

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Título: Pesquisa da associação dos Polimorfismos M235T do gene do angiotensinogênio e de Inserção/ Deleção do gene da enzima conversora de angiotensina com doença arterial coronariana (DAC) e hipertensão arterial sistêmica

Igor Fernando Ferreira

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Título: Pesquisa da associação dos Polimorfismos M235T do gene do angiotensinogênio e de Inserção/ Deleção do gene da enzima conversora de angiotensina com doença arterial coronariana (DAC) e hipertensão arterial sistêmica

Igor Fernando Ferreira

Elisângela Rosa Cordeiro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Dezembro – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Título: Pesquisa da associação dos Polimorfismos M235T do gene do angiotensinogênio e de Inserção/ Deleção do gene da enzima conversora de angiotensina com doença arterial coronariana (DAC) e hipertensão arterial sistêmica.

Igor Fernando Ferreira

Elisângela Rosa Cordeiro
Instituto de Biomedicina

Homologado pela Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em 7_ /

Professor Doutor Kleber Del Claro

Uberlândia – MG
Dezembro – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Título: Pesquisa da associação dos Polimorfismos M235T do gene do angiotensinogênio e de Inserção/ Deleção do gene da enzima conversora de angiotensina com doença arterial coronariana (DAC) e hipertensão arterial sistêmica

Igor Fernando Ferreira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Elisângela Rosa Cordeiro

Uberlândia - MG
Agosto – 2015

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço à todos de coração.

Agradeço aos meus pais, Ari Fernando Ferreira e Edimari Aparecida Varussa Ferreira, pela determinação e luta na minha formação e do meu irmão, fazendo amparar os ensinamentos de meus avós.

Agradeço ao meu irmão, Bruno Antonio Ferreira que por mais difícil que fossem as circunstâncias, sempre teve paciência e confiança.

Agradeço a minha orientadora, Elisângela Rosa Cordeiro, que com paciência e muita determinação, conseguiu me orientar sabiamente nos meus caminhos e por ser uma excelente professora e profissional, a qual me espelho.

Agradeço também à minha namorada Priscilla Presotto Alves de Moura na qual me incentivou a todo momento sem me deixar abalar pelas dificuldades encontradas no caminho.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo do Curso, que por mais difícil fosse a jornada eles sempre a tornavam mais fácil.

E finalmente agradeço a Deus, por proporcionar estes agradecimentos à todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. Deus, que a mim atribuiu alma e missões pelas quais já sabia que eu iria batalhar e vencer, agradecer é pouco. Por isso lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, e o principal, viver é o meu modo de agradecer sempre.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior parte das taxas de morbidade e mortalidade por doenças não infecciosas na maioria dos países. Os fatores de risco, incluem: idade, sexo, hipertensão, tabagismo, elevada concentração sanguínea de lipoproteínas de baixa densidade, baixa concentração de lipoproteínas de alta densidade, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidade e história familiar de doença cardíaca prematura onde fatores genéticos parecem também estar envolvidos. O polimorfismo do gene humano do angiotensinogênio tem sido associado com a hipertensão arterial essencial. Já o polimorfismo inserção/deleção do gene da enzima conversora da angiotensina I tem se mostrado em associação com alto risco para eventos coronários agudos, morte súbita cardíaca e cardiomiopatia hipertrófica. O Brasil é um país com alta miscigenação populacional, sendo um fator delicado a ser considerado neste referido trabalho, se tratando de um número amostral reduzido, podendo não ser representativa para este tipo de estudo. Para se analisar fatores genéticos, seria mais satisfatório um estudo realizado com n amostral mais amplo. Através do referido estudo, foi constatado que ambos não apresentam relação intrínseca com a doença arterial coronariana e à hipertensão.

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana, Hipertensão Arterial Sistêmica, Sistema Renina Angiotensina, Angiotensinogênio, Enzima Conversora de Angiotensina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Doença Arterial Coronariana (DAC)	01
1.2. Sistema Renina-Angiotensina	03
1.3. A variante M235T do angiotensinogênio	05
1.4. Polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina	07
2. OBJETIVO	08
3. DESENVOLVIMENTO	08
3.1 Material e Métodos	08
3.1.1. Obtenção das Amostras	08
3.1.2. Extração de DNA	08
3.1.3. PCR (Polimerase Chain Reaction)	08
3.1.4. Reação de eletroforese	09
3.1.5. Estatística	10
3.2. RESULTADOS	10
3.3. DISCUSSÃO	15
3.4. CONCLUSÃO	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4.1. Referências das figuras	24
Anexo I	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Arterial Coronariana (DAC)

As doenças cardiovasculares representam importante problema de saúde pública em todo o mundo, visto que constituem a principal causa de morbi-mortalidade entre as doenças não infecciosas, e representam os mais altos custos em assistência médica (GUS, *et. al.*, 2002). A doença arterial coronariana (DAC) foi responsável por aproximadamente um terço de todas as mortes no mundo em 2002 (NORDLIE *et. al.*, 2005). No Brasil essa doença é responsável por aproximadamente 195 mil mortes por ano (BORGES, LESSA, 2015). Estima-se que, a nível mundial, as mortes por doença das artérias coronárias irão passar dos 13,1 milhões de 1990 para 24,8 milhões em 2020. Dada a importância desta doença como causa global de morte e de morbidade, e as respectivas consequências sociais e econômicas, a avaliação e a gestão dos seus riscos são fundamentais (Handler, 2005).

A DAC é uma doença cardiovascular de caráter inflamatório-crônica (Jing *et al.*, 2014). Em 1958, a aterosclerose foi definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como resultado do acúmulo de lipídios, hidratos de carbono, sangue e produtos sanguíneos, tecido fibroso e depósito de cálcio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1958). Esse depósito é chamado de "placa aterosclerótica" podendo obstruir as artérias e torná-las rígidas e irregulares, o que resulta em insuficiência de irrigação no coração devido à diminuição do fluxo sanguíneo coronariano, que por sua vez, ocorre em razão da redução da luz arterial que está diretamente relacionada ao nível de obstrução causada pelas placas (IGLÉZIAS *et al.*, 2001; PINHO *et al.*, 2010). (Figura 1)

Em geral, as manifestações clínicas da DAC, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica, têm início a partir da meia idade. No entanto, estudos indicam que o processo aterosclerótico começa a se desenvolver na infância. Estrias gordurosas, precursoras das placas ateroscleróticas, começam a aparecer na camada íntima da

aorta aos 3 anos de idade (HOLMAN, *et. al.*, 1958) e nas coronárias durante a adolescência, podendo progredir significativamente na terceira e quarta décadas de vida (STARY, 1990). O desenvolvimento da DAC sintomática tem sido correlacionado a fatores de risco para a aterosclerose. Entre os principais fatores estão a história familiar de DAC, dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, tabagismo e sedentarismo (KANNEL, *et. al.*, 1995; TRACY, 1995).

Estudos documentam a associação entre história familiar de DAC e a presença de fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes (BURKE, *et. al.*, 1991; BAO, *et. al.*, 1997). Considera-se que a ocorrência de DAC prematura, isto é, em ascendentes antes dos 55 e 65 anos de idade, respectivamente, para o sexo masculino e feminino, confere um risco significativo para a doença (Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia., 2001).

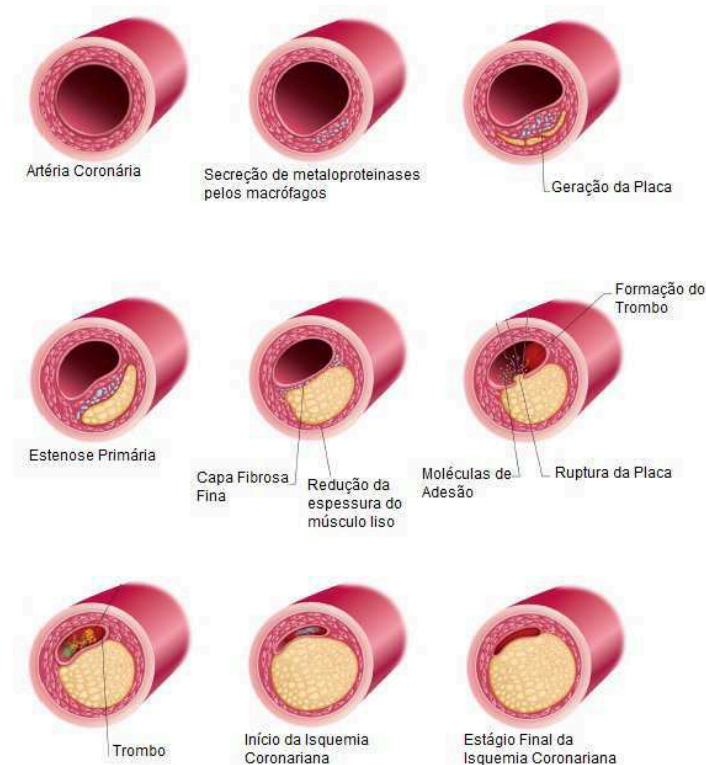


Figura 1- Desenho esquemático representando o desenvolvimento das placas de ateroma no processo de isquemia coronariana (YAYAN, J., 2013)

1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema hormonal amplamente estudado, cuja cascata de formação inclui interações enzima-substratos que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos (MOURA, 2006) influenciando o sistema cardiovascular tanto de forma direta, alterando morfologia funções cardíaca e vascular, como indiretamente modificando o ganho dos reflexos cardiovasculares, volume sanguíneo e o níveis de hormônios circulantes e teciduais (SANTOS,2000).

Os estudos acerca deste sistema iniciaram-se em 1898, com o relato realizado pelo fisiologista Robert Tiegerstedt e seu estudante Per Bergman sobre o extrato salino de rim de coelho, que apresentava um princípio pressórico ao qual denominaram renina (FHYRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Em 1940, o grupo argentino liderado por Braum-Menendez e, independentemente, Page e Helmer na Clínica Cleveland publicaram que a renina atuava sobre um substrato protéico plasmático gerando o verdadeiro princípio pressor, um peptídeo que os primeiros denominaram hipertensina e o segundo grupo denominou angiotonina. Posteriormente, ficou acordado que o peptídeo seria denominado angiotensina (SILVA, 2008).

Quando há diminuição da pressão arterial, com menor estiramento da arteríola aferente, depleção de sal, com menor oferta de cloreto de sódio, alterações de decúbito e hemorragias, os rins secretam uma substância chamada renina, a qual é sintetizada pelas células justaglomerulares. (GUYTON &, HALL, 2006). Classicamente, o SRA tem toda sua origem a partir do dodecapeptídeo angiotensinogênio, até então o único precursor das angiotensinas, que é clivado pela protease renina, que tem sua biossíntese realizada nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais, formando assim o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) liberado na circulação. A Ang I, por sua vez, é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em vários locais, com altas

concentrações principalmente nos pulmões, para formar o octapeptídeo Angiotensina II (AngII) (MOURA,2006).

Nos rins a Ang II realiza a sua principal função, a regulação da pressão arterial, alterando nos níveis de sódio e da hemodinâmica intra-renais e filtração glomerular (MCDONOUGH, 2010). Ela ainda estimula secreção do hormônio anti-diurético (ADH) pela glândula pituitária, este promove a inserção de aquaporinas e leva ao aumento da reabsorção de água no ducto coletor dos nefrons. Atua também aumentando a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, um hormônio esteroide sintetizado pela enzima aldosterona sintetase que tem efeito direto na excreção renal, induzindo a reabsorção de sódio e concomitante de potássio e a excreção do íon hidrogênio no rim (GUYTON &, HALL, 2006) (Figura 2). Portanto, qualquer disfunção neste sistema, como o aumento na síntese dos componentes desta cascata, faz com que eleve a pressão arterial à níveis que excedam os valores normais, causando o estado patológico de hipertensão.

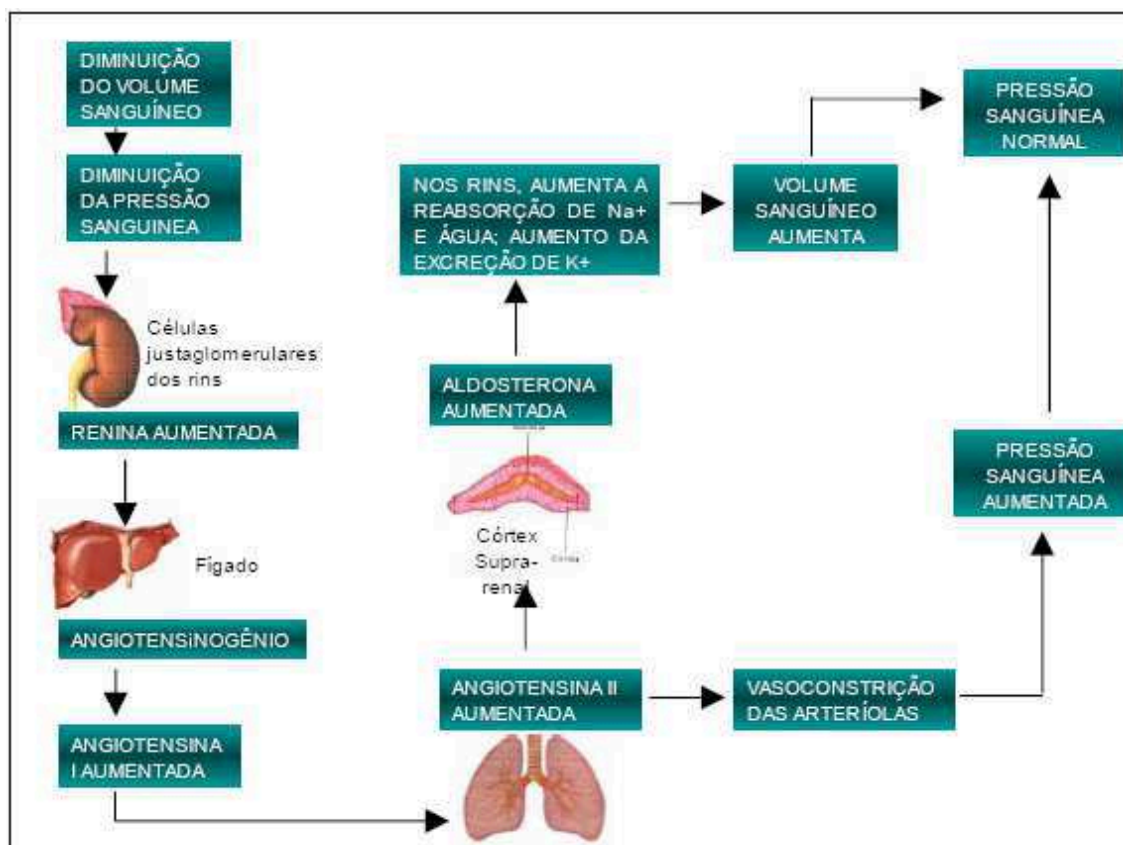


Figura 2 - Fluxograma representando sequência de eventos que ocorrem no Sistema Renina-Angiotensina. (ARAÚJO, 2010)

1.3. A variante M235T do angiotensinogênio

Entre as ações do angiotensinogênio estão contração e proliferação de células do músculo liso vascular por fosforilação de tirosina quinase e conseqüente ativação de proteínas envolvidas na transcrição do DNA, com importante efeito mitógeno (HATA, 1995). Portanto, o angiotensinogênio é um dos componentes que pode estar atuando na patogênese da doença arterial coronariana e suas diversas síndromes (CARLUCCIO, *et. al.*, 2001).

O gene do angiotensinogênio localiza-se no cromossomo 1q 42-43. Uma mutação denominada de variante M235T está localizada no exon dois do gene, correspondendo a uma transição de aminoácidos de metionina para treonina na posição 235 da proteína madura e é denominada de T235. Foi demonstrada uma importante associação entre a T235 e a variante molecular no promotor proximal do gene do angiotensinogênio, uma adenina no lugar da

guanina seis nucleotídeos acima do local de iniciação da transcrição, A (-6) (CARLUCCIO; et al., 2001). A substituição A/G no nucleotídeo seis afeta especificamente interações entre pelo menos um fator nuclear de transcrição e do promotor do angiotensinogênio, influenciando assim a velocidade basal de transcrição do gene.

Este achado muito provavelmente explica porque os homozigotos T235 possuem níveis plasmáticos de angiotensinogênio 10% a 20% maior que os homozigotos M235. Indivíduos portadores do genótipo homozigoto M235/M235 apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio plasmático; os heterozigotos M235/T235 têm níveis intermediários e os homozigotos T235/T235 possuem as médias maiores (HEGELE, *et al.*, 1994). A relação observada entre o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (MM, MT e TT), os seus produtos proteicos e os fenótipos da doença arterial coronariana sugerem a evidência de um possível papel dos níveis elevados do angiotensinogênio circulante na sua patogênese.



Figura 3 - Representação esquemática da organização do gene do Angiotensinogênio. Os retângulos representam as regiões exônicas e as linhas (horizontais) representam as intrônicas. No éxon2 pode ocorrer a troca de um aminoácido Metionina (M) por um Treonina (T) na posição 235 (TAVARES, 2000).

1.4. Polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina (ECA):

A ECA é responsável pela regulação da pressão arterial e seu gene está localizado no cromossomo 17 sendo caracterizado pelo polimorfismo de inserção/deleção baseado na presença (Inserção-I) ou ausência (Deleção - D), no intron 16, de 287 pares de base: resultando em três genótipos (DD e II homozigotos e ID heterozigoto) (RIGAT, *et al*,1990). O genótipo DD está associado com o dobro do nível da atividade sérica da ECA em relação ao genótipo II, e níveis intermediários nos heterozigotos (CAMBIEN, *et. al.* 1994, BAYRAM, *et al.* 2010) .

Rigat et al. (1992) demonstraram que esse polimorfismo está fortemente associado com o nível de enzima na circulação. Esta enzima tem um papel chave na produção de angiotensina e no catabolismo da bradicinina, dois peptídeos envolvidos na modulação do tônus vascular e na proliferação das células musculares lisas.

Tiret et al. (1992) também detectaram que indivíduos com o polimorfismo de deleção tinham maiores níveis de ECA no soro do que aqueles com o polimorfismo de inserção; concluiu assim que o principal efeito desse polimorfismo era refletido em diferentes níveis de ECA no soro e que esse gene exercia uma função significativa na patogênese da hipertensão arterial essencial.



Figura 4 – Representação esquemática do Polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina. A ECA é responsável pela regulação da pressão arterial e seu gene está localizado no cromossomo 17 sendo caracterizado pelo polimorfismo de inserção/deleção baseado na presença (Inserção-I) ou ausência (Deleção - D), no intron 16, de 287 pares de base (BARRETO, 2011).

2. OBJETIVO

O objetivo do estudo é relacionar os polimorfismos M235T do angiotensinogênio e o de inserção/deleção da ECA com a presença da doença arterial coronariana e com hipertensão arterial sistêmica.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram obtidas 84 amostras de sangue periférico dos pacientes do Setor de Cardiologia (Dor Torácica / Laboratório de Hemodinâmica) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período 01/09/2014 a 05/08/2015.

A coleta foi realizada em tubo vacutainer de 3 ml com EDTA, mediante um termo de consentimento assinado pelos pacientes e autorização da Comissão de Ética Humana da UFU. (parecer 189.679 (anexo I)).

3.1.2. Extração de DNA:

A extração do DNA foi feita com o reagente Brazol segundo especificações do fabricante (LGC Biotecnologia Ltda) e protocolo de Chomczynski descrito no rótulo do produto (1993).

3.1.3. PCR (Polimerase Chain Reaction)

Variante M235T do gene do Angiotensinogênio:

O fragmento do gene do angiotensinogênio com 165 pb, contido no éxon 2, códon 235 foi amplificado por meio da PCR com os seguintes primers:

Sense - 5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T-3'

Anti-sense - 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'

As reações foram feitas com, aproximadamente, 100 ng de DNA genômico, 10 pMoles de cada primer, 200 µMolar de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, uma unidade de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume final de 30µL. A PCR ocorreu em um termociclador MJ. Research, Inc. utilizando-se o seguinte programa: 90° C por 3 min, 10 ciclos de 94° C por 1 min, 68° C 1min, 72° C 1 min; seguidos por 30 ciclos de 90° C 30 s, 68° C 1 min, 72° C 30 s e uma extensão final de 72° C por 10min.

Polimorfismo inserção/deleção do gene da ECA:

O fragmento correspondente ao íntron 16 do gene da ECA foi amplificado, segundo Nakai et al., 1994 ,com os primers abaixo:

Sense : 5'- CTG CAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT- 3'

Anti-sense: 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T- 3'

Em cada reação foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 25 pmol de primer, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,5mmol/L de cada dNTP, uma unidade de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume de reação de 30µL. A PCR foi feita utilizando-se o programa: 30 ciclos a 93° C por 1,5 min, 58° C por 2 min e 72° C por 2 min.

O polimorfismo no íntron 16 foi caracterizado pela deleção/inserção de um fragmento de 287 pb no gene da ECA. Os primers dessa reação são específicos para a detecção do polimorfismo I/D, portanto após a amplificação, os produtos visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, caracterizarão os genótipos em questão.

3.1.4. Eletroforese

Para a visualização dos fragmentos utilizamos o processo de eletroforese, em gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídio (Corante de integração para coloração de DNA). Em seguida as amostras foram documentadas através do

Fotodocumentador Labtrade e analisadas. O marcador 100 pb DNA Ladder, consiste de múltiplas repetições de fragmentos de DNA (10 bandas), separadas a cada 100 pb até 1 Kb, com dois fragmentos adicionais de 1.500 e 2.080 pb.

3.1.5. Estatística

Para avaliar a frequência dos genótipos da variante M235T e o polimorfismo Inserção/Deleção em relação à ocorrência da DAC e hipertensão, utilizou-se o teste de Qui-quadrado. Todos os dados utilizaram o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (SCHMIDT, 1997).

3.2. RESULTADOS

Variante M235T do gene do Angiotensinogênio:

A variante M235T apresenta ou não sítio de restrição para a enzima; na presença de C (citosina) na posição 704, códon 235, o fragmento é clivado, resultando em dois de 141 pb e 24 pb, que correspondem ao alelo T235 e na presença de T (timina) na mesma posição o fragmento não sofre clivagem, resultando em um fragmento de 165 pb que corresponde ao alelo M235.

Indivíduos homozigotos para o alelo T235 (T235T) apresentam dois fragmentos de 141 pb e 24 pb cada, os heterozigotos (M235T) têm três fragmentos de 165 pb, 141 pb e 24 pb cada e os homozigotos para o alelo M235 (M235M) têm apenas um fragmento de 165 pb.

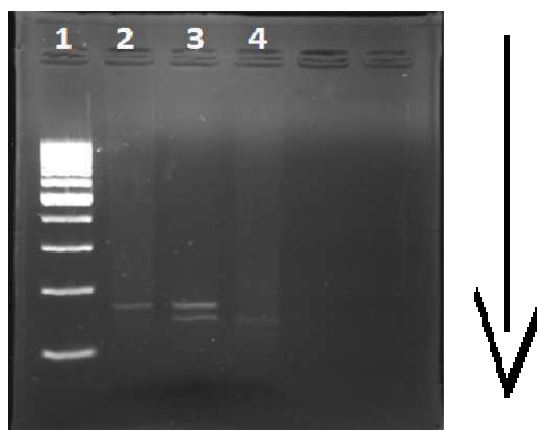


Figura 5 Gel de agarose 2% da variante M235T do gene do angiotensinogênio sendo visualizado no fotodocumentador. Na coluna 1 esta representado o marcador de peso molecular de 100pb. Na coluna 2 esta representado o fragmento de 165pb referente ao genótipo MM. Na coluna 3 esta representado os fragmentos de 165, 141 e 24 pb referente ao genótipo MT. Na coluna 4 esta representado os fragmentos de 141 e 24 pb (não visível) referente ao genótipo TT.

Polimorfismo inserção/deleção do gene da ECA:

O polimorfismo no íntron 16 é caracterizado pela deleção/inserção de um fragmento de 287 pb no gene da ECA. Os primers dessa reação são específicos para a detecção do polimorfismo I/D, portanto após a amplificação, os produtos visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, caracterizarão os genótipos em questão.

Um indivíduo homocigoto para a deleção (D/D) apresentará no gel uma banda de 190 pb, o heterocigoto (D/I) terá duas bandas de 490 pb e 190 pb cada e o homocigoto para a inserção (I/I) mostrará um fragmento de 490 pb.

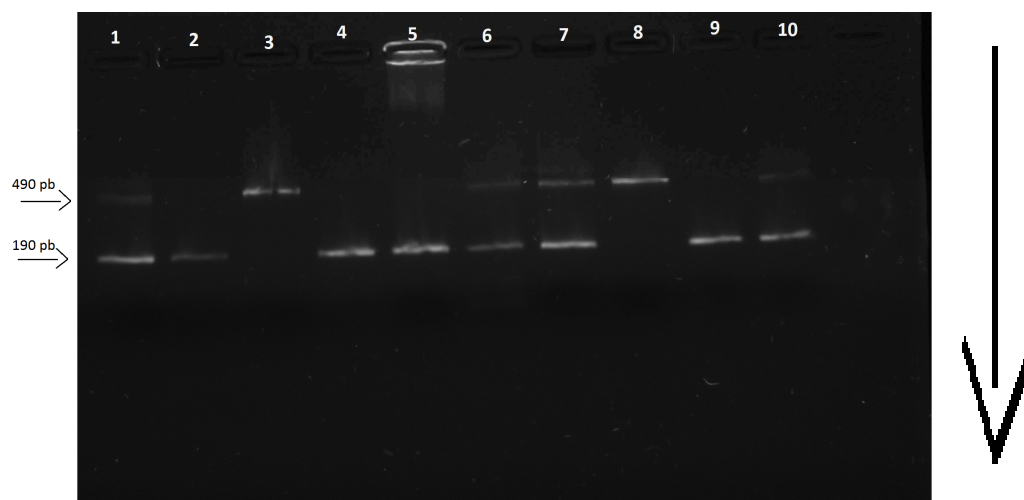


Figura 6 Gel de agarose 2% do polimorfismo inserção/deleção do gene da ECA sendo visualizados no fotodocumentador. Colunas 2,4,5 e 9 representam o genótipo D/D (um fragmento com 190 pb); Colunas 3 e 8 representam o genótipo I/I (um fragmento com 490 pb); Colunas 1,6 7 e 10 representam o genótipo I/D (um fragmento com 490 pb e outro com 190 pb).

No teste estatístico, relacionamos a frequência de cada gene em conjunto, sendo M/M + D/D; M/M + I/D; M/M + I/I como exemplo, a fim de relacionar todas as maneiras possíveis os genótipos com o grupo caso e controle da doença.

Tabela 1 – Relação do genótipo homocigoto M/M do polimorfismo M235T com os possíveis genótipos para o polimorfismo Inserção/Deleção (I/I; I/D; D;D). M/M + D/D = 3 (2 casos e 1 controle) M/M + I/D = 13 (6 casos e 7 controles) M/M + I/I = 0 (0 Caso e 0 controle).

	MM/DD	MM/ID	MM/II
Caso	2	6	0
Controle	1	7	0
Total	3	13	0

Tabela 2 - Relação do genótipo homocigoto T/T do polimorfismo M235T com os possíveis genótipos para o polimorfismo Inserção/Deleção (I/I; I/D; D;D). T/T + D/D = 3 (1 caso e 2 controles) T/T + I/D = 7 (3 casos e 4 controles) T/T + I/I = 0 (0 Caso e 0 Controle).

	TT/DD	TT/ID	TT/II
Caso	1	3	0
Controle	2	4	0
Total	3	7	0

Tabela 3 - Relação do genótipo heterozigoto M/T do polimorfismo M235T com os possíveis genótipos para o polimorfismo Inserção/Deleção (I/I; I/D; D;D). $M/T + D/D = 26$ (20 casos e 6 controles) $M/T + I/D = 24$ (15 casos 9 controles) $M/T + I/I = 8$ (4 casos e 4 controles).

	MT/DD	MT/ID	MT/II
Caso	20	15	4
Controle	6	9	4
Total	26	24	8

Doença Arterial Coronariana

Para o calculo da relação entre pacientes que apresentam os polimorfismos com os grupos caso e controle, foram observados 84 indivíduos sendo 51 pertencentes ao caso e 33 ao controle. O método qui-quadrado foi utilizado junto a plataforma do programa Action (suplemento do Excel). Foram estabelecidos os seguintes resultados:

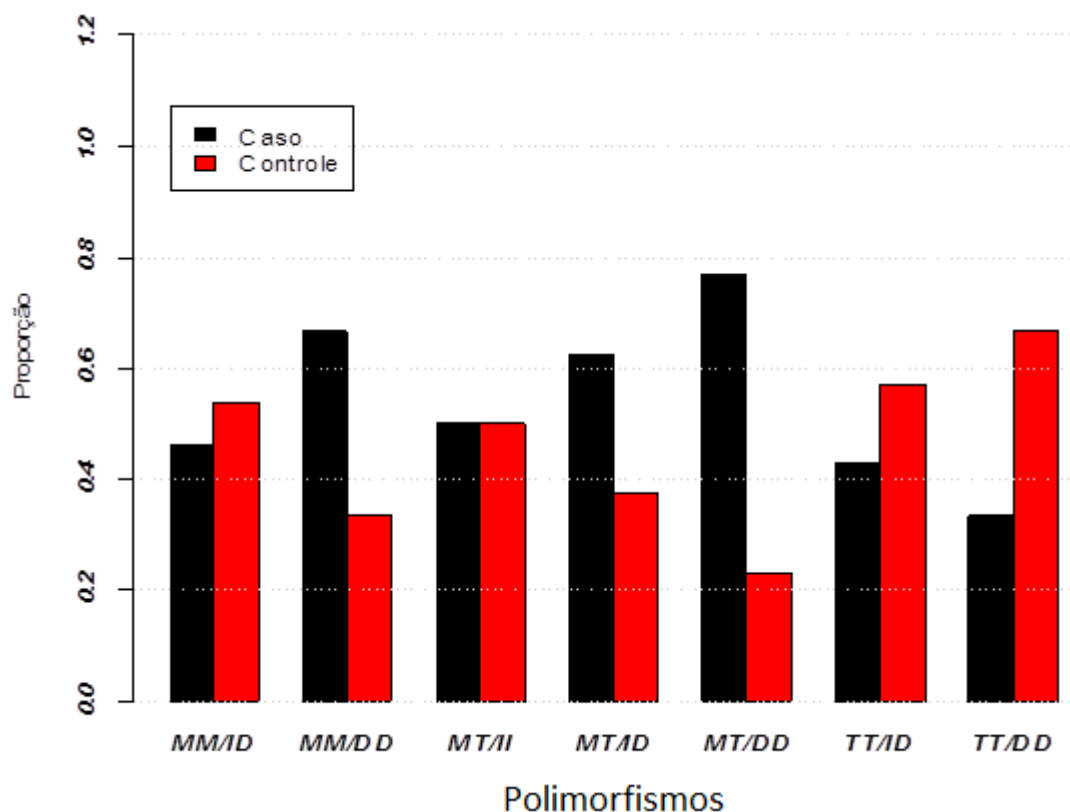


Gráfico 1 – Gráfico representativo da relação grupo caso e controle frente aos polimorfismos M235T e inserção/deleção no DNA extraído do sangue coletado em pacientes do HC – UFU no período de 01/09/2014 a 05/08/2015.

Utilizando o nível de significância de 5%, os dados nos mostram um valor superior a este (38,42%). Isso nos revela que a relação entre os polimorfismos e a DAC não é estabelecida.

Doença Arterial Coronariana e presença/ausência de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

Para o cálculo da relação entre pacientes que apresentam os polimorfismos junto a DAC com presença do quadro de hipertensão ou não, foram observados 55 indivíduos sendo 35 pertencentes ao grupo com hipertensão e 20 pertencentes ao grupo sem hipertensão. O método qui-quadrado foi utilizado junto à plataforma do programa Action (suplemento do Excel).

Foram estabelecidos os seguintes resultados:

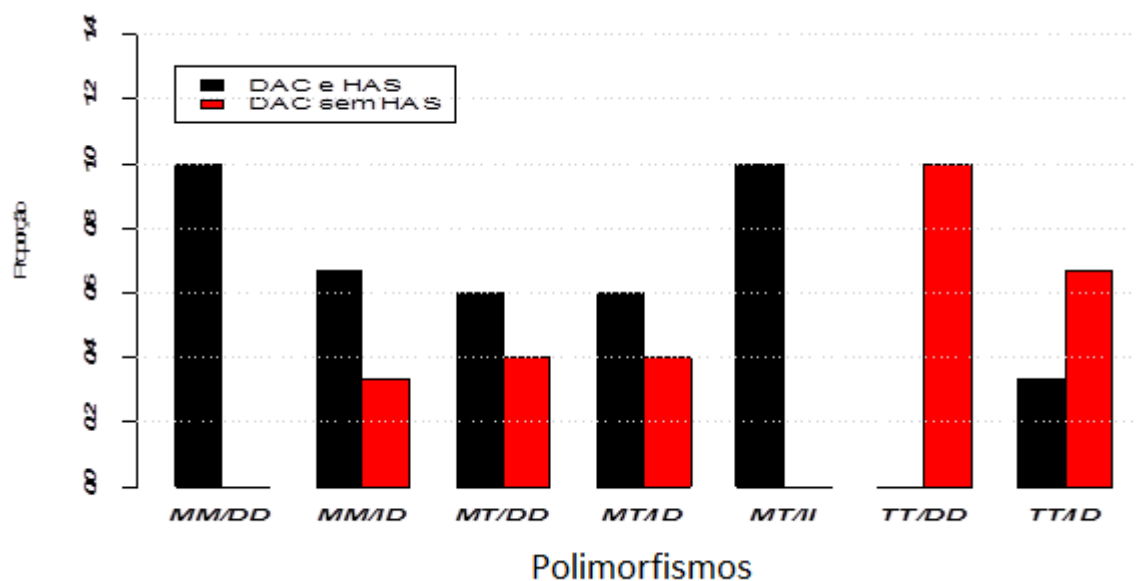


Gráfico 2 - Gráfico representativo da relação grupo DAC e hipertensos ou DAC e não hipertensos frente aos polimorfismos M235T e inserção/deleção.

Utilizando o nível de significância de 5%, os dados nos mostram um valor superior a este (36,86%). Isso nos revela que a relação entre os polimorfismos junto a DAC com a hipertensão não é estabelecida.

3.3. DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares representam importante problema de saúde pública não só no nosso meio, mas em todo o mundo, visto que constituem a principal causa de morbimortalidade e representam os mais altos custos em assistência médica (GUS *et. al.*, 1999).

No presente trabalho foram analisados os fatores genéticos ou hereditários correlacionados com a prevalência da DAC assim como a comparação entre o surgimento ou não de HAS nos pacientes previamente acometidos pela DAC. O fator genético experimentado no trabalho foi a variante M235T do gene do angiotensinogênio e o polimorfismo inserção/deleção do gene da ECA.

No estudo realizado por Araújo (2010), foi encontrada associação entre o genótipo homocigoto 235TT no gene do AGT a um aumento no risco de HAS entre os brasileiros Afrodescendentes. A análise de regressão logística multivariada mostrou que os indivíduos homocigotos para o alelo 235T no AGT apresentavam um risco cerca de 1,8 vezes maior de terem hipertensão (*Odds ratio*= 1,848; $p=0,013$) quando comparados aos portadores do alelo 235M.

Tem sido relatada associação do polimorfismo I/D da ECA com HAS (BARRETO-FILHO *et.al.*, 2003; SAKUMA *et. al.*, 2004) e com elevada morbidade em hipertensos e diabéticos, embora estudos em populações caucasianas não tenham conseguido detectar um efeito maior desse gene nos hipertensos (MONDRY *et. al.*, 2005; MILLER *et. al.*, 2004; FABRIS *et. al.*, 2005).

No presente estudo, ao se relacionar os dois polimorfismos, tanto para detecção de DAC quanto para além da DAC, aparecimento de hipertensão, através dos dados estatísticos, não obteve resultado positivo para as relações.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os estudos de FREITAS *et. al.* (2007) que não encontraram evidências relacionando a doença coronariana, hipertensão e a presença destes polimorfismos genéticos.

O Brasil é um país com uma população muito miscigenada, sendo este um fator delicado a ser considerado neste referido trabalho em se tratando de um número amostral reduzido, podendo não ser representativa para este tipo de estudo. Para se analisar fatores genéticos, seria mais satisfatório um estudo realizado com n amostral mais amplo. Desta forma, devido às divergências encontradas na literatura é de suma importância que se prossiga com os estudos a cerca dos componentes do SRA, para ver se há realmente uma relação íntima com estes e o processo de desenvolvimento da DAC como sendo o fator de predisposição para outras doenças e, quão expressiva é esta influência.

3.4. CONCLUSÃO

No presente estudo não foi possível obter correlação estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas das variantes do gene do AGT, (M/M; M/T e T/T), nem do polimorfismo inserção/deleção do gene da ECA com a doença arterial coronariana, nem com a prevalência de hipertensão arterial sistêmica nos referidos grupos analisados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARAÚJO, M. A. Polimorfismos de genes do sistema renina angiotensina na doença arterial coronariana. 2003., 121f., **Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica)** – Universidade Federal de Uberlândia.

ARAÚJO, L. J. Estudo Sobre Aspectos Genéticos da Hipertensão Arterial Sistêmica em Amostra da População Afro-descendente do sudoeste do Estado da Bahia. 93 f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. **J Am SocNephrol**, 10(11): 30-39, 1999.

BAO, W.; SRINIVASAN, S.R.; VALDEZ, R.; GREENLUND, K.J.; WATTINGNEY, W.A.; BERENSON, G.S. Longitudinal changes in cardiovascular risk from childhood to young adulthood in offspring of parents with coronary artery disease. **The Bogalusa Heart Study. JAMA.**;278:1749-54, 1997.

BARRETO-FILHO, J.A.S.; KRIEGER, J.E.; Genética e hipertensão arterial: conhecimento aplicado à prática clínica? **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**. 2003; 1: 46-55.

BAYRAM, B.; SAYIN, E.; GÜNEŞ, H.; DEĞİRMENCI, İ.; TÜRKOĞLU, Z.; DOGANER, F.; COŞAN, D. DD genotype of ace gene I/D polymorphism is associated in a turkish study population with osteoarthritis. **Mol Bio Reports**, 38: 1713- 1716, 2011.

BORGES, J.P.; LESSA, M.A. Mechanisms involved in exercise-induced cardioprotection: a systematic review. **Arq.Bras.Cardiol.**, 27 Mar., 2015.

BURKE, G.L.; SAVAGE, P.J.; SPRAKFA, J.M.; SELBY, J.V.; JACOBS, D.R. Jr.; PERKINS, L.L.; et al. Relation of risk factor levels in young adulthood to parental history of disease. **The CARDIA Study. Circulation.**; 84:1176-87, 1991.

CAMBIEN, F.; ALHENE-GALAS, F.; HERBETH, B.; ANDRE, J.L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F.; ALLEGRINI, J.; BLOCH, C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. **Am. J. Hum. Gent.** 43: 774-780, 1988.

CARLUCCIO, M.; SOCCIO, M.; DE CATERINA, R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. **Eur J Clin Invest**;31:476-88, 2001.

Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia.**;77 Suppl III:1-48, 2001.

DZAU, V. J.; BURT, D W.; PRATT, R. E.Molecular biology of the renin-angiotensin system.**AM J Physiol**, 255(4):563-73, 1988.

FABRIS, B.; BORTOLETTO, M.; CANDIDO, R.; BARBONE, F.; CATTIN, M.R.; CALCI, M.; et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal insufficiency in essential hypertension. **J Hypertens.**; 23 (2): 309-16, 2005.

FHYRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal Of Internal Medicine*, Oxford, vol. 264, n. 3, p 224-236, 2008.

FREITAS, S.R.S.; CABELLO, P.H.; MOURA-NETO, R.S.; DOLINSKY, L.C.; BÓIA, M.N.; Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em município da Região Amazônica. **Arq Bras Cardiol.**; 88 (4): 447-51, 2007

GUS, I.; ZIELINSKY, P.; As Cardiopatias no Brasil. In: Ferreira C; Póvoa R. *Cardiologia para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: Atheneu,: 131-43, 1999

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Gestação e Lactação: Respostas do corpo materno à gestação*. In_. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1034-1035, 2006.

HANDLER, C. **Guia Prático Climepsi de Cardiologia nos Cuidados Primários**. 1ª ed. Climepsi Editores, 2005.

HATA, A. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. **Life Sci**;57:2385-95, 1995.

HEGELE, R. A.; BRUNT, J. H.; CONNELLY, P. W. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure on a genetic isolate. **Circulation**. 90: 2207-2212, 1994.

HOLMAN R.L.; MCGILL Jr. H.C.; STRONG J.P.; GEER J.C.; The natural history of atherosclerosis. **Am J Path.**;34:209-35, 1958.

IGLÉZIAS, J. C. R.; OLIVEIRA-Jr, J. L.; DALLAN, L. A. O.; LOURENÇÃO-Jr, A.; STOLF, N. A. G. Preditores de mortalidade hospitalar no paciente idoso portador de doença arterial coronária. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, n. 2, p. 94-104, 2001.

JEUNEMAITRE, X.; SOUBRIER, F.; KOTELVTSEV, Y. V.; LIFTON, R.P.; WILLIAMS, C. S.; CHARRU, A; HUNT, S. C.; HOPKINS, P.N.; WILLIAMS, R. R.; LALOUEL, J. M.; CORVOL, P. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. **Cell**; 71: 169-180, 1992.

KATSUYA, T.; KOIKE, G.; YEE, T. W.; SHARPE, N.; JACKSON, R.; NORTON, R.; HORIUCHI, M.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J.; MACMHON, S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **Lancet**; 345: 1600-1603, 1995.

KANNEL, W.B.; WILSON P.W.F. An update on coronary risk factors. **Med Clin North Am**;79:951-71, 1995.

KRIEGER, E. M. Angiotensinas - aspectos fisiológicos. . **Hipertensão**,1: 1-10, 1998.

MCDONOUGH, A. A. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. **Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol**, v. 298, n. 4, p. 27. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119, 2010

MILLER, J.A.; SCHOLEY, J.W.; The impact of rennin-angiotensin system polymorphism on physiological and pathophysiological processes in humans. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**; 13 (1):101-6, 2004.

MONDRY, A.; LOH, M.; LIU, P.; ZHU, A.L.; NAGEL, M.; Polymorphism of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. **BMC Nephrol.**; 6 (1): 1-11, 2005.

MOURA, M. D. *Papel do flavonóide diocleína no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E*. Belo Horizonte. 88 p. **Tese (Mestrado)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

MOURA, M. M. Reflexos cardiovasculares em camundongos com alteração na expressão do receptor da Angiotensina-(1-7), MAS. 2007. 213 f. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2007.

NORDLIE, M. A.; WOLD, L.; E.; KLONER, R. A.; Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 39(4): 667-679, 2005.

PINHO, R. A.; ARAÚJO, M. C.; GHISI, G. L.; BENETTI, M. Coronary Heart Disease, Physical Exercise and Oxidative Stress. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 515 – 521, 2010.

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

RIGAT, B.; HUBERT, C.; CORVO, P.; SOUBRIER, F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the. *Nucleic Acids Res* **20**: 1433–1443, 1992.

SAKUMA, T.; HRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal.*; 18 (6): 309-16, 2004.

SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; SILVA, A. C. S. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Revista Brasileira de Hipertensão*, São Paulo, vol. 7, n.3, pp. 227-236, 2000.

SCHMIDT, S. R.; LAUNSBY, R. G. Understanding Industrial Designed Experiments, **Air Academic Press**, Colorado Springs, CO, (1997).

SILVA, J. V. Expressão da Angiotensina-(1-7), do receptor MAS e da Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2 no endométrio humano. 2008. 76 f. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 2008.

STARY H.C. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J.*;11 Suppl E:3-19, 1990.

TRACY, R.E. Risk factors and atherosclerosis in youth autopsy findings of the Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci.*;310 Suppl 1:37-41, 1995.

TIRET, L., RIGAT, B., VISVIKIS, S., et al. Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene

controls plasma ACE levels. *Am. J. Hum. Genet.*; 51: 197-205, 1992.

4.1. REFERÊNCIAS DAS FIGURAS

Figura 1 - Adaptação de: YAYAN, J. Emerging families of biomarkers for coronary artery disease: inflammatory mediators. *Vasc Health Risk Manag*, 9, 435-456, 2013.

Figura 2 - ARAÚJO, L. J. **Estudo Sobre Aspectos Genéticos da Hipertensão Arterial Sistêmica em Amostra da População Afro-descendente do sudoeste do Estado da Bahia.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

Figura 3 -TAVARES, Agostinho. Polimorfismo dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares. *Rev Bras Hipertens*, v. 7, n. 3, p. 237-42, 2000.

Figura 4 - BARRETO, A. et al. Relación entre la enzima convertidora de angiotensina, polimorfismo I/D, y obstrucción coronaria en una población del Quindío, Colombia. *Universitas Scientiarum, Quindío*, v.16, n.3, p.193-199, Nov. 2011.

Anexo I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos Genéticos na Doença Coronariana

Pesquisador: Messias Antonio de Araujo

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

Versão: 3

CAAE: 01736412.9.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 189.679

Data da Relatoria: 01/02/2013