadas.

Em relação à genotipagem do SNP (rs1050829), as figuras IV.6 e IV.7 abaixo representam os resultados obtidos para este SNP, sendo que a análise do polimorfismo foi efetuada de acordo com processos descritos nos materiais e métodos.

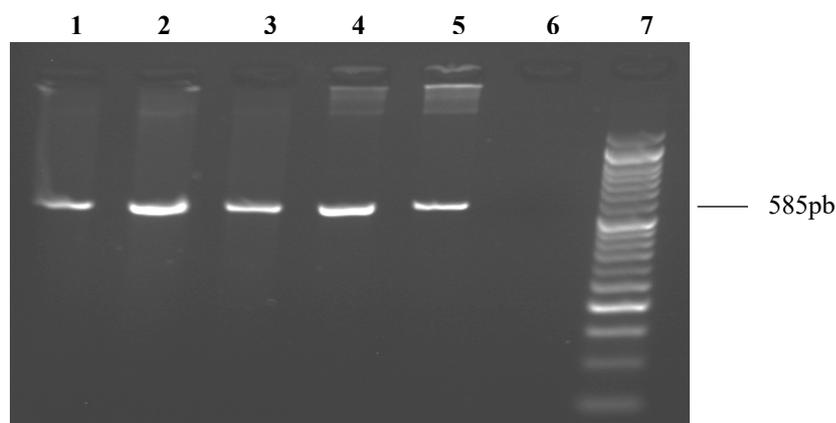


Figura IV. 6. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo da amplificação de um fragmento da região do gene *Gd* (rs1050829). Canais 1-5: Fragmentos amplificados dos indivíduos em estudo. Canal 6: Controle negativo. Canal 7: Marcador de peso molecular 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen).

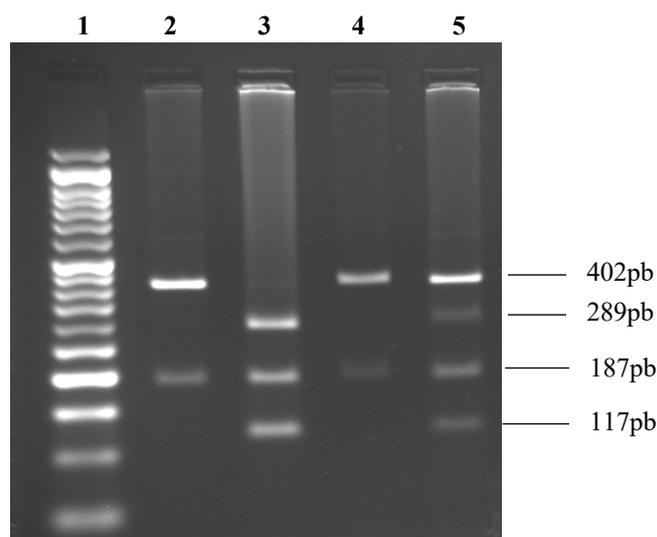


Figura IV. 7. Gel de agarose com perfil eletroforético representativo dos fragmentos obtidos no ensaio de restrição com a endonuclease *Fok I*. Canal 1: Marcador de peso molecular 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen) Canais 2 e 4: Genótipo Gd+/Gd+. Canal 3: Genótipo Gd-/Gd-; Canal 5: Genótipo Gd+/Gd-.

Para o gene *Gd*, num total de 164 indivíduos genotipados (106 do sexo feminino e 58 do sexo masculino) não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas entre hipertensos e normotensos, tanto para o sexo feminino como para o sexo masculino (tabela IV.8).

Tabela IV. 8. Frequências genotípicas e alélicas para o gene da *Gd* (rs10500829) para ambas populações (hipertensos e normotensos)

Frequência Genotípica						
Gênero	Genótipos	Hipertensos			Normotensos	
		Frequência Observada	Frequência Relativa (%)	<i>p-value</i>	Frequência Observada	Frequência Relativa (%)
Sexo Feminino	Gd+/Gd+	104	98,12	0,693 ¹	62	98,4
	Gd+/Gd-	1	0,94		1	1,6
	Gd-/Gd-	1	0,94			
	Total	106	100		63	100
Sexo Masculino	Gd+	57	98,3	0,469 ¹	30	100
	Gd-	1	1,7			
	Total	58	100		30	100
Frequência Alélica						
Gênero	Alelos	Hipertensos			Normotensos	
		Frequência Observada	Frequência Relativa (%)	<i>p-value</i>	Frequência Observada	Frequência Relativa (%)
Sexo Feminino	Gd+	209	98,6	0,609 ¹	125	99,2
	Gd-	3	1,4		1	0,8
	Total	212	100		126	100
Sexo Masculino	Gd+	114	98,3	0,306 ¹	60	100
	Gd-	2	1,7			
	Total	116	100		60	100

Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos. ¹Teste do Qui-quadrado

Efetuuou-se uma análise de *Odds Ratio* para medir a força de associação do alelo Gd-, entre hipertensos e normotensos, para ambos os sexos. Os resultados não são estatisticamente significativos, respectivamente [OR = 1,794; IC (95%) = (0,184 – 17,438); *p-value* = 0,614] e [OR = 2,642; IC (95%) = (0,125 – 55,917); *p-value* = 0,533].

Para o sexo feminino, a população hipertensa não apresenta o alelo Gd em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 46,4373 > 3,841_{gl(1);p-value=0,05}$), enquanto que, a população normotensa encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,0040 < 3,841_{gl(1);p-value=0,05}$).

Para o sexo masculino, a população hipertensa não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 58,000 > 3,841_{gl(1);p-value=0,05}$). Em relação a população normotensa, para o mesmo sexo, como apenas verificou-se a frequência de um alelo (alelo Gd+), para esta população não foi possível verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o sexo feminino não se observaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das variáveis estudadas e a presença (em heterozigotia ou homozigotia) ou ausência do alelo Gd- (tabela IV.9). Utilizou-se o teste estatístico T de *Student*, para as variáveis com distribuição gaussiana, e o Teste de Mann-Witney, para as variáveis com distribuição não gaussiana.

Tabela IV. 9. Análise entre as variáveis estudadas e a presença ou ausência do alelo G do gene *G6PD* (rs10500829), na população de indivíduos hipertensos

Sexo Feminino (Hipertensos)			
Variáveis	Presença do alelo Gd-	<i>p-value</i>	Ausência do alelo Gd-
TSH (mcUI/ml)	1,3; 1,1-1,6 (2)	0,748*	1,5; 0,20-8,1 (52)
IMC (kg/m ²)	30,8±6,3 (2)	0,755**	32±5,4 (55)
Glicémia (mg/dl)	89; 78-101 (2)	0,943*	86; 63-208 (50)
HbA1c (%)	—		5,3; 3,2-8,4 (14)
Colesterol (mg/dl)	210; 202-218 (2)	0,497*	199; 134-330 (49)
HDL-Colesterol (mg/dl)	70±28,3 (2)	0,259**	57,7±14,6 (49)
LDL-Colesterol (mg/dl)	124,5; 111-138 (2)	0,627*	114,8; 0-217 (54)
Triglicéridos (mg/dl)	77,5; 72-83 (2)	0,373*	99,5; 47-404 (48)
Uricémia (mg/dl)	4,2±0,4 (2)	0,226**	5,1±1,0 (35)

*Teste de Mann-Witney – as medidas estatísticas consideradas são: mediana; mínimo-máximo; número total de indivíduos (n).
 **Teste T de *Student*– as medidas estatísticas consideradas são: média±desvio padrão; número total de indivíduos (n). — Ausência de dados. Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos

Não foi possível realizar as restantes análises estatísticas, uma vez que, para os genótipos (Gd+/Gd- e Gd-/Gd-) do gene *Gd* SNP (rs10500829), não se verificam valores para as variáveis em estudo, tanto para o sexo masculino como para o sexo feminino. Também não foram observadas para o sexo feminino (população normotensa) a frequência do genótipo Gd-/Gd-. Para o sexo masculino não se verificou a frequência do genótipo Gd- também na população normotensa.

IV.4. Análise da Deleção α -Talassémica ($-\alpha^{3,7}$) no Agrupamento Génico da α -Globina e Associação com as Variáveis Estudadas.

A identificação da deleção de 3,7kb no agrupamento génico da α -globina foi realizada de acordo aos preceitos descritos nos materiais e métodos (figura IV.8).

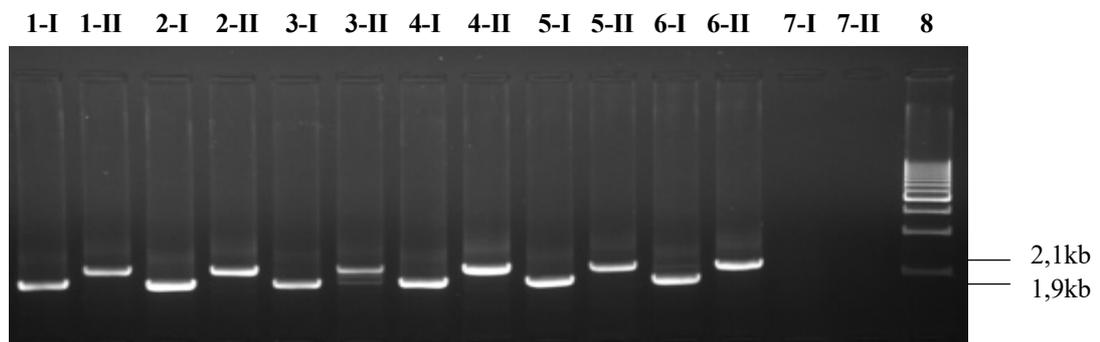


Figura IV. 8. Perfil eletroforético em gel de agarose representativo da confirmação da deleção de 3,7kb no agrupamento génico da α -globina. Canais 1 (I-II), 2 (I-II), 4 (I-II), 5 (I-II) e 6 (I-II): Indivíduos normais sem a deleção. Canal 3 (I-II): Indivíduo heterozigótico para a deleção. Canal 7 (I-II): Controlo negativo. Canal 8: Marcador de peso molecular 1kb (1kb DNA Ladder, Invitrogen). Os números em numeração decimal (1 a 7) correspondem a indivíduos diferentes, e os números em numeração romana correspondem, respetivamente, as Mix 1 e Mix 2 referidas no anexo VIII.5 tabelas VIII.6 e VIII.7.

A amplificação seletiva dos genes alfa (*HBA1* e *HBA2*) para posterior sequenciação foi realizada de acordo aos preceitos descritos nos materiais e métodos e as figuras IV.9 e IV.10 abaixo, representam os resultados obtidos na amostragem para cada um dos procedimentos.

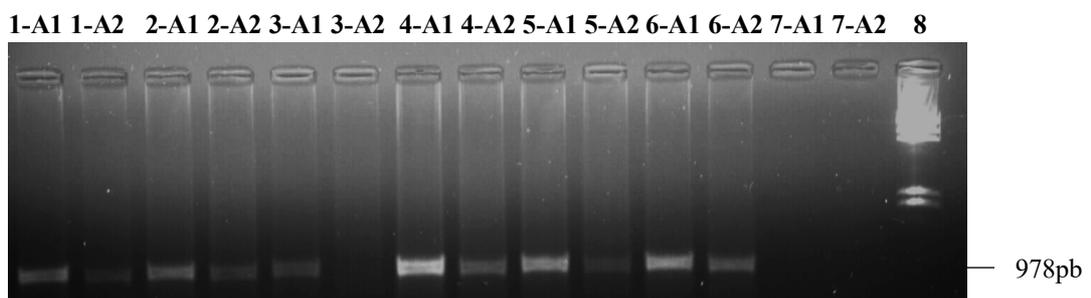


Figura IV. 9. Perfil eletroforético em gel de agarose representativo da amplificação dos genes α . Canais 1, 2,3 4, 5 e 6 (A1-A2): Fragmentos amplificados dos indivíduos em estudo. Canal 7 (A1-A2): Controlo negativo. Canal 8 Marcador de peso molecular 1kb (1kb DNA Ladder, Invitrogen). Os números em numeração decimal (1 e 7) correspondem a indivíduos diferentes, e a numeração (A1 e A2) correspondem, respetivamente, as Mix A1 e Mix A2 referidas no anexo VIII.6 tabelas VIII.8 e VIII.9.

T A A G A C T A C T T C C C G C A C T T C G A C C T G A G C C A C G G C T C T G C C C A G G T A A G G G C C A C G G C A A G A A G G T G G C G G A C G C G C T G A C C A A C G C C G T G G C G C A C

 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460

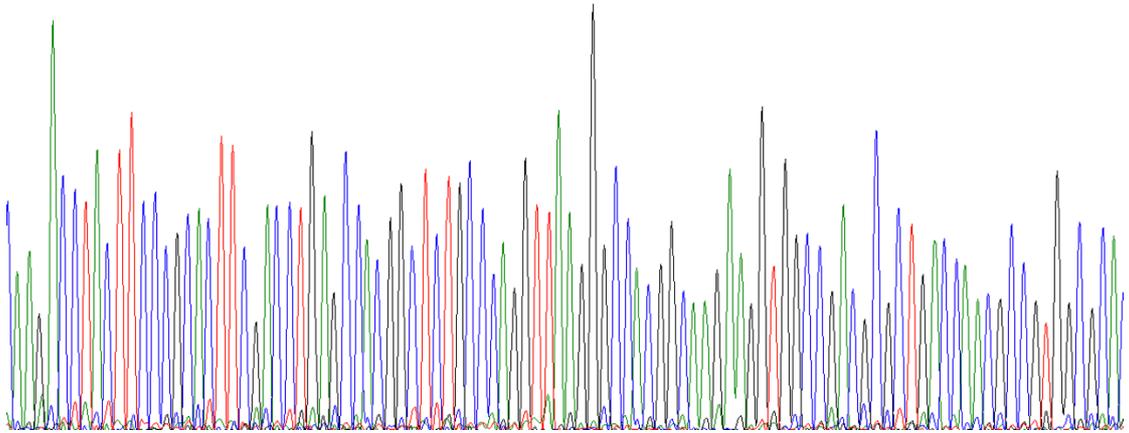


Figura IV. 10. Imagem representativa do resultado obtido da sequenciação parcial do exão 2 dos genes $\alpha 1$ -globina e $\alpha 2$ -globina, estando marcado com um retângulo azul a região de interesse para pesquisa de variantes polimórficas.

Não foram encontradas variantes polimórficas na análise do exão 2 dos genes *HBA1* e *HBA2*. No entanto, foram calculadas as frequências genóticas e alélicas para a população hipertensa e normotensa em relação à deleção de 3,7kb ($-\alpha^{3,7}$). Não foi observado nenhum caso de homozigotia para a deleção em ambas as populações (hipertensos e normotensos), nem diferenças estatisticamente significativas para as frequências genóticas e alélicas (tabelas IV.10 e IV.11).

Tabela IV. 10. Frequências genóticas para a alfa-talassemia em ambas as populações (hipertensos e normotensos)

Genótipos	Frequência Genotípica					
	Hipertensos			Normotensos		
	N	Frequência Relativa (%)	<i>p-value</i>	N	Frequência Relativa (%)	
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	96	99,0	0,791 ¹	66	98,5	
$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	1	1,0		1	1,5	
$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	—	—		—	—	
Total	97	100		67	100	

Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos. ¹Teste do Qui-quadrado

Tabela IV. 11. Frequências alélicas para a alfa-talassémia em ambas as populações (hipertensos e normotensos)

Frequência Alélica					
Hipertensos			Normotensos		
Alelos	N	Frequência Relativa (%)	<i>p-value</i>	N	Frequência Relativa (%)
$\alpha\alpha$	193	99,5	0,792 ¹	133	99,3
$-\alpha^{3,7}$	1	0,5		1	0,7
Total	194	100		134	100

Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos. ¹Teste do Qui-quadrado

Considerando a alfa-talassémia, tanto a população hipertensa como a população normotensa para alfa-talassémia, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, respetivamente $\chi^2 = 0,0026 < 3,841_{gl(1); p-value=0,05}$ e $\chi^2 = 0,0038 < 3,841_{gl(1); p-value=0,05}$.

Salienta-se que aquando da pesquisa para a alfa-talassémia, observou-se a existência de dois indivíduos com triplo-alfa ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$; frequência de 2,0%), na população hipertensa.

IV.5. Caracterização Genotípica e Alélica dos genes *NOS3*, *G6PD* e *HBA* numa População Moçambicana Normotensa

A pesquisa de variantes polimórficas nos genes *NOS3*, *G6PD* e *HBA* para a população Moçambicana, seguiu os mesmos preceitos descritos para população Portuguesa nos materiais e métodos. Os dados das tabelas (IV.12, IV.13 e IV.14) abaixo, representam os resultados obtidos.

Tabela IV. 12. Frequência genotípica para o gene *NOS3* na população normotensa Moçambicana

Frequência Genotípica			
	Genótipos	N	Frequência Relativa (%)
<i>NOS3</i>	4a/4a	4	18,1
	4a/4b	9	40,9
	4b/4b	7	31,8
	4b/4c	1	4,5
	4a/4d	1	4,5
	Total	22	100

Tabela IV. 13. Frequência genotípica para o gene *Gd* na população normotensa Moçambicana

Frequência Genotípica				
Género	Genótipos	N	Frequência Relativa (%)	
G6PD	Gd+/Gd+	7	50,0	
	Sexo Feminino	Gd+/Gd-	4	28,6
		Gd-/Gd-	3	21,4
		Total	14	100
Sexo Masculino	Gd+	6	100	
	Gd-	—		
	Total	6	100	

Tabela IV. 14. Frequência genotípica para a alfa-talassémia na população normotensa Moçambicana

Frequência Genotípica			
	Genótipos	N	Frequência Relativa (%)
Alfa-Talassémia	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6	27,3
	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	14	63,6
	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	2	9,1
	Total		100

Foram também calculadas as frequências alélicas e observou-se que para a *NOS3* as frequências dos alelos 4a, 4b, 4c e 4d, foram, respetivamente, 40,9%, 54,5%, 2,3% e 2,3%. Em relação a *G6PD* para o sexo feminino as frequências dos alelos Gd+ e Gd- foram, respetivamente, 64,3% e 35,7%, enquanto que no sexo masculino apenas se observou o alelo Gd+. Aquando da pesquisa da alfa-talassémia, para o alelo normal ($\alpha\alpha$), observou-se uma frequência alélica de 59,1% e para o alelo mutado ($-\alpha^{3,7}$) uma frequência alélica de 40,9% para o alelo normal.

Verificou-se que para as variantes estudadas nos três genes (*NOS3*, *G6PD*, *HBA*), esta população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, respetivamente, $\chi^2 = 0,1257 < 12,592$, $_{gl(6); p-value=0,05}$ e $\chi^2 = 1,9980 < 3,841$, $_{gl(1); p-value=0,05}$. $\chi^2 = 2,2002 < 3,841$, $_{gl(1); p-value=0,05}$. Salientado que para a *G6PD* o cálculo foi realizado apenas para o sexo feminino.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências dos genótipos em estudo entre a população Moçambicana aqui estudada e duas populações africanas reportadas na literatura, uma proveniente do Mali [124] e outra da Tanzânia [125] (tabela IV.15).

Tabela IV. 15. Análise da frequência dos genótipos em estudo entre a população Moçambicana e duas outras populações Africanas

		Frequência Genotípica				Outras Populações Africanas ^{1,2}	
Género	Genótipos	Moçambique		<i>p-value</i>	N	Frequência Relativa	
		N	Frequência Relativa (%)				
NOS3	4a/4a	4	18,1	0,762 ¹	22	13,8	
	4a/4b	9	40,9		68	43,0	
	4b/4b	7	31,8		61	38,6	
	4b/4c	1	4,5		5	3,6	
	4a/4d	1	4,5		2	1,0	
	Total	22	100		158	100	
G6PD	Gd+/Gd+	7	50	0,108 ¹	73	54,9	
	Gd+/Gd-	4	28,6		52	39,1	
	Gd-/Gd-	3	21,4		8	6,0	
	Total	14	100		133	100	
Sexo Masculino	Gd+	6	100	0,224 ¹	88	80,0	
	Gd-	—	—		22	20,0	
	Total	6	100		110	100	
Alfa-Talassémia	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	6	27,3	0,124 ¹	224	47,2	
	$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$	14	63,6		199	41,9	
	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	2	9,1		52	10,9	
	Total	22	100		475	100	

¹Para a NOS3 usou-se para a análise estatística uma população do Mal [181]. ²Para a G6PD e alfa-talassémia usou-se para análise estatística uma população da Tanzânia [182]. Valores de *p-value* < 0,05 são considerados estatisticamente significativos. ¹Teste do Qui-quadrado.

V. DISCUSSÃO

A hipertensão é uma doença multicausal, multifatorial e poligénica, caracterizada pela presença de níveis elevados de tensão arterial e frequentemente associada a distúrbios metabólicos e hormonais, com presença de hipertrofia cardíaca e elevação do tónus vascular, observando-se que a elevação da resistência periférica é tida como um dos principais fatores que contribuem para o aumento da pressão arterial, isto porque, a medida da pressão arterial é determinada pelo produto do batimento/débito cardíaco (frequência cardíaca e ejeção ventricular esquerda) e da resistência vascular periférica (explicada pela resistência das arteríolas, relacionada com o diâmetro do lúmen).

Neste sentido, o óxido nítrico resultante da atividade da eNOS parece ter um papel crucial na proteção dos vasos sanguíneos, uma vez que as enzimas eNOS sintetizam o NO que irá atuar ao nível das células musculares ou no lúmen vascular, sendo esta ação associada a manutenção da tonicidade vascular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, efeito antiproliferativo e efeito antioxidativo. Esta ação é essencial para impedir que se instale a disfunção endotelial que é um processo que conduz ao desenvolvimento da hipertensão.

Deste modo, foi levantada a hipótese de que o gene *NOS3* (codificante da eNOS) poderá ter uma contribuição significativa no surgimento do fenótipo hipertenso, uma vez que uma redução na biodisponibilidade do NO está associada a perda de integridade do endotélio, sendo que um estudo associa o alelo 4a a baixos níveis de NO [67].

No trabalho aqui apresentado, observou-se diferenças estatisticamente significativas para as frequências genóticas (p -value = 0,003) e alélicas (p -value = 0,001) dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* (entre hipertensos e normotensos), o que revela associação entre os polimorfismos do intrão desse gene e a hipertensão [126]. Observou-se também que as frequências para o alelo 4a e 4b na população hipertensa foram respetivamente, 26,3% e 73,7% e que esta frequência encontrada para o alelo 4b é semelhante às frequências encontradas na população Japonesa e no Reino Unido com hipertensão [127].

No estudo realizado para a nossa amostra populacional, verificou-se que a presença do alelo 4a está associado a um maior risco de ser hipertenso, o que vem de acordo com o descrito na literatura [128].

Apesar dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* serem polimorfismos intrónicos, têm a capacidade de modular a transcrição, influenciar a eficiência da tradução, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e os níveis enzimáticos da eNOS [127]. Pensa-se ser esse o mecanismo subjacente a esta associação genótipo/fenótipo. Foi também observado num estudo (sobre a hipertensão pulmonar) que o polimorfismo do intrão 4 do gene *NOS3* interfere na função da eNOS, o que resulta na redução da biodisponibilidade do NO e aumenta o risco de hipertensão pulmonar. Neste estudo, o grupo de indivíduos que apresentavam o genótipo 4a/4a tinham um risco de desenvolver hipertensão duas vezes superior quando comparado com os indivíduos que apresentam os demais genótipos [129]. Observa-se que os resultados de uma meta-análise que envolveu 35 estudos de associação do ponto de vista genético, parecem suportar a ideia da associação entre os polimorfismos no intrão 4 do gene *NOS3* e a hipertensão [128], verificando-se que na população caucasiana o alelo 4a está associado a um risco elevado (cerca de 22%) para o desenvolvimento da hipertensão [130]. No entanto, há que salvaguardar que outra possível explicação para estes resultados seja o facto dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3*

atuarem como marcadores genéticos para um outro locus funcional em *linkage* desequilíbrio dentro ou em redor do gene [128].

Na literatura encontram-se ainda outros estudos mostrando a associação dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* com outras síndromes metabólicas que evidenciam a associação deste alelo (4a) com outras doenças cardiovasculares ligadas à hipertensão, como a aterosclerose carótida [131]. Neste caso foi observado que o referido alelo é tido como um fator de risco independente para o enfarte agudo do miocárdio, especialmente em pacientes que não apresentam outros fatores de risco [131] e que a frequência do genótipo 4a/4a é maior em indivíduos com doença arterial coronária em comparação com indivíduos normais [132].

No trabalho realizado, verificou-se que para a amostra em estudo existem diferenças estatisticamente significativas em relação à frequência genotípica dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* entre sexos (p -value = 0,011) e que a presença do alelo 4a está associado no sexo feminino a um maior risco de ser hipertenso. Este resultado encontra-se em contradição com o que foi observado noutro estudo onde são os indivíduos do sexo masculino que transportam o alelo (4a) que estão associados a um risco elevado de ser hipertenso [133].

A análise das variáveis em estudo, sem a inclusão dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3*, mostrou que após o ajuste para a idade apenas o IMC e a glicémia apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre hipertensos e normotensos, mostrando uma possível associação destas variáveis com a hipertensão. Assim, parece haver uma ligação da hipertensão com níveis/valores elevados de IMC e glicémica, indicando uma possível ligação da hipertensão com a obesidade /excesso de peso assim como com a diabetes.

Após a inclusão dos polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* na análise, sem o ajuste para a idade, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os polimorfismos do intrão 4 do gene *NOS3* e as variáveis em estudo (entre hipertensos e normotensos ou apenas na população hipertensa), mas quando o ajuste para a idade é realizado, deixam de se verificar estas associações entre as variáveis e os polimorfismos nas respectivas populações, com a exceção do IMC e da uricémia, porque observou-se que na ausência do alelo 4a encontram associados aos indivíduos hipertensos, (p -value = 0,002 e p -value = 0,016). E apesar de não serem encontrados na literatura estudos que relacionam diretamente estes polimorfismos no intrão 4 do gene *NOS3* com as variáveis em estudo entre hipertensos e normotensos, verifica-se num estudo sobre a relação destes polimorfismos e artéria carótida um resultado semelhante ao obtido para o IMC, ou seja, não se verifica nenhuma associação entre os indivíduos que possuem o alelo 4a e o IMC [131], bem como entre os genótipos do gene *NOS3* e o IMC e a uricémia [131] [134]. O que poderá sugerir que tanto IMC e a uricémia possam ser fatores de risco independentes e associados a hipertensão na ausência de outros fatores de risco, sendo que a uricémia é uma das variáveis associadas aos casos de hipertensão secundária.

Em relação à G6PD e à sua possível associação com a hipertensão por diminuição da biodisponibilidade do NO, verifica-se que em relação aos resultados obtidos (para as frequências genotípicas e alélicas) não existem diferenças estatisticamente significativas entre hipertensos e normotensos (para ambos os sexos), apesar de estar descrito que indivíduos que apresentam o SNP rs10500829, têm a atividade da G6PD normal ou medianamente reduzida (cerca de 85 % da atividade normal), isto não parece ter interferência no desenvolvimento da hipertensão nesta nossa população. Uma hipótese poderá ser pelo reduzido número de casos positivos aqui detetados, uma vez que a variante

estudada é sobretudo frequente em indivíduos de ascendência africana [82] e a frequência das enzimopatias relacionadas com a G6PD em Portugal é muito baixa (0,51%) [69].

Em relação aos resultados obtidos para a alfa-globina e alfa-talassémia estes são condizentes com os observados para a G6PD, ou seja, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre hipertensos e normotensos no que diz respeito a pesquisa da deleção α -talassémica ($-\alpha^{3,7}$).

Foi descrito um potencial mecanismo de interação proteína-proteína entre a α -globina e a eNOS (numa região da proteína α -globina correspondente ao exão 2 dos genes *HBA1* e *HBA2*) uma vez que formam um complexo macromolecular que poderá regular os efeitos do NO na reatividade vascular, atuando de modo a balancear os processos de constrição com os processos de relaxamento de modo a assegurar a tonicidade vascular, que é maior em doentes hipertensos [123]. Na pesquisa de variantes polimórficas para o exão 2 dos genes *HBA1* e *HBA2* (nos indivíduos que não apresentam a deleção) não foram detetadas quaisquer alterações. Isto significa que a hipótese que foi levantada de possíveis polimorfismos nesta região poderão interferir na interação proteína – proteína entre a α -globina e a eNOS se revelou sem significado na população estudada.

No trabalho aqui apresentado observou-se uma prevalência de portadores de alfa-talassémia ($-\alpha_{3,7kb/\alpha\alpha}$) de 1,2% o que foi abaixo do esperado segundo os dados da literatura para a população portuguesa (7%,) [108]. Seria interessante realizar um estudo de prevalência desta patologia na população Portuguesa para confirmação deste resultado.

Uma vez que a população Moçambicana apresenta uma taxa de hipertensão elevada (33,1%) sendo ligeiramente menor nas mulheres (31,2%) do que nos homens (35,7%), fez-se uma caracterização das frequências genotípicas e alélicas das variantes dos genes suscetíveis de estarem relacionados com à hipertensão em indivíduos Moçambicanos normotensos para se averiguar a distribuição das mesmas. Observou-se que para as variantes no *NOS3* os alelos e 4a, 4b, 4c e 4d apresentam, respetivamente, as frequências de 40,9%, 54,5%, 2,3% e 2,3%, estando estes resultados semelhantes aos que se encontram referenciados, uma vez que se encontra descrito frequências do alelo 4c em Africanos (6,3%), Afro-Americanos (10,4%) e em indivíduos Caucasianos (0,4%) [124] [135], sendo adicionalmente observado na população Africana a frequência do alelo 4d (1,1%) [134]. Apesar de raros os alelos 4c e 4d, alguns estudos têm tentado aferir a relação dos mesmos com diferentes patologias em diferentes populações, sendo sugerido que o alelo 4c pode desempenhar um papel importante como um potencial marcador genético para o acidente vascular cerebral (AVC) isquémico [135].

Nesta população Moçambicana, tanto para a G6PD (alelo Gd-) e para a alfa-talassémia (alelo mutado, $-\alpha^{3,7}$) as frequências bastante elevadas obtidas, respetivamente, 35,7% e 40,9%, e podem estar relacionados com o fator protetivo que estas conferem em relação a zonas endémicas para a malária, existindo possivelmente uma seleção positiva dos heterozigóticos para esta patologia [70] [136]. Ainda assim, para melhor caracterização das frequências elevadas para a população Moçambicana observadas para o alelo 4a em *NOS3*, para a deleção talassémica de 3, kb no agrupamento génico da α -globina e do alelo Gd- da G6PD, procurou-se na literatura [124] [125] populações próximas com características sociodemográficas e *background* genéticos semelhantes para inferir se apesar de amostra Moçambicana ser pequena (N = 22) se os resultados obtidos estariam de acordo com o esperado para uma população Africana. Observou-se que as diferenças não foram estatisticamente significativas o que poderá evidenciar que este padrão de distribuição destes genótipos seja o esperado para populações Africanas de acordo as pressões seletivas que os mesmos possam ter estado sujeitos.

VI. CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se existirem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de indivíduos hipertensos e o grupo de normotensos no que diz respeito a idade, IMC, glicémia, os triglicéridos. Este facto é coincidente com o conhecimento de que a hipertensão existe muitas vezes em associação com outras patologias tais como a sobrecarga em peso/obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, etc.

No presente estudo concluiu-se que o alelo 4a do gene *NOS3* encontra-se associado a um maior risco de ser hipertenso e que os indivíduos que apresentam o alelo 4a, o risco (relativo) de ser hipertenso é 1,2 vezes superior em comparação com os indivíduos que apresentam o alelo 4b, ou seja, que a presença do alelo 4a (em heterozigotia ou homozigotia) parece ser um fator de suscetibilidade genética para a hipertensão na população portuguesa. No entanto, será desejável realizar a confirmação destes resultados num outro grupo de pacientes hipertensos e, de preferência, com ausência de outras comorbilidades. Estes resultados valorizam o papel do metabolismo do óxido nítrico na manutenção da tensão arterial, tal como já tem vindo a ser sugerido na literatura.

Não foram encontradas quaisquer associações entre as variantes genéticas estudadas e os fenótipos intermédios em estudo. No entanto, na ausência do alelo 4a do gene *NOS3* verificaram-se associações de alguns fenótipos intermédios (IMC e uricémia), ajustado para a idade, bem como a glicémia (sem o ajuste para a idade) com a hipertensão.

Não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas para a variante da G6PD e para a presença da alfa-talassémia entre os grupos de indivíduos hipertensos vs normotensos. Contudo observou-se uma frequência muito elevada para variante da G6PD (alelo Gd-) e para a alfa-talassémia (alelo mutado, $-\alpha 3,7$) na população Moçambicana. Estas frequências muito elevadas já eram esperadas atendendo ao conhecimento do poder de seleção positiva que têm sofrido pela malária em África.

Deste modo, a identificação do contributo de variantes genéticas suscetíveis de induzirem o surgimento do fenótipo hipertenso, poderá permitir o reconhecimento de indivíduos suscetíveis e a classificação dos pacientes em subgrupos com distintas características genéticas, de maneira a serem delineadas as melhores estratégias preventivas e terapêuticas. No entanto, os resultados deste estudo deverão ser confirmados numa amostra populacional de maior dimensão de forma a serem obtidos dados mais representativos da contribuição dos referidos polimorfismos para esta patologia.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kohlman N, Kohlman O. Histórico e perspectivas da medida da pressão arterial. *R Hipertensão* 2011; 14 (2).
- [2] Introcaso L. História da medida da pressão arterial – 100 anos de esfigmomanómetro. *Arq Cardiologia* 1996; 67 (5).
- [3] Introcaso L. História da medida da pressão arterial. *HiperAtivo* 1998; 5 (2).
- [4] Estañol B, Delgado G, Borgstein J. Korotkoff sounds - The improbable also occurs. *Arq Cardiologia* 2013; 101 (5): e99Ye105.
- [5] Babbs C. The origin of Korotkoff sounds and the accuracy of auscultatory blood pressure measurements. *J Hypertension* 2015; 9 (12): 935–950.
- [6] Saklayen M, Deshpande N. Timeline of history of hypertension treatment. *J Cardiovascular Medicine* 2016; 3:3.
- [7] Moser M. Historical perspectives on the management of hypertension. *J. Hypertension* 2006; 8 (e-suppl 2):15–20.
- [8] Romero J, Wolf P. Epidemiology of Stroke: Legacy of the Framingham Heart Study. *G Heart* 2013; 8:67–75
- [9] Franklin S, Wong D. Hypertension and cardiovascular disease: contributions of the framingham heart study. *G Heart* 2013; 8:49-57.
- [10] Rahimi K, Emdin C, MacMahon S. The epidemiology of blood pressure and its worldwide management. *C Research*. 2015;116 (6): 925–936
- [11] Kumar J. Epidemiology of hypertension. *C Q Nephrology* 2013; 2 (2): 56-61.
- [12] Passos V, Assis T, Barreto S. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa da prevalência a partir de estudos de base populacional. *E S Saúde* 2006; 15(1): 35 – 45.
- [13] Mills K, Bundy J, Kelly T, Reed J, Kearney P, Reynolds K, et al. Global disparities of hypertension prevalence and control: a systematic analysis of population-based studies from 90 countries. *Circulation* 2016; 134: 441–50.
- [14] Poulter N, Prabhakaran D, Caulfield M. Hypertension. *Lancet* 2015; 386: 801-12
- [15] Oparil S, Acelajado M, Bakris G, Berlowitz D, Cífková R, Dominiczak A, et al. Hypertension. *Nature* 2018; 4.
- [16] Polonia J, Martins L, Pinto F, Nazare J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertension* 2014; 32: 1211e1221.

- [17] Krieger J, Pereira A. Genética da hipertensão arterial. Elsevier 2006; 17 – 24.
- [18] Rosário T, Scala L, França G, Pereira M, Jardim P. Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres – MT. *A Cardiologia* 2009; 93: 622–8
- [19] Corrêa T, Namura J, Silva C, Castro G, Meneghini A, Ferreira C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Arq Med ABC* (2005), 31(2), 91-101.
- [20] Chobanian A, Bakris G, Black H, Cushman W, Green L, Izzo J, et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of high blood pressure hypertension 2003; 42 (6): 1206-52.
- [21] Sanjuliani A. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. *R SOCERJ* 2002; 15 (4).
- [22] Bloch K, Rodrigues C, Fiszman R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. *R Hipertensão* 2006; 13 (2): 134-43.
- [23] Krieger E, Franchini K, Krieger J. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. *Medicina* 1996; 29: 181 – 192.
- [24] Couto A, Kaiser S. Manual de hipertensão arterial da sociedade de hipertensão do Estado do Rio de Janeiro. *SOHERJ* 2003.
- [25] Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M. Guidelines de 2013 da ESH/ESC para o tratamento da hipertensão arterial. *J Hypertension* 2013; 31: 1281 – 1357.
- [26] Direção Geral de Saúde. A hipertensão arterial em Portugal: Análise epidemiológica nos cuidados de Saúde Primários. Lisboa (2013). Disponível em <https://www.dgs.pt/em-destaque/a-hipertensao-arterial-em-portugal-.aspx>. Consultado em 10/04/2018.
- [27] Lurbe E, Cifkova R, Cruickshank J, Dillon M, Ferreira I, In-vitti C, et al. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2009; 27: 1719–1742.
- [28] Whelton P, Carey R, Aronow W, Casey E, Collins K, Dennison C. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension* 2017.
- [29] Sousa A, Jardim P, Mendonça B, Jardim T, Barroso W, Rodrigues R, et al. Medida casual da pressão arterial: vantagens e desvantagens no diagnóstico e tratamento da hipertensão arterial. *S B Hipertensão* 2011; 14 (14).
- [30] Mion D, Ortega K. Monitorização ambulatorial da pressão arterial: o que mudou no diagnóstico, prognóstico. *S B Hipertensão* 2011; 14 (14).

- [31] O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mancia G, Mengden T, et al. Practice guidelines of the European Society of Hypertension for clinic, ambulatory and self blood pressure measurement. *J Hypertension* 2005; 23: 697–701.
- [32] O'Brien E, Parati G, Stergiou G, Asmar R, Beilin L, Bilo G, et al. On behalf of the European Society of Hypertension working group on blood pressure monitoring. European Society of Hypertension position paper on ambulatory blood pressure monitoring. *J Hypertension* 2013.
- [33] Oliveira G, Mendes M, Malachias M, Morais J, Filho O, Coelho A, et al. Diretrizes de 2017 para manejo da hipertensão arterial em cuidados primários nos países de língua portuguesa. *R Cardiologia* 2017; 36 (11): 789 – 798.
- [34] O'Donnell M, Mente A, Smyth A, Yusuf S. Salt intake and cardiovascular disease: why are the data inconsistent? *J. Heart* 2013; 34: 1034 – 40.
- [35] Aburo N, Ziolkovska A, Hooper L, Elliott P, Cappuccio F, Meerpohl J. Effect of lower sodium intake on health: systematic review and meta-analyses. *J. Biology and Molecular* 2013; 346: f1326.
- [36] Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Chemistry* 2002; 277: 44085-44092.
- [37] Moncada S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *A Sciences* 1997; 811: 60-7.
- [38] Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *J Biochemical* 2001; 357 (3): 593-615.
- [39] Furchgott F, Zawadzki V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- [40] Dusse L, Vieira L, Carvalho M. Revisão sobre óxido nítrico. *J Patologia Médica* 2003; 39: 343–350.
- [41] Junior T, Asano R, Prestes J, Sales M, Coelho J, Simões H. Óxido nítrico e exercício: uma revisão. *R Educação Física* 2012; 23 (3): 468 – 481.
- [42] Zago A, Kokubun E, Brown M. Exercício físico como estímulo para o aumento da produção e biodisponibilidade do óxido nítrico e seu efeito no controle da pressão arterial. *Arq Saúde* 2009; 13 (1): 59 – 66.
- [43] Williams I, Wheatcroft S, Shah A, Kearney M. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric bioavailability in obese humans. *J Obesity* 2002; 26: 754 – 764.
- [44] Santiago C, Fernandes C, Nogueira M, Veiga E, Câmio E. Utilização do óxido nítrico como terapêutica: implicações para a enfermagem. *R Enfermagem* 2000; 8 (6): 76 – 82.

- [45] Lacchini S. Óxido nítrico: perspectivas clínicas na função endotelial. R S Cardiologia 2004; 3.
- [46] Vargas M, Viera D. O papel do óxido nítrico na proteção dos vasos sanguíneos e sua relação com a aterosclerose: revisão de literatura. R Saúde 2009; 1 (1): 101-109.
- [47] Dias-Junior C, Cau A, Tanus-Santos J. Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. J Pneumologia 2008; 34 (6): 412-419.
- [48] Zago A, Zanesco A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. Arq Cardiologia; 87 (6): e264-e270. 2006.
- [49] Clancy R, Amin A, Abramson S. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. A Rheum 1998; 41 (7): 1141-51.
- [50] Viaro F, Évora P. Expressão das óxido nítrico sintetases na vasculopatia coronariana do transplante cardíaco. R Cardiologia 2000; 15 (1): 55-65
- [51] Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. R Hipertensão; (2001) 8 (3); 328-338.
- [52] Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. R Medicina 2000; 46 (3): 265 – 71.
- [53] Farah C, Michel L, Balligand JL. Nitric oxide signaling in cardiovascular health and disease. Nature 2018.
- [54] Johnson A, Faraci F. Transforming endothelial nitric oxide synthase in hypertension: more than meets the eye. Hypertension 2011; 58: 359 –360.
- [55] Nascimento C, Patriarca G, Heimann J. Estrutura orgânica do endotélio vascular. E D Cardiovascular 2003; 1- 16.
- [56] Galley H; Webster N. Physiology of the endothelium. J Anaesthesia, 2004; 93: 105-13.
- [57] Carvalho M, Nigro D, Lemos V, Tostes R, Fortes Z. Hipertensão arterial: o endotélio e as suas múltiplas funções. R Hipertensão 2001; 8 (1).
- [58] Lundberg J, Gladwin M, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. Nature 2015.
- [59] Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher A. Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes. Further evidence for the existence of the “vulnerable” patient. Circulation 2004; 110: 1926-1932.
- [60] Marte A, Santos R. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. R Hipertensão 2007; 14 (4): 252 – 257.

- [61] Gewaltig M, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. *R Cardiovascular* 2002; 55: 250-60.
- [62] Wang X, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *M G Metabolic* 2000; 70 (4): 241-51.
- [63] Shankarishan P, Borah P, Ahmed G, Mahanta J. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of hypertension in an Indian population. *R BioMed* 2014.
- [64] Zhang M, Shen Y, Wang J, Wang J, Coselli J, Wang X. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *PNAS* 2005; 102 (47): 16967–16972.
- [65] Kimura T, Yokoama T, Matsumura Y, Yoshiike N, Muramatsu M, Tanaka H. NOS3 Genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension* 2003
- [66] Wattanapityakul S, Mihm M, Young A, Bauer J. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthases gene polymorphism. *Science* 2001; 22: 361–368.
- [67] Tsakuda T, Yokoyoma K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *B. Comunications* 1998; 245: 190 – 193.
- [68] Dhangdamajhi G. A new allele (eNOS4e) in the intron 4 (VNTR) of eNOS gene in malaria infected individuals of the population of Orissa (an eastern Indian state). *Elsevier* 2010; 22: 58 – 59.
- [69] Gomes O, Biléu M, Borges L. deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase – a propósito de um caso clínico. *R S A Lusitano* 2013; 32: 31-35.
- [70] Cappellini M, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008; 371 (9606): 64-74.
- [71] Costa E, Barbot J, Coimbra E, Pinho L, Benvindo J, Cabeda J. Défice de glicose-6-fosfato desidrogenase em 10 famílias residentes no norte de Portugal.
- [72] Stanton R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB* 2012; 64 (5): 362-369.
- [73] Perinoto A, Costa C, Duarte G, Paula R, Paula F, Duarte S. Prevalência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em uma população adulta. *R Rio Verde* 2013; 11 (1): 127 – 134.
- [74] Ferreira R, Leite F, Leite A. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara, Estado de São Paulo. *R Aplicada* 2014; 35 (3): 469 – 472.
- [75] Hecker P, Lionetti V, Ribeiro R, Rastogi S, Brown B, O'Connell K, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency increases redox stress and moderately accelerates the development of heart failure. *Circulation* 2012; 6 (1): 118-126.

- [76] Katsuragawa T, Gil L, Stabile R, Pires M, Bonini-Domingos C: Incidence evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and hematological profile in Rondônia. *R Hematologia* 2004; 26: 268-273.
- [77] Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hematological* 2016; 30: 373 – 393.
- [78] Minucci A, Moradkhani K, Hwang M, Zuppi C, Giardina B, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the “old” and update of the new mutations. *Blood Cells* 2012; 48: 154–165.
- [79] Compri M, Saad S, Ramalho A. G-6-PD deficiency in a Brazilian community: An investigation involving epidemiological, genetics and molecular techniques. *C. S Pública* 2000; 16: 335–342.
- [80] Ho H, Cheng M, Chiu D. G6PD--an old bottle with new wine. *J Medicine* 2005; 28: 606–612.
- [81] Au S, Gover S, Lam V, Adams M. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP (+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* 2000; 8 (3): 293–303.
- [82] Enevold A, Vestergaard L, Lusingu J, Drakeley C, Lemnge M, Theander T, Bygbjerg I, Alifrangis M. Rapid screening for glucose- 6-phosphate dehydrogenase deficiency and haemoglobin polymorphisms in Africa by a simple high-throughput SSOPELISA method. *J Malaria* 2005; 4: 61
- [83] Santos S, Prado R, Oliveira C, Pessoa C, Borges R, Barros K. Associação da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em população brasileira afrodescendente. *B Geum* 2016; 7 (1): 106 – 111.
- [84] Kwangu M, Chileya S, Yassa P, Lambwe N, Sijumbila G. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency and its role in pathophysiology of essential hypertension. *J Medical Science & Technology* 2014; 3 (2): 67 –74.
- [85] Matsui R, Xu S, Maitland K, Hayes A, Leopold J, Handy D, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases the vascular response to angiotensin II. *Circulation* 2005; 112: 257–263.
- [86] Hecker P, Leopold J, Gupte S, Recchia F, Stanley W. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. *J. Physiology* 2013; 304: H491–H500.
- [87] Kwangu M, Yassa P, Lambwe N, Mukosha M, Sijumbula G. Interplay between nitric oxid (NO) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity in primary hypertension. *J Medicine and Medical Sciences* 2014; 6 (7): 165 – 170.
- [88] Steinberg M, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Journal Hematology* 2012; 87: 795–803.
- [89] Steinberg M, Benz Jr. E, Adewoye A, Ebert B. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Elsevier 2009: 427–38.

- [90] Beutler E. Disorders of hemoglobin structure: sickle cell anemia and related abnormalities. *W Hematology* 2006; 667-700.
- [91] Frenette P, Atweh G. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J C Investigation* 2007; 117 (4): 850-8.
- [92] Wood B, Higgs D. Molecular basis of thalassemia syndromes. *ESH Handbook on Disorders of Erythropoiesis* 2009; 250–63.
- [93] Chui D, Steinberg M. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemias. Elsevier 2009; 525–33.
- [94] Goh S, Lee Y, Bhanu H, Cam M, Desper R, Martin B, et al. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood* 2005; 106: 1466-1472.
- [95] Weatherall D. The Thalassemias. *The molecular basis of blood diseases*. Philadelphia 2001b; 183-226.
- [96] Forget B, Hardison R. The normal structure and regulation of human globin gene clusters. *C University* 2009; 46-85.
- [97] Costa S, Madeira S, Sobral M, Delgadinho G. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *R Medicina Geral Familiar* 2016; 32 (4): 16 – 24.
- [98] Schechter A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008; 112:3927–38 161.
- [99] Sankaran V, Lettre G, Orkin S, Hirschhorn J. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of hemoglobin disorders. *A Sciences* 2010; 1214:47–56.
- [100] Melo-Reis, Naoum P, Diniz-Filho J, Dias-Penna K, Mesquita M, Balestra F, et al. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás. *J Medicina Laboratorial* 2006; 42 (6): 425 – 430.
- [101] Williams T, Weatherall D. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *C Medicine* 2012; 2 (9): a011692.
- [102] Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *D International* 2011; 108 (31-32): 532–40.
- [103] Forget B, Bunn H. Classification of the disorders of hemoglobin. *C Medicine* 2013; 3 (2): a011684.
- [104] Giardina P, Forget B. Thalassemia Syndromes. *Hematology* 2009; 535–63.
- [105] Rachmilewitz E, Giardina P. How I treat thalassemia. *Blood* 2011 29; 118 (13): 3479–88.
- [106] Forget B, Cohen A, Thalassemia Syndromes. Elsevier 2005; 557-589.

- [107] Weatherall D. Disorders of globin synthesis: The thalassemias. *W Hematology*, 2006; 633-666.
- [108] Peres M, Carreiro M, Machado M, Seixas T, Picanço I, Batalha L, et al. Rastreo neonatal de hemoglobinopatias numa população residente em Portugal. *A M Portuguesa* 1996; 9: 135-139.
- [109] Weatherall D, Clegg J. Genetic disorders of hemoglobin. *Hematology* 1999; 36 (4): 24-37.
- [110] Forget B, Cohen A, *Thalassemia Syndromes*. Elsevier 2005; 557-589.
- [111] Weatherall D, Clegg J, Higgs D, Wood W. *The Hemoglobinopathies*. McGraw-Hill 2001; 8 (3): 4571-4636.
- [112] Higgs D. The molecular basis of α -thalassemia. *C Medicine* 2013; 3(1): a011718.
- [113] Weatherall D, Provan A. Red cell I: inherited anaemias. *Lancet* 2000; 355: 1169-1175, 2000.
- [114] Vichinsky E. Clinical manifestations of α -thalassemia. *C medicine* 2013; 3 (5): a011742.
- [115] Singer S. Variable clinical phenotypes of alpha-thalassemia syndromes. *J World* 2009; 9: 615–25.
- [116] Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $\alpha^3.7$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *J Haematology* 1993; 83 (1), 105-111.
- [117] Wang W, Ma E, Chan A, Prior J, Erber W, Chan L, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for anti-3.7 and anti -4.2 alpha-globin gene triplications. *C. Chemistry* 2003; 49 (10): 1679-1682.
- [118] Zago M, *Talassemias*. *T Hematologia* 2017; 28.
- [119] Somlyo A, Le T, Isakson B. Hemoglobin α /eNOS coupling at myoendothelial junctions is required for nitric oxide scavenging during vasoconstriction. *A Biology* 2014; 34: 2594e2600.
- [120] Straub C, Lohman A, Billaud M, Johnstone S, Dwyer S, Lee Y, Isakson B. Endothelial cell expression of haemoglobin α regulates nitric oxide signalling. *Nature* 2012; 491 (7424): 473-477.
- [121] Helms C, Kim-Shapiro D. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *B. Medicine* 2013; 0: 464 – 472.
- [122] Reddy P, Bowie L, Callisten S. Binding of nitric oxide to thiols and hemes in hemoglobina H: implications for α -thalassemia and hypertension. *C. Chemistry* 1997; 43 (8): 1442 – 1447.
- [123] Buecher J, Johnson T, Beers J, Columbus L, Isakson B. Hemoglobin α in the blood vessel wall. Elsevier 2014; 73: 136 – 142.
- [124] Thomas B, Thakur T, Yi L, Guindo A, Diallo D, Ott J. Extensive ethnogenomic diversity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) polymorphisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 2013; 7: 1 – 10.

- [125] Manjurano A, Sepulveda N, Nadjim B, Mtove G, Wangai H, Maxwell C. et al. African glucose-phosphate dehydrogenase alleles associated with protection from severe malaria in heterozygous females in Tanzania. *PLoS Genetics* 2015; 11 (2) : e1004960.
- [126] Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsue K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *J. Hypertension* 1998; 11: 125 – 128.
- [127] Shankarishan P, Borah P, Ahmed G, Mahanta J. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of hypertension in an Indian population. *BioMed* 2014.
- [128] Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal A, Sikdar S, Gupta M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension. *Elsevier* 2008; 44: 1912 – 1918.
- [129] Chen Q, Wang H, Xiao D, Liang T, Yu J, Yang J. Association between eNOS 4b/a polymorphism and susceptibility of pulmonar hypertension: a meta-analysis of 6 studies. *J. Medicine* 2016; 9 (8): 15510 – 15517.
- [130] Kitsios G, Zintzaras E. An NOS3 haplotype is protective against hypertension in a caucasian population. *J. Hypertension* 2010.
- [131] Sen F, Demirturk M, Abaci N, Golcuk E, Oflaz H, Elitok A, et al. *J. Endocrinology* 2008; 158: 615 – 622.
- [132] Sivri N, Unlu A, Palabiyik O, Budak M, Kacmaz Y, Yalta K, et al. Endothelial nitric oxide synthase intron 4a/4b polymorphism in coronary artery disease in Thrace region of Turkey. *Biotechnology & Biotechnological* 2014; 28 (6): 1115 – 1120.
- [133] Patkar S, Charitta B, Ramesh C, Padma T. High risk of essential hypertension in males with intron 4 VNTR polymorphism of eNOS gene. *J. Human Genetics* 2009; 15 (2).
- [134] Munshi A, Rajeshwar K, Kaul S, Chandana E, Gowhar S, Anila A, et al. VNTR polymorphism in intron 4 of the eNOS gene and the risk of ischemic stroke in a South Indian population. *B. Bulletin* 2010; 82: 247 – 250.
- [135] Grewal R, Dutra A, Liao Y, Juo H, Papamitsakis N. The intron 4c allele of the NOS3 gene is associated with ischemic stroke in African Americans. *BMC. Medical Genetics* 2007; 8: 76.
- [136] Mockenhaupt F, Ehrhardt S, Gellert S, Otchwemah R, Ekkerhart D, Anemana S, et al. α^+ -thalassemia protects African children from severe malaria. *B. Journal* 2004; 104 (7).
- [137] Direção-Geral da Saúde. Atualização dos critérios de classificação e diagnóstico da diabetes mellitus – Circular normativa n°09/DGCG 2002.
- [138] Direção-Geral da Saúde. Programa nacional de combate à obesidade – Circular normativa n°03/DGCG 2004.

[139] Direção-Geral da Saúde. Atualização dos critérios de classificação e diagnóstico da diabetes mellitus – Circular normativa nº09/DGCG 2002.

[140] Observatório Nacional da Diabetes. Diabetes: factos e números 2010 – Relatório anual.

[141] Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e classificação da diabetes mellitus – 002/2011

[142] Direção-Geral da Saúde. Prescrição de exames laboratoriais para avaliação e monitorização da função tiroideia – 039/2011.

[143] Direção-Geral da Saúde. Prescrição e determinação da hemoglobina glicada A1c – 033/2011.

[144] Direção-Geral da Saúde. Abordagem terapêutica das dislipidemias no adulto – 019/2011.

VIII. ANEXOS

VIII.1. Extração de DNA através do Método de *Salting-out*

Composição dos reagentes:

- ↪ TKMX-100 (2,5% (v/v) Triton X-100 diluído em tampão TKM1);
- ↪ Tampão TKM1 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA);
- ↪ Tampão TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA 0,4M NaCl);
- ↪ IGEPAL CA-630-octilfenoxi polietoxietanol (Sigma-Aldrich);
- ↪ Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%;
- ↪ NaCl 6M;
- ↪ Tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA);
- ↪ Etanol absoluto.

Protocolo experimental:

1. O DNA foi extraído de sangue periférico colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transferiu-se 2mL para um tubo rolhado e graduado de 10ml.
3. Adicionou-se 1 volume de TKM X-100.
4. Adicionou-se 25µl de IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue.
5. O tubo foi agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Seguiu-se uma centrifugação a 2200 rpm, à temperatura de aproximadamente 4° C e durante 15 minutos, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante foi rejeitado e ao *pellet* que contém, entre outros constituintes, ao DNA, foi adicionado 1ml de tampão TKM 1 por cada ml de sangue.
8. Centrifugou-se à mesma temperatura, a 1600 rpm e por um período de 10 min e foram repetidos os passos de rejeição do *pellet* e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior foi repetido no máximo duas vezes de modo a ser obtido um *pellet* branco evitando perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspendeu-se o *pellet* (vortex) na solução de TKM 2 numa proporção de 160ml por ml de sangue.
11. Adicionou-se 10µl de SDS 10% por ml de sangue e a mistura foi ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta.
12. Incubou-se a 55° C por 10 minutos.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo foi transferido para um *ependorf* ao qual se juntou 60µl de NaCl saturado por ml de sangue. Visualizou-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que forma uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).

14. Agitou-se o tubo *ependorf* no vortex.
15. Centrifugou-se numa centrífuga de *ependorfs*, a 12000 rpm, à temperatura ambiente e por 30 minutos num processo denominado *salting-out*.
16. Verteu-se o sobrenadante resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionou-se aproximadamente 2 volumes de etanol absoluto previamente arrefecido a -20° C.
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, foi invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Realizou-se a resuspensão do DNA em 200µl de Tampão TE previamente colocados no tubo de *ependorf* devidamente rotulado e armazenado a 4° C.

VIII.2. Tampões usados para realização do PCR e Eletroforese em Gel de Agarose

Tampões (PCR):

- ↗ PCR Master Mix (2X) – Thermo Scientific:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012622_PCR_Master_2X_K0171_UG.pdf;
- ↗ EmeraldAmp Max PCR Master Mix – Takara:
http://www.clontech.com/PT/Products/PCR/High_Yield_PCR/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=11102&fileId=7313918&sitex=10023:22372:US;
- ↗ Tampão α 10x: 116mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl pH 8,8, 15mM MgCl₂, 0.67mM EDTA, 100mM β -mercaptoetanol.
- ↗ Tampão Big Dye 5x:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_086582.pdf.

Tampão (eletroforese):

- ↗ TBE 10x: 108g de Tris base (FW=121), 55g de ácido bórico (FW=61.8), 40mL de 0.5M de EDTA (pH=8.0) para 1000mL de H₂O.

VIII.3. Mistura Reacional e Condições de PCR (*NOS3*)

Tabela VIII. 1. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho dos fragmentos amplificados para o VNTR do intrão 4 do gene *NOS3*

Reagentes	Quantidade (μl)	Primers	Fragmentos amplificados (pb)
Master Mix (2x)	12,5		
Primer direto (10 pmol/μl)	1	Primer direto: 5'AGGCCCTATGGTAGTGCC3'	447
Primer reverso (10 pmol/μl)	1	Primer reverso: 5'TCTCTTAGTGCTGTGGTCA3'	420
H ₂ O	9,5		393
DNA molde (100ng/μl)	1		

Tabela VIII. 2. Condições de PCR para o VNTR do intrão 4 do gene *NOS3*

	T (°C)	Δt
30 Ciclos	94	2'
	94	30"
	55	30"
	72	45"
	72	5'
	4	∞

VIII.4. Mistura Reacional e Condições para PCR-RFLP (G6PD)

Tabela VIII. 3. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho do fragmento amplificado para o SNP rs1050829

Reagentes	Quantidade (µl)	Primers	Fragmentos amplificados (pb)
Master Mix (2x)	12,5		
Primer direto (10 pmol/µl)	1	Primer direto: 5'CTGCGTTTTTCTCCGCCAATC3'	
Primer reverso (10 pmol/µl)	1	Primer reverso: 5'AGGCAACGGCAAGCCTTAC3'	585
H ₂ O	9,5		
DNA molde (100ng/µl)	1		

Tabela VIII. 4. Condições de PCR para o SNP rs1050829.

	T (°C)	Δt
25 Ciclos	94	5'
	94	30''
	62,8	30''
	72	30''
	72	5'
	4	∞

Tabela VIII. 5. Condições da reação de restrição para o SNP rs1050829. N (qualquer nucleótido)

SNP	Enzima de restrição	Reagentes	Quantidade (µl)	Local de clivagem (setas)	Temperatura e o Tempo	Fragmentos (pb)
rs1050829	<i>Fok I</i>	Tampão Cutsmart (10x)	2,5	5'... GGATG(N) ₉ ▾ ... 3' 3'... CCTAC(N) ₁₃ ▴ ... 5'	37°C – 1 hora	402 289 187 117
		<i>Fok I</i> (5U/µl)	0,5			
		H ₂ O	2			
		Produto de PCR	15			

VIII.5. Mistura Reacional e Condições para o Gap-PCR (Alfa-Talassémia)

Tabela VIII. 6. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho dos fragmentos amplificados para a detecção da deleção de -3,7 Kb no agrupamento gênico da α -globina

Reagentes	Quantidade (μ l)		Primers	Fragmentos amplificados (kb)
	Mix 1	Mix 2		
EmeraldAmp Max PCR Master Mix	12,5	12,5	Primer direto A: 5'GGGATGCACCCACTG GCACT3'	2,1 1,9
DMSO	2,5	2,5		
BSA (10mg/mL)	0,6	0,4	Primer reverso B: 5'CTCCATTGTTGGCAC ATTCCGGG 3'	
Primer direto A (25 pmol/μl)	0,5	0,5	Primer Reverso C: 5'CTGCTGTCCACGCCC ATGCC3'	
Primer reverso B (25 pmol/μl)	0,5			
Primer reverso C (25 pmol/μl)	-	0,5		
H₂O	7,4	7,4		
DNA molde (100ng/μl)	1	1		

Tabela VIII. 7. Condições de PCR para detecção da deleção de -3,7 Kb no agrupamento gênico da α -globina

	T ($^{\circ}$ C)	Δ t
25 Ciclos	94	5'
	94	1'
	64	1'
	72	150''
	72	10'
	4	∞

VIII.6. Mistura Reacional e Condições de PCR para Amplificação dos Genes Alfa

Tabela VIII. 8. Especificação dos reagentes, primers e o tamanho do fragmento amplificado resultante da amplificação dos genes alfa

Reagentes	Quantidade (μ l)		Primers	Fragmentos amplificados (pb)
	A1	A2		
Tampão α (10x)	2,5	2,5		
DMSO	2,5	2,5		
BSA (10mg/mL)	0,4	0,4	Primer direto A: 5'GGACTCCCCTGCGGT CCAGG3'	
MgCl ₂ (25mM)	0,5	0,5	Primer reverso B: 5'CTCCATTGTTGGCAC ATTCCGGG 3'	
dNTPs (100mM)	0,5	9,5		978
Primer direto A (25 pmol/ μ l)	0,5	0,5	Primer Reverso C: 5'CTGCTGTCCACGCCC ATGCC3'	
Primer reverso B (25 pmol/ μ l)	0,5			
Primer reverso C (25 pmol/ μ l)	-	0,5		
H ₂ O				
DNA molde (100ng/ μ l)	1	1		

Tabela VIII. 9. Condições de PCR para amplificação dos genes alfa

	T (°C)	Δ t
32 Ciclos	95	10'
	95	1'
	61	1'
	72	1'
	72	10'
	4	∞

VIII.7. Protocolo de Purificação de produtos de PCR (Colunas JetQuick)

1. Ligar um banho seco a 65°C —70°C. Seguidamente colocar a aquecer a quantidade de Tampão de Eluição ou água bidestilada que será usada no passo 10.
2. Caso o volume de PCR tenha sido de 25µl, juntar 17µl de produto de PCR + 83µl água bidestilada para obter-se um volume final de 100µl
3. Adicionar 400µl da solução H1 aos 100µl anteriores.
4. Colocar a coluna num tubo coletor de 2mL e adicionar a mistura anterior, centrifugando o conjunto durante 1min a 12000 rpm.
5. Descartar o tubo coletor.
6. Reinsere a coluna num novo tubo coletor e adicionar 500µl da solução H2.
7. Centrifugar durante 1min a 12000 rpm.
8. Descartar o filtrado, reinsere a coluna no mesmo tubo coletor e centrifugar novamente a velocidade máxima durante 1min.
9. Descartar o tubo coletor.
10. Eluição do DNA: colocar a coluna num tubo de 1,5mL e adicionar, no centro da membrana, 30µl de tampão de eluição ou água bidestilada, previamente aquecido a 65°C — 70°C.
11. Deixar repousar 1min e centrifugar durante 2min a 12000 rpm.
12. Descartar a coluna e conservar o filtrado a -20°C caso não seja para uso imediato e a 4° se for para uso imediato.

VIII.8. Mistura Reacional e Condições de PCR para Sequenciação dos Genes Alfa

Tabela VIII. 10. Especificação dos reagentes e primer da mistura de PCR para os genes alfa

Reagentes	Quantidade (μl)	Primers
Tampão Big Dye (5x)	1,75	Primer direto: 5'GGACTCCCCTGCGGTCCAGG3'
Big Dye	0,5	
Primer direto (2 pmol/μl)	1	
H ₂ O	5,25	
Produto de PCR Purificado (100ng/μl)	1,5	

Tabela VIII. 11. Condições do PCR para sequenciação dos genes alfa

	T (°C)	Δt
25 Ciclos	96	4'
	96	10''
	55	5''
	60	4'
	60	8'
	4	∞

VIII.9. Valores de Referência para as Variáveis em Estudo.

Tabela VIII. 12. Indicação dos valores de referência para as variáveis em estudo

Variáveis	Valores de Referência
TSH (mcUI/ml)	0,30 – 4,20
IMC (kg/m ²)	18,5 – 24,9 ¹
	25,0 – 29,9 ²
	30,0 – 34,9 ³
	35,0 – 39,9 ⁴
	≥ 40 ⁵
Glicémia (mg/dl)	≥ 126 (ou ≥ 7,0 mmol/l) ⁶
HbA1c (%)	4,0 – 5,6
	5,7 – 6,4
	≥ 6,5
Colesterol (mg/dl)	≤ 190
HDL-Colesterol (mg/dl)	≥ 40
LDL-Colesterol (mg/dl)	≤ 115
Triglicéridos (mg/dl)	≤ 150 ⁷ ou ≤ 175 ⁸
Uricémia (mg/dl)	3,5 – 7,2 ⁹

¹Varição normal; ²Pré-obesidade; ³Obesidade Classe I; ⁴Obesidade Classe II; ⁵Obesidade Classe III. ⁶ Glicémia de Jejum. ⁷Em jejum; ⁸Sem jejum. ⁹(2,5 a 7,0 para homens e 1,5 a 6,0 para mulheres). Adaptado de [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144].