

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“A interferência de fatores do Bioma Antropomórfico Urbano na expressão de polimorfismos genéticos GPX1 e GPX4 em relação à hipertensão essencial”**

Maximiliano Soares Lemos Araújo Gobbo

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  
Maio - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“A interferência de fatores do Bioma Antropomórfico Urbano na expressão de polimorfismos genéticos GPX1 e GPX4 em relação à hipertensão essencial”**

Maximiliano Soares Lemos Araujo Gobbo

Dr. Marcelo José Barbosa Silva

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

Maio – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“A interferência de fatores do Bioma Antropomórfico Urbano na expressão de polimorfismos genéticos GPX1 e GPX4 em relação à hipertensão essencial”**

Maximiliano Soares Lemos Araujo Gobbo

Dr. Marcelo José Barbosa Silva  
Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Ciências Biomédicas

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

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior

Uberlândia – MG

Maio – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**“A interferência de fatores do Bioma Antropomórfico Urbano na expressão de polimorfismos genéticos GPX1 e GPX4 em relação à hipertensão essencial”**

Maximiliano Soares Lemos Araujo Gobbo

Aprovado pela Banca Examinadora em \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_ Nota: \_\_\_\_

Assinatura do Presidente da Banca Examinadora Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

O presente trabalho é dedicado à  
minha família, amigos e pessoas  
que fizeram parte da construção  
do indivíduo, cidadão e biólogo  
que me tornei

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Universidade Federal de Uberlândia, principalmente ao Instituto de Biologia, cuja importância ímpar na formação acadêmica me permitiu conhecer, significar e ressignificar ideias, conhecimentos, aprendizados e conceitos, permitindo-me sonhar e vislumbrar novas perspectivas educativas, culturais, científicas e humanas.

Em concomitância, ao Governo Nacional, o qual financiou durante todo meu período nesta Universidade e durante o intercâmbio cultural e científico pelo Programa Ciência sem Fronteiras na Università degli Studi di Roma Tor Vergata, agradeço pelo apoio e pelas oportunidades que ambas me proporcionaram, como a tese que vos apresento.

A Professora Maria Fucciarelli, docente na Università di Roma Tor Vergata, ministradora da disciplina de Ecologia Humana e responsável pelo Laboratório de Ecologia Humana, com a qual pude aprender, ensinar e desenvolver o presente trabalho. Nesta linha, a Università di Roma Tor Vergata que me acolheu durante um ano e que me proporcionou experiências inigualáveis.

Por fim, ao Professor Marcelo que abraçou este trabalho e me auxiliou em todas as etapas de compilação e as presentes Professoras Maura e Elóisa, as quais foram coadjuvantes durante grandes etapas de minha carreira acadêmica.

## **Resumo**

É sabido que fatores ambientais relacionados a cada um dos Biomas Antropomórficos interferem diretamente no comportamento diário da espécie humana, mas pouco se compreende como estes podem estar associados com a insurgência de patologias com origem genética e que podem ser expressas ou silenciadas por ações enzimáticas ou outros recursos fisiológicos. O presente trabalho, realizado na população do antroma urbano em Roma – Itália, pretende associar fatores de risco a expressão da hipertensão essencial, correlacionando a dois polimorfismos de duas selenoproteínas que auxiliam no processo de redução do estresse oxidativo do genoma, GPX1 e GPX4, mas que podem ter suas funções alteradas de acordo com os interferentes. O material genético fora coletado de pacientes diagnosticados com hipertensão e de outros considerados controle. Seguiu-se análise em PCR, Gel de Acrilamida e Agarose e posteriores análises estatísticas com *softwares* disponíveis online. Acredita-se que o grau de significância resultante dos estudos não associa nenhum dos fatores ao desenvolvimento da cardiopatia e que nenhuma das duas enzimas é responsável pela expressão da enfermidade.

**Palavras-chave:** biomas antropomórficos, selenoproteínas, hipertensão.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1.Os Antromas	1
1.2.Da molécula as funções	3
2.OBJETIVO	11
2.1.Gerais	11
2.2.Específicos	11
3.MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.Amostras	12
3.2.Extração do DNA da mucosa bucal	13
3.3.Amplificação	15
3.4.Purificação	19
3.5.Digestão	21
3.6.Migração e análise em gel de acrilamida	22
3.7.Análises estatísticas	22
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.CONCLUSÃO	35
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37



# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1.Os antromas

A nova tendência de antromas, teorizada pelo Professor e diretor do *Laboratory for Anthropogenic Landscape Ecology*, Erle C. Ellis nos anos 90, vem ao encontro do pensamento de interação entre agrupamentos populacionais e biomas; nesta tendência sugere-se que as ações humanas alteraram e alteram fortemente o meio ambiente original segundo suas necessidades, de modo a sustentar-se e aos demais biomas antropomórficos (ELLIS *et. al*, 2006). Compreende-se também, segundo o autor, que a relação para se estabelecer os biomas antropogênicos é indicada através das práticas de manejo, da estrutura e do funcionamento do ecossistema associado, de forma que estes são ou devem apresentar-se como resultantes das transformações associadas aos delimitados biomas antropomórficos. Eles são distribuídos em três grandes grupos, utilizando-se da interação, estabelecimento, uso e ação humana sobre os biomas: *em uso*, *seminatural* e *selvagem*; cada um deles seguem subdivisões que irão quantificar e qualificar o uso ou não dos terrenos (ANTHROPOGENIC LANDSCAPE ECOLOGY, 2016).

Ressalva-se que a associação entre homem e espaço é também parte de sua cultura e de sua formação enquanto indivíduo (CASCIANO, 2015). Assim sendo, os antromas são, também, reflexos da cultura absorvida e modificada segundo primícias e ânsias de cada um destes agrupamentos, primando otimizar a vida tais. Ao se pensar nos biomas antropogênicos *em uso* (*urbano*, *periférico*, *vilas*, *área agrícola* e *área de pastagem*) e *seminaturais* (*floresta* e *área verde com ou sem intervenção humana pouco*

ou não habitada), observa-se que a população humana se estabelece, o modifica, mas, também, é sujeita a diversos fatores que alteram sua expressão gênica e social; tais podem ser descritos através do clima, as chuvas, o nível de urbanização, a poluição a qual os indivíduos estão submetidos, o estresse pelo trabalho, entre outros (VERBURG *et. al*, 2013). Durante a delimitação dos biomas antropogênicos, criou-se um gradiente de concentração da população, onde o antroma urbano mostra-se com a maior densidade, reduzindo significativamente até as pastagens, perpassando por todos os outros anteriormente citados. É de suma importância captar que estes fatores também estão associados a cultura das comunidades humanas, já que estes norteiam o funcionamento, manejo e controle dentro dos antromas (ELLIS, 2011).

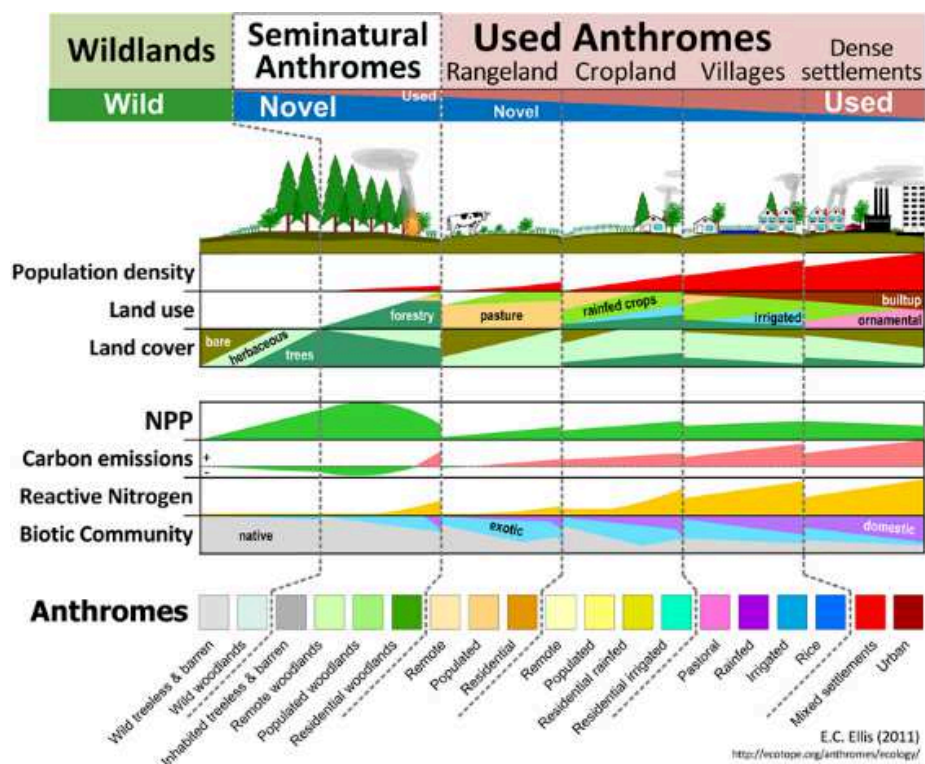


Figura 1: Diferenciação dos antropomas. Disponível em <<http://www.ecotope.org/anthromes/ecology/>>. Acesso em 23 de maio de 2016.

Tomando nota desta abordagem ecológica e sua associação com fatores genéticos, fisiológicos, anatômicos, culturais, sociais e evolucionísticos, diversos estudos

buscam atinar para esta relação entre fatores antropogênicos e o desenvolvimento tanto de patologias quanto de problemas socioculturais ainda impressos nas sociedades contemporâneas; além disso, a perspectiva apontada pelos antromas permite a interdisciplinaridade em estudos avançados, trazendo aspectos, anteriormente, tratados distintamente, os quais, aqui, podem ser tomados em concomitância, indicando de forma mais concreta e consciente resultados que podem otimizar a solução de tais adversidades.

### **1.2.Da molécula às funções**

Os organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante necessário para a eliminação de espécies reativas do oxigênio (ROS), como os íons superóxidos e o peróxido de hidrogênio. Baixos níveis de ROS são necessários para muitos processos bioquímicos, enquanto que níveis altos ou/e a remoção insuficiente gera estresse oxidativo, levando ao mau funcionamento e à danos as macromoléculas biológicas. A prevenção da peroxidação lipídica é um processo essencial aos organismos anaeróbicos, visto que os seus produtos podem determinar danos ao DNA e inibir diretamente as proteínas. O aumento da peroxidação e a redução da proteção antioxidante geram episódios que podem permitir uma reação com os centros nucleofílicos da célula, permitindo uma ligação covalente as estruturas genômicas e proteicas; tais atividades determinam processos alérgicos, citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MATÈS, 1999).

As enzimas responsáveis pelo metabolismo dos ROS são polimórficas, característica que permite uma grande diversidade nas respostas enzimáticas a tal

estímulo (HAMDY *et al.*, 2003). O conjunto de uma resposta enzimática de baixo nível e a interferência de estímulos ambientais de risco, permeiam a expressão de diversas doenças multifatoriais, as quais são causadas pela somatória de fatores antropogênicos e alterações genéticas em diversos *locus* do genoma. A susceptibilidade aos fatores de risco e a possibilidade de aumentar o desenvolvimento determinada doença estão correlacionados à capacidade dos genes do indivíduo de adaptar-se e responder aos estímulos. Portanto, identificar os tratos gênicos relacionados a expressão da defesa do organismo, feita através das enzimas glutatônicas peroxidases (GPXs), é de suma importância médica e biológica (COCOZZA & VACCARO, 2005), permitindo compreender, identificar e potencializar a ação, seja no que resguarda aos medicamentos utilizados na prevenção de doenças multifatoriais, seja no que diz respeito à evolução dos organismos para proteger-se de determinados fatores de risco que permeiam a expressão das mesmas.

A hipertensão essencial é classificada como uma patologia complexa, definida pela interação entre fatores de risco ambiental e genético (POLIMANTI *et al.*, 2011), além de apresentar-se como um importante indutor de infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência arterial periférica e mortalidade prematura, repercutindo aspectos genéticos, ambientais e homeostáticos, seja nos indivíduos, seja em sua prole, através da transmissão de caracteres ou tratos gênicos durante os processos de hereditariedade. Segundo literatura descritiva de doenças cardiovasculares, a hipertensão, e o desenvolvimento desta, pode estar associado à inúmeros fatores fisiológicos e enfermidades que acarretaram no desenvolvimento precoce da patologia cardíaca, a exemplo tem-se a resistência à insulina enquanto mediadora da promoção da cardiopatia (RUDD & OSTERBERG, 2005).

O *stress* oxidativo representa um importante fator de risco no desenvolvimento das patologias cardiovasculares. O aumento das espécies reativas do oxigênio (ROS) e/ou a diminuição das defesas celulares contra o estresse oxidativo, podem levar não somente a disfunções a nível endotelial, mas também a danos estruturais em órgãos e tecidos. Além disso, induzem uma sinalização fisiológica molecular, recrutando as enzimas glutatônicas peroxidases (GPXs), as quais realizarão reações de desintoxicação e cascatas de sinalização (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2013). Desse ponto de vista, os sistemas de desintoxicação celular representam um mecanismo crucial nos organismos vivos.

Entre essas enzimas desoxidantes, as GPXs reduzem a peroxidação dos lipídios aos seus correspondentes álcoois, mantendo íntegras as membranas celulares (POLIMANTI *et al.*, 2013). No genoma humano são conhecidos 25 genes que codificam as selenoproteínas, entretanto para cada um deles existem inúmeros polimorfismos, os quais ainda não foram totalmente descritos na literatura (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009). Segundo Brigelius-Flohé, até o ano de 2009 apenas 5 glutatônicas peroxidases (GPXs) foram identificadas em humanos: *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4* e *GPX5*. Tais enzimas podem reagir com peróxidos de hidrogênio e/ou com peróxidos de ácidos graxos solúveis, sendo GPX4 a única capaz de reagir com hidroperóxidos lipídicos.

As GPXs são enzimas selênio dependentes, o qual é ligado diretamente à enzima sobre forma de selenocisteína (forma ativa do selênio). O selênio, por sua vez, desenvolve papel importante em diversas atividades de defesa do organismo, como: resposta imunitária, supressão viral, fertilidade do sexo masculino, função da glândula tireoide e agente antitumoral (BROOME, *et al.*, 2004). Cada uma delas desenvolve sua atividade em determinados órgãos e/ou sistemas do organismo humano. A presente pesquisa analisará GPX1, a qual é um antioxidante no citoplasma celular, e GPX4, atividade

antioxidante de membrana celular, além de ser uma proteína estrutural do esperma e auxiliar no processo de apoptose (SCHIEVER *et al.*, 2009).

Segundo a filogenia, a árvore composta pelas GPXs possui como ancestral comum uma enzima composta por cisteína (Cys) e seguindo tal agrupamento GPX1/GPX2, GPX3/GPX5/GPX6 e GPX4/GPX7/GPX8 (MARIOTTI *et al.*, 2012), onde GPX7 e GPX8 surgiram a partir de GPX4 como ancestral; GPX5 e GPX6 aparecem através de uma duplicação de GPX3; enquanto que GPX1 e GPX2 formam um sub-clado de GPXs tetraméricas, composta por GPX1-3 e 5-6 (TOPPO, 2008).

A síntese de selenoproteínas é claramente dependente da presença de selênio e sua incorporação é feita durante a criação de uma cadeia de polipeptídios. Durante uma produção normal destas enzimas, o selênio é distribuído uniformemente; porém, em uma baixa da sua concentração no organismo, observa-se que alguns dos tipos reduzirão sua produção em detrimento dos outros, elencando a mais adequada ao momento para manter o funcionamento orgânico (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). A selenocisteína (Sec) é sintetizada a partir de uma serina ligada ao tRNA<sup>(Ser)Sec</sup> através de 3 complexos: *selenofosfato sintetase-2 (SPS2)*, *selenofosfato e Sec sintase*. O SBP2 (SECIS binding protein-2) se liga ao complexo eEF<sup>Sec</sup> (SECIS element in the 3'UTR and recruits), um ao complexo ribossômico. A proteína ribossomal L30 faz o reconhecimento da trinca UGA no mRNA e dá início a transcrição da selenoproteína (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2013).

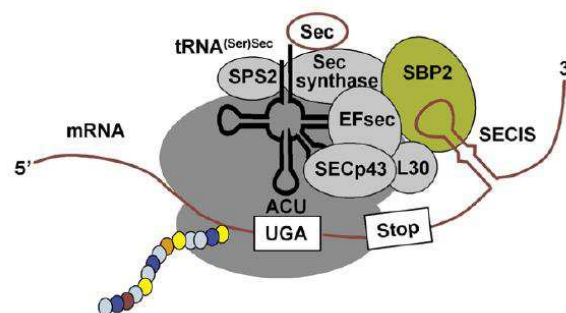


Figura 2: Modelo molecular ilustrativo de transcrição de uma selenoproteína. Disponível em BRIGELIUS-FLOHÉ (2013)

O processo catalítico descrito para GPX1 é o mesmo utilizado para GPX4. No esquema pode-se observar que o selenol na GPX torna-se organizado em ácido selênico através da ação de um hidroperóxido (ROOH). A taxa constante respectiva é  $k_{+1}$ . A parte total reduzida é caracterizada por  $k'_{+2}$ . Posteriormente, a primeira forma de GSH transforma o ácido selênico em selenosulfureto através da remoção do oxigênio, formando uma molécula de água ( $H_2O$ ). Sequencialmente, o segundo GSH reduz o selenosulfureto em tiol-disulfeto, de tal forma que GSSG seja liberado e a enzima retorne a forma de selenol, permitindo reiniciar o ciclo (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2013). Desta forma, o selênio desenvolve papel fundamental na estrutura enzimática, sendo ele o responsável por capturar o hidróxido de oxigênio, o qual, tendo sua conformidade estrutural, pode implicar na potencialização do *stress* oxidativo nas células eucarióticas.

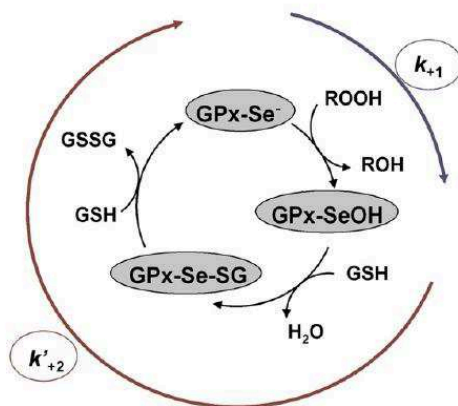


Figura 3: Modelo reativo da ação das GPXs sobre os ROS. Disponível em BRIGELIUS-FLOHÉ (2013)

A primeira selenoproteína a ser identificada foi GPX1 por sua alta capacidade de reduzir hidroperóxidos, sendo classificada como uma enzima que continha o stress oxidativo nas células. Em condições de normais de interferência de ROS, as enzimas GPX1 são estimuladas e dão início ao processo de defesa das células, reduzindo o estresse

oxidativo; por outro lado em condições exorbitantes, as enzimas irão se desnaturar. Tais indicações denotam que GPX1 não pode ser substituída por outra selenoproteína para desenvolver a ação de reduzir o estresse oxidativo e que se mostra como um poderoso antioxidante (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009). A glutathione peroxidase 4, também conhecida como GPX4, é a maior representante de enzimas antioxidantes e se mostra efetiva no combate a hidroperóxidos fosfolipídicos em membranas e lipoproteínas e sendo um monômero, diferentemente de GPX1-3 que são homotetrâmeros, podem facilmente reagir com lipídios, mostrando-se uma das mais importantes selenoproteínas por possuir funções importantes na defesa e combate aos ROS (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

A deficiência de selênio induz respostas diferentes nas duas proteínas estudadas neste trabalho (GPX1 e GPX4). Na primeira há uma queda repentina, permitindo dano celular induzido pela peroxidação lipídica e a degradação das proteínas, além de modular o estresse global da célula, desta forma potencializa a susceptibilidade da célula ao estresse oxidativo, induzindo o acúmulo de oxidantes nocivos; o aumento na concentração de GPX1 na célula irá determinar uma redução significativa do ROS, o que irá influenciar diretamente no crescimento celular, levando à apoptose; vale ressaltar que o aumento da concentração de ROS nas células também auxilia no processo de morte celular; enquanto isso, a segunda auxilia no processo de embriogênese e no controle da fertilidade dos machos (LOBUS *et al.*, 2011).

Contudo, as variantes funcionais, também conhecidas como SNPs, quando presentes nos genes que codificam tais proteínas podem influenciar diretamente no mecanismo de defesa antioxidante da célula, alterando a disposição de aminoácidos, resultando na mudança estrutural das enzimas, podendo intensificar a ação enzimática (FORSBERG *et al.*, 2000; FOSTER *et al.*, 2006; HESKETH, 2008). Em estudos



realizados em uma população escandinava (FORSBERG *et al.*, 2000) e em grupos de populações japoneses e afro-caribenhas (FOSTER *et al.*, 2006), alguns SNPs foram identificados em ambas e notou-se que as suas frequências genotípicas são variáveis, mediadas, principalmente, pelos tipos de fatores de riscos aos quais tais populações estão submetidas.

As mudanças conformacionais nas enzimas (disposição dos aminoácidos), as quais levam a formação de variantes funcionais, alteram a sua função (HESKETH, 2008) implicando em uma associação dos SNPs a predisposição a patologias complexas, como câncer de pulmão, mama e vesícula, a cardiopatia e doenças respiratórias (FORSBERG *et al.*, 2000). A interferência do SNP na susceptibilidade individual a tais doenças é notável só quando associadas a outros fatores genéticos e não com outros SNP e a dieta. Rasschou-Nielsen (2007), observou uma forte associação do fumo e do uso de álcool com a expressão das patologias supracitadas, ou seja, em determinadas populações o uso recorrente leva ao *stress* oxidativo da célula que não é reduzido pelas variantes funcionais das GPXs, permeando a expressão de tais enfermidades.

A interação entre genes e ambiente é definida através de como os indivíduos ou grupos respondem, diferentemente ou com níveis díspares de eficiência, às mudanças ambientais e/ou submissão a fatores de risco por seus distintos genótipos (CALIGARI & MATHER, 1975); como fatores de risco podemos elencar: fumo, álcool, sedentarismo, dieta, estresse intelectual e físico. As alterações funcionais das GPXs, mediadas pelo alto nível de polimorfismo em todos os grupos, permeiam a expressão de patologias, uma vez que o *stress* oxidativo, reduzindo a atividade enzimática e/ou a síntese de tais enzimas, facilitará o desenvolvimento de determinadas enfermidades, principalmente em indivíduos com predisposição. Por este motivo é indispensável não estudar somente

marcadores de susceptibilidade às patogenias, mas, também, a relação que pode existir entre a componente genética e os fatores de risco ambiental (ADAME *et al.*, 2012).

Infere-se que o atual estudo se mostra fundamental para o reconhecimento de como a expressão da hipertensão está associado aos fatores de risco supracitados e como as patologias cardiovasculares podem ser resultantes do mal funcionamento de tal mecanismo de defesa realizado pelos dos SNPs aqui estudados, processo que pode induzir e/ou colabora para a manifestação de tratos genéticos silenciados ou ainda não revelados. De acordo com Rasalingam e Pearson (2005) a comunidade científica e médica mostra-se cada vez mais preocupada em analisar não somente o quadro patológico, os tecidos associados a ela e o tratamento, mas o conjunto de fatores relacionados ao seu desenvolvimento e como eles devem ser compreendidos enquanto riscos somatórios da cardiopatia. Desta forma, o presente trabalho tenta reunir alguns dos mediadores ambientais que podem influenciar direta ou indiretamente a expressão da enfermidade.

É indispensável dizer que tais estudos são realizados com populações pontuais, já que se toma os elementos de cada localidade como mediadores na expressão das enzimas e seus polimorfismos no organismo, reduzindo ou amplificando. Não há em literatura trabalhos realizados associando os dois polimorfismos e habitantes da cidade de Roma, além de não haver trabalhos que afirmem uma ligação entre manifestação da hipertensão e dos SNPs para o mesmo público. Por fim, visa-se determinar se há tais ligações acima citadas para delimitar medidas preventivas, as quais possam reduzir a exteriorização da enfermidade.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1.Gerais**

O presente estudo faz parte de um projeto de pesquisa em curso junto ao Laboratório de Ecologia Humana da Università di Roma Tor Vergata, o qual analisa, através de estudos multifatoriais, a função das GPXs na expressão de patologias causadas por pré-disposição genética e que podem ou não estar associadas ao estresse oxidativo causado pelos diversos fatores ambientais relacionados aos biomas antropomórficos. A hipertensão essencial é classificada como uma patologia complexa, definida através da interação entre fatores de risco ambiental e genético; assim sendo, o *stress* oxidativo representa um importante fator de risco no desenvolvimento das patologias cardiovasculares.

### **2.2.Específicos**

Desta forma, o presente trabalho pretende analisar se duas variantes funcionais dos genes GPX1 e GPX4, GPX1\*Pro200Leu (rs1050450) e GPX4\*C718T (rs713041), denotam um fator de risco ou protetivo aos indivíduos. Verificar se ambos estão associados a insurgência da hipertensão na cidade de Roma - Itália. Além disso, avaliar se o sexo (masculino e feminino), o fumo (ativo, passivo e não fumante), o tipo de

trabalho, a submissão a estresse cotidianamente, a prática de exercícios físicos, a idade e o índice de massa corporal estão relacionados ao *stress* oxidativo que levará a insurgência da cardiopatia.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.Amostras**

As amostras caso-controle totais analisadas neste estudo, coletadas no Centro de Fisiopatologia Clínica do Hospital “San Giovanni Calibita Fatebenefratelli” em Roma, no segundo semestre de 2013, consistem em 188 pacientes diagnosticados com hipertensão e 101 pacientes sãos. De cada indivíduo foi coletado uma amostra da mucosa bucal mediante o uso de uma solução de tampão oral; os tampões obtidos foram conservados em temperatura ambiente até a chegada no Laboratório de Ecologia Humana do Departamento de Biologia da Università di Roma “Tor Vergata” e sucessivamente conservado a 4°C até o momento da extração do DNA. Além disso, todos os sujeitos, acometidos ou não da patologia, após a aceitação em forma escrita (documentada) em participar da pesquisa, preencheram um questionário base. Através deste, foram recolhidas informações sobre suas características físicas, hábitos de vida, histórico da doença, riscos no trabalho; ademais, dos pacientes hipertensos foram recolhidas outras informações sobre as características da doença. Ressalva-se que o diagnóstico da enfermidade segue avaliação médica e uso de medicamentos.

### **3.2.Extração do DNA da mucosa bucal**

É uma metodologia que permite extrair DNA a partir de pequenas quantidades de material biológico. As células da mucosa bucal são uma boa fonte de DNA genômico e as vantagens principais do uso do tampão bucal estão de que esta não é invasiva e é de fácil aplicação comparada a extração de sangue; portanto, mostra-se preferível quando há um número elevado de amostras a serem coletadas. Em seguida, apresenta-se o protocolo seguido para a extração do DNA com base na mucosa bucal (BUDOWLE *et. al*; 2000).

#### Protocolo de extração do DNA da mucosa bucal

Em uma proveta de 1,5ml se transfere o algodão com a amostra recolhida; adiciona-se 300µL de tampão de extração, contendo:

- 100mM Tris/HCl; pH 8,0
- 100mM NaCl
- 10mM EDTA; pH 8,0
- 2% SDS
- 15µL de proteinase K (10mg/mL)

Após a adição foram realizados os seguintes procedimentos, seguindo a ordem aqui indicada:

1. Incubar a 56°C a noite toda
2. Agitar no vortex e spin em centrifuga para homogeneizar a solução

3. Eliminar o suabe utilizando uma proveta vazia, na qual se despeja o conteúdo líquido da amostra anterior e com auxílio de um bisturi esterilizado.
4. Centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm.
5. À proveta adicionar 300 $\mu$ L de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e agitar até obter uma emulsão láctea.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 8 minutos. Neste ponto serão visíveis duas fases distintas: uma aquosa que contém o DNA e uma orgânica, contendo o fenol.
7. Transferir a fase aquosa (cerca de 500  $\mu$ L) para uma proveta de 1,5mL.
8. Adicionar 50 $\mu$ L (um décimo do volume) de acetato de amônia 5M e 1000 $\mu$ L (o dobro do volume) de etanol P.A. frio.
9. Agitar no vortex e deixar a -20°C por 20 minutos.
10. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos, fazendo atenção de colocar todas as provetas na mesma posição.
11. Eliminar a fase líquida sem tocar o *pellet* sedimentado no fundo da proveta.
12. Eliminar qualquer resquício de etanol mediante evaporação, utilizando a chapa de aquecimento por 5 minutos a 50°C
13. Ressuspender o *pellet* em 50  $\mu$ L de água bidestilada (ddH<sub>2</sub>O).

Para validar a certeza da extração, 3  $\mu$ L de DNA são submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,089M / Ácido bórico 0,089 M / EDTA 0,002 M; pH 8,0). O DNA é misturado com 1  $\mu$ L de gel *Loading Buffer*, contendo 0,25% xilenecyanol FF e 40% de sacarose em água. O *Loading Buffer* serve para aumentar a densidade da amostra, permitindo ao DNA de penetrar de maneira uniforme

nos poços do gel, para colorir as amostras, simplificando o preenchimento no gel e para visualizar a migração das amostras a partir do momento que se move em direção ao anodo com uma velocidade notável. A visualização das bandas é efetuada ao término da migração eletroforética mediante coloração do gel com Brometo de Etídio (100µL em 100mL de ddH<sub>2</sub>O) e sucessiva leitura à luz UV a 350 nm no *UVP Transilluminator*.

### 3.3. Amplificação

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro* de tratos específicos de DNA, descritas por Mullis em 1986 (MULLIS *et. al*, 1986). O método consiste em ciclos repetidos de desnaturação, nos quais se separam os dois filamentos da dupla hélice, de hibridação ou *annealing*, durante a qual se ligam os *primers*, e de extensão, onde a *Taq polimerase* estende o *primer* sobre a base do filamento molde. Para que a reação aconteça é necessário preparar um mix de reação, composta por:

- **PCR buffer** (7,5µL): o tampão Tris-HCl, pH 8,3, é necessário para manter o pH estável, com o intuito de constituir o ambiente ótimo para a atividade da *Taq polimerase*;
- **Taq polimerase** (0,9 µL): é uma DNA polimerase termoestável isolada a partir de uma bactéria termal (*Thermus aquaticus*), uma arqueobactéria adaptada a viver em fontes de águas termais. A sua função é de catalisar, em presença do íon Mg<sup>2+</sup>, a polimerização dos nucleotídeos em direção 5'-3'.

sua termoestabilidade a torna idônea para a PCR porque durante a desnaturação do DNA base se atinge temperaturas de 94°C;

- **MgCl<sub>2</sub>** (2,25µL): o cloreto de magnésio é um cofator fundamental para a polimerização de novas cadeias de DNA, visto que o íon Mg<sup>2+</sup> se insere no sítio ativo da enzima, induzindo a formação da ligação entre 3'-OH e o grupamento fosfato ao 5';
- **Mistura de dNTP** (2,4 µL): é uma mistura de quatro nucleotídeos que compõem o DNA; se encontram sobre a forma de sais de lítio em solução (pH 7,0), cada um a uma concentração de 100mM e são os monômeros fundamentais para o alongamento de cada fita simples;
- **Dupla de Primers** (3+3µL): a dupla de *primers* é constituída pelo *primer forward*, para induzir a amplificação do filamento contínuo, e um *primer reverse* para a amplificação do outro filamento no sentido oposto, também compreendido como filamento descontínuo. Para que a reação de polimerização possa ser realizada é necessária uma quantidade suficiente de DNA genômico alvo, constituído de breves sequências de DNA (oligonucleotídeos), complementares a região *target* que delimitam o trato a ser amplificado e que fornecem o 3'-OH necessário para o início da polimerização, a qual se dá por ação da cópia de *primers*;
- **Água** (48,75 µL): utilizada para solubilizar a reação (meio para se produzir o mix);



O ciclo da PCR é constituído de três fases:

- I. Fase de desnaturação
- II. Fase de *annealing*
- III. Fase de extensão

No primeiro passo é necessário otimizar seja a desnaturação do DNA base, seja a manutenção da atividade da *Taq polimerase*. O DNA deve ser levado a uma condição de fita simples de modo que no segundo momento seja possível a ligação dos *primers*. Para realiza-lo, a solução de DNA é elevada a uma temperatura acima da temperatura de desnaturação,  $T_m$  (*melting temperature*), na qual as ligações de hidrogênio, não mais estáveis, são rompidas, formando duas fitas simples. No que resguarda a *Taq polimerase*, é preciso considerar sua curta meia-vida (35 minutos a 95°C) para poder estabelecer o número de ciclos a serem realizados. No segundo passo, a temperatura de *annealing* ( $T_a$ ) mostra-se como parâmetro mais crítico para otimizar a especificidade da PCR. Normalmente se elege uma temperatura inferior a 5°C daquela da  $T_m$  dos *primers*. A  $T_a$  dos *primers* depende dos conteúdos de guanina + citosina (GC), do comprimento da cadeia e da temperatura de desnaturação. A  $T_m$  se calcula através de uma fórmula empírica, que baseia-se na contribuição à estabilidade das ligações GC e das adeninas e timinas (AT) dos *primers*:

$$T_m = 4 \times n_{GC} + 2 \times n_{AT}$$

Quanto maior a  $T_m$ , maior a probabilidade de os oligonucleotídeos aparecerem especificamente.

O terceiro passo está ligado a programação da temperatura e do tempo para extensão dos *primers*. Uma passagem gradual da temperatura de *annealing* à temperatura de extensão, permite a *Taq polimerase* de iniciar a construção sem que os *primers* se desgrudem da fita molde. Pouco a pouco a *Taq polimerase* polimeriza, a temperatura supera os 72°C e o ciclo recomeça com a desnaturação. Durante o primeiro, e a cada um dos ciclos sucessivos, a ligação de cada um dos oligonucleotídeos seguindo o filamento molde produzirá uma nova molécula de DNA, a qual terá suas dimensões definidas pelos *primers* utilizados. Deste modo, se desenvolverá uma reação em cadeia que levará ao acúmulo de um específico trato de DNA de modo exponencial, de acordo com o número de ciclos reacionais. Isto permite obter um número de cópias do trato analisado próximo a  $2^{(n-2)}$ , onde  $n$  representa o número de ciclos.

Posteriormente, o resultado da PCR é visualizado por Eletroforese. A Eletroforese é um procedimento que consiste na separação de uma molécula qualquer ou várias através de sua carga elétrica, de acordo com diferentes velocidades de migração que atingem quando submetidas a um campo elétrico. Este sistema implica na imersão de uma matriz tridimensional formada por fibras cruzadas de um polímero hidrofílico, o qual representa o gel de suporte, em um tampão de migração.

Um bom exemplo de gel é representado pelo gel de agarose, um componente do ágar, polímero de origem natural extraído das algas vermelhas da família *Gelidiacee*. Em água ou solução salina, a agarose origina um gel termo-reversível de considerável consistência, mesmo em baixa concentração do polímero. O gel se forma porque as cadeias do polímero se unem entre elas, originando uma rede tridimensional rígida, a qual se mantém unida as moléculas de água por pontes de hidrogênio. As cadeias do polímero se ligam por sua vez através de pontes de hidrogênio, formando hélices duplas que se unem a grupo de 10-20, dando origem a fibras helicoidais que conferem rigidez ao gel.

Para verificar a ocorrência de amplificação do modelo através da PCR, se realiza uma eletroforese em gel de agarose utilizando o tampão TBE (0,04M Tris Borato e 0,001M EDTA): 5 $\mu$ L de cada produto amplificado mesclados com 1 $\mu$ L de um *gel loading buffer*.

O *gel loading buffer* desempenha três funções: a) aumenta a densidade das amostras, permitindo ao DNA de penetrar de modo uniforme nos poços do gel; b) colore as amostras, facilitando desta forma o carregamento das amostras no gel; c) contente um corante que migra pelo campo elétrico em direção ao ânodo com velocidade notável. O gel assim obtido é submetido a um campo elétrico e uma cuba de eletroforese (*Mini SubTM DNA Electrophoresis Cell*; Bio-Rad, Califórnia, USA).

Posteriormente o gel é imerso em brometo de etídio e evidenciado diante a exposição a raios UV a 350nm. O brometo de etídio é uma molécula cíclica planar que se liga entre os pares de base de DNA (substancia intercalante), a qual aumenta a concentração de acordo com a correspondência de bandas de DNA e estas, quando expostas a luz UV, emitem uma fluorescência laranja-rosa. Desta forma, foi possível avaliar se as amostras coletadas possuíam o trato definido neste estudo, ou seja, aquele que determina a presença dos polimorfismos GPX1 e GPX4; assim, as que os possuíam passaram a próxima etapa do estudo e as que não, foram descartadas.

### **3.4.Purificação**

Como supracitado, as amostras analisadas que possuíam os genótipos codificantes das enzimas GPX1 e GPX4 passaram as etapas seguintes do projeto. A purificação foi realizada seguindo as seguintes orientações:

- Em Ependorfs de 1,5 ml, enumeradas de acordo com a amostra que seria utilizada, adiciona-se 30 $\mu$ L de cada amostra de PCR, 2  $\mu$ L de acetato de sódio e 150  $\mu$ L de etanol 100%;
- Vortex e centrifuga para homogeneizar a mistura
- Centrifugar por 10 minutos à temperatura de 15°C e 13200 rpm, com a abertura do Ependorf voltada para o centro, de modo que com a rotação do aparelho o trato gênico se deposite na parede oposta (dobra da tampa);
- Aspirar todo o líquido, sem tocar a parede oposta a abertura, não comprometendo o material genético ali fixado;
- Inserir 150 $\mu$ L de etanol 70% em cada um dos Ependorfs, auxiliando no processo de lavagem do material, removendo todo e qualquer tipo de impureza;
- Vortex e centrifuga para homogeneizar a solução;
- Centrifugar a 13200 rpm por 10 minutos à temperatura de 15°C, seguindo a mesma orientação para o manuseio e inserção das amostras na máquina;
- Aspirar todo o conteúdo dos Ependorfs, tomando o cuidado para não tocar a amostras de genes;
- Aquecer na chapa de aquecimento, com a tampa do Ependorf aberta, por 3 minutos à temperatura de 90°C;

Realizadas todas as etapas acima descritas, as amostras passavam ao processo de digestão, onde as ligações entre os pares de base eram rompidas e as ligações 3'5', evidenciando assim as bases prevalentes em cada uma das amostras.

### 3.5.Digestão

Às amostras advindas da purificação foram adicionados 10 $\mu$ L de água bidestilada e realizado vortex e centrifuga, fazendo com que o material genético preso à parede da proveta se desgrudasse, solubilizando-o. 7 $\mu$ L destas amostras de DNA purificado foram transferidos para provetas de 100 $\mu$ L (segundo a enumeração anterior) e adicionados 3 $\mu$ L do mix descrito a seguir:

Mix para digestão	
ddH <sub>2</sub> O	2,0 $\mu$ L
Buffer	1,0 $\mu$ L
Sty I	0,2 $\mu$ L

Os valores da tabela eram multiplicados pelo número de amostras e preparados em um ependorf de 1,5mL; após a inserção de todos os reagentes, realizou-se vortex e centrifuga com o intuito de homogeneizar a solução (mix).

Feita a mistura do produto da digestão com o mix, vortex e centrífuga para homogeneizar e auxiliar na reação (agitação das moléculas e contato entre elas). Posteriormente, as provetas foram levadas a chapa de aquecimento por 24 horas à temperatura de 37°C.

### **3.6.Migração e análise em gel de acrilamida**

Transcorridas as 24 horas, coletava-se 10 $\mu$ L de cada uma das amostras e adicionava-se 1 $\mu$ L de *gel loading Buffer*, cuja função fora descrita anteriormente. Carregou-se o gel de acrilamida com as amostras supracitadas, imersos em solução tampão TBE 1% e submetidos à corrente elétrica (não lembro a voltagem, mas acredito 240v) para que migrassem no gel; esta migração finaliza-se quando as amostras superavam a marcação do aparelho de eletroforese. Ao término da migração, o gel passava por coloração em brometo de etídio e analisado através de raios UV, permitindo identificar, através do peso molecular, o genótipo de cada um dos indivíduos.

Com o término destes protocolos, foi possível analisar de forma quantitativa e qualitativa, mesclando os dados genéticos aos dados pessoais de cada um dos indivíduos amostrados. Os resultados apresentam-se adiante como base para as análises estatísticas pertinentes ao trabalho, permitindo assim verificar se há relação entre a expressão de ambos polimorfismos genéticos e os fatores de risco; ressalva-se que se o indivíduo não possuísse ambos ou ao menos um dos polimorfismos GPX1 e/ou GPX4 codificados em seu material genético, era eliminado da base de dados analisadas estatisticamente.

### **3.7.Análises estatísticas**

Com os dados colhidos durante as entrevistas médicas para cada indivíduo e os resultados advindo das análises biomoleculares, compilou-se uma tabela utilizando o

programa *Excel 2013*, onde cada genótipo foi atrelado as características individuais dos pacientes, também compreendidas como fatores de risco; desta forma, tornou-se possível sistematizar os dados, permitindo a transferência dos dados para os *softwares* que auxiliaram nos cálculos das frequências observadas e absolutas, através dos testes “chi square”, “p-value” e “t-test” (RESEARCH METHODS KNOWLEDGE BASE, 2016; SOCIAL SCIENCE STATISTICS, 2016; FANELLI, 2016), dados que denotariam o grau de significância dos resultados obtidos, havendo ou não uma associação direta entre a variante (sexo, fumo ativo, fumo passivo, tipo de trabalho, estresse, atividade física, idade e índice de massa corporal) e a expressão da hipertensão.

Para as variantes não numéricas o *software* “OpenEpi – arquivo RybC” foi utilizado para os cálculos do “*chi square*” e “*p-value*”, permitindo assim determinar se os dados são parecidos entre si ou não, ou seja, se é ou não significativo; através dos valores expressos por “*P-value*” torna-se possível realizar tal avaliação: se “*p-value*” for menor que 0,05 os dados são significantes, ou seja, diferentes entre si; se for maior que 0,05, não são significativos, parecidos entre si. Posteriormente, através do site [<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>], foi possível calcular as frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos separadamente; além disso, tornou-se possível quantificar a associação das GPX com o status de resposta.

Por outro lado, as variantes numéricas (idade e índice de massa corporal) foram calculadas através do site [<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>], a partir do qual seriam analisados e indicariam os resultados do “*t-test*” e “*p-value*”, permitindo a análise da significância dos dados; além disso, o *software* SPSS fora utilizado para calcular, posteriormente, o índice de significância comparando a presença da patologia nos indivíduos e a presença dos polimorfismos.

Com os cálculos realizados, passa-se para a análise dos resultados, trazendo as tabelas e gráficos como indicações para sustentar as posteriores conclusões.

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise biomolecular, utilizando os procedimentos anteriormente descritos, mostrou-se possível identificar os genótipos de cada um dos indivíduos que participaram deste estudo, seja caso, seja controle. Na imagem a seguir é possível visualizar o padrão eletroforético resultante dos géis de agarose.

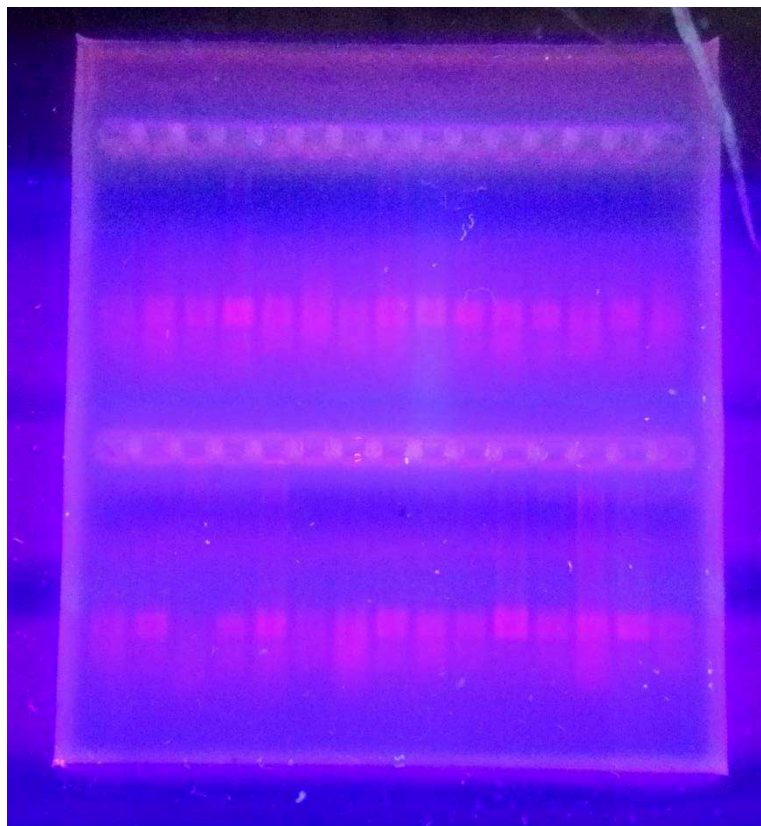


Figura 4: Fotografia revelando o padrão de migração em gel de agarose, permitindo constatar a presença dos polimorfismos nos indivíduos.



Como explicitado anteriormente, os dados qualitativos e quantitativos foram organizados em uma tabela com o uso do programa *Excel2013* seguindo o seguinte formato:

identidade	gpx1	gpx4	status	sexo	idade	imc	fumo ativo	fumo passivo	atividade. física	trabalho	stress
------------	------	------	--------	------	-------	-----	---------------	-----------------	----------------------	----------	--------

Ressalva-se que esta tabela segue uma função de classificação podendo ser separada de acordo com os subitens, em se tratando das variáveis qualitativas, divididos segundo tabela:

VARIANTE QUALITATIVA	SUBINTENS			
GPX1	C/C	C/T	T/T	N/A
GPX4	C/C	C/T	T/T	N/A
STATUS	Hipertenso		Controle	
SEXO	macho		fêmea	
FUMO ATIVO	Sim		Não	Ex
FUMO PASSIVO	Sim		Não	
TRABALHO	Sedentário		Ativo	
AT. FÍSICA	Ausente	Moderada	Leve	Intensa
STRESS	Ausente	Moderado	Leve	Intenso

Tabela 1: Formato Excel2013 para análises das variantes qualitativas

Para as variantes quantitativas não havia a possibilidade de organizar os dados e não se mostrou necessário, visto que seriam processados através de outro *software* estatístico.

Posteriormente à organização, os dados qualitativos foram processados no programa computacional *OpenEpi*, cuja função é calcular os valores de *Chi-square* e *P-value*, demonstrando o grau de significância de tais fatores ambientais na expressão da hipertensão. Os resultados apresentados estão descritos nas tabelas:

<b>Variante: Sexo</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	NÃO SIGNIFICATIVO
Masc	77	36	0,94	0,3323	
Fem	110	65			
<b>Variante: Fumo ativo</b>					
<b>Variante: Fumo ativo</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	NÃO SIGNIFICATIVO
Sim	35	26	2,628	0,2688	
Não	90	40			
Ex	62	35			
<b>Variante: Fumo passivo</b>					
<b>Variante: Fumo passivo</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	NÃO SIGNIFICATIVO
Sim	79	40	0,1585	0,6905	
Não	108	61			
<b>Variante: Trabalho</b>					
<b>Variante: Trabalho</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	SIGNIFICATIVO
Sedentário	123	47	10,26	<b>0,00136</b>	
Ativo	64	54			
<b>Variante: Stress</b>					
<b>Variante: Stress</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	SIGNIFICATIVO
Ausente	12	1	8,856	<b>0,03533</b>	
Intenso	30	13			
Leve	42	35			
Moderado	103	52			
<b>Variante: Atividade Física</b>					
<b>Variante: Atividade Física</b>	Casos	Controles	Chi square	P-valeu	NÃO SIGNIFICATIVO
Leve	72	47	4,249	0,2358	
Moderada	41	18			
Intensa	5	6			
Ausente	69	30			

Tabela 2: Variantes qualitativas analisadas pelo programa computacional *OpenEpi*, indicando o valor de *Chi square* e *P-value*

Tomando nota da bibliografia referente a análise de dados *Chi square* e *P-value* (FANELLI, 2016; RESEARCH METHODS KNOWLEDGE BASE, 2016; SOCIAL SCIENCE STATISTICS, 2016), onde valores menores que 0,05 são significativos, ou seja, são diferentes entre eles, e valores maiores que 0,05 não são significativos, ou seja, são parecidos entre si, averiguou-se que dos resultados obtidos apenas os fatores de risco “estresse” e “trabalho” podem estar diretamente associados ao desenvolvimento da enfermidade cardiovascular. Segundo Emery e O’Neil (2005) apresentam que estudos

realizados na população norte americana confirmam que ambos os fatores, e também casos de depressão, estão diretamente associados ao desenvolvimento de hipertensão.

Em se tratando dos dados quantitativos, o prospecto eleito, disponível on-line através do site <<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>>, resultou as informações aqui apresentadas:

<b>Idade Casos</b>		T test	P-value	não significativo
Mean	58,74			
SD	9,64			
<b>Idade Controles</b>				
Mean	57,64	0,8729	0,3834	não significativo
SD	11,21			
<b>IMC Casos</b>				
Mean	24,0872			
SD	2,885	T TEST	P-value	não significativo
<b>IMC Controles</b>				
Mean	24,483			
SD	2,741			
		1,1314	0,2588	não significativo

Tabela 3: Variantes quantitativas analisadas através do site <<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>>, indicando o valor de *Chi square* e *P-value*

Desta maneira notou-se que ambas as variáveis quantitativas não estão diretamente associadas ao desenvolvimento da cardiopatia em estudo realizado para dada população urbana romana. É indispensável reafirmar que tais aspectos caracterizantes servem apenas para se pensar nos residentes de determinado local, pois, tais estudos consideram somente fatores de riscos específicos atrelados à localidade em pauta. Em estudos realizados em outras cidades, países e até continentes, é possível identificar algum grau de associação entre alguns dos fatores supracitados que neste estudo não apresentam nível de significância, como por exemplo os estudos realizados por Forsberg *et al.* (2000), Foster *et al.* (2006) e Hesketh (2008).

Subsequentemente, para os referidos itens que se apresentaram como significativos para a insurgência da hipertensão, compilou-se um novo catálogo, o qual seria utilizado pela plataforma on-line <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm?> para mensurar o índice de associação entre estress e trabalho e o desenvolvimento da

cardiopatia, podendo indicar se os polimorfismos são fatores de risco ou protetivos nos indivíduos analisados. O processamento fora realizado para GPX1 e GPX4 separadamente e adiante são apresentados:

GPX1 frequências alélicas (n=278)				
	Controles		Casos	
Alelo	N	Proporção	N	Proporção
C	126	0,64	239	0,66
T	70	0,36	121	0,34

GPX1 frequências genotípicas (n=288)				
	Controle		Casos	
Alelos	N	Proporção	N	Proporção
C/C	35	0,36	76	0,42
C/T	56	0,57	87	0,48
T/T	7	0,07	17	0,09
NA	2	---	8	---

ASSOCIAÇÃO DE GPX1 COM A RESPOSTA STATUS (n=279, ajustado para estress + trabalho)							
Modelo	genótipo status	controle status	hipertenso status	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominante	C/C	35 (35,7%)	76 (42,2%)	1	0,4	352,3	377,7
	C/T	56 (57,1%)	87 (48,3%)	0,72 (0,41 - 1,25)			
	T/T	7 (7,1%)	17 (9,4%)	1,13 (0,41 - 3,10)			
Dominante	C/C	35 (35,7%)	76 (42,2%)	1	0,33	351,2	372,9
	C/T - T/T	63 (64,3%)	104 (57,8%)	0,77 (0,45 - 1,31)			
Recessivo	C/C - C/T	91 (92,9%)	163 (90,6%)	1	0,51	351,7	373,5
	T/T	7 (7,1%)	17 (9,4%)	1,37 (0,53 - 3,55)			
Overdominante	C/C - T/T	42 (42,9%)	93 (51,7%)	1	0,19	350,4	372,1
	C/T	56 (57,1%)	87 (48,3%)	0,7 (0,42 - 1,19)			
Log - additive				0,91 (0,6 - 1,37)	0,64	351,9	373,7

Tabela 4: apresentando as análises feitas através do site <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm?>, associando os dois fatores de riscos concomitantemente e a insurgência da hipertensão, apresentando os graus de significância para populações com prevalências genotípicas diferentes, o intervalo de confiança e o *Chi-square* para GPX1

GPX4 frequências alélicas (n=248)				
	Controle		Casos	
Alelos	N	Proporção	N	Proporção
C	107	0,61	195	0,61
T	69	0,39	125	0,39

GPX4 frequências genotípicas (n=288)				
	Controle		Casos	
Alelos	N	Proporção	N	Proporção
C/C	35	0,4	63	0,39
C/T	37	0,42	69	0,43
T/T	16	0,18	28	0,18
NA	12	---	28	---

ASSOCIAÇÃO DE GPX4 COM A RESPOSTA STATUS (n=248, ajustado para estresse + trabalho)							
Modelo	Genótipo Status	Controles Status	Hipertenso Status	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominante	C/C	35 (39,8%)	63 (39,4%)	1	0,98	322	346,6
	C/T	37 (42%)	69 (43,1%)	1,02 (0,56 - 1,87)			
	T/T	16 (18,2%)	28 (17,5%)	0,94 (0,44 - 2,00)			
Dominante	C/C	35 (39,8%)	63 (39,4%)	1	0,99	320,1	341,2
	C/T -T/T	53 (60,2%)	97 (60,6%)	1,00 (0,57 - 1,73)			
Recessivo	C/C - C/T	72 (81,8%)	132 (82,5%)	1	0,83	320	341,1
	T/T	16 (18,2%)	28 (17,5%)	0,93 (0,46 - 1,87)			
Overdominante	C/C - T/T	51 (58%)	91 (56,9%)	1	0,88	320,1	341,1
	C/T	37 (42%)	69 (43,1%)	1,04 (0,60 - 1,82)			
Log - additive				0,98 (0,68 - 1,41)	0,9	320,1	341,1

Tabela 5: apresentando as análises feitas através do site <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm?>, associando os dois fatores de riscos concomitantemente e a insurgência da hipertensão, apresentando os graus de significância para populações com prevalências genotípicas diferentes, o intervalo de confiança e o *Chi-square* para GPX4

Por intermédio dos valores obtidos descritos na coluna *OR* é possível visualizar que, quando os fatores de riscos são considerados em conjunto, alguns genótipos indicaram associação positiva, ou seja, valores maiores que 1, e outros, associação negativa, ou seja, valores menores que 1; e indispensável compreender que uma “associação positiva” indica que o polimorfismo denota um aumento da susceptibilidade, sendo assim, torna-se um fator de risco, enquanto que a “associação negativa” o SNP confere a seu portador um fator de proteção.

No entanto, a afirmação anterior baseia-se em genótipos avaliados separadamente e não rende conto dos grupos étnicos estudados e suas origens. Segundo dados do *National Center for Biotechnology Information* (2016) o alelo “C” é aquele que não sofrera mutação e o “T”, o que sofrera; desta forma, observa-se que quanto maior a presença de timinas no trato que codifica os SNPs, maior será o processo mutagênico ao qual o indivíduo fora submetido através de sua história evolutiva; a exemplo, estudos realizados *in vitro* evidenciam que a presença de um alelo mutado em GPX1 deveriam aumentar a atividade sua atividade enzimática, enquanto que naqueles indivíduos com dois alelos mutados, a atividade seria reduzida (KUZUYA *et al.*, 2008). Tudo isto fora dito para que se possa compreender que o grau de significância, calculado através do *P-value*, novamente indica que não há um valor significativo para inferir que a insurgência da enfermidade na cidade de Roma não está diretamente associada aos dois fatores de risco analisados em concomitância.

É de suma importância que compreender que o estresse oxidativo ao qual a célula está submetida pode estar vinculado não só a fatores exógenos, mas a fatores endógenos, ou seja, associados à pré-disposição genética dos indivíduos. Em contraposição ao estudo relacionado a patologia cardiovascular para a população romana, da qual resulta que nenhum dos fatores de risco estão ligados à insurgência da enfermidade, nota-se que para

a asma o estresse oxidativo, mediado pelos mesmos fatores aqui estudados, apontam para o aumento do desenvolvimento da patologia respiratória na população, principalmente naqueles indivíduos com pré-disposição genética (VIGNOLA, 1998; AHMAD *et al.*, 2012; VELOCCI, 2014).

Por fim, realizou-se uma análise complementar às supracitadas, para averiguar se a presença ou ausência dos polimorfismos enzimáticos está intimamente associada a patologia (*status* – hipertenso ou controle); para tal o *software SPSS* fora utilizado, por meio do qual fora possível averiguar se há ou não esta correlação. Seguem-se os resultados obtidos:



Tabela: Ter GPX1 \* Status

## Crosstab

		STATUS		Total	
		Hipertenso	Normotenso		
TEMGPX1	Sim	Count	88	40	128
		% within TEMGPX1	68.8%	31.3%	100.0%
	Não	Count	2	0	2
		% within TEMGPX1	100.0%	0.0%	100.0%
Total	Count	90	40	130	
	% within TEMGPX1	69.2%	30.8%	100.0%	

## Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.903	1	.342		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.032	1	.859		
Likelihood Ratio	1.485	1	.223		
Fisher's Exact Test				1.000	.478
Linear-by-Linear Association	.896	1	.344		
N of Valid Cases	130				

Tabela 6: apresentando as análises feitas no *software SPSS*, associando a presença ou ausência do polimorfismo GPX1 com a insurgência da hipertensão

Tabela: Ter GPX4 \* Status

**Crosstab**

		STATUS		Total
		Hipertenso	Normotenso	
TEMGPX4	Sim	Count 78	Count 36	Count 114
		% within TEMGPX4 68.4%	% within TEMGPX4 31.3%	% within TEMGPX4 100.0%
	Não	Count 12	Count 4	Count 16
		% within TEMGPX4 75.0%	% within TEMGPX4 25.0%	% within TEMGPX4 100.0%
Total		Count 90	Count 40	Count 130
		% within TEMGPX4 69.2%	% within TEMGPX4 30.8%	% within TEMGPX4 100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.285	1	.593		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.060	1	.807		
Likelihood Ratio	.295	1	.587		
Fisher's Exact Test				.775	.414
Linear-by-Linear Association	.283	1	.595		
N of Valid Cases	130				

Tabela 7: apresentando as análises feitas no *software SPSS*, associando a presença ou ausência do polimorfismo GPX4 com a insurgência da hipertensão

Após analisar os índices obtidos, é possível deduzir que não há relação estatística entre a presença ou ausência de ambos os polimorfismos GPXs com a propensão ao desenvolvimento da hipertensão, já que o nível de significância, observado através do *Chi-square*, indicam uma dissociação entre os dois parâmetros avaliados: *status* e *presença/ausência do polimorfismo*. Alguns estudos realizados acerca do câncer de mama e atividade do polimorfismo GPX1 aqui estudado, demonstram que sua atividade antioxidante é reduzida em mulheres acometidas pela patologia, contrapostas a aquelas que não o são (RAVN-HAREN *et al.*, 2006), demonstrando que há uma relação íntima entre ao polimorfismo e ao desenvolvimento de outras patologias. Para GPX4, há enzima apresenta-se como fator protetivo para fisiopatologias relacionadas à proteção de tecidos nervosos (YANT *et al.*, 2003), indicando também uma associação das enfermidades teciduais e o SNP. No entanto, nenhum dos estudos supracitados fora realizado para a mesma população, dando indicativo para uma discussão de associabilidade entre ambos polimorfismos enzimáticos e a hipertensão, visto que diferentes patologias estão correlacionadas a diferentes SNPs, alterando assim o sítio de ação enzimático.

## 5.CONCLUSÃO

Infere-se que nem GPX1, nem GPX4 estão associados à expressão de hipertensão na cidade de Roma – Itália, já que nenhum dos fatores de risco analisados possuem valores significativos atrelados a coeficientes de risco ou de proteção para os acima elencados SNPs. Porém, é de grande valia ter em mente que este estudo se direciona a uma região específica, não podendo ser tomado como absoluto, enquanto resultados

apresentados, para quaisquer outros países/cidades; entretanto, é passível de replicação, considerando os mesmos fatores em outros biomas antropomórficos, permeando a construção de uma ciência mais ampla e a compilação de dados que permitam investir em políticas preventivas, de manejo e de saúde dos respectivos antromas. Além disso, é preciso compreender que há uma carência de dados e bibliografia no que resguarda esta metodologia, por apresentar uma compreensão ecológica contemporânea e que se lapida ao longo dos últimos 20 anos; assim sendo, novos estudos, com outras populações, permitiriam o reconhecimento e o aprimoramento de tal metodologia enquanto colaboradora de pesquisas interdisciplinares.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAME, E. M.; FLOREA, D.; PEREZ, L. S.; LOPEZ, J. M.; LOPEZ-GONZALEZ, B.; CRUZ, A. P. de la C.; POZO, E. P. del; Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. **Nutricion hospitalaria**, v. 27, p. 524-528, 2012.

AHMAD, A.; SHAMEEM, M.; HUSAIN, Q.. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. **Ann. Thorac. Med.**, n. 7, p. 226-232, 2012.

ANTHROPOGENIC LANDSCAPE ECOLOGY. Anthromes: The global ecological patterns created by humans. Disponível em <<http://www.ecotope.org/anthromes/>>. Acesso em 18 de jan. 2016.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A.; Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1555-1568, 2009.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M.; Glutathione Peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 3289-3303, 2013.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9/10, p. 951-965, 1999.

BROOME, C.S.; MCARDLE, F.; KYLE, J.A.; ANDREWS, F.; LOWE, N.M.; HART, C.A.; ARTHUR, J.R.; JACKSON, M.J.; An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. **Am. J. Clin. Nutr**, v. 80, p. 154-16, 2004.

BUDOWLE, B.; MORETTI, T.; SMITH, J.; DIZINNO, J.; DNA typing protocols: Molecular Biology and Forensic analysis. A Bio Techniques® Books Publications. Natick, MA: **Eaton Publishing**; 2000.

CALIGARI, P. D.; MATHER, K.; Genotype--environment interaction. III. Interactions in *Drosophila melanogaster*. **Pro. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 191, p. 387-411, 1975.

CASCIANO, R. L. Considerações sobre o papel e a atuação dos professores como agentes fomentadores de transformação social. In: SEXTO SEMINÁRIO BRASILEIRO DE ESTUDOS CULTURAIS E EDUCAÇÃO. Canoas, 2015.

COCOZZA, S.; VACCARO, O.; Interazione geni-ambiente in relazione al rischio cardiovascolare. **Grandangolo in Diabetologia**, p. 7-15, 2005.

ELLIS, E. C. Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. **Philosophical Transactions**, n. 369, p. 1010-1035, 2011.

ELLIS, E. C.; WANG, H.; XIAO, H. S.; PENG, K.; LIU, X. P.; LI, S. C.; OUYANG, H.; CHENG, X.; YANG, L. Z.. Measuring long-term ecological changes in densely populated landscapes using current and historical high resolution imagery. **Remote Sensing of Environment**, n. 100, p. 457-473, 2006.

EMERY, C. F.; O'NEIL, J. N.. Medicina comportamental e cardiopatia. In: TOPOL, E. J.. **Tratado de Cardiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, p. 185-196, 2005.

FANELLI, L.; I test statistici e il p-value. Disponível em <<http://www.rimini.unibo.it/fanelli/TEST.pdf>>. Acesso em 09 de mai. 2016.

FORSBERG, L.; FAIRE, U. De; MARKLUND, S.L.; ANDERSSON, P.M.; STEGMAYR, B.; MORGENSTERN, R.; Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 26, p. 423-426, 2000.

FOSTER, C.B.; ASWATH, K.; CHANOCK, S.J.; MCKAY, H.F.; PETERS, U.; Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. **BMC Genet**, v. 7, p. 56, 2006.

- HAMDY, S.I.; HIRATSUKA, M.; NARAHARA, K.; ENDO, N.; EL-ENANY, M.; MOURSI, N.; AHMED, M.S.; MIZUGAKI, M.; Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br. J. Clin. Pharmacol*, v. 55, p. 560-569, 2003.
- HESKETH, J.; Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 28, p. 157-177, 2008
- KUZUYA, M.; ANDO, F.; IGUCHI, A.; SHIMOKATA, H.. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu: variant contributes to the metabolic syndrome in men in a large Japanese cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, n. 87, p. 1939-1944, 2008.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D.E.; Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal*, v. 15, p. 1957-1997, 2011.
- MARIOTTI, M.; RIDGE, P. G.; ZHANG, Y.; LOBANOV, A. V.; PRINGLE, T. H.; GUIDO, R.; HATFIELD, D. L.; GLADSHEV, V. N.; Composition and Evolution of the Vertebrate and Mammalian Selenoproteomes. *Plos One*, v.7, p. 1-19, 2012.
- MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I.; Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem*, v. 32, p. 595-603, 1999.



MILLER, J.C.; THOMSON, C.D.; WILLIAMS, S.M.; HAVRE, N. Van; WILKINS, G.T.; MORISON, I.M.; *et al.*; Influence of the glutathione peroxidase 1 Pro200Leu polymorphism on the response of glutathione peroxidase activity to selenium supplementation: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, p.923-931, 2012.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., & ERLICH, H.; Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1*, p. 263-273, 1986.

NATIONAL CENTER for BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GPX1 & GPX4. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 10 de mai. 2016.

POLIMANTI, R.; FUCIARELLI, M.; DESTRO-BISOL, G.; BATTAGLIA, C.; Functional diversity of the glutathione peroxidase gene family among human populations: implications for genetic predisposition to disease and drug response. **Pharmacogenomics**, p. 1037-1045, 2013.

POLIMANTI, R.; PIACENTINI, S.; LAZZARIN, N.; RE, M.A.; MANFELLOTTI, D.; FUCIARELLI, M.; Glutathione S-transferase variants as risk factor for essential hypertension in Italian patients. **Mol Cell Biochem**, p. 227-233, 2011.

- POLONIKOV, A.V.; VIALYKH, E.K.; CHURNOSOV, M.I.; ILLIG, T.; FREIDIN, M.B.; VASIL'EVA, O.V.; et al.; The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension. **Hypertens Res**, p. 35-507, 2012.
- RAASCHOU-NIELSEN, O.; SORENSEN, M.; HANSEN, R. D.; FREDERIKSEN, K.; TJONNELAND, A.; OVERVAD, K.; VOGEL, U.; GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. **Cancer Lett.**, v. 247, p. 293-300, 2007.
- RASALINGAM, R.; PEARSON, T. A.. Uma abordagem integrada para a modificação dos fatores de risco. In: TOPOL, E. J.. **Tratado de Cardiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, p. 213-225, 2005.
- RAVN-HAREN, G.; OLSEN, A.; TJONNELAND, A.; DRAGSTED, L. O.; NEXO, B. A.; WALLIN, H.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; VOGEL, U.. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. **Carcinogenesis**, n. 27, p. 820-825, 2006.
- RESEARCH METHODS KNOWLEDGE BASE. The t-test. Disponível em <[http://www.socialresearchmethods.net/kb/stat\\_t.php](http://www.socialresearchmethods.net/kb/stat_t.php)>. Acesso em 09 de mai. 2016.

- RUDD, P.; OSTERBERG, L. G.. Hipertensão: contexto, fisiopatologia e tratamento. In: TOPOL, E. J.. **Tratado de Cardiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, p. 76-104, 2005.
- SCHRIEVER S. C.; BARNES K. M.; EVENSON, J. K.; RAINES, A. M.; R.A., S.; Selenium requirements are higher for glutathione peroxidase-1 mRNA than gpx 1 activity in rat testis. **Exp. Biol. Med.** (Maywood), v. 234, p. 513-531, 2009.
- SOCIAL SCIENCE STATISTICS. Chi-square Calculator. Disponível em <<http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>>. Acesso em 09 de mai. 2016.
- TOPPO, S.; VANIN, S.; BOSELLO, V.; TOSATTO, S. C. E.; Evolutionary and Structural insights into the multifaceted glutathione peroxidases (GPx) superfamily. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1501-1513, 2008.
- VELOCCI, M.. Varianti funzionali delle Glutatione perossidasi in un campione di pazienti italiani affetti da asma. Ano acadêmico 2013/2014. 60 folhas. Dissertação – Università degli Studi di Roma Tor Vergata. Roma, Lacio – Itália, 2014.
- VERBURG, P. H.; ASSELEN, S. van; ZANDEN, E. H. van der; STEHFEST, E. The representation of landscape in global scale assessments of environmental change. **Landscape Ecol**, n. 28, p. 1067-1080, 2013.

VIGNOLA, A. M.; CHANEZ, P.; CAMPBELL, A. M.; SOUQUES, F.; LEBEL, B.; ENANDER, I.; BOUSQUET, J.. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, n. 157, p. 403-409, 1998.

YANT, L. J.; RAN, Q.; RAO, L.; REMMEN, H. V.; SHIBATANI, T.; BELBER, J. G.; MOTTA, L.; RICHARDSON, A.; PROLLA, T. A.. The selenoprotein GPX4 in essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, p. 496-502, 2003.