

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
575.113
G263 a
TES/MEM

*Análise dos Polimorfismos Gênicos M235T do
Angiotensinogênio Humano, Glu-298-Asp e T⁷⁸⁶ → C da
ecNOS na Hipertensão e no Infarto Agudo do Miocárdio*

Renata Ríspoli Gatti

SISBI/UFU



1000210969

UBERLÂNDIA – MG
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

UMU
542.112
G863a
1997/01

*Análise dos Polimorfismos Gênicos M235T do
Angiotensinogênio Humano, Glu-298-Asp e T⁷⁸⁶ → C da
ecNOS na Hipertensão e no Infarto Agudo do Miocárdio*

Renata Ríspoli Gatti
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica

UBERLÂNDIA – MG
2003

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que estiveram comigo me orientando, me dando apoio, me ajudando física, emocional, espiritual e intelectualmente e que puderam tornar possível a realização deste trabalho: meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, ao Dr. Messias Antônio Araújo, ao meu namorado e companheiro Dr. Fernando Martins da Silva, ao meu grande amigo Dr. Andrei Mousasticoshvilly, aos meus pais Reinaldo Saramago Gatti e Beatriz Ríspoli Gatti e aos meus amigos e amigas do laboratório.

AGRADECIMENTOS

Existe dentro de cada um de nós o desejo de realizar um sonho esquecido, deixado de lado. Existe em cada um, a certeza de uma esperança, de uma conquista. Está dentro de nós a razão pela qual lutamos pela vida. Está dentro de nós a busca e a coragem. Está em nosso meio o motivo pelo qual muitos ainda dão suas vidas pela vida de muitos. Mas, em nosso meio também está a falsidade, o individualismo, o egoísmo. São desafios que encontramos a cada novo dia. São dificuldades que se apresentam como obstáculos a serem superados. Mas existe uma saída, ela está ao nosso lado dia após dia, hora após hora, são simples momentos que acabamos por viver que relatam a própria magia da vida, resumidos numa simples palavra: AMIZADE. A amizade é a razão, a busca, a coragem, é a centelha de esperança que surge como caminho diante de tantas dúvidas. É a resposta a todos os desafios, dificuldades. Tudo na vida passa, pode acreditar que de qualquer modo ela não é fácil como queremos que fosse, é uma loucura, muita correria dia após dia mas, difícil mesmo é ser amigo para todas horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. A vida é como uma bicicleta, você aprende a andar, cai com ela mas se levanta, se machuca, mas se cura, se a quebra a conserta, mas as vezes não se preocupa com você, mas com a pobre da bicicleta e com certeza nenhum aprendizado é válido se não existirem as pessoas com as quais possamos trocar experiências. A todas as pessoas que me ajudaram e me proporcionaram momentos alegres como Rossana Vilela, Luciana Benedetti, Karina Marangoni, Paula Cristina, Paula Souza, Tatiane Mundim, Júlio, Marcelo, Fausto, Carlos, Rone, Guilherme, Cícero, Waldesse, Jaqueline, Fred, Katiana, Alexandra, Andréia, Ana Paula, Juliana Machado, Juliana Franco, Adriana, Elaine, Mércia, Walter, Prof. Heyder, Dr. Messias Antônio Araújo, a secretária Marlene, aos pacientes que colaboraram com a pesquisa, a Prof. Leonilda e ao Prof. Valdo por terem aceito o meu convite para fazerem parte da banca de defesa enfim, a todos vocês o meu sincero agradecimento. Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart por ter "segurado as pontas" comigo, me aguentando com tanto estresse e problemas pelos quais passei durante o curso e por mais uma vez me dar a oportunidade de trabalho. Agradeço finalmente a Deus pois sem Ele nada disso seria possível.

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo Geral	xiv
General Abstract	xix
Introdução Geral	01
▪ Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)	01
▪ Mecanismos Bioquímicos e Moleculares Envolvidos na Regulação da Pressão Arterial(PA) e na Patogênese da Hipertensão	04
• Sistema Renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)	04
• Angiotensinogênio (AGT)	07
• Óxido Nítrico (NO)	11
▪ Disfunção Endotelial, Aterogênese e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)	15
Objetivos Gerais	21
Referências Bibliográficas	22
Capítulo 1: Associação do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio humano (AGT) com hipertensão e infarto agudo do miocárdio	27
Resumo	28
Abstract	29
Introdução.....	30
Materiais e Métodos.....	33
Resultados.....	37
Discussão.....	46
Referências Bibliográficas.....	52
Capítulo 2: Associação dos polimorfismos Glu-298-Asp e T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS na hipertensão e infarto agudo do miocárdio	54
Resumo.....	55
Abstract.....	56

Introdução.....	57
Materiais e Métodos.....	60
Resultados.....	64
Discussão.....	79
Referências Bibliográficas.....	85
Capítulo 3: Interações entre fatores de risco convencionais e polimorfismos gênicos dos genes do AGT humano e ecNOS na hipertensão.....	88
Resumo.....	89
Abstract.....	90
Introdução.....	91
Materiais e Métodos.....	93
Resultados.....	96
Discussão.....	106
Referências Bibliográficas.....	115
Anexo: Termo de consentimento informado.....	118

Lista de Figuras

- Figura 1:** Modelo multifatorial da determinação da pressão sangüínea demonstrando a potencial influência de genes, fatores ambientais e fatores demográficos.....03
- Figura 2:** Esquema do sistema renina-angiotensina-aldosterona adaptado de Nakagawa e Ishizaki (2000) e Carey *et al* (2000).....07
- Figura 3:** Síntese de óxido nítrico a partir de L-arginina..... 12
- Figura 4:** Mapa dos polimorfismos do gene da ecNOS. (A) organização do gene, (B) detalhe da região promotora..... 15
- Figura 5:** Passos que iniciam a aterosclerose. Associação dos fatores de risco com síndrome hipertensiva contribuindo para o estresse oxidativo que causa disfunção endotelial resultando em anormalidades vasculares, morbidade e mortalidade, adaptado de Schiffrin (2000) e Vogel (1999).....20
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio evidenciando a amplificação de acordo com o protocolo e primers informado. Neste caso, a variante M235T apresenta 332pb.....37
- Figura 7:** Gel de agarose 3% evidenciando o padrão de genotipagem obtido após restrição enzimática pela enzima Psy I(Tth111-1). Homozigotos M235/M235 com 332pb, heterozigotos M235/T235 com 332, 308 e 24pb e homozigotos mutantes com 308 e 24pb.....38
- Figura 8:** Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo M235T do AGT humano no grupo de pacientes HAS.44
- Figura 9:** Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo M235T do AGT humano no grupo de pacientes HAS/IAM.....44
- Figura 10:** Gel de agarose 1,5% evidenciando o resultado obtido pela amplificação da região de 457pb que cerca a variante Glu-298-Asp.....64
- Figura 11:** Padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo Glu-298-Asp...65
- Figura 12:** Gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação obtida para a região de 236pb que cerca a variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS.....65
- Figura 13:** Gel de poliacrilamida 15% evidenciando o padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C.....66

Figura 14:	Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo Glu-298-Asp no grupo de pacientes HAS.....	71
Figura 15:	Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo T ⁻⁷⁸⁶ →C da ecNOS no grupo de pacientes HAS.....	71
Figura 16:	Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo Glu-298-Asp da ecNOS no grupo de pacientes HAS/IAM.....	76
Figura 17:	Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo T ⁻⁷⁸⁶ →C da ecNOS no grupo de pacientes HAS/IAM..	76
Figura 18:	a) gel de agarose 3% evidenciando o padrão de genotipagem da variante M235T do AGT humano. b) gel de agarose 3% evidenciando a genotipagem da variante Glu-298-Asp.....	96
Figura 19:	Estimativas de risco de desenvolver a hipertensão associada aos polimorfismos M235T e Glu-298-Asp isoladamente e simultaneamente.....	105
Figura 20:	Regressão logística entre os dois polimorfismos M235T e Glu-298-Asp na gênese da hipertensão.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Características clínicas entre pacientes HAS e controles.....	38
Tabela 2:	Freqüência genótípicas e alélicas da variante M235T entre pacientes HAS e controles.....	39
Tabela 3:	Efeito da presença dos genótipos do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes HAS.....	40
Tabela 4:	Características clínicas entre pacientes HAS/IAM e controles.....	41
Tabela 5:	Freqüência genotípica e alélica da variante M235T entre pacientes HAS/IAM e controles.....	42
Tabela 6:	Efeito da presença dos genótipos do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes HAS/IAM.....	42

Tabela 7:	Correlação entre todas as variáveis e entre o polimorfismo M235T do AGT humano.....	45
Tabela 8:	Características clínicas entre pacientes HAS e controles.....	66
Tabela 9:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante Glu-298-Asp da ecNOS entre pacientes HAS e controles.....	67
Tabela 10:	Frequências dos genótipos identificados entre os grupos HAS, HAS/IAM e controle.....	68
Tabela 11:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante T ⁷⁸⁶ →C da ecNOS entre pacientes HAS e controles considerando o possível novo alelo como sendo desfavorável.....	68
Tabela 12:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante T ⁷⁸⁶ →C da ecNOS entre pacientes HAS e controles considerando o possível novo alelo como sendo favorável.....	69
Tabela 13:	Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS.....	70
Tabela 14:	Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo T ⁷⁸⁶ →C associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS.....	70
Tabela 15:	Características clínicas entre pacientes HAS/IAM e controles.....	72
Tabela 16:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante Glu-298-Asp da ecNOS entre pacientes HAS/IAM e controles.....	72
Tabela 17:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante T ⁷⁸⁶ →C da ecNOS entre pacientes HAS/IAM e controles considerando o possível novo alelo como sendo desfavorável.....	74
Tabela 18:	Freqüências genótípicas e alélicas da variante T ⁷⁸⁶ →C da ecNOS entre pacientes HAS/IAM e controles considerando o possível novo alelo como sendo favorável.....	74
Tabela 19:	Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS/IAM.....	75
Tabela 20:	Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo T ⁷⁸⁶ →C associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS/IAM.....	77

Tabela 21:	Correlação entre todas as variáveis e entre os polimorfismos Glu-298-Asp e T ⁷⁸⁶ →C da ecNOS.....	78
Tabela 22:	Características clínicas entre hipertensos e controles.....	97
Tabela 23:	Freqüências gênicas e genóticas as duas variantes M235T do AGT humano e Glu-298-Asp da ecNOS entre grupo controle e o grupo e hipertensos.....	98
Tabela 24:	Efeito da presença do gene do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes hipertensos.....	99
Tabela 25:	Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais.....	99
Tabela 26:	Distribuição dos genótipos favoráveis e desfavoráveis considerando a presença simultânea de ambos os genes no grupo de pacientes hipertensos controle.....	100
Tabela 27:	Regressão logística múltipla entre os polimorfismos M235T e Glu-298-Asp.....	100
Tabela 28:	Correlação entre todas as variáveis e entre os polimorfismos M235T e Glu-298-Asp.....	104
Tabela 29:	Estimativas de desenvolver a hipertensão associada aos alelos desfavoráveis de cada polimorfismo e a presença de fatores de risco convencionais.....	102
Tabela 30:	Estimativas de desenvolver a hipertensão associada a presença simultânea de ambos os alelos desfavoráveis (T235 e T) na presença de fatores de risco convencionais.....	103

Lista de Abreviaturas

ADMA	dimetilarginina assimétrica
AGT	angiotensinogênio
Ang-(1-7)	angiotensina (1-7)
AngI	angiotensina 1
AngII	angiotensina 2
At1 e At2	receptor da angiotensina tipo1 e receptor da angiotensina tipo2
AVC	acidente vascular cerebral
B2	receptor endotelial da bradicinina
BK	bradicinina
°C	graus celsius
CBP	carboxipeptidase
cGMP	guanosina cíclica monofosfato
CK-MB	enzima creatinofosfoquinase
CT	colesterol total
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucleotídeo
Dntp	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DAC	doença arterial coronariana
ECA	enzima conversora de angiotensinas
ecNOS	enzima óxido nítrico sintase endotelial
ecSOD	enzima superóxido dismutase extracelular
EDIP	proteína indutora de disfunção endotelial
EDT A	ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico
EDRF	fator relaxante endotélio derivado
ET-1	endotelina-1
FRAs	fatores de risco associados
GP1Ib/IIIa	receptor de glicoproteína
Glu	glutamina também indicando o polimorfismo Glu-298-Asp nas tabelas 21 e 28
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HF	histórico familiar
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMA	angiotensinogênio de alto peso molecular
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	intervalo de confiança
ICAM-1	molécula de adesão intracelular
LDL-ox	colesterol de baixa densidade oxidado
LIS-SSCP	conformação polimórfica de fita simples em baixa força iônica
IMC	índice de massa corporal
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzida
Kb	quilobase(1Kb=1000pb)
Kda	quilodaltons
Kg	quilograma
Leu	leucina
LDL	lipoproteína de baixa densidade

L-NMMA	N ⁹ - monometil-L-arginina
L-NOARG	N ⁹ - nitro L-arginina
L-NAME	N ⁹ - nitro L-arginina metil-éster
Met	metionina
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
μL	microlitros
mL	mililitros
mmHg	milímetros de mercúrio
mM	milimolar
min	minutos
M	molar
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfo hidrogênio
NAD(P)Hox	enzima de membrana associada nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase
NDPH	nicotinamida adenina fosfato hidrogênio
NEP	endopeptidase neutra
nNOS	enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	radical superóxido
OR	odds ratio
PA	pressão arterial
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDE	fosfodiesterase
PDE5	fosfodiesterase tipo 5
PDGF	fator de crescimento plaqueta derivado
PEP	prolilendopeptidase
PKG1	proteína quinase cGMP dependente tipo 1
PKG2	proteína quinase cGMP dependente tipo 2
pmol	pico- moles
RAAS	sistema renina-angiotensina-aldosterona
RNA _m	ácido ribonucléico (mensageiro)
rpm	rotações por minuto
ROS	espécies de oxigênio reativos
s	segundos
SED	sedentarismo
sGC	enzima solúvel guanilato ciclase
SSCP	conformação polimórfica de fita simples
TABA	tabagismo
T/C	polimorfismo T ⁻⁷⁸⁶ →C da ecNOS
TG	triglicérides
TGFβ-1	fator de crescimento e transformação beta-1
und	unidades
V	volts
VCAM	molécula de adesão celular vascular
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

VNTR	número variável de repetições em tandem
VSMC	células musculares vasculares lisas
X	vezes

RESUMO GERAL

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular com prevalência de cerca de 25-30% na população caucasiana adulta. Os determinantes primários da hipertensão, os quais representam 95% da população hipertensa, não têm sido completamente elucidados nas numerosas investigações acerca dos vários mecanismos envolvidos na regulação da pressão sangüínea. O conhecimento dos sistemas fisiológicos atuantes na regulação da pressão oferece oportunidades para examinar o possível papel de variações em genes candidatos específicos na patogênese da hipertensão humana.

Muitos estudos relatam que sujeitos hipertensos consistentemente possuem altos níveis de colesterol total, índice de massa corporal (IMC), proporção cardíaca, glicemia e triglicérides. Em estudos prévios, foi observado que a hipertensão usualmente ocorre em conjunto com outros fatores de risco metabolicamente ligados.

Elevações crônicas ou moderadas nos níveis de AngII pode aumentar o tônus vascular promovendo o desenvolvimento da HAS. Uma grande concentração de angiotensinogênio (AGT) na circulação não constitui excesso de substrato para a renina clivar que atua aproximadamente com metade da sua velocidade máxima, indicando considerável potencial de reserva nesta reação. Conseqüentemente, um aumento na concentração de AGT plasmático ou tecidual associado à variações estruturais específicas do AGT pode resultar em aumento basal de AngII.

O polimorfismo M235T do AGT humano pode permitir a identificação de indivíduos que são mais propensos a desenvolver doença arterial coronariana (DAC) ou infarto agudo do miocárdio (IAM). A determinação dos genótipos pode ser usado no conhecimento dos risco de desenvolver estas patologias e selecionar indivíduos que possam ser beneficiados por uma intervenção preventiva.

O balanço e as interações entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras é fator crítico na regulação da pressão, fluxo sangüíneo coronário

e injúrias cardiovasculares e renais. O receptor At2 inicia um importante papel no estímulo da AngII à produção de substâncias vasodilatadoras, incluindo bradicinina e NO. O sistema RAAS atua tanto na função parácrina quanto autócrina e AngII e NO interagem em nível do endotélio de forma endócrina. As ações do NO incluem a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e adesão celular e retardo da inflamação da parede vascular, diminuindo não somente o tônus vascular mas também o crescimento celular além de prevenir o dano no órgão-alvo além de manter a integridade vascular.

Acredita-se que polimorfismos na ecNOS podem estar associados com aumento na suscetibilidade à aterogênese. A disfunção nos mecanismos moleculares importantes envolvidos da regulação da pressão arterial (PA) bem como na manutenção da integridade vascular como a inibição da agregação plaquetária e efeitos antiproliferativos, pode promover aterogênese por exposição da parede arterial a efeitos vasoconstritores diretos de fatores como AngII, aumentando o risco de trombose, caminhando para o IAM.

A disfunção endotelial é o início precoce da aterosclerose e está associada com o avanço da idade, sexo, tabagismo, hipertensão, dieta gordurosa, sedentarismo, histórico familiar prematuro de DAC, diabetes mellitus, e os outros fatores descritos anteriormente como por exemplo a hipercolesterolemia. A magnitude da disfunção endotelial correlaciona-se com o número de fatores de risco.

No primeiro capítulo procuramos enfatizar o papel do polimorfismo M235T na gênese da hipertensão em três grupos considerados como hipertensos, hipertensos com infarto e controles totalizando 192 pacientes, sendo verificado que o mesmo é fator de risco independente para a gênese desta patologia mas não o é para o IAM mas que possui um papel crucial na manifestação do mesmo. As frequências dos genótipos desfavoráveis em ambos os grupos de pacientes hipertensos foram significativamente maiores do que no grupo controle. Pelas análises de regressão logística foi verificado que o efeito do gene é mascarado na presença de fatores de risco clássicos. Os fatores de risco como tabagismo, níveis baixos de HDL, sedentarismo bem como níveis altos de colesterol total e LDL

foram considerados fatores agravantes para a manifestação do fenótipo hipertensivo com subsequente manifestação clínica do IAM. Neste capítulo concluímos que o polimorfismo tem papel fundamental na gênese da hipertensão e que o combate aos fatores de risco clássicos se faz necessário na medida em que estes interagem entre si e com o polimorfismo no sentido de desenvolver a hipertensão e outras doenças cardiovasculares como o IAM.

No segundo capítulo, foi investigada a associação dos polimorfismos gênicos da *ecNOS*, Glu-298-Asp e T⁻⁷⁸⁶→C na mesma amostragem de 192 pacientes divididos em três grupos: hipertensos sem infarto (HAS), hipertensos com infarto (HAS/IAM) e controles. O polimorfismo Glu-298-Asp foi aqui considerado como fator de risco independente para a hipertensão mas, assim como no caso do polimorfismo M235T, não é fator de risco isolado para a manifestação clínica do IAM. O risco associado ao polimorfismo Glu-298-Asp em desenvolver a hipertensão foi 5 vezes para o genótipo TT com relação ao genótipo GG. O polimorfismo estaria relacionado com a ausência de uma enzima funcional ou ainda com a presença de uma enzima hipofuncional. O efeito do polimorfismo Glu-298-Asp não é mascarado na presença de fatores de risco clássicos. Em nenhuma análise realizada, o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C esteve associado com a hipertensão e nem com o risco de desenvolver a mesma porém, a maior descoberta desta pesquisa foi a presença de um possível novo alelo aqui denominado como "alelo A" o qual talvez possa exercer um papel protetor a indivíduos hipertensos ou que ainda nem o polimorfismo e nem o alelo A tenha efeito algum sobre a gênese da hipertensão.

Como os polimorfismo M235T e Glu-298-Asp foram considerados como fatores de risco independentes para a gênese da hipertensão, no terceiro capítulo foram feitas as mesmas análises agrupando os dois grupos de hipertensos (HAS+HAS/IAM) na tentativa de verificar o efeito dos dois polimorfismos em conjunto na gênese da hipertensão. Pelos resultados obtidos, os polimorfismos estão associados à gênese desta patologia e que mesmo que o efeito do polimorfismo M235T esteja sendo mascarado por diversos fatores de risco e outros fatores genéticos que possam estar agindo no IAM, ele é considerado ainda

como fator de risco independente para a hipertensão. O efeito aditivo do gene do AGT humano foi de 1.81 significando que pessoas heterozigotas para o polimorfismo M235T possuem um aumento do risco de desenvolver a hipertensão de 1.81 vezes e que pessoas homozigotas mutantes possuem um aumento no risco de 3.62 vezes. O mesmo ocorre para o polimorfismo Glu-298-Asp que possui efeito aditivo de 2.12 vezes indicando que pessoas heterozigotas para este polimorfismo possuem um aumento de 2.12 no risco de serem hipertensas e que pessoas homozigotas possuem um aumento de 4.24 vezes no risco de serem hipertensas. Ao associar a presença dos dois polimorfismos em conjunto na gênese da hipertensão, foi verificado que os mesmos são importantes na gênese da mesma que uma pessoa heterozigota para o polimorfismo M235T tem 58% de chances de ser hipertensa enquanto uma homozigota para o mesmo polimorfismo tem 78% de chance. Já para o polimorfismo Glu-298-Asp, uma pessoa heterozigota possui 61% de chance de ser hipertensa contra 80% de um indivíduo homozigoto para o mesmo polimorfismo. Desta forma, de acordo com as análises de regressão logística, o fenótipo hipertensivo é 95% explicado pela presença simultânea dos dois alelos mutantes em homozigose. Os alelos desfavoráveis podem ser considerados como fatores de risco para a idade onde o risco de velhos desenvolverem doenças cardiovasculares depende mais do polimorfismo do que dos fatores de risco, ao contrário, indivíduos jovens dependem mais dos fatores de risco do que do próprio polimorfismo isoladamente.

As dislipidemias aqui observadas nos três capítulos são abordadas no final do terceiro capítulo como tendo duas possíveis causas: genética e ambiental. A causa ambiental pode ser levada em consideração devido ao fato de termos um grande número de indivíduos fumantes, sedentários e com peso acima do normal e que estes fatores foram predominantemente maiores nos dois grupo de pacientes hipertensos. A possível causa genética envolvendo os dois polimorfismos estudados no terceiro capítulo e que estiveram relacionados com a gênese da hipertensão, foi baseada no fato de que células endoteliais que também produzem AngII e NO, expressam receptores de LDL e enzimas necessárias para o metabolismo lipídico. Na presença de substâncias

vosocostriadoras e que possam estimular a expressão gênica de diversos fatores de crescimento bem como de receptores de membrana, ocorreria um influxo maior de LDL nas células endoteliais. Na ausência de um balanço entre as substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, este excesso de colesterol se oxidaria aumentando ainda mais a destruição do NO, favorecendo o processo inflamatório e formação das células espumosas, incentivando a proliferação e migração celular com subsequente formação do processo aterosclerótico caminhando para o IAM.

É conclusivo que a disfunção endotelial observada pelo prejuízo da função vasodilatadora é multifatorial e que AngII e NO aparecem como o início de um papel essencial mas não exclusivo.

GENERAL ABSTRACT

Hypertension is the major cause of morbidity and mortality in the adult Caucasian population, with a prevalence rate of 25-30%. The primary causes of hypertension have yet to be completely understood; about 95% of the cases are of unknown etiology. Current physiological systems that act on pressure regulation offer the opportunity to examine possible candidate genes with specific influence on hypertensive individuals.

There are many studies that show individuals with higher levels of cholesterol, total body mass, heart proportion, hyperglycemia, and triglycerides that suffer from HAS. Nevertheless, there are other studies showing that HAS occurs in conjunction with other metabolically linked risk factors.

Chronic ANG II elevations can increase vasculature tonus promoting HAS. Increasing AGT concentration in circulation does not constitute an excess of substrate for the renin to cleave, which in turn reacts with half of its maximum velocity showing considerable reserve potential in this reaction. Consequently, an increase in AGT concentration in plasma or tissue associated with structural variations specific to AGT can result in a basal increase in ANG II.

AGT human M235T polymorphism permits the identification of individuals which are more susceptible to develop CAD (coronary artery disease) or AMI (acute myocardial infarction). Genotypes can be used to recognize high risk individuals to develop these pathologies, hence these individuals can benefit from a preventive intervention.

The interactions and balances between vasoconstriction and vasodilatation substances are critical for regulating pressure, coronary blood flow, and renal and cardiovascular injuries. A₂ receptor begins an important role in stimulating ANG II in the production of vasodilatation substances, including, bradikinin and nitric oxide. RAAS system affects both paracrine and autocrine, while ANG II and NO affect at the endothelial level. NO actions include: vasodilatation, inhibition of platelet aggregation, and delaying inflammation response at the vascular wall, diminishing not only the vascular tone, but also the cellular growth and platelet

proliferation as well as preventing organ damage and maintaining vascular integrity.

It is believed that polymorphisms of the eNOS gene can be associated with the increase susceptibility to atherogenesis. Dysfunction of molecular mechanisms involved in blood pressure (BP) regulation as well as in vascular integrity can promote atherogenesis, by exposing the arterial wall to vasoconstriction effects directly from ANG II, increasing the thrombosis risk and consequently an AMI may occur.

Endothelial dysfunction is the beginning of atherosclerosis, which is associated with age, sex, smoking, hypertension, diet habits, sedentary life style, CAD family history, diabetes mellitus, as well as other factors previously mentioned. There is a correlation between level of endothelial dysfunction and number of risk factors.

In the first chapter M235T polymorphism function was explored in relation to HAS development. Three groups of patients were separated: hypertensive, hypertensive patients with myocardial infarction (MI) and controls, in a total of 192 patients. It was verified that the M235T polymorphism is an independent risk factor for hypertension, but is not for AMI; however, it has a crucial role in the manifestation of AMI. The frequencies of undesirable genotypes in both groups of hypertensive patients were significantly larger than in the control group. Using a logistic regression analysis, it was verified that the gene effect may have been masked by the presence of other risk factors. These risk factors, for example, smoking, low HDL, sedentary life style, as well as high total cholesterol and high LDL levels were considered aggravating factors for the hypertension phenotype manifestation, and clinical AMI. The T235 allele can be considered a risk factor for those with age related cardiovascular risk. Whereas in young individuals the conventional risk factors outweigh the risk of the polymorphism alone. It was concluded in this chapter that the AGT polymorphism has a important role in hypertension genesis, and prevention of classic risk factors is a necessity since the risk factors interact amongst themselves and with the polymorphism to develop HAS and other cardiovascular diseases.

The second chapter investigated the association between the endothelium nitric oxide synthase genetic polymorphisms, Glu-298-Asp and T-786-C in 192 patients divided in 3 groups. The groups of patients consisted of: hypertensive without MI, hypertensive with MI, and a normotensive control. Glu-298-Asp was considered an independent risk factor for hypertension. However, just as in M235T polymorphism, Glu-298-Asp is not a risk factor by itself for AMI occurrence. Hypertension risk associated with Glu-298-Asp polymorphism is 5 times greater in for the TT genotype in relation to the GG genotype. The polymorphism is related to the absence of a functional enzyme or the presence of a hypofunctional enzyme. The Glu-298-Asp polymorphism was not masked by the presence of classical risk factors. Statistical analysis showed that the T-786-C polymorphism was not associated with hypertension, nor with the risk of developing hypertension. A new gene variant, denominated A allele was described and it may not have any effect on hypertension.

In the third chapter the same groups were analyzed. HAS and HAS/IAM were pooled, once they presented similar frequencies for both genes as well as for classical risk factors. The simultaneous effect of both M235T and Glu-298-Asp gene polymorphisms were investigated for the risk of hypertension development, although they were considered independent risk factors. The results show that, both polymorphisms are associated in the development of hypertension, even though the polymorphism M235T is being masked by many risk factors, and other genetics factors that could be affecting AMI. M235T is considered independent risk factor for hypertension development. The AGT polymorphism had an additive affect with an increasing risk value of 1.81 for each allele incorporated, which means that heterozygous individuals present a risk 1.81 greater to develop hypertension, and the mutant homozygous has a risk 3.62 greater. The Glu-298-Asp polymorphism has an additive affect of 2.12, indicating that heterozygous people have an increasing risk of 2.12 to become hypertensive, and that mutants homozygous individuals have an increasing risk of 4.24 to become hypertensive. When presence of the two polymorphisms was associated to hypertension, it was verified that both genes are important in the genesis of this pathology. A

heterozygous person for the M235T polymorphism has a 58% chance of being hypertensive while a mutant homozygous person for the same polymorphism has a 78% chance. On the other hand, for the Glu-298-Asp polymorphism, a heterozygous person has a 61% chance to become hypertensive, compared to a 80% chance of a mutant homozygous person. Combined results of both polymorphisms explained 95% of the hypertensive phenotype, considering the presence of both mutant alleles in homozygous condition.

Dyslipidemia observed in the 3 chapters is discussed at the end of the third chapter having 2 possible causes: genetic or environmental. The environmental cause is due to the great number of individuals with: smoking habit, sedentary life styles, and obese. These factors were encountered in greater numbers in both hypertensive groups. The possible genetic cause involving both polymorphisms discussed in chapter three was elaborated in the basis that endothelial cells produce ANG II and NO, expresses LDL receptors and enzymes necessary for lipid metabolism. In the presence of vasoconstriction substances that might stimulate the expression of genes of many growth factors as well as membrane receptors, would increase the influx of LDL in the endothelial cells. In the absence of a balance between vasoconstriction and vasodilatation substances, the excess of cholesterol gets oxidized, increasing even more NO destruction, aiding in the inflammatory process and in the formation of foam cells. Migratory cells are proliferating and its subsequent migration stimulates the atherosclerotic process, increasing the AMI risk.

In conclusion, endothelial dysfunction due to a reduced vasodilatation function is multifactorial, and ANG II and NO appear to have an important role but not exclusive.

INTRODUÇÃO GERAL

HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

Extensivos estudos relacionados à hipertensão, são baseados na alta incidência (cerca de $\approx 25\%$ da população tendo PA $> 140/90\text{mmHg}$), no marcante decréscimo na expectativa de vida devido às severas complicações quando não é aplicado o tratamento e no fato de ser uma das doenças mais dispendiosas no que diz respeito ao custo médico social (GENEST 2001). A hipertensão é uma elevação patofisiológica nos níveis da pressão sangüínea onde um indivíduo é diagnosticado como tendo alta pressão sangüínea quando medidas repetidas mostram a PA sistólica $> 140\text{mmHg}$ e PA diastólica $> 90\text{mmHg}$. A PA é considerada ótima quando possui valores $< 120\text{mmHg}$ para PA sistólica e $< 80\text{mmHg}$ para PA diastólica (SANKARANARAYANAN et al., 1999; DOMINIEZAK et al., 2000).

A HAS é um traço comum estimando-se que sua prevalência na população varia consideravelmente dependendo dos pontos e métodos analisados e são influenciados pela característica da população como idade, gênero, raça e *status* sócio econômico. Nas cidades industrializadas a prevalência na população em geral é da ordem de 10 a 25% (DOMINIEZAK et al., 2000; LIFTON 1995). Elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa tendência de elevação na doença cardiovascular tende a persistir agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nos países em desenvolvimento. Na população brasileira adulta de acordo com dados do Ministério da Saúde e IBGE a prevalência é de 15%. Entretanto, estudos transversais nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo mostraram taxas de 30% (III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2001).

A HAS contribui para cerca de 200.000 óbitos anualmente tendo uma grande importância clínica pelo fato de ser o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais, especificamente acidente vascular cerebral (AVC), aterosclerose e doença arterial coronariana (DAC),

insuficiência cardíaca e insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio e estágio final da doença renal. O mecanismo devido ao qual a hipertensão predispõe à doenças cardiovasculares, mortalidade e morbidade está provavelmente nas observações de que a alta pressão arterial acelera o processo aterosclerótico bem como os efeitos ocasionados por ela levando à progressiva dilatação e ruptura de pequenos e grandes vasos sanguíneos (SANKARANARAYANAN et al., 1999; LIFTON 1995; ISHIGAMI et al., 1995). A HAS também ocorre em 5-7% de todas as gestações, sendo causa de morbidade e mortalidade maternal, fetal e neonatal (INOUE et al., 1995).

A despeito de extensivas investigações fisiológicas, os determinantes primários deste traço, bem como os fatores os quais direcionam ao quadro clínico específico, permanecem ainda desconhecidos na maioria dos indivíduos afetados. Esta ignorância resulta na redução da eficácia do tratamento dado à doença frustrando esforços para prevenir futuras morbidades (LIFTON 1995). Segundo Thomas et al. (2001), o tratamento antihipertensivo reverte somente em parte o risco de complicações cardiovasculares especialmente complicações coronárias em indivíduos hipertensos. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as complicações relacionadas à hipertensão, especialmente DAC, são determinadas por um grande número de fatores de risco associados (FRAs), inclusive parâmetros metabólicos que são freqüentemente alterados em indivíduos hipertensos tratados e não tratados.

A HAS de causa desconhecida é denominada hipertensão primária e é um exemplo típico de um traço complexo, multifatorial e poligênico. A maior parte existe devido à causas genéticas as quais em conjunto contribuem com cerca de 30-50% da variação na pressão sanguínea entre indivíduos (LIFTON 1995 ; SANKARANARAYANAN et al., 1999; HATA et al., 1995). Estes determinantes genéticos interagem com fatores ambientais dentre os quais por exemplo, a dieta de sal e outros fatores como a idade, gênero e massa corporal (SANKARANARAYANAN et al., 1999).

Segundo Lifton (1995), a pressão sanguínea individual é dada a partir de efeitos combinados de variações, que podem ser geneticamente herdadas, como o número de *loci* que determinam a PA bem como fatores ambientais e fatores demográficos como demonstra a Figura 1.

No caso da hipertensão, cada gene candidato é proposto não simplesmente pelo fato destes se expressarem diretamente sobre o tecido, mas pelo fato de investigações terem demonstrado que tendo alterada a função no produto do gene, pode direcionar alterações na PA.

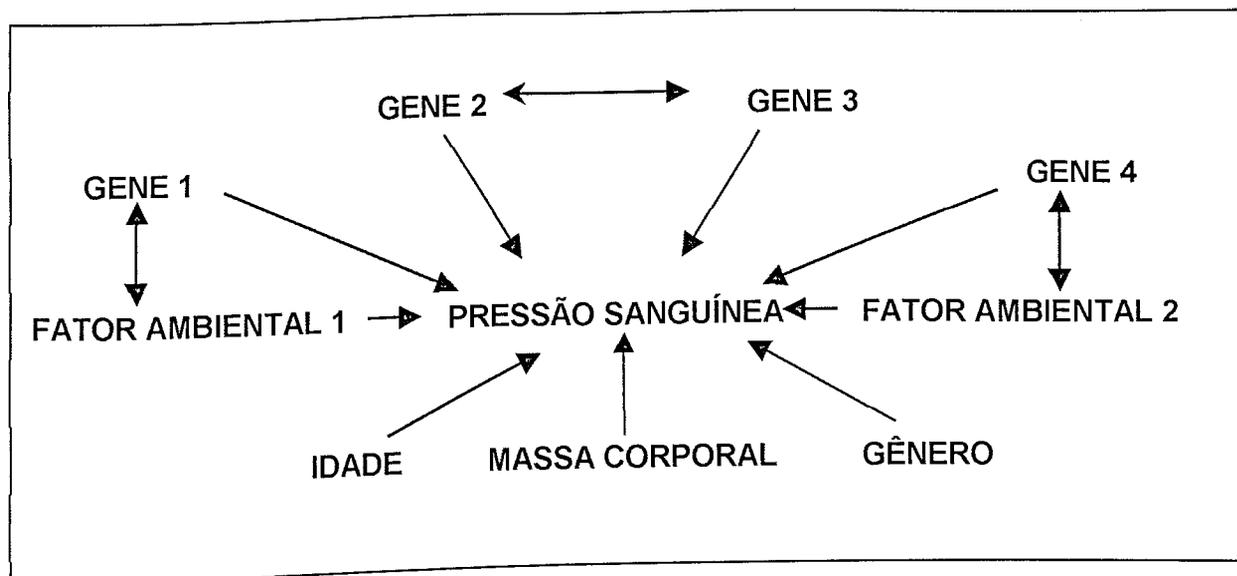


Figura 1 – Modelo multifatorial da determinação da pressão sanguínea, demonstrando a potencial influência de genes, fatores ambientais e fatores demográficos. A potencial interação é representada por setas ligando diferentes determinantes (LIFTON 1995).

Muitos estudos relatam que sujeitos hipertensos consistentemente possuem altos níveis de colesterol total, índice de massa corporal (IMC), proporção cardíaca, glicemia e triglicérides. Em estudos prévios, foi observado que a hipertensão usualmente ocorre em conjunto com outros fatores de risco metabolicamente ligados. Entre indivíduos hipertensos, cerca de 40% dos eventos coronários em homens e cerca de 60% dos eventos coronários em mulheres são atribuídos à presença de 2 ou mais FRAs e que somente 14% dos eventos coronários em homens hipertensos e 5% dos eventos coronários em mulheres hipertensas ocorrem na ausência de FRAs adicionais (THOMAS 2001).

Pelo fato da hipertensão ser determinada pelo débito cardíaco e resistência vascular, determinantes chaves da PA podem ser inferidos a atuar diretamente nesse caminho. Sistemas fisiológicos os quais são conhecidos por influenciar estes parâmetros incluem o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) o qual contribui para determinação não só do débito cardíaco via efeito no volume

intravascular, mas também no débito vascular, em vias adrenérgicas centrais e periféricas, batimento cardíaco, uma variedade de canais renais transportadores de íons os quais determinam a reabsorção de Na^+ e conseqüentemente volume intravascular, alterações nos canais de cálcio e o sistema do óxido nítrico (NO) o qual também afeta o tônus vascular bem como controle da pressão sanguínea sistêmica e intrarenal e é um importante alvo para terapia anti-hipertensiva (GENEST 2001; SCHIMIDT-OTT et al., 2000; LIFTON 1995).

MECANISMOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PA) E PATOGÊNESE DA HIPERTENSÃO

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS)

O clássico RAAS circulante é formado pelos principais peptídeos: renina, angiotensinogênio (AGT), *enzima conversora da angiotensina (ECA)*, angiotensina I (Ang I), angiotensina II (Ang II) e receptores de angiotensina tipo 1 (At1) e tipo 2 (At2). A renina é uma glicoproteína sintetizada predominantemente nas células justaglomerulares dos rins a partir de seu precursor denominado prorenina que é sua forma inativa circulante. Devido a estímulos pressóricos, a renina sintetizada age sobre seu principal substrato, o AGT que é produzido nas células hepáticas, para originar o decapeptídeo inativo Ang I. No lúmen do endotélio vascular, Ang I é convertida pela ECA no octapeptídeo Ang II, um hormônio e produto biologicamente ativo da cascata enzimática que age sobre os receptores de membrana plasmática, caracterizados em At1 e At2 baseados em propriedades farmacológicas e que possuem 95% de homologia. (DOSTAL 2000; DOSTAL e BAKER 1999; DANSER e SCHUNKERT 2000; FERREIRA e ZANELLA 2000; INOUE et al., 1995; MILLAT et al., 1999; VAUGHAN 2001).

A grande maioria dos papéis fisiológicos e patofisiológicos da Ang II ocorrem via receptor At1, induzindo vários fatores de crescimento incluindo TGF- β_1 , *fator de crescimento plaqueta-derivado (PDGF)*, IGF-1, proliferação de moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e adesão celular vascular (VCAM-1) além de promover vasoconstrição induzindo retenção hídrica no território renal por ação direta sobre as células dos túbulos proximais e indiretamente por estimular a

zona glomerulosa das adrenais para produzir aldosterona (FERREIRA e ZANNELA 2000; SCHIMIDT-OTT et al.,2000; MILLAT et al.,1999). A Ang II ainda está relacionada nas patologias cardíacas e vasculares, associadas com hipertensão, DAC, miocardites e insuficiência cardíaca em adição a efeitos no volume e homeostase de eletrólitos além de produzir estresse oxidativo na parede arterial participando da disfunção endotelial (SCHIMIDT-OTT et al., 2000; DOSTAL, 2000; DOSTAL e BAKER, 1999).

Recentemente este clássico sistema tem sido alvo de inúmeras mudanças nas quais evidências clínicas e experimentais indicam que componentes do RAAS podem ser sintetizados por alguns tecidos e Ang II pode ser regulada independentemente do RAAS circulante (DOSTAL 2000; DOSTAL e BAKER 1999). Ang II é vista como um hormônio conduzido pela corrente sanguínea, produzido como resultado da reação da cascata enzimática (SCHIMIDT-OTT et al.,2000). Sabe-se hoje que outras enzimas como tripsina, quimiotripsina, catepsina G, calicreína e quimase I podem produzir Ang II a partir de Ang I, embora seus papéis fisiológicos no sistema cardiovascular ainda não tenham sido bem elucidados (URATA et al., 1996; KARLSSON et al., 1998).

Embora o RAAS seja um sistema endócrino, renina, AGT, ECA e receptores At1 e At2 estão presentes no miocárdio e grande parte da Ang II encontrada no tecido cardíaco é sintetizada *in situ* o que possibilita a produção independentemente da circulação (DOSTAL 2000). A partir de Ang I e Ang II, um outro produto biologicamente ativo do RAAS, denominado Ang-(1-7) pode ser produzido (SANTOS et al.,2001). Nas células endoteliais de diferentes fontes, Ang-(1-7) é derivada da degradação carboxi-terminal da AngI e/ ou AngII por endopeptidases neutras (NEP), proil-endopeptidases (PEP) ou por carboxipeptidases (CBP) (HEITSCH et al., 2001). Uma vez formada, Ang-(1-7) é rapidamente hidrolizada, especialmente pela ECA. Porém, além de ser substrato, Ang-(1-7) é um inibidor endógeno da ECA, por ligação no sítio ativo da enzima que é responsável pela inativação da bradicinina, conseqüentemente Ang-(1-7) favorece a produção de NO por potencialização da ação da bradicinina (SANTOS et al.,2001; SANTOS et al., 2000; HEITSCH et al.,2001).

Recentes dados indicam um importante papel do sistema calicreína-cinina, em particular da bradicinina que é um potente hormônio vasodilatador que atua

fortemente no aumento da concentração local do óxido nítrico (NO). A bradicinina é um nonapeptídeo gerado a partir do cininogênio de alto peso molecular pela ação de calicreínas e é rapidamente degradada por cininases, especialmente pela ECA que a transforma em metabólitos inativos (PRASAD et al., 2000). A atividade das cininogenases é estimulada pelo receptor At2, indicando que o mesmo é hábil em regular a atividade do sistema calicreína-cinina. Bradicinina é liberada por células musculares lisas através de estímulo dado pelo receptor At2, atuando no receptor endotelial de bradicinina (B2) de forma parácrina para causar vasodilatação endotélio dependente (TSUTSUMI et al., 1999; LINZ et al., 1999).

Segundo Linz et al. (1999), inibidores da ECA são hábeis em tratar doenças como aterosclerose, DAC e hipertensão pelo acúmulo de cininas endotélio derivadas e inibição da conversão da AngI para AngII. Dados revelam que esta inibição não somente facilita o acúmulo local de BK mas também estimula a síntese de NO e também induz a expressão de enzimas responsáveis pela produção do mesmo. Entretanto, a inibição crônica da síntese de NO leva a uma regulação positiva da atividade da ECA cardíaca e vascular.

O papel central que o sistema RAAS, representado na Figura 2, tem na homeostase do sistema cardiovascular e renal, justifica a busca de genes candidatos que possam participar do desenvolvimento da HAS. Atenção tem sido máxima naqueles polimorfismos relacionados com a modificação funcional das proteínas que estes genes codificam (GINER et al., 2001). Novas técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico genético representam mecanismos básicos para estudar a predisposição individual e familiar. Especificamente à DAC e a hipertensão, os marcadores genéticos do RAAS e ligados ao RAAS recebem atenção especial (ORTEGA 2002). Segundo Nakagawa e Ishizaki (2000), duas variações genéticas podem interagir sinergicamente para elevar a pressão arterial substancialmente a índices maiores do que é esperado para variações individuais, interações estas que podem ser também aditivas.

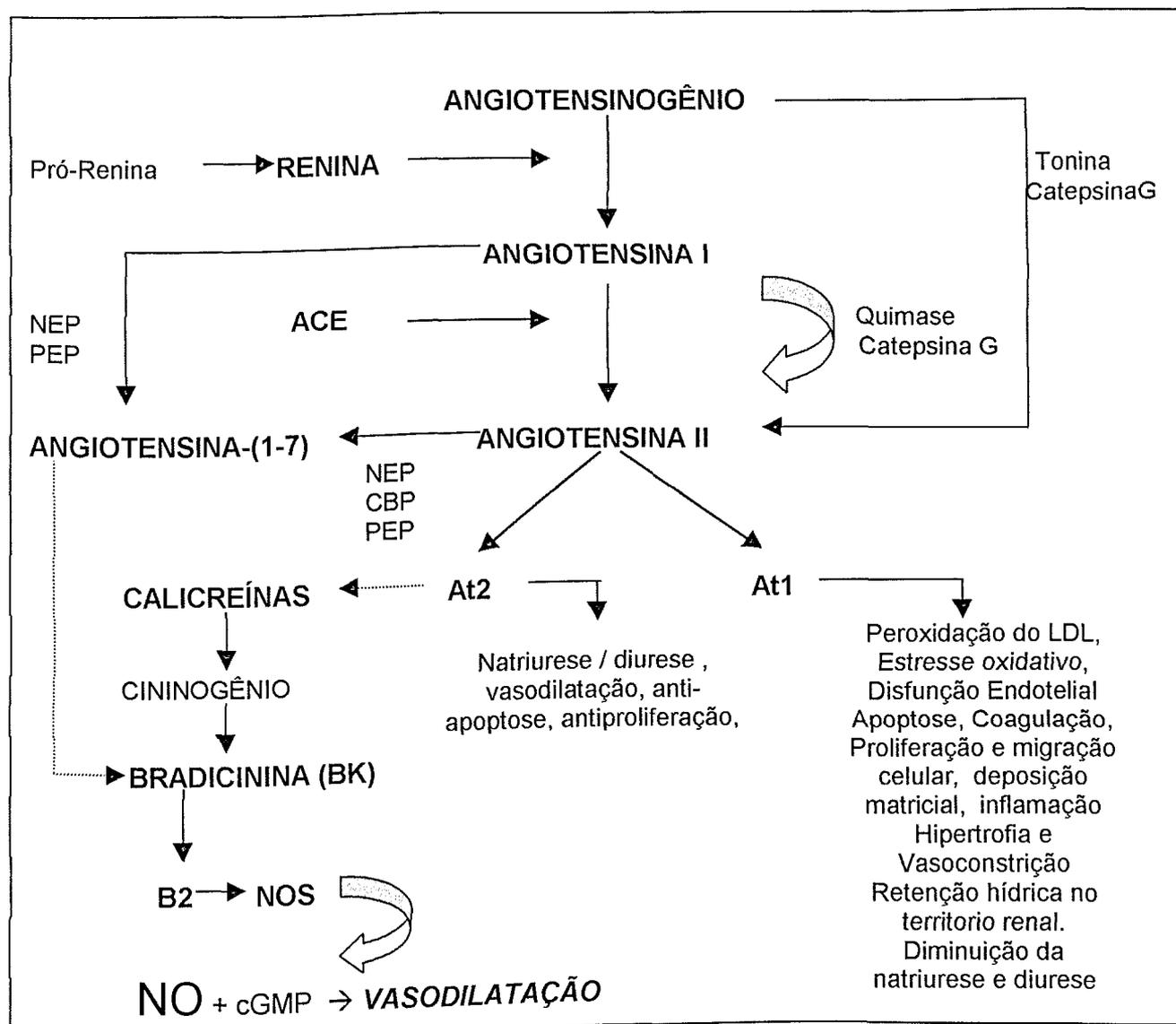


Figura 2 – Esquema do sistema RAAS – NEP: endopeptidase neutra; CBP: carboxipeptidase; PEP: prolil-endopeptidase; adaptado de Nakagawa e Ishizaki (2000); Carey et al (2000).

→ Estímulo ou potencialização → clivagem, produção, ação direta

• Angiotensinogênio (AGT)

Consideráveis esforços têm sido feitos na identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão. O bem documentado efeito do RAAS na regulação cardiovascular o faz um candidato para a evolução deste traço complexo. Muitos ligantes/receptores, enzima/substrato e transportadores contribuem para a elevação da PA, sendo suspeitos potenciais para o desenvolvimentos da HAS, os genes que os codificam (CORVOL et al., 1999).

Estudos de ligação genética em modelos animais com hipertensão, sugeriram o envolvimento de duas enzimas chaves do RAAS na patogênese da HAS, renina e ECA. Entretanto, algumas pesquisas falharam em demonstrar alguma associação entre cada um destes genes e a HAS. Estes resultados sugerem que o envolvimento da renina e ECA na patogênese da HAS é ainda desconhecido (HATA 1995).

O ponto inicial do sistema RAAS é o pró-hormônio da Ang I, o AGT, o único precursor de angiotensinas e o único substrato natural da renina. O AGT é uma glicoproteína globular de peso molecular de 55-60 KDa, contendo 13-14% de carboidratos e é constitutivamente secretada na circulação tendo uma meia vida de 4 a 10 horas (HATA 1995; FUKAMIZU et al., 1990; KLETT e GRANGER 2001).

Existem espécies de AGT com peso molecular aparente de 350-500 KDa estimado por gel filtração, chamadas de AGT de alto peso molecular (HMA) as quais existem no plasma humano e fluidos amnióticos. Entretanto, esta forma é normalmente o componente mínimo do AGT plasmático total existindo em altos níveis somente durante o terceiro trimestre de gravidez. A porcentagem de HMA no plasma de mulheres gestantes é da ordem de 12-61% enquanto somente 3-7% está presente em homens e mulheres não gestantes. Embora o HMA exista, sua fisiologia ainda não é muito bem conhecida (HATA 1995).

É geralmente aceito que o fígado é o maior sítio de produção de AGT plasmático que é posteriormente lançado à corrente sanguínea porém, seu mRNA pode ser encontrado também em vários outros tecidos. A síntese é regulada por alguns diferentes fatores hormonais, incluindo estrógeno, glicocorticóides, hormônios da tireóide, insulina e AngII. O tratamento com contraceptivos orais contendo o componente estrógeno, pode aumentar a concentração de AGT plasmático. Durante a gravidez, níveis de AGT plasmático aumentam cerca de 3 a 5 vezes, provavelmente devido ao aumento endógeno dos níveis de estrógeno (HATA 1995; JEUNEMAITRE et al., 1992).

O passo limitante para o RAAS é, dentre muitas condições fisiológicas e patofisiológicas, a clivagem do decapeptídeo inativo Ang I a partir de AGT pela aspartil protease renina (KLETT e GRANGER 2001; INOUE et al., 1995).

Embora o papel do RAAS local seja pobremente compreendido, surge a hipótese de que elevações nos níveis plasmáticos e teciduais de AGT causada

por alguma mutação, pode aumentar o nível basal de AngII. Elevações crônicas ou moderadas nos níveis de AngII podem aumentar o tônus vascular promovendo o desenvolvimento da HAS. Uma grande concentração de AGT na circulação não constitui excesso de substrato para a renina clivar que atua aproximadamente com metade da sua velocidade máxima, indicando considerável potencial de reserva nesta reação. Conseqüentemente, um aumento na concentração de AGT plasmático ou tecidual associado à variações estruturais específicas do AGT pode resultar em aumento basal de AngII (JEUNEMAITRE et al., 1992; HATA 1995; CAULFIELD et al., 1996; YANAI et al., 1997; STAESSEN et al., 1999).

Acredita-se que na circulação a concentração plasmática de AGT influencia diretamente a atividade do RAAS. Uma superatividade do RAAS determinada geneticamente pode favorecer a reabsorção de sódio, hipertrofia vascular, aumento na atividade do sistema nervoso simpático e predisposição a desenvolver doenças cardiovasculares (JEUNEMAITRE et al, 1992).

Alguns experimentos em nível genético, apontam para a influência do AGT na formação da AngII e portanto, da elevação da PA. Interessantemente, a PA parece ser dependente de um número de alelos que codificam o AGT no genoma. A observação de uma ligação genética significativa entre hipertensão e marcadores do *locus* do AGT sugerem que variantes moleculares neste gene podem estar associadas na patogênese da HAS (JEUNEMAITRE et al., 1992; KLETT e GRANGER 2001). Em concordância, estudos experimentais baseados em observações clínicas, apontam uma associação de mutações no gene que codifica o AGT com o aumento da PA ou pré-eclâmpsia. É fato, mas não muito bem compreendido, de que estas mutações interferem na cinética da reação de clivagem pela renina, o passo limitante da cascata enzimática (KLETT e GRANGER 2001).

O AGT humano foi purificado e homogeneizado em alguns laboratórios. Os primeiros 25 aminoácidos da seqüência amino-terminal revelaram que a renina cliva entre os resíduos Leu₁₀ – Val₁₁. A estrutura do gene do AGT humano possui organização semelhante ao gene do AGT de ratos. Ambos os genes possuem 5 exons interrompidos por 4 íntrons. O primeiro exon (37pb) codifica uma região 5' não traduzida do mRNA. Análises indicam que o início da transcrição ocorre na base adenina localizada a 25pb abaixo do TATAAA box. O segundo exon

(858pb) codifica o peptídeo sinal (24 ou 33pb) e para os 252 primeiros aminoácidos da proteína madura (mais de 50% da proteína) incluindo os 10 aminoácidos da Ang I (HATA 1995; GAILLARD et al., 1989). Os exons III (268pb) IV (145pb) são menores e codificam uma pequena seqüência de 62pb e uma seqüência 3' não traduzida respectivamente. Os 4 íntrons exibem grande disparidade no que diz respeito ao tamanho. Por exemplo, o íntron localizado entre os exons II e III tem cerca de 6,4Kb enquanto que o íntron entre os exons IV e V possui somente 0,6Kb (GAILLARD et al., 1989).

A primeira suspeita do AGT na hipertensão humana foi em um estudo epidemiológico no qual uma forte correlação foi encontrada entre a concentração plasmática de AGT e pressão sangüínea (CORVOL et al., 1999).

Segundo Jeunemaitre et al. (1992), algumas observações apontam para a relação direta entre AGT e a PA : a alta correlação significativa entre concentração plasmática de AGT e pressão sangüínea em humanos; alta concentração de AGT em hipertensos e descendentes de parentes hipertensos comparado com normotensos, diminuição e aumento da PA seguida da administração de anticorpos de AGT ou injeção de AGT respectivamente e elevação da PA em animais transgênicos que superexpressam AGT.

Muitas associações moleculares do gene AGT e doenças incluindo pré-eclampsia, aterosclerose coronária, infarto agudo do miocárdio e nefropatia diabética tem sido reportadas. Um total de 15 variantes moleculares tem sido identificadas incluindo 5 substituições na região 5' do gene. A primeira variante detectada e significativamente mais freqüente em pacientes hipertensos foi a M235T, resultados estes que se repetiram em uma outra amostragem proveniente de uma outra população. Uma outra variante denominada T174M também esteve associada à casos hipertensivos. A variante M235T esteve ainda relacionada com o aumento na concentração plasmática de AGT (JEUNEMAITRE et al., 1992).

O polimorfismo M235T pode permitir a identificação de indivíduos que são mais propensos a desenvolver DAC ou IAM. A determinação dos genótipos pode ser usado no conhecimento do risco de desenvolver estas patologias e selecionar indivíduos que possam ser beneficiados por um intervenção preventiva (KATSUYA et al., 1995).

Óxido Nítrico (NO)

O balanço e as interações entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras é fator crítico na regulação da pressão, fluxo sanguíneo coronário e injúrias cardiovasculares e renais. O receptor At2 inicia um importante papel no estímulo da AngII à produção de substâncias vasodilatadoras, incluindo bradicinina e NO (CAREY et al, 2000; RAIJ 2001). O sistema RAAS atua tanto na função parácrina quanto autócrina e AngII e NO interagem a nível do endotélio. As ações do NO incluem a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e adesão celular e retardo da inflamação da parede vascular, diminuindo não somente o tônus vascular mas também do crescimento além de prevenir o dano no órgão-alvo e ainda manter a integridade vascular (HALCOX e QUYYUMI 2001; VIARO et al., 2000; RAIJ 2001). A homeostase das substâncias vasoativas é interrompida pela disfunção endotelial levando à mudanças na estrutura e função vascular (SCHIFFRIN 2002).

Desde a identificação do NO como um vasodilatador endógeno em 1987, também conhecido como fator relaxante endotélio-derivado (EDRF), tornou-se crescente o aparente balanço existente entre o hormônio vasoconstritor AngII e NO (MONKADA e HIGGS 1993; MONKADA et al., 1991). Células do músculo vascular liso se contraem em resposta à AngII e se dilatam em resposta ao NO. Estas duas moléculas apresentam efeitos antagonistas não somente no tônus vascular, mas também em outras áreas como remodelamento vascular e função renal (MILLATT et al., 1999).

Em 1988, o NO foi identificado como o produto da reação de oxidoredução da L-arginina, um aminoácido semi-essencial produzido no organismo. Quando diluído, o NO tem um meia-vida de 10 segundos devido sua rápida oxidação a nitrito e nitrato ou também por sua inativação por ânions superóxido (O_2^-) ou ainda pela ligação à hemoglobina logo após a sua produção. Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Por este motivo, o organismo utiliza NO em processos fisiológicos em que é necessária uma resposta rápida (RAIJ 2001; FILHO e ZILBERSTEIN 2000).

A Figura 3 indica a clássica reação química de formação de NO pela óxido nítrico sintase (NOS) em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) e O₂ para a formação de L-citrulina e NO (FILHO e ZILBERSTEIN 2000).

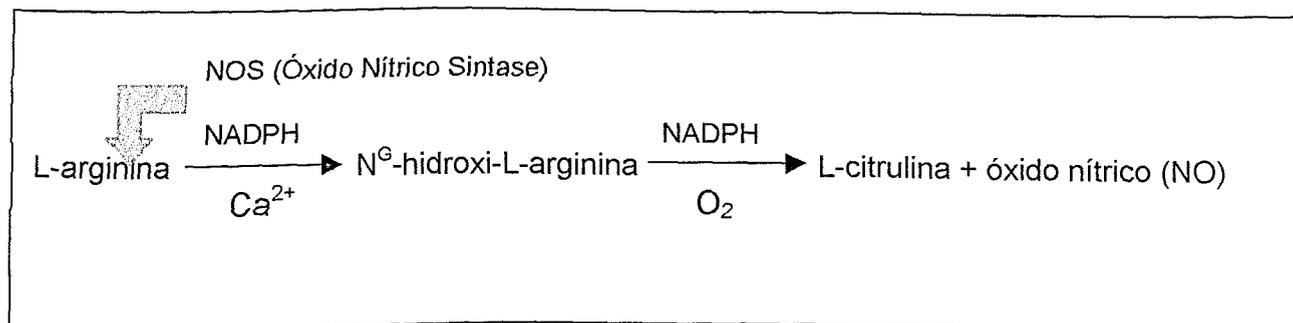


Figura 3 – Síntese do Óxido Nítrico a partir de L-arginina.

As NOS do ponto de vista bioquímico, são uma família de enzimas complexas. As três formas humanas da NOS identificadas até o momento, ecNOS (endotelial constitutiva), nNOS (neuronal) e iNOS (induzida) são encontradas nos cromossomos 7, 12 e 17, respectivamente, e assim foram nomeadas com base nos tecidos nos quais foram primeiramente clonadas e caracterizadas. O papel do NO na regulação do tônus vascular e da função plaquetária é atribuído à atividade da ecNOS. A sua inativação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos e resulta num aumento do tônus vascular e da adesão e agregação plaquetária (VIARO et al., 2000).

A localização cromossomal do gene da ecNOS foi feita por Robinson et al. (1994) por hibridização fluorescente *in situ* indicando que ele está no cromossomo 7q35-q36 com 0% de discordância. O gene possui o tamanho aproximado de 22Kb do DNA genômico contendo 26 exons e 25 introns, codificando um mRNA de 4052 nucleotídeos e está presente como uma cópia simples do gene. Os 26 exons possuem tamanho entre 68 pb (exon14) e 579 pb (exon 26). Os 25 introns possuem tamanho entre 89pb (intron 25) e 4200pb (intron 13). O início da transcrição e o sítio de terminação são os exons 1 e 26 respectivamente, levando uma região 5' não traduzida de apenas 22 nucleotídeos (ROBINSON et al., 1994; NADAUD et al., 1994).

A porção N-terminal da proteína contém elementos regulatórios, sítios de ligação Ca^{+2} / calmodulina e sítio de fosforilação. A porção C-terminal possui sítios de ligação para cofatores (NADAUD et al., 1994).

A ecNOS é cálcio – calmodulina dependente e pode ser ativada por substâncias neurohormonais como acetilcolina, bradicinina e adenosina difosfato bem como por estímulos físicos e por estresse oxidativo. Após a condição fisiológica de um exercício, a ecNOS é regulada positivamente, aumentando sua expressão genética, levando à vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo para os órgãos (RAIJ 2001; FILHO e ZILBERSTEIN 2000).

Na via de transdução de sinal, que leva à ativação da ecNOS, no seu curso completo, observa-se que ecNOS é regulada pela concentração de Ca^{+2} livre intracelular e pelo complexo Ca^{+2} -calmodulina. Análises da associação da ecNOS com a membrana celular, mostraram que esta enzima está localizada no Complexo de Golgi, bem como em estruturas específicas na membrana identificadas como cavéolas. A associação da ecNOS com uma região da membrana plasmática na qual estão concentradas várias chaves dos complexos de transdução de sinal, como as G-proteínas, tem provavelmente profunda repercussão na atividade enzimática bem como na sua acessibilidade aos processos intracelulares da via de liberação do NO, incluindo processos não associados ao aumento de cálcio intracelular (VIARO et al., 2000, GEWALTIG e KOJDA 2000).

O NO ativa a enzima solúvel guanilato ciclase (sGC) para produzir um segundo mensageiro denominado guanosina cíclica monofosfato (cGMP), a qual é responsável pela maioria das ações do NO pela ativação de duas outras proteínas quinases específicas cGMP-dependentes (PKG1 e PKG2), onde PKG1 é a maior quinase mediadora da vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. A atividade da cGMP é interrompida pela rápida conversão a GMP que é catalisada por várias fosfodiesterases (PDE). Uma delas, PDE5 é particularmente específica para cGMP (GEWALTIG e KOJDA 2000).

Acredita-se que polimorfismos da ecNOS podem estar associados com aumento na suscetibilidade a aterogênese (NAPOLI e IGNARO 2001). Desordens no caminho que leva a produção de NO podem ocorrer por alguns mecanismos incluindo atuações em lipoproteínas, aumento na geração de radicais O_2^- seguido

da degradação do NO, elevados níveis de antagonistas circulantes ou ainda pela hipercolesterolemia ou inibidores da ecNOS como L-NMMA, L-NOARG, L-NAME e ADMA, um inibidor endógeno circulante (VIARO et al., 2000; NAPOLI e IGNARO 2001).

Segundo Yoon et al. (2000), existem associações positivas entre polimorfismos genéticos da ecNOS e concentrações do NO em pacientes com DAC. Defeitos na síntese de NO pode predispor ao desenvolvimento do ateroma.

O gene que codifica a ecNOS exibe alguns polimorfismos evidenciados na figura 4 (G-10-T no intron 23, G-894-T conhecido por Glu-298-Asp no exon 7 ou ainda um número variável de seqüências repetidas CA no intron 13), alguns dos quais relacionam-se com a proporção dos níveis plasmáticos de NO. Igualmente, um número variado de repetições sequenciais polimórficas (VNTR) localizadas no intron 4, correlaciona-se com a variação na concentração plasmática, deste modo relacionando-se com hipertensão, DAC e AVC. Esta variação consiste em uma seqüência consenso de 27 pb (GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/G)GGGGTGAG) repetida 5 vezes na forma nativa (ecNOS4b). A base 19 é a A (adenina) nas primeiras 3 repetições e G (guanina) nas duas últimas. A forma "mutante" contém 4 repetições sendo as duas primeiras com A e as duas últimas com G (ecNOS4a), correlacionando-se com IAM. Um outro polimorfismo localizado na região 5' foi recentemente descrito em Japoneses com associação a espasmos coronários. Consiste de 3 mutações descritas ($T^{-786} \rightarrow C$, $A^{-922} \rightarrow G$ e $T^{-1468} \rightarrow A$). A incidência destas mutações é relativamente alta em pacientes com espasmos coronários, podendo iniciar papel importante na patogênese do IAM (ORDÓÑEZ et al., 2000).

A região promotora ainda contém sítios de ligação sensíveis a fatores de oxidação e para elementos de resposta antioxidante (DRUMMOND et al., 2000).

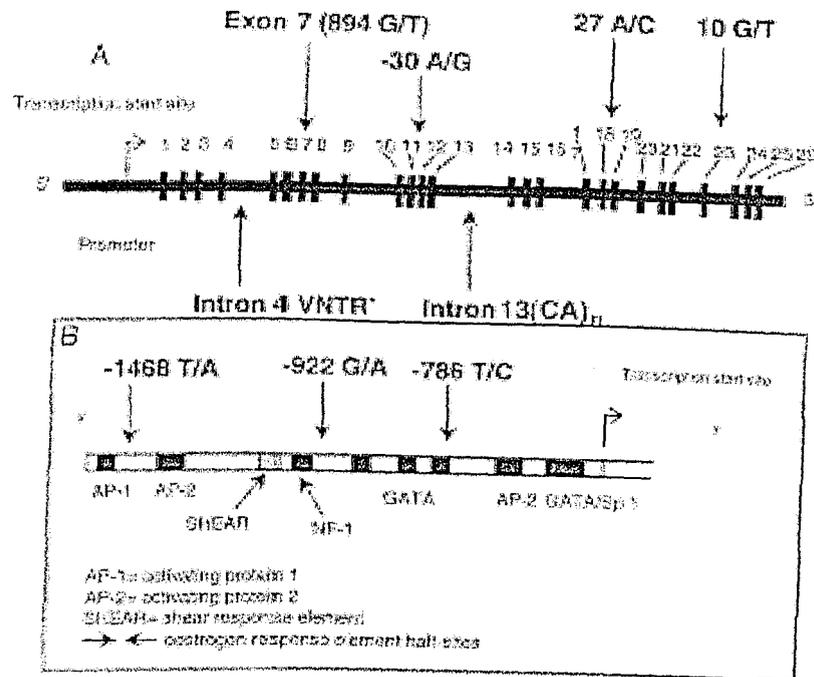


Figura 4 – Mapa dos polimorfismos do gene da ecNOS. (A) organização do gene, (B) detalhe da região promotora (HINGORANI *et al.*, 2000)

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, ATEROGÊNESE E INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

✗ A disfunção nos mecanismos moleculares importantes envolvidos da regulação da PA bem como na manutenção da integridade vascular como a inibição da agregação plaquetária e efeitos antiproliferativos, podem promover aterogênese por exposição da parede arterial a efeitos vasoconstritores diretos de fatores como AngII, aumentando o risco de trombose, levando a manifestação clínica do IAM. Estudos indicam que o IAM resulta de dois maiores processos: aterosclerose coronária, a formação de um agregado plaquetário e uma ruptura de uma placa coronária. Espasmos das artérias coronárias podem também iniciar uma parte na patogênese do IAM e morte súbita (HIBI *et al.*, 1998).

As plaquetas tem um efeito vital na homeostase vascular. Elas possuem a habilidade para agregar e formar “plug” hemostático devendo ser cuidadosamente balanceadas em defesa da necessidade da manutenção do estado fluídico do sangue e para evitar trombose. Mudanças ateroscleróticas são muitas vezes

seguidas de hiperatividade plaquetária associada com trombose, IAM e AVC (GEWALTIG²⁰⁰ e KOJDA 2000).

A agregação plaquetária pode também ser afetada por alterações no receptor de glicoproteína (GPIIb/IIIa). O determinante primário da agregação é a ligação do fibrinogênio e o fator de Von Willebrand no receptor GPIIb/IIIa encontrado na superfície da plaqueta. Ambos são essenciais e alterações nestas proteínas podem levar ao aumento ou decréscimo da agregação plaquetária, processo importante na evolução e progressão da placa aterosclerótica. Mudanças genéticas nos genes que codificam ecNOS e GPIIb/IIIa podem contribuir para o desenvolvimento de DAC e IAM (HOOPER et al 1999).

* Dois processos interagem acreditando serem eles os responsáveis pela aterosclerose: a disfunção endotelial e a modificação de lipídios. A disfunção endotelial proporciona ativação plaquetária, acúmulos de lipídios, monócitos, linfócitos T, os quais promovem a migração e proliferação das células musculares lisas, trombogênese e inflamação. Em estágio mais avançado, a progressão da aterosclerose é caracterizada pelo episódio da ruptura da placa, trombose e reorganização vascular, os quais são fatores das síndromes clínicas de angina instável e IAM (VOGEL 1999; SCHIMIDT-OTT 2000).

A instabilidade da placa aterosclerótica está associada dentre outros fatores, à hipercolesterolemia, o aumento na expressão de moléculas de adesão e agregação, bem como na vasoconstrição, estimulando a inflamação vascular e aumento na expressão de metaloproteases (VOGEL 1999).

Sabe-se que o endotélio é um grande órgão com funções autócrinas, parácrinas e endócrinas. Em resposta às condições físicas e humorais, o endotélio secreta algumas substâncias biologicamente ativas que controlam o tônus vascular, trombogênese, inflamação, metabolismo lipídico, remodelamento e crescimento vascular. Endotelina-1, Ang II (produzida em parte pela ECA tecidual) e tromboxane, são os principais vasoconstritores predominantes no endotélio e que também promovem a agregação plaquetária, proliferação das células musculares lisas e adesão celular (VOGEL 1999).

O aumento na adesão leucocitária é o maior passo na patogênese da aterosclerose. Este aumento é dependente da expressão de várias moléculas de adesão na superfície celular das células endoteliais como VCAM-1, ICAM,

citocinas e E-seletinas. Entretanto, a redução da expressão de moléculas de adesão ou inibição da função adesiva, são consideradas estratégias vasoprotetoras reduzindo a progressão e o dano vascular (GEWALTIG e KOJDA 2000).

A função endotelial é prejudicada pela mínima modificação do LDL. O LDL oxidado (LDL-ox) diminui a expressão da ecNOS e conseqüentemente a atividade do NO. Um outro tipo de LDL possui uma parte da cadeia com um alto grau de homologia com o plasminogênio entrando em competição para com o receptor de plasminogênio endotelial causando um estágio protrombótico. Pacientes com níveis altos de LDL têm aproximadamente um aumento cerca de 3 vezes para o risco de doenças coronárias. Estudos experimentais e clínicos sugerem que elevados níveis de colesterol total e LDL são associados com o prejuízo da função endotelial, independentemente da presença ou não de DAC (VOGEL 1999).

Outros estudos sugerem que polimorfismos e o colesterol LDL podem interagir sinergicamente e indivíduos que possuem mutações na ecNOS e hiperlipidemias podem ter alterações vasculares mais pronunciadas do que outros (ELBAZ et al., 2000).

Metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio também desempenham um papel importante no fenótipo inflamatório que é observado em todos os segmentos de microcirculação que possuem altas concentrações de colesterol. O aumento crônico nos níveis de colesterol induz o estresse oxidativo no endotélio resultando na geração de espécies de oxigênio reativos (ROS) diminuindo a atividade do NO. A hipercolesterolemia está também associada com o aumento do aminoácido assimétrico circulante ADMA, o qual compete com L-arginina (STOKES et al., 2002; VOGEL 1999).

Entre as várias espécies de oxigênio reativos (ROS) formados durante esta condição, o superóxido (O_2^-) sem dúvida é o mais importante. Superóxido pode ser produzido por várias células que possuem implicação na resposta inflamatória como monócitos, neutrófilos, B-linfócitos, plaquetas e células endoteliais. Algumas células como os leucócitos e células endoteliais, que também podem ser estimuladas pela Ang II, usam a enzima de membrana associada nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase (NAD (P) Hox) para gerar O_2^- (STOKES et al., 2002, FARRÉ e CASADO 2001; SCHIFFRIN 2002).

Em adição à redução da bioatividade do NO, as ROS podem também estar envolvidos na regulação da expressão da ecNOS. A manutenção da adequada atividade da ecNOS e a habilidade do endotélio em produzir NO depende da preservação da expressão da enzima ecNOS. É conhecido que citocinas reduzem a expressão da ecNOS por um mecanismo que aparentemente está ligado à redução da meia-vida do mRNA da ecNOS. O mRNA possui uma extremidade 3' não traduzida e existe uma proteína citosólica endotelial denominada proteína indutora da disfunção endotelial (EDIP) que interage com esta extremidade e que possui tamanho de 60KDa. Na presença de citocinas, aumenta a afinidade da EDIP pela extremidade 3' do mRNA da ecNOS que fica sensível à degradação (FARRÉ e CASADO 2001). Ao contrário de outros radicais livres, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido pela ação da enzima superóxido dismutase extracelular (ecSOD) não está envolvido no estresse oxidativo participando da regulação da expressão da ecNOS. O H_2O_2 reduz a afinidade da EDIP pela porção 3' aumentando a taxa de transcrição do gene além de aumentar a estabilidade da mensagem após sua produção (DRUMMOND et al., 2000).

Entretanto, NO reage muito rapidamente com superóxido para formar peroxidonitrito, o qual é mais oxidante do que o próprio superóxido. Lipídeos aterogênicos, particularmente LDL-ox, são responsáveis pela ampla extensão da disfunção endotelial na parede vascular. LDL-ox pode perturbar a função do relaxamento celular ou atuar diretamente contra as substâncias vasodilatadoras como o NO. O melhor efeito conhecido antioxidante do NO é a diminuição desta oxidação lipídica. (GEWALTIG e KOJDA 2000; NAPOLI e IGANARO 2001).

Outra fonte potencial de ROS nas células endoteliais, incluem a xantina oxidase, enzimas envolvidas no metabolismo do ácido aracdônico como lipooxigenase e ciclooxigenase e NOS. A geração de O_2^- por NOS ocorre como resultado do desacoplamento desta com a L-arginina para produzir NO, que pode ser provocado por inibição por análogos (FARRÉ e CASADO 2001).

Durante a condição normal, o balanço entre NO e ROS favorece um fenótipo anti-inflamatório pelo fato do caminho NO/cGMP predominar como resultado da produção de NO ser 1000 vezes maior comparado com a produção

de radicais O_2^- nas células endoteliais. Porém, uma mudança no balanço entre NO e ROS como ocorre durante a hipercolesterolemia, pode levar ao fenótipo inflamatório. Deste modo, o fluxo de O_2^- relativo ao NO aumenta sendo que os mecanismos dependentes de ROS tornam-se predominantes e os mecanismos dependentes de NO apresentam-se inativos. O declínio na disponibilidade de NO no estágio de hipercolesterolemia resulta na redução da biossíntese de NO, inativação do NO por O_2^- , ou ambos (STOKES et al., 2002).

Segundo Vogel (1999), a disfunção endotelial é o início precoce da aterosclerose e está associada com o avanço da idade, sexo, tabagismo, hipertensão, dieta gordurosa, sedentarismo, histórico familiar prematuro de DAC, diabetes mellitus, e os outros fatores descritos anteriormente como hipercolesterolemia e níveis altos de colesterol. A magnitude da disfunção endotelial correlaciona-se com o número de fatores de risco. Todos os passos que iniciam a aterosclerose caminhando para as síndromes clínicas de IAM, angina instável e falha cardíaca são representados na figura 5.

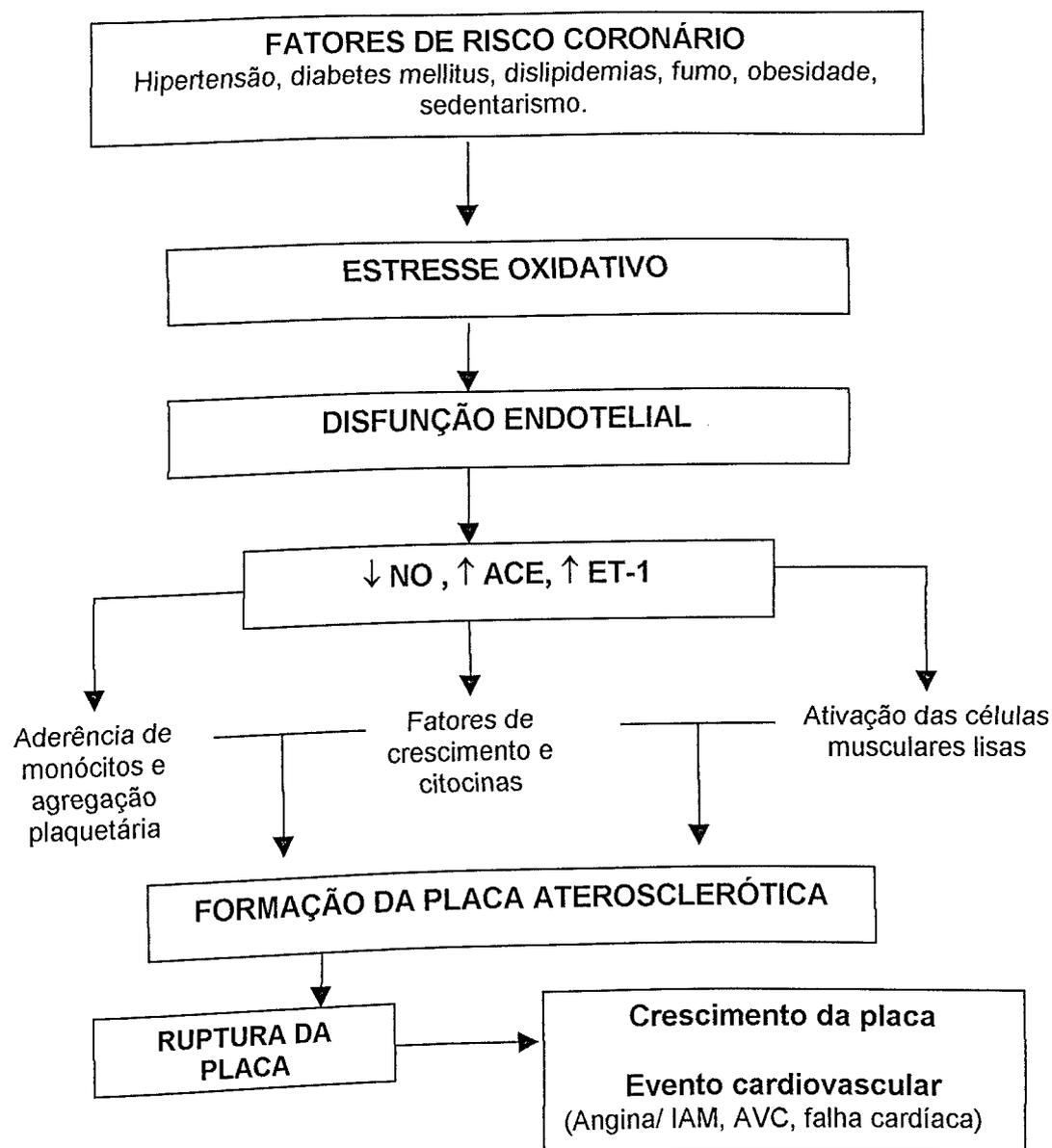


Figura 5 - Passos que iniciam a aterosclerose. Associação dos fatores do risco com síndrome hipertensiva contribuindo para o estresse oxidativo que causa disfunção endotelial resultando em anormalidades vasculares, morbidade e mortalidade. Adaptado de Schiffrin (2002) e Vogel (1999).

OBJETIVOS GERAIS

- Verificar a associação dos polimorfismos M235T do angiotensinogênio humano, Glu-298-Asp e T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS na gênese da hipertensão e na progressão para a manifestação clínica do infarto agudo do miocárdio.
- Determinar o efeito de cada polimorfismo isoladamente e em conjunto na manifestação do fenótipo hipertensivo na ausência e na presença de fatores de risco clássicos para hipertensão.
- Verificar o risco de desenvolver a hipertensão associada a presença de polimorfismos juntamente com fatores de risco convencionais.
- Analisar a correlação entre os fatores de risco clássicos e os polimorfismos.
- Existindo associação entre fator de risco e polimorfismo, tentar estabelecer um caminho molecular que associe os mesmos na determinação da hipertensão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq.Bras.Cardiol**; Vol 77, 4-48, 2001.

CAULFIELD M, et al. Angiotensinogen in human essential hypertension. **Hypertension**. 28: 1123-1125, 1996.

CAREY R.M; WANG Z.Q ;SIRAGY H.M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. **Hypertension**. 35(part2): 155-163, 2000.

CORVOL P. et al. Seven lessons from two candidate genes in human essential hypertension: angiotensinogen and epithelial sodium channel. **Hypertension**.33: 1324-1331, 1999.

DANSER A.H.J ; SCHUNKERT H. Renin-angiotensin system gene polymorphism: potential mechanisms for their association with cardiovascular disease. **European Journal of Pharmacology**. 410: 303-310, 2000.

DOMINIEZAK A.F. et al. Genes and hypertension : from gene mapping in experimental models to vascular gene transfer strategies. **Hypertension**. 35(part2): 164-172, 2000.

DOSTAL D.E. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanism related to cardiac growth and function. **Regulatory Peptides**. 91: 1-11,2000.

DOSTAL D.E. ; BAKER K.M. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? **Circ. Res**. 85: 643-650, 1999.

DRUMMOND G.R. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circ. Res**. 86: 347-345, 2000.

ELBAZ A. et al. Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. **Stroke**. 31: 1634-1639, 2000.

FARRÉ A.L.; CASADO S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. **Hypertension**. 38: 1400-1405, 2001.

FERREIRA S.R.G; ZANELLA M.T. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e nefropatia diabética. **Rev.Bras.Hipertens**. 7(03):268-271,2000.

FILHO R.F ; ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade: metabolismo, síntese e funções. **Rev.Ass.Med.Brasil.** 46(3): 265-271,2000.

FUKAMIZU A. et al. Structure and expression of the human angiotensinogen gene. **The J.Biol.Chem.** 265(13): 7576-7582, 1990.

GENEST J. Progress in hypertension research. **Hypertension.** 38:13,2001.

GEWALTIG M.T; KOJDA G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research.** 55: 250-260, 2000.

GINER V. et al. Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertensión arterial esencial en la población española. **Med.Clin.** 117: 525-529, 2001.

HALCOX J.P.J; QUYYUMI A.A. Coronary vascular endothelial function and myocardial ischemia: why should we worry about endothelial dysfunction?. **Coronary Artery Disease.** 12:475-484, 2001.

HATA A. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. **Life Science.** 57(26): 2385-2395, 1995.

HEITSCH H. et al. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. **Hypertension.** 37:72-76, 2001.

HIBI K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. **Hypertension.** 32: 521-526, 1998.

HINGORANI A.D. Polymorphism in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. **Atherosclerosis.** 154: 521-527, 2000.

HINGORANI A.D. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸ → Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation.** 100: 1515-1520, 1999.

HOOPER W.C. et al. The relationships between polymorphism in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in african americans. **Chest.** 116: 880-886, 1999.

INOUE I. et al. A mutation of angiotensinogen in patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin-angiotensin system. **The J.Biol.Chem.** 270(19):11430-11436,1995.

ISHIGAMI T. et al. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. **Circulation.** 91: 951-954, 1995.

JEUNEMAITRE X. et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**. 71: 169-180, 1992.

KARLSSON C. et al. Human adipose tissue express angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. **J.Clin.Endocrinol. Metabol.** 83: 3925-3929, 1998.

KATSUYA T. et al. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **The Lancet**. 345: 1600-1603, 1995.

KLETT C.P.R; GRANGER J.P. Physiological elevation in plasma angiotensinogen increases blood pressure. **Am.J. Physiol. Regulatory Integrative Comp.Physiol.** 281: R1437-R1441,2001.

LIFTON R.P. Genetic determinants of human hypertension. **Proc.Nad.Acad.Sci.USA**. 92:8845-8851,1995.

LINZ W. et al. Interactions among ACE, kinins and NO. **Cardiovascular Research**. 43: 549-561,1999.

MILLAT L.J; ABDEL-RAHMAN E.M; SIRAGY H.M. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. **Regulatory Peptides**. 81:1-10, 1999.

MONCADA S; PALMER R.M E HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Rev.** 43:109-142,1991.

MONCADA S e HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N.Engl.J.Med.** 329:2002-2012, 1993.

NADAUD S. et al. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 198(03): 1027-1033, 1994.

NAKAGAWA K; ISHIZAKI T. Therapeutic relevance of pharmacogenetic factors in cardiovascular medicine. **Pharmacology and Therapeutics**. 86:1-28, 2000.

NAPOLI C; IGNARRO L.J. Nitric oxide and atherosclerosis. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. 5(2): 88-97,2001.

ORDOÑEZ A.J.G; CARREIRA J.M.F. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron 4, 27bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. **Thrombosis Research**. 9: 563-566, 2000.

ORTEGA E.H. et al. The involvement of the renin-angiotensin system gene polymorphisms in the coronary heart disease. **Rev.Esp.Cardiol**. 55(02): 92-99, 2002.

PRASAD A. et al. Contribution of bradykinin receptor dysfunction to abnormal coronary vasomotion in human. **Journal of the American College of Cardiology**. 36(5):1467-1473, 2000.

RAIJ L. Hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. **Hypertension**. 37(part2): 767-773, 2001.

ROBINSON L.J. et al. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. **Genomics**. 19: 350-357, 1994.

SANKARANARAYANAN K; CHAKRABORTY R; BOERWINKLE E.A. Ionizing radiation and genetics risks VI. Chronic multifactorial diseases: a review of epidemiological and genetical aspects of coronary heart disease, essential hypertension and diabetes mellitus. **Mutation Research**. 436:21-57, 1999.

SANTOS R.A.S; CAMPAGNOLE-SANTOS M.J; ANDRADE S.P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regulatory Peptides**. 91:45-62, 2000.

SANTOS R.A.S. et al. Interactions between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney and blood vessels. **Hypertension**. 38(part2):660-664, 2001.

SCHIFFRIN E.L. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. **Am. J. Hypertension**. 15:115S-122S, 2002.

SCHMIDT-OTT K.M; KAGIYAMA S; PHILLIPS M.I. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. **Regulatory Peptides**. 93: 65-77, 2000.

STAESSEN J.A. et al. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. **Journal of Hypertension**. 17:09-17, 1999.

STOKES K.Y. et al. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. **Free Radical Biology and Medicine**. 33(08): 1026-1036, 2002.

THOMAS F. et al. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. **Hypertension**. 37:1256-1261, 2001.

TSUTSUMI Y. et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilatation. **J.Clin.Invest**. 104: 925-935, 1999.

URATA H; NISHIMURA H; GANTEN D. Chymase-dependent angiotensin II forming system in humans. **Am.J.Hypertension**. 9: 277-284, 1996.

VAUGHAN D.E. Angiotensin, fibrinolysis and vascular homeostasis. **Am.J.Cardiol**. 87(suppl): 18C-24C, 2001.

VIARO F; NOBRE F; EVORA P.R.B. Expressão das óxido nítrico sintases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. **Arq.Bras.Cardiol.** 74(4):365-379, 2000.

VOGEL R.A. Cholesterol lowering and endothelial function. **Am.J.Med.** 107: 479-484, 1999.

YANAI K. et al. Molecular variation of the human angiotensinogen core promoter element located between the TATA Box and transcription initiation site affects its transcriptional activity. **The Journal of Biological Chemistry.** 272(48):30558-30562, 1997.

YOON Y. et al. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. **Clinical Chemistry.** 46(10):1626-1630, 2000.

WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. **Circulation.** 59: 607-609, 1979.

CAPÍTULO 1

*Associação do Polimorfismo M-235-T do Gene do
Angiotensinogênio Humano (AGT) com Hipertensão e
Infarto Agudo do Miocárdio*

Resumo

Associação do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio humano (AGT) com hipertensão e infarto agudo do miocárdio

Introdução: A hipertensão essencial é um doença humana comum acreditando ser resultado de interações entre fatores genéticos múltiplos e determinantes ambientais. A variante T235 tem sido associada com altos níveis plasmáticos de AGT relacionando um possível mecanismo bioquímico ligado à variação do DNA genômico com o fenótipo hipertensivo.

Métodos e Resultados: Indivíduos de raça branca (n=192) foram consecutivamente recrutados e classificados em três grupos: HAS/IAM (n=69), HAS (n=71) e controles normotensos (n=52). A distribuição dos genótipos foi significativamente diferente tanto para o grupo HAS/IAM (p=0,041) como para o grupo HAS (p=0,043) quando comparado com o grupo controle. A presença dos fatores de risco foi predominantemente maior nos dois grupos de hipertensos comparado com o grupo controle. O tabagismo esteve em maior frequência no grupo HAS/IAM (p<0,001). Na presença de fatores de risco, o polimorfismo M235T ainda é significativo (p=0,048). O efeito do polimorfismo M235T na manifestação do fenótipo hipertensivo é mascarado na presença do IAM, provavelmente devido a outras interações genéticas relacionadas a manifestação desta patologia (p=0,151). Foi verificado o risco de desenvolver a hipertensão associada ao polimorfismo M235T (OR=2,28; 95% CI, 1.09-4,76). O sedentarismo e o tabagismo estiveram associados a hipertensão e ao IAM correlacionando-se com o aumento da idade e ao colesterol LDL.

Conclusão: O polimorfismo M235T é fator de risco independente para a gênese da hipertensão mas não o é para a manifestação clínica do IAM isoladamente. O polimorfismo interage com os fatores de risco ambientais na manifestação de ambas as patologias.

Abstract

Association of the polymorphism M235T of the angiotensinogen human gene (AGT) with hypertension and acute myocardial infarction

Background: Essential hypertension is a common human disease believed to be a consequence from the interplay of multiple genetic factors and environmental determinants. The variant T235 is associated with higher levels of plasma AGT, providing a possible biochemical mechanism linking the genomic DNA variation with a hypertension phenotype.

Methods and Results: Individuals of white race were recruited consecutively (n=192) and classified in three groups: HAS/AMI (n=69), HAS (n=71) and normotense controls (n=52). The distribution of the genotypes was significantly different for both HAS/AMI (p=0,041) and HAS groups (p=0,043) when compared to the control group. The presence of environmental risk factors was dominantly greater for the two hypertensive groups of patients compared to the control group. The smoking habit presented a higher frequency in the HAS/AMI group (p<0,001). In the presence of the risk factor, the M235T polymorphism was still significant (p=0,048). The effect of the M235T polymorphism in the manifestation of the hypertension phenotype may be masked by the presence of the AMI, probably due to other related genetic interactions in the manifestation of this pathology (p=0,151). The risk of developing hypertension associated to the M235T polymorphism was 2.3 times greater (OR=2,28; 95% CI, 1.09-4,76). The sedentary life style and smoking habit were associated with hypertension and AMI, which were correlated with increase age and total serum cholesterol.

Conclusion: The M235T polymorphism is an independent risk factor for the hypertension but it is not for the clinical manifestation of AMI alone. This polymorphism interacts with environmental risk factor for the manifestation of both pathologies.

INTRODUÇÃO

A hipertensão é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular com prevalência de cerca de 25-30% na população caucasiana adulta. Os determinantes primários da hipertensão, os quais representam 95% da população hipertensa, não têm sido completamente elucidados nas numerosas investigações acerca dos vários mecanismos envolvidos na regulação da pressão sangüínea. O conhecimento dos sistemas fisiológicos atuantes na regulação da pressão oferece oportunidades para examinar o possível papel de variações em genes candidatos específicos na patogênese da hipertensão humana¹.

Estudos em grandes populações fornecem evidências concordantes para fortes componentes genéticos na regulação da pressão tendo-se concluído que determinantes moleculares contribuem para a patogênese da hipertensão^{1,2}.

Entre os vários genes candidatos do RAAS, o AGT é de particular interesse por algumas evidências: níveis de AGT plasmático correlacionam-se com a elevação da pressão sangüínea; concentração de AGT plasmático determina a produção de Ang I e ratos transgênicos que superexpressam AGT desenvolvem hipertensão enquanto ratos com ausência do gene do AGT desenvolvem hipotensão⁶.

O AGT plasmático é sintetizado nos hepatócitos, adipócitos e astrócitos após controle positivo de estrógenos, glicocorticóides e hormônios da tireóide sendo secretado constitutivamente^{1-2,7-8}. Pelo fato de sua forte dependência de estrógenos, o AGT pode estar implicado no desenvolvimento de hipertensão que aparece em estágios estrogênicos como gravidez e uso de contraceptivos orais².

O AGT humano foi purificado e homogeneizado em alguns laboratórios e é uma glicoproteína extracelular⁷. Os primeiros 25 aminoácidos da sequência amino-terminal mostram que a renina cliva entre os resíduos Leu₁₀ - Val₁₁ ligando os resíduos Leu₁₀ - Leu₁₁. A estrutura primária de 452 resíduos foi deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA. O tamanho molecular está em torno de 49-61KDa. As diferenças que ocorrem está na presença de cadeias de oligossacarídeos e potenciais sítios de glicosilação. Ocorrem semelhanças entre seqüências de nucleotídeos do cDNA de AGT humano, AGT de ratos, antrombina III humana, α_1 - antripsina humana e ovalbumina³.

O gene humano do AGT é uma cópia simples de 12 a 13Kb e contém 5 exons interrompidos por 4 íntrons. O locus do gene foi determinado por hibridização *in situ* mostrando que ele está na posição 1q42-43. O primeiro exon codifica somente uma região 5' não traduzida e as regiões codificadoras estão no exon 2 ao 5. A região 5' do gene está implicada na regulação hormonal da transcrição e na expressão tecidual específica^{1,8}.

Segundo Bettinaglio et al⁹, mais de 20 variantes moleculares têm sido identificadas no AGT humano, sendo que de particular interesse é o polimorfismo presente no exon 2, que consiste de uma substituição de bases T→C na posição 704 do gene promovendo a mudança dos aminoácidos Met→Thre no códon 235 da proteína final.

Jeunemaitre et al², encontrou associação positiva entre a substituição de aminoácido que ocorre no códon 235 caracterizando o polimorfismo M235T do gene do AGT humano e a HAS. Segundo Ortega et al¹⁰, o polimorfismo no exon 2 do gene está relacionado com a alta concentração plasmática de AGT, alta pressão sangüínea e desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

Existe ainda a hipótese de um possível envolvimento do *locus* do AGT na predisposição ao infarto agudo do miocárdio (IAM) baseado em um argumento de que a pressão sangüínea pode atuar como fenótipo intermediário na relação entre o *locus* do AGT e IAM. Entretanto, em um estudo feito por Tiret et al⁵, esta associação foi relativamente baixa. Poucos trabalhos associaram o polimorfismo M235T, doenças cardíacas e alguns diferentes fenótipos clínicos. Isto inclui DAC, doenças cerebrovasculares e IAM. Na França, a presença do alelo T235 correlacionou-se com a extensão da lesão coronária mas não com o IAM. Outros dados da população dos Emirados Árabes mostrou alta freqüência do alelo M235 e um decréscimo da freqüência do alelo T235, 0,43 no grupo de IAM e 0,52 no grupo controle⁶.

Variações no códon 235 têm sido associadas com variações nos níveis plasmáticos de AGT relacionando um possível mecanismo bioquímico ligado a variação do DNA genômico com o fenótipo hipertensivo. Entre todos os indivíduos hipertensos, os homocigotos M235/M235 possuem um baixo nível de AGT plasmático, os heterocigotos M235/T235 níveis intermediários e os homocigotos T235/T235 níveis elevados de AGT plasmáticos. Elevações nos níveis

plasmáticos e/ou teciduais de AGT associadas com variantes específicas pode resultar em aumento na produção basal de Ang II, conseqüentemente favorecendo o aumento do tônus vascular e aumento da pressão sangüínea^{1,11}. A variante M235T pode em princípio atuar no aumento da síntese/ excreção de AGT a partir do fígado ou pode levar a um prolongamento da meia vida da proteína.

Verificar a associação de variantes moleculares no AGT abrem questões de como estas podem afetar os mecanismo que regulam a pressão sangüínea e avaliar quais seriam os riscos dos indivíduos desenvolverem patologias que geralmente estão associadas ao aumento da pressão arterial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de Estudo e Critérios de Inclusão

O estudo constou de amostras obtidas em colaboração com o Setor de Hemodinâmica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Instituto do Coração do Triângulo Mineiro. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica (UFU).

Foram incluídos na pesquisa 192 pacientes de raça branca (critério baseado na cor da pele ou cútis) sendo 95 homens e 97 mulheres que foram separados em 3 grupos: Grupo I : pacientes hipertensos (n=71; 33 homens e 38 mulheres); Grupo II : pacientes hipertensos com infarto (n=69; 34 homens e 35 mulheres); Grupo III: controles constituídos de indivíduos normotensos (n=52; 27 homens e 25 mulheres).

Os critérios de inclusão adotados foram baseados segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)²². Para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio, tomou-se por base a presença de pelo menos dois dos três critérios: 1- história clínica de dor torácica típica de isquemia; 2 – alterações do segmento ST, supra e infradesnivelamento em eletrocardiograma seriados; 3- elevações dos níveis séricos de marcadores cardíacos, sendo a enzima creatinofosfoquinase (CK-MB) o teste laboratorial usado, segundo Ryan et al¹⁴. A hipertensão foi diagnosticada em indivíduos que mantiveram uma PA sistólica > 140mmHg e PA diastólica > 90mmHg. Os valores de referência dos fatores de risco convencionais como níveis elevados de colesterol total, LDL e triglicérides, níveis baixos de HDL e obesidade foram adotados conforme o III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2000)¹⁵: Colesterol Total >200mg/dl, LDL >159mg/dl, HDL <40mg/dl, Triglicérides > 200mg/dl e IMC >25Kg/m². Os 52 indivíduos incluídos como controle seguiram somente o critério de não ter histórico pessoal de hipertensão, não excluída a possível presença de outras doenças. Para todos os grupos também foi feita a triagem de história de tabagismo e sedentarismo bem como o histórico familiar de doença arterial coronariana.

Material Biológico e Isolamento do DNA

O material biológico utilizado foi o sangue periférico obtido mediante termo de consentimento informado e coletados em tubos *Vacutainer* contendo EDTA para evitar coagulação e armazenados a 4°C.

As extrações do DNA genômico foram feitas segundo o método de isolamento de DNA adaptado de Sambrook et al¹⁶. O material biológico foi centrifugado para separação da camada de leucócitos e uma alíquota de 500µl desta camada foi retirada e transferida para um eppendorf de 1.5mL

Acrescentou-se 1.0mL de tampão de lise celular (NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM e EDTA 1mM) em cada amostra, vortexando durante 10 segundos. A mistura foi centrifugada a 5000rpm por 5min para peletizar os núcleos. O sobrenadante foi descartado repetindo-se o passo por mais 3-4 vezes até que os peletes ficassem límpidos de cor branco-creme.

Adicionou-se 400µL de solução Master Mix juntamente com 20µL de Proteinase K (10mg/ml) e as amostras foram incubadas a 65°C em banho-maria por 4h. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.000rpm por 5min e o sobrenadante recolhido em eppendorf limpo adicionando-se 200µl de NaCl saturado e colocando em gelo por 10min. As amostras foram submetidas a centrifugação a 13.000rpm por 15min e o sobrenadante recolhido em novo eppendorf limpo adicionando-se etanol Absoluto (1ml).

Misturou-se por inversão até que os flocos de DNA tornassem visíveis. Novamente as amostras foram submetidas a centrifugação a 13.000 por 10min para precipitar o DNA. Após a centrifugação descartou-se o etanol residual para que os peletes pudessem secar. O DNA foi ressuspendido em 200µL de água de injeção.

Todos os cuidados para evitar contaminação tanto cruzada de paciente para paciente como de outros materiais vindos do meio foram tomados.

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo M235T do AGT humano

A região no exon 2 do gene do AGT humano que contém a variante M235T foi amplificada por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o par de primers: 5'- GGA-AGGAACA-AGA-ACT-GCA-CCT- 3' (*sense*) 3'- GAC-GGT-GCT-GTC-CAC-ACT-GGA-CCC-C- 5' (*antisense*).

As reações foram feitas nas seguintes condições: 3µl de DNA genômico, 1und de Taq Polimerase (*Phoneutria*), Tampão da Enzima (1X), dntps 200µM, 1,5mM de MgCl₂, 7 pmols de cada primers em um volume final de 30µl.

A PCR foi realizada em um termociclador da MJ. Research, Inc. seguindo o programa de 35 ciclos: 10 ciclos a 95°C-5min; 94°C-40 segundos; 64°C-1min; 72°C-1min seguidos por mais 25 ciclos a 94°C-40 segundos; 62°C- 40 segundos; 72°C-1min. Extensão final de 72°C por 10min e 4°C por 20min.

O produto final amplificado de 332pb foi posteriormente visualizado em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio (10mg/ml) utilizando marcador de 50pb como referência. Todas as visualizações foram feitas em aparelho VDS (*Pharmacia Biotech*).

Os produtos amplificados foram submetidos a restrição enzimática utilizando a enzima *Psy I* (Tth111-1) (MBI *Fermentas*) que reconhece o seguinte sítio de restrição criado pelo primer *antisense* (*mismatch*):

5'.....GACN ↓ NNGTC.....3'

3'.....CTGNN ↑ NCAG.....5'

As reações de restrição seguiram o protocolo: 10 µl de produto amplificado foram adicionados a 2und da enzima *Psy I* (Tth111-1), Tampão da Enzima (1X) em um volume final de 20µL e submetidos a temperatura de 37°C por 3h. Os produtos digeridos foram visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio utilizando um marcador de 50pb como referência.

A enzima reconhece o indivíduo mutante. Assim, indivíduos homozigotos M235/M235 apresentam o padrão de banda de tamanho ao fragmento original, não digerido de 332pb. Indivíduos heterozigotos M235/ T235 apresentam padrões de 332pb, 308pb e 24pb e indivíduos homozigotos T235/ T235 apresentam padrões de 308pb e 24pb.

Análise Estatística

Utilizou-se o programa Statistica 5.5 para realizar as análises. Em todas elas, foi utilizado o erro α menor que 5% ($p < 0.05$) para o nível de significância.

O teste do χ^2 foi utilizado para verificar diferenças entre as frequências gênicas e genóticas entre os grupos de pacientes e controles. As variáveis contínuas foram expressas em frequência e as diferenças entre os grupos foram comparadas também pelo teste do χ^2 .

O risco relativo (*Odds Ratio*) foi avaliado para a razão de chances e todas as variáveis foram transformadas em numéricas com valores atribuídos de 0 (zero) para ausência e 1 (um) para presença.

Foram utilizadas análises de regressões múltiplas com distribuição binomial para verificar a associação conjunta dos genótipos e fatores de risco convencionais na gênese da hipertensão e progressão para o IAM.

Análises de correlação de Pearson com $p < 0.05$ foram realizadas para verificar todas as possíveis associações entre fatores de risco e o polimorfismo.

RESULTADOS

Amplificação e Genotipagem

A amplificação obtida por meio da técnica PCR utilizando o programa e o par de primers descrito é evidenciada na figura 6. O fragmento original amplificado possui o tamanho de 332pb.

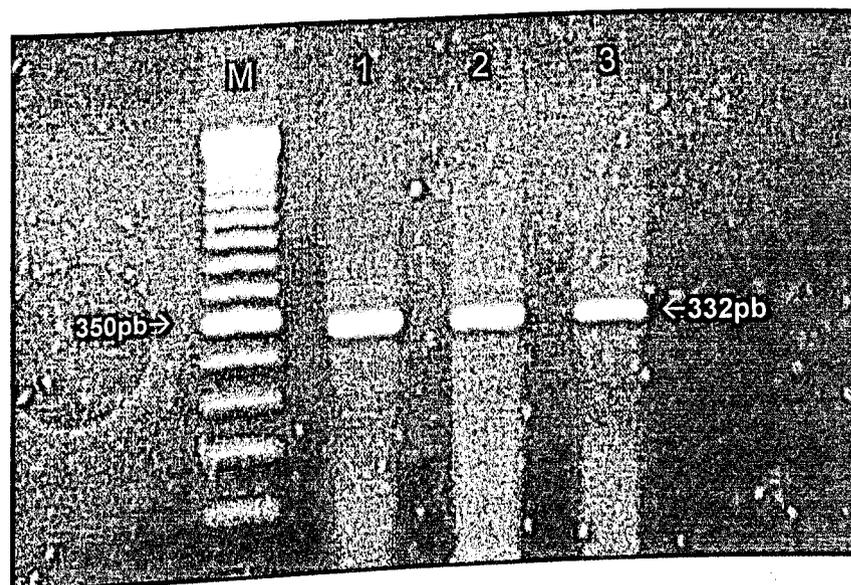


Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio evidenciando a amplificação de acordo com protocolo e primers informados. O amplicon para o polimorfismo do exon 2 do gene do AGT humano apresenta 332pb como mostra a figura, M – marcador de 50pb. Colunas 1, 2 e 3 – indivíduos da pesquisa

Os resultados obtidos pela restrição enzimática utilizando a enzima *Psy I* (Tth111-1) estão evidenciados na figura 7 onde indivíduos M235/M235 aparecem com apenas uma única banda de 332pb, indivíduos M235/T235 apresentando bandas de 332pb, 308pb e 24pb e indivíduos T235/T235 apresentando bandas de 308pb e 24pb. A banda de 24pb não é visualizada no gel de agarose devido à baixa resolução deste método eletroforético para fragmentos menores do que 50pb.

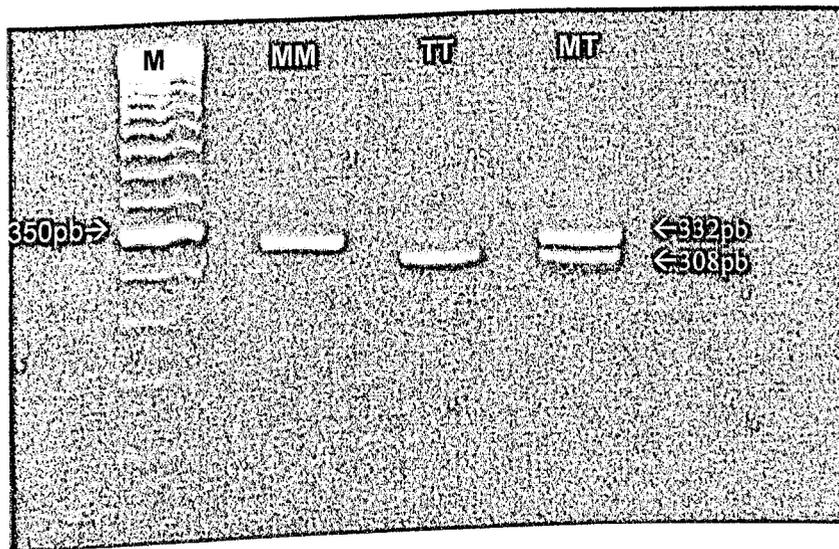


Figura 7 – Gel de agarose 3% evidenciando o padrão de genotipagem do exon 2 do polimorfismo do AGT humano obtido após restrição enzimática pela enzima Psy I (Tth11-1).
 MM – indivíduo homozigoto M235/M235 com 332pb
 MT – indivíduo heterozigoto M235/ T235 com 332pb, 308pb e 24pb
 TT – indivíduo homozigoto T235/T235 com 308pb e 24pb

Análise do polimorfismo M235T do AGT humano entre casos e controles

- **Pacientes hipertensos versus controles**

As características clínicas principais dos indivíduos incluídos nos dois grupos foram comparadas e estão evidenciadas na tabela 1. A média da idade dos pacientes com hipertensão foi de 60.29 ± 11.08 anos de idade, estatisticamente diferente do grupo controle que foi de 54.75 ± 11.35 ($p=0.002$).

Tabela 1 –Características clínicas entre pacientes HAS e controles

Variáveis	Controles N=52	HAS N=71	p-valor
Histórico Familiar de DAC	(40.4)	(30.9)	ns
Tabagismo	(15.4)	(38.0)	$p<0.001$
Sedentarismo	(48.0)	(62.0)	$p<0.050$
IMC $>25\text{kg}/\text{m}^2$	26.1 ± 3.76	30.2 ± 1.1	ns
Colesterol Total $>200\text{mg}/\text{dl}$	(44.2) 203.3 ± 27.9	(47.8) 196.0 ± 46.49	$p<0.001$
LDL $>159\text{mg}/\text{dl}$	(25.0) 115 ± 25.1	(12.6) 116.0 ± 29.6	$p<0.005$
HDL $<40\text{mg}/\text{dl}$	(5.7) 49.1 ± 7.2	(8.4) 47.6 ± 12.4	$p<0.025$
Triglicérides $>200\text{mg}/\text{dl}$	(3.8) 171.6 ± 58.7	(15.4) 172.4 ± 140.8	$p<0.010$

Valores expressos em frequência (%), média e desvio padrão.

Os fatores de risco convencionais como tabagismo, sedentarismo, níveis elevados de colesterol total, LDL, triglicérides bem como os níveis baixos de HDL foram mais freqüentes no grupo de hipertensos do que no grupo dos controles. O histórico familiar e o IMC foram estatisticamente semelhantes nos dois grupos.

As freqüências genóticas e alélicas do polimorfismo nos dois grupos estão representadas na tabela 2.

Dos 52 indivíduos do grupo controle genotipados para a variante M235T, 53.8% são homozigotos normais M235/M235, 38.4% são heterozigotos M235/T235 e 7.8% são homozigotos mutantes T235/T235. Dos 71 pacientes hipertensos, 33.8% são homozigotos normais M235/M235, 56.3% são heterozigotos M235/T235 e 9.9% são homozigotos mutantes T235/T235. O teste do χ^2 foi utilizado para verificar a diferença entre os grupos controle e de pacientes hipertensos em relação aos genótipos e aos alelos. De acordo com a análise obtida, existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os genótipos sendo o valor de $\chi^2=4.749$ e o valor de $p=0,043$. Pode-se observar também que as freqüências dos genótipos M235/T235 e T235/T235 são maiores no grupo de pacientes hipertensos do que no grupo controle. Também houve uma diferença significativa na freqüência alélica entre os dois grupos, mostrando um aumento na presença do alelo T235 no grupo dos paciente hipertensos e uma diminuição da presença do alelo M235 neste mesmo grupo.

Tabela 2 – Freqüências genóticas e alélicas da variante M235T entre pacientes HAS e controles.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS N= 71 (%)
M235/M235	28 (53.8)	24 (33.8)
M235/T235	20 (38.4)	40 (56.3)
T235/T235	04 (7.8)	07 (9.9)
Alelos		
M235	(73.0)	(62.0)
T235	(27.0)	(38.0)

A estimativa de risco (OR) de desenvolver hipertensão associada ao genótipo do AGT com os respectivos intervalos de confiança foram: para o genótipo T235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR=2.04 (0.53 – 7.82),

para o genótipo M235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR=2.33 (1.08 – 5.01), para os genótipos M235/T235 e T235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR=2.28 (1.09 – 4.76) e para os genótipos M235/M235 e M235/T235 em relação ao genótipo T235/T235, OR=0.21 (0.21 – 2.75). Estes dados estão dispostos na Figura 8. Ainda foram utilizadas as análises de regressões múltiplas com distribuição binomial para verificar o efeito dos genótipos associados aos fatores de risco convencionais na gênese da hipertensão. Os dados estão evidenciados na tabela 3.

Tabela 3- Efeito da presença do polimorfismo do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes HAS.

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo M235T	1,00	3.881	0.048 *
Tabagismo	1,00	9.546	0.002 *
Sedentarismo	1,00	0.362	0.547
LDL > 159 mg/dl	1,00	0.948	0.330
HDL < 40mg/dl	1,00	4.669	0.030 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.568	0.450
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.293	0.588
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.109	0.741
Histórico Familiar	1,00	0.265	0.265

Ao associar o efeito do polimorfismo associado com os fatores de risco, verificou-se que os fatores tabagismo e HDL foram significativos e o polimorfismo M235T do AGT humano também foi significativo ($p=0.048$).

- **Pacientes hipertensos com infarto *versus* controles**

As características clínicas principais dos indivíduos incluídos nos dois grupos foram comparadas e estão evidenciadas na tabela 4 . A média da idade dos pacientes hipertensos com infarto foi de 60.57 ± 11.22 anos de idade, sendo estatisticamente diferente do grupo dos controles que foi de 54.75 ± 11.35 ($p=0,002$).

Tabela 4 –Características clínicas entre pacientes HAS/IAM e controles

Variáveis	Controles N=52	HAS +IAM N=69	p-valor
Histórico Familiar	(40.4)	(44.9)	ns
Tabagismo	(15.4)	(47.8)	p<0.001
Sedentarismo	(48.0)	(72.5)	p<0.050
IMC >25kg/m ²	(44.2) 26.1 ± 3.76	(52.2) 27.7 ± 2.13	ns
Colesterol Total >200mg/dl	(25.0) 203.3 ± 27.9	(71.0) 216.8 ± 33.4	p<0.050
LDL >159mg/dl	(5.7) 115 ± 25.1	(18.8) 131.0 ± 30.6	p<0.005
HDL <40mg/dl	(3.8) 49.1 ± 7.2	(15.9) 45.5 ± 8.2	p<0.025
Triglicérides >200mg/dl	(7.7) 171.6 ± 58.7	(27.5) 181.0 ± 55.8	p<0.001

Valores expressos em frequência (%), média e desvio padrão

No grupo de pacientes hipertensos com infarto houve um aumento em cerca de 7% no número de indivíduos fumantes (44.9%) em comparação com o grupo de pacientes hipertensos (38%). Todos os outros fatores de risco como níveis elevados de colesterol total (71%), LDL (18,8%), triglicérides (27.5%), bem como sedentarismo (72.5%), IMC (52.2%) e histórico familiar (44.9%) estiveram mais frequentes no grupo de pacientes hipertensos com infarto, porém o IMC e o histórico familiar, assim como observado para o grupo de hipertensos, não foram significativos tanto para a gênese da hipertensão como para a progressão para o infarto agudo do miocárdio.

Dos 69 indivíduos do grupo de pacientes hipertensos com infarto genotipados para a variante M235T do AGT humano, 3.8% são homozigotos normais M235/M235, 52.2% são heterozigotos M235/T235 e 13% são homozigotos mutantes T235/T235. Em comparação com o grupo controle existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($\chi^2= 4.166$, $p=0.041$) o mesmo ocorre para a frequência alélica onde o grupo controle apresenta frequência de 73% para o alelo M235 e 27% para o alelo T235 enquanto para o grupo de pacientes hipertensos com infarto a frequência do alelo M235 foi de 61% contra 40% para o alelo T235 ($\chi^2=3.952$, $p<0.05$) como mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Frequências genóticas e alélicas da variante M235T entre pacientes HAS/IAM e controles.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS +IAM N= 69 (%)
M235/M235	28 (53.8)	24 (34.8)
M235/T235	20 (38.4)	36 (52.2)
T235/T235	04 (7.8)	09 (13.0)
Alelos		
M235	(73.0)	(61.0)
T235	(27.0)	(40.0)

A estimativa de risco (OR) de desenvolver hipertensão e progressão para o IAM associada ao genótipo do AGT humano com os respectivos intervalos de confiança estão distribuídos na figura 9 onde para o genótipo T235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR=2.62 (0.71 – 9.61), para o genótipo M235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR= 2.10 (0.97 – 4.56), para os genótipos T235/T235 e M235/T235 em relação ao genótipo M235/M235, OR=2.18 (1.04 – 4.56) e para os genótipos M235/M235 e M235/T235 em relação ao genótipo T235/T235, OR=0.55 (0.16 – 1.91).

As análises de regressões múltiplas com distribuição binomial também foram utilizadas para o grupo de pacientes hipertensos com infarto para verificar o efeito dos genótipos associados com os fatores de risco convencionais na gênese da hipertensão e progressão para o IAM. Os dados estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6- Efeito da presença dos genótipos do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes HAS/IAM.

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo M235T	1,00	2.052	0.151
Tabagismo	1,00	7.163	0.007 *
Sedentarismo	1,00	0.692	0.405
LDL > 200mg/dl	1,00	1.150	0.283
HDL < 40mg/dl	1,00	4.965	0.025 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.060	0.805
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.005	0.941
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.020	0.886
Histórico Familiar	1,00	0.723	0.394

Ao associar o efeito do polimorfismo com os fatores de risco no grupo de HAS/IAM verifica-se que somente os fatores tabagismo de HDL foram significativos. Na presença de fatores de risco convencionais, o polimorfismo M235T do AGT humano não foi significativo para este grupo ($p=0.151$).

Nos dois grupos de pacientes, HAS e HAS/IAM, houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos as frequências gênicas e genotípicas com o grupo controle, não havendo portanto diferença entre os dois grupos com relação à hipertensão, podendo ambos formarem um único grupo de hipertensos.

Para verificar todas as possíveis associações entre os fatores de risco e entre o polimorfismo M235T, utilizou-se as análises de Correlação de Pearson com $p<0.05$. Os resultados estão dispostos na tabela 7. Os valores em vermelho são valores significativos com $p<0.05$.

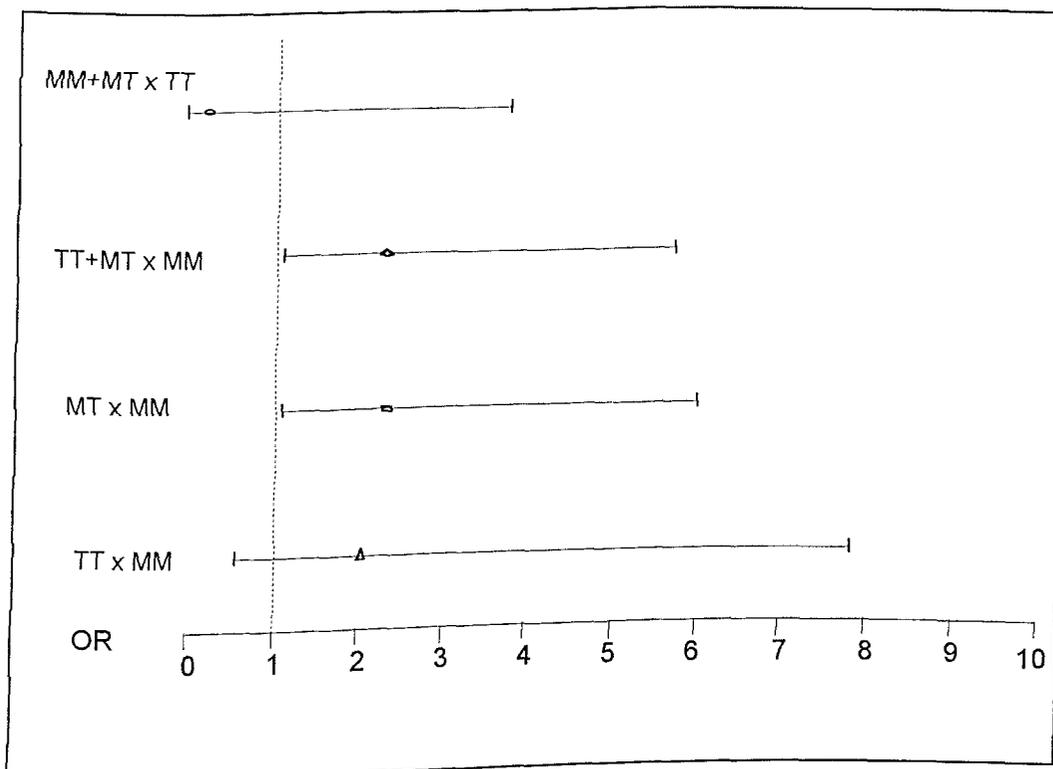


Figura 8 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo M235T do AGT humano no grupo de pacientes HAS

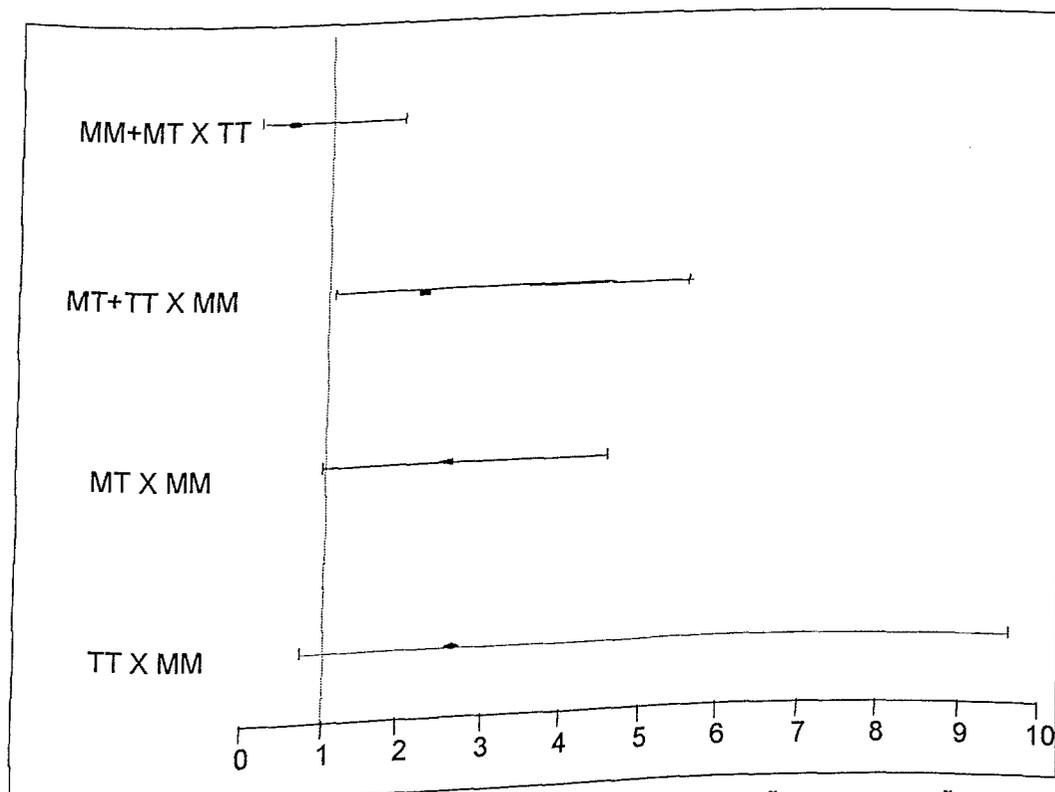


Figura 9 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o IAM associado ao polimorfismo M235T do AGT humano no grupo de pacientes HAS/IAM

Tabela 7 – Correlações entre todas as variáveis e entre o polimorfismo M235T do AGT humano

	SEXO	IAM	HAS	HAS/IAM	IDADE	AGT	TABA	SED	LDL	HDL	CT	TG	IMC
IAM	-0.10372												
HAS	0.02979	0.2006											
HAS/IAM	-0.0038	0.7434	0.7187										
IDADE	-0.09048	0.1860	0.2166	0.17039									
AGT	-0.10849	0.03604	0.1607	0.12566	0.04502								
TABA	-0.05156	0.20816	0.232	0.26394	0.04209	-0.0229							
SED	0.06163	0.14935	0.1201	0.18278	0.23933	0.02251	0.11186						
LDL	-0.08709	0.13211	0.1385	0.19834	0.18688	-0.0227	0.1062	0.19799					
HDL	-0.04803	-0.07447	0.1589	0.0475	-0.0217	0.12325	-0.0514	-0.052	-0.008				
CT	-0.01207	0.28583	0.0661	0.20348	-0.0047	0.01771	-0.0149	0.09394	0.2351	-0.1945			
TG	0.00857	0.18707	0.136	0.19032	0.00272	0.10908	0.06677	0.02091	0.05065	0.1773	0.18948		
IMC	-0.09364	-0.03986	0.0379	0.00831	-0.0723	-0.0138	0.03765	0.00135	-0.113	0.0155	-0.0547	0.05919	
HF	0.02403	0.13953	-0.0297	0.05507	0.07283	-0.0618	0.10621	0.03904	-0.0338	-0.0607	0.06891	0.04704	0.1339

IAM: infarto agudo do miocárdio, HAS: hipertensão, TABA: tabagismo, SED: sedentarismo, CT: colesterol total, TG: triglicérides, HF: histórico familiar.

DISCUSSÃO

Complicações relacionadas à hipertensão, especialmente DAC, são determinadas por um grande número de fatores de risco associados. Muitos estudos mostram que indivíduos hipertensos consistentemente possuem altos níveis de colesterol total, triglicérides, IMC e glicemia. O risco de eventos cardiovasculares entre pacientes hipertensos varia enormemente dependendo do número destes fatores de risco¹⁷.

No presente estudo, os fatores de risco para hipertensão foram analisados entre os três grupos considerados e verificou-se que eles foram mais freqüentes dentro do grupo de pacientes com HAS comparado com o grupo controle e que há um aumento desta freqüência dentro do grupo de pacientes HAS/IAM.

Dentro do grupo de pacientes HAS, o hábito do tabagismo esteve presente em 38% dos pacientes contra apenas 15.4% dos controles indicando um importante fator de risco para hipertensão. O mesmo valor de importância é dado aos fatores de risco como o sedentarismo (62% dos pacientes contra 48% dos controles), colesterol total (47.8% dos pacientes contra 25% dos controles), LDL (12.6% dos pacientes contra 5.7% dos controles) e HDL (8.4% dos pacientes contra 3.8% dos controles e triglicérides (15.4% dos pacientes contra 7.7% dos controles).

Os fatores de risco foram predominantes dentro do grupo HAS/IAM. Em comparação com o grupo de pacientes HAS, houve um aumento cerca de 7% no número de indivíduos fumantes (47.8%) assim como também foi observado um aumento de indivíduos com colesterol total elevado (71%), LDL (18.8%), triglicérides (27.5%), sedentarismo (72.5%) e aumento do número de indivíduos com níveis de HDL baixo (15.9%). Embora o número de indivíduos com histórico familiar e IMC elevado também seja maior dentro do grupo HAS/IAM, essa diferença assim como para o grupo de pacientes HAS, não foi significativa comparado com o grupo controle.

O excesso de peso principalmente associado ao acúmulo de gordura na região abdominal está associado a um maior risco de doença aterosclerótica. Alguns estudos demonstram a associação de níveis plasmáticos de AGT com o IMC e a ligação de polimorfismos do AGT na obesidade. Na obesidade a gordura

é anormalmente aumentada e distribuída. O aumento da produção de AngII pode ter um papel importante no crescimento e diferenciação dos adipócitos na medida em que AngII estimula a secreção de prostaciclina (PGI_2) que é um potente efector autócrino da diferenciação adipogênica. Nenhuma atividade lipolítica foi encontrada em relação à AngII¹⁸. Embora esta possibilidade de envolvimento de polimorfismos do AGT com obesidade exista, de acordo com os dados analisados não houve diferença entre os IMC dos pacientes comparado com o controle.

O sedentarismo teve diferença significativa entre os grupos de HAS e HAS/IAM comparado com o grupo dos controles onde os indivíduos hipertensos tanto com ou sem infarto são mais sedentários do que os indivíduos normotensos indicando ser um fator de risco importante para a gênese da hipertensão.

Segundo Corvol et al¹⁹, a hereditariedade da hipertensão é baixa ($\approx 30\%$). Nada é conhecido a respeito do número de genes envolvidos, o modo de transmissão, seus efeitos quantitativos na pressão sangüínea, suas interações com outros genes ou suas modulações com fatores ambientais. A apropriada definição de "histórico familiar" permanece ainda com controvérsias. Tipicamente um indivíduo é considerado como tendo histórico familiar positivo se um ou mais pessoas relativamente tenham sido diagnosticadas hipertensas. Entretanto, o histórico familiar tem sido baseado na completa história familiar do indivíduo sendo que esta análise é ausente no presente estudo e onde o histórico familiar de DAC não teve importância significativa tanto para o grupo de pacientes HAS como para o grupo de pacientes HAS/IAM.

Com relação à distribuição gênica e genotípica dentro do grupo HAS e controles, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos e os genótipos ($\chi^2=4.749$, $p=0.043$) onde a frequência dos mesmos encontrada para o grupo de pacientes HAS foi de 33.8% para M235/M235, 56.3% para M235/T235 e 9.9% para T235/T235 contra 53.8% para M235/M235, 38.4% para M235/T235 e 7.8% para T235/T235 do grupo dos controles. Os resultados encontrados não foram semelhantes a nenhum estudo já publicado, exceto para o genótipo M235/M235 que teve frequência de 33.8% semelhante as frequências encontradas nos estudos de Katsuya et al²⁰, Hegele et al¹¹, Frossard et al⁶ e Bettinaglio et al⁹ que foram de 38,4%, 33%, 35% e 31.8%, respectivamente.

Observou-se também que a freqüência do genótipo homozigoto mutante T235/T235 foi bem menor em comparação com os resultados obtidos nos mesmos estudos acima mencionados. Enquanto os resultados obtidos nesta pesquisa foram de 56,3% e 9,9% para os genótipos M235/T235 e T235/T235 nos outros estudos foram de 45% e 20% de Frossard et al⁶, 45,5% e 22,7% de Bettinaglio et al⁹ e 44% e 21,9% de Katsuya et al¹³.

Em relação à freqüência alélica entre os grupos de pacientes HAS e controles, também houve diferença significativa ($\chi^2=6.28$, $p<0.05$) onde para o alelo M235 a freqüência foi de 62% contra 72% entre casos e controles respectivamente, e para o alelo T235, 38% contra 27% entre casos e controles, respectivamente.

Analisando as distribuições encontradas para as freqüências gênicas e genotípicas da variante M235T dentro do grupo de pacientes HAS/IAM, verificou-se que também há diferença significativa comparado com o grupo controle ($\chi^2=4.166$, $p=0.041$) sendo que entre os 69 pacientes, 24 (34,8%) são homozigotos normais M235/M235, 36 (52,2%) são heterozigotos M235/T235 e 9 (13%) são homozigotos mutantes T235/T235. Também neste caso, não foi encontrada nenhuma semelhança entre as freqüências genotípicas encontradas com as de outros trabalhos publicados e verificou-se também uma diminuição da freqüência do genótipo homozigoto mutante T235/T235 em relação a outros estudos.

Com relação a distribuição da freqüência alélica, houve diferença significativa entre o grupo de pacientes HAS/IAM comparado com o grupo controle ($\chi^2=3.952$, $p<0.05$) onde a presença do alelo T235 é também maior no grupo de pacientes.

A freqüência do alelo T235 para o grupo de pacientes HAS foi de 38% e para o grupo de HAS/IAM foi de 40%. Estes dados corroboram com os estudos de Jeunemaitre et al², Caulfield et al²¹ e de Frossard et al⁶ os quais citam que a freqüência alélica na população de raça branca está geralmente em torno de 35-49%, mesmo sendo a população brasileira formada por um alto grau de miscigenação. O Brasil possui uma miscigenação racial muito importante, com uma mistura de diversas raças e origens, excluindo assim o efeito racial e maximizando as combinações genéticas e ambientais.

É possível verificar que há um aumento na presença do alelo T235 tanto no grupo de pacientes HAS como no grupo de pacientes HAS/IAM embora este aumento seja percebido somente dentro do genótipo heterozigoto ou seja, os alelos T235 estão sendo "deslocados" para este genótipo intermediário aumentando assim, o número destes indivíduos em ambos os grupos de pacientes. Verifica-se também que há uma menor frequência do genótipo homozigoto T235/T235 no grupo controle, embora o "deslocamento" ocorra no sentido do genótipo favorável M235/M235. Esta diferença encontrada para a frequência dos genótipos e que foi diferente da maioria dos estudos já publicados talvez possa ser explicada pelo possível efeito deletério que o alelo T235 possa ter quando em homozigose. O fato deste mesmo efeito ter sido percebido no grupo controle talvez possa indicar que o mesmo não foi um controle ideal mesmo porque os indivíduos aqui classificados como "controles" foram somente sob o critério da ausência de diagnóstico de hipertensão, não excluindo a possibilidade de existir outras enfermidades como DAC e diabetes mellitus. Possivelmente, o alelo T235 possa estar relacionado com outras patologias além da hipertensão.

Analisando o risco relativo de desenvolver a hipertensão no grupo de pacientes HAS, observa-se que para o genótipo T235/T235 em relação ao genótipo normal M235/M235 não houve diferença uma vez que para o intervalo de confiança de 95%, o valor não chegou a ultrapassar o valor 1 (um). Já ao analisar o genótipo M235/T235 em relação ao M235/M235 obteve-se o valor 2,33 em um intervalo de confiança estatisticamente significativo, o mesmo ocorrendo para o alelo T235 (M235/T235 + T235/T235) em relação ao alelo M235 (M235/M235) onde o valor foi de 2,28 em um intervalo de confiança estatisticamente significativo.

Quando foi analisado o risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o IAM, somente foi observado o valor de 2,18 em um intervalo de confiança estatisticamente significativo para o alelo T235 (M235/T235 + T235/T235) em relação ao alelo M235 (M235/M235). Embora o intervalo de confiança para o genótipo M235/T235 em relação ao M235/M235 esteve próximo do valor 1 no grupo de pacientes HAS/IAM, verifica-se que para a manifestação clínica do IAM provavelmente depende de outros fatores que não só a hipertensão. Corvol et al¹⁹ demonstrou que o risco relativo de desenvolver a hipertensão é 20-30% maior em

indivíduos portadores do alelo T235 do que os portadores do alelo M235. É possível observar também que neste grupo temos um número muito maior de fatores de risco do que no grupo HAS e que podem estar "mascarando" o efeito do alelo T235 e que talvez existam outros componentes genéticos interagindo com o polimorfismo M235T do AGT humano.

Ao analisar os dados obtidos com relação às distribuições das frequências gênicas e genóticas entre os três grupos, é possível concluir que a variante M235T é fator de risco independente para a gênese da hipertensão, não havendo portanto, diferença entre os dois grupos de pacientes, HAS e HAS/IAM. Esta associação da variante M235T do AGT humano com a gênese da hipertensão pode ainda ser afirmada pelo desvio da frequência do alelo T235 observado dentro das frequências dos genótipos onde nos dois grupos de pacientes, em que a variação ocorreu no sentido dos genótipos desfavoráveis (M235/T235 e T235/T235) e não no sentido do genótipo favorável (M235/M235) que manteve a frequência semelhante a de outros estudos, enquanto que no grupo controle a variação foi percebida no sentido do genótipo favorável (M235/M235). De acordo com Tiret et al⁵, o polimorfismo M235T está associado com a variação na concentração plasmática de AGT que é o componente chave do RAAS levando à produção de AngII. Corvol et al¹⁹, afirmou que a concentração no plasma de AGT é cerca de 20% maior em indivíduos portadores do alelo T235. A análise cinética da reação da renina, mostra que a produção plasmática de AngII é sensível a pequenas variações na concentração do AGT na circulação, conseqüentemente, um aumento na produção de AGT leva a uma maior síntese de AngII já que não constitui excesso de substrato para a renina. Assim, tem-se um aumento do tônus vascular e aumento da pressão sangüínea caminhando para a expressão do fenótipo hipertensivo.

A variante M235T do AGT humano pode ser considerada como um fator de risco independente na gênese da hipertensão onde o risco para o alelo T235 foi de 2 em relação ao alelo M235 porém, ao verificar o efeito do polimorfismo com os fatores de risco no grupo de pacientes HAS/IAM, o mesmo perde a significância ($p=0.151$) provavelmente devido à interferência de outras interações genéticas envolvidas na gênese do IAM.

De acordo com as correlações obtidas entre os fatores de risco e entre o polimorfismo, o sedentarismo além de ser um fator de risco associado a hipertensão e ao infarto, também está correlacionados ao aumento da idade e ao LDL. Assim, é recomendável o exercício físico tanto de alta como de baixa intensidade, pois reduz os níveis de triglicérides e aumenta os níveis de HDL e além disso, há uma melhora na composição corporal, redução da obesidade e também o aumento do efeito benéfico na pressão arterial.

Talvez um dos fatores de risco mais importantes na gênese da hipertensão seja o tabagismo. O fumo promove aumento dos radicais livres induzindo modificações no colesterol LDL prejudicando a vasodilatação associada ao endotélio. O fumo também induz resistência à insulina o que pode levar à quadros de hipertrigliceridemia²⁰. A diminuição de agentes antioxidantes que também pode ser provocado pelo hábito do tabagismo, favorece a exposição da parede arterial a substâncias vasoconstritoras como a AngII que parece ser aqui o ponto inicial e importante na manifestação da hipertensão porém, as interações que ocorrem em nível do endotélio tem papel crucial na gênese desta patologia e também na manifestação clínica do IAM devido a estes fatores de risco atuarem sinergicamente com o polimorfismo no sentido único de se chegar à morbidade e mortalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Hata A. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. **Life Science**. 1995;57(26): 2385-2395.
- 2 - Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM e Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**. 1992;71: 169-180.
- 3 - Gaillard I, Clauser E e Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. **DNA**. 1989;8 (2): 87-89.
- 4 - Lifton RP. Genetics determinants of human hypertension. **Proc.Nad.Acad.Sci.USA**. 1995; 92:8845-8851.
- 5 - Tiret L, Ricard S, Poirier, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, Evans A, Nicaud V e Cambien F. Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction : the ECTIM study. **Journal of Hypertension**. 1995; 13:311-317.
- 6 - Frossard PM, Hill SH, Elshahat YI, Obineche EN, Bokhari AM, Lestringant GG e Addulle JA. Associations of angiotensinogen gene mutation with hypertension and myocardial inarction in a gulf population. **Clin.Genet**. 1998;54:285-293.
- 7 - Danser AHJ e Schunkert H. Renin-angiotensin system gene polymorphism: potential mechanisms for their association with cardiovascular disease. **European Journal of Pharmacology**. 2000;410: 303-310.
- 8 - Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R e Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. **Journal of Hypertension**. 1999; 17:09-17.
- 9 - Bettinaglio P, Galbusera A, Caprioli J, Orisio S, Perna A, Arnoldi F, Bucchioni S e Noris M. Single Strand Conformation polymorphism (SSCP) as a quick and reliable method to genotype M235T polymorphism of angiotensinogen gene. **Clinical Biochemistry**. 2002;35:363-368.
- 10 - Ortega EH, Fernandez-Aceituno AM, Rodriguez FJ, Perera OH, Nuez FM, Espinosa AD, Pérez DF, Prieto AA e Pérez JCR. The involvement of the renin-angiotensin system gene polymorphisms in the coronary heart disease. **Rev.Esp.Cardiol**. 2002;55(02): 92-99.
- 11 - Hegele RA, Brunt JH, Connely PW. A polimorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure on a genetic isolate. **Circulation**. 1994;90: 2207-2212.

- 12 - Ishigami T, Umemura S, Iwamoto , Tamura K, Hibi K e Yamaguchi S. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. **Circulation**. 1995;91: 951-954.
- 13 - Katsuya T, Koike G, Yee T.W, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ e MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **The Lancet**. 1995;345: 1600-1603.
- 14 - Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, Braniff BA, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF, Rapaport E, Riegel BJ, Russel RO, Smith EE Jr e Weaver WD. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guideline (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). **J.Am.Coll.Cardiol**. 1996;28:1328-1428.
- 15 - III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq.Bras.Cardiol**. 2001; 4-48, Vol77.
- 16 - Sambrook J, Fritsch EF, Manistis T. Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA, 1989; 3vols. 237p.
- 17 - Thomas F, Rudnich A, Bacri AM, Bean K, Guize L e Athanase B. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. **Hypertension**. 2001;37:1256-1261.
- 18 - Engeli S, Negrel R e Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin angiotensin system. **Hypertension**. 2000;35: 1270-1277.
- 19 - Corvol P, Persu A, Gimenez-Roqueplo AP, Jeunemaitre X. Seven lessons from two candidate genes in human essential hypertension: angiotensinogen and epithelial sodium channel. **Hypertension**. 1999;33: 1324-1331.
- 20 - Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JÁ, Miller GJ, Vallance P, Humphries SE e Hingorani AD . Genetic and enviromental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. **Hypertension**. 2001;38:1054-1061.
- 21 - Calfield M, Lavender P, Newell-Price J, Kamdar S, Farral M e Clark AJL. Angiotensinogen in human hyperension. **Hypertension**. 1996;28:1123-1125.
- 22 - WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. **Circulation** 1979; 59: 607-609.

CAPÍTULO II

*Associação dos polimorfismos Glu-298-Asp e T⁷⁸⁶ → C da
ecNOS na Hipertensão e Infarto Agudo do Miocárdio*

Resumo

Associação dos polimorfismos Glu-298-Asp e T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS na hipertensão e infarto agudo do miocárdio

Introdução: Sendo a ecNOS de grande importância na função cardiovascular, a investigação de polimorfismos correlacionando com o aumento do risco de doenças cardiovasculares e determinando a associação destes na origem da hipertensão e infarto agudo do miocárdio e seus efeitos associados a estímulos ambientais, tem sido uma área de constantes pesquisas.

Métodos e Resultados: Para explorar o envolvimento genético da ecNOS na hipertensão e no infarto agudo do miocárdio, foi examinada a possível associação destas patologias com a variante Glu-298-Asp e a mutação encontrada na região promotora da ecNOS denominada de T⁻⁷⁸⁶→C. Indivíduos de raça branca foram consecutivamente selecionados e separados em três grupos: HAS (n=71), HAS/IAM (n=69) e controles normotensos (n=52). A distribuição dos genótipos do polimorfismo Glu-298-Asp foi estatisticamente diferente no grupo HAS comparado com o grupo controle (p=0.023) e foi verificado o risco de 5 vezes de desenvolver a hipertensão associada ao alelo T desfavorável. Não houve diferença significativa para o grupo HAS/IAM (p=0.078). Na presença de fatores de risco convencionais e na presença do IAM, o polimorfismo Glu-298-Asp é significativo embora não seja fator de risco para o IAM isoladamente. O polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C não esteve associado com a gênese da hipertensão e nem com a predisposição ao IAM não sendo verificado nenhum risco de desenvolver estas patologias associadas a este polimorfismo. A existência de um possível novo alelo e um padrão mosaico com relação ao polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C devem ser melhor investigados. O sedentarismo e o tabagismo estiveram associados a hipertensão e ao IAM correlacionando-se com o aumento da idade e ao colesterol LDL.

Conclusão: Em conclusão, somente o polimorfismo Glu-298-Asp foi significativamente associado com a hipertensão sugerindo ser um fator de risco independente para esta patologia enquanto que o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C não esteve associado nem com a hipertensão e nem com a predisposição ao IAM.

Abstract

Association of the polymorphisms Glu-298-Asp and T⁻⁷⁸⁶→C of the eNOS with hypertension and acute myocardial infarction

Background: Given the importance of the eNOS in the cardiovascular function it has been an area of constant research, the investigation of polymorphisms correlating with increase of cardiovascular disease risk and determining the association of these polymorphisms in the origin of hypertension and acute myocardial infarction and its effects associated with environmental risk factors.

Methods and Results: To explore the genetic involvement of the eNOS gene in hypertension and myocardial infarction we examined the possible association between these pathologies including the Glu-298-Asp variant and the mutation in the promoter region denominated T⁻⁷⁸⁶→C. White race individuals were recruited (n=192) and classified in three groups: HAS/AMI (n=69), HAS (n=71) and normotense controls (n=52). The distribution of the genotypes of the Glu-298-Asp polymorphism was significantly different for the HAS group when compared to the control group (p=0.023) and the risk developing hypertension associated to the unfavorable T allele was 5 times greater. There was no significant difference for the HAS/AMI group (p=0.078). In the presence of the conventional risk factors and in the presence of the AMI, the Glu-298-Asp polymorphism is significant although it is not risk factor for the AMI alone. The T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism was neither associated with the genesis of hypertension nor with the predisposition to the AMI not being verified any risk of developing these pathologies associated to this polymorphism. The existence of a possible new allele and a standard mosaic with relationship to the T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism should be investigated better. The relationship to the T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism should be investigated better. The sedentary life style and smoking habit were associated with hypertension and to AMI which were correlated with increasing age and serum total cholesterol.

Conclusion In conclusion, only the Glu-298-Asp polymorphism missense variant was significantly associated with essential hypertension, suggesting to be a factor of independent risk for this pathology while T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism was neither associated with hypertension, nor with the predisposition to myocardial infarct.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) foi identificado como vasodilatador endógeno em 1987 e é também conhecido como fator relaxante endotélio derivado (EDRF)²⁶⁻²⁷. Tornou-se crescente o aparente balanço existente entre o hormônio vasoconstritor AngII e NO onde estas duas moléculas apresentam efeitos antagonistas não somente no tônus vascular, mas também em outras áreas como remodelamento vascular e função renal¹. NO é também conhecido por suprimir a produção de vasoconstritores como ET-1 e AngII².

O NO é uma molécula envolvida ainda nas respostas imunológicas e transmissões neuronais, é altamente difusível tendo uma curta meia-vida e é produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS)³.

No endotélio de animais e humanos, a síntese de NO a partir do aminoácido L-arginina é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (ecNOS, eNOS ou NOSIII), sendo constitutivamente gerada servindo como manutenção basal do tônus vascular². Na parede vascular, o NO se difunde para ativar a enzima solúvel guanilato ciclase (sGC) e produzir um segundo mensageiro denominado de guanosina cíclica monofosfato (cGMP), a qual é responsável pela maioria das ações do NO pela ativação de duas outras proteínas específicas kinases cGMP-dependentes (PKG1 e PKG2)⁴.

Um dos estímulos fisiológicos para a produção de NO pelas células endoteliais é o estresse oxidativo. Outros fatores são a acetilcolina, bradicinina, endotelina, vasopressina e histamina. Inúmeras observações sugerem que o caminho NO/cGMP é prejudicado na hipertensão. O decréscimo na produção de NO é determinante no processo hipertensivo uma vez que a inibição da síntese de NO pela injeção de N^g-monometil - L-arginina (L-NMMA), um antagonista específico da NOS resulta em aumento da pressão arterial em humanos e animais³.

O gene da ecNOS apresenta-se como candidato potencial para o desenvolvimento da hipertensão. Recentemente foram identificadas 3 mutações ligadas na região 5' do gene da ecNOS denominadas: T⁻⁷⁸⁶→C, A⁻⁹²²→C e T¹⁴⁶⁸→A. A incidência destas mutações é relativamente alta em pacientes com espasmos coronários. A mutação T⁻⁷⁸⁶→C resulta em uma redução significativa

(cerca de 50%) na atividade promotora do gene da ecNOS enquanto nenhum efeito foi encontrado nas outras mutações descritas. O acúmulo de evidências sugerem que a mutação T⁻⁷⁸⁶→C pode ser responsável pelo decréscimo na produção de NO nas células endoteliais podendo estar associada com hipertensão e IAM⁵. O decréscimo na transcrição da ecNOS é consistente com a noção de que a produção de NO é reduzida em pacientes portadores da mutação T⁻⁷⁸⁶→C sugerindo que estes pacientes estão predispostos a espasmos coronários².

Segundo Fairchild et al⁵, pacientes com espasmos coronários ou doença renal são associados com polimorfismos na região promotora do gene que promove impacto nos níveis tanto de RNAm quanto da proteína enquanto que pacientes com hipertensão ou DAC são associados com polimorfismos presentes nas regiões dos exons que podem afetar a atividade da enzima.

O polimorfismo encontrado no exon 7 do gene que codifica a ecNOS denominado Glu-298-Asp, leva à mudança do aminoácido Glutamato→Aspartato, pela substituição de G→T na posição 894 do gene e tem sido analisado em populações com pacientes hipertensos, com DAC e com AVC. Este polimorfismo é de relativo interesse pelo fato da substituição ocorrer em uma região conservada de aminoácidos podendo influenciar na função da enzima⁵. Análises computacionais revelaram que a variante Glu-298-Asp resulta em uma mudança conformacional na proteína da ecNOS⁶. Em recentes estudos, foi demonstrado que a ecNOS de pacientes portadores do alelo T é clivada por uma protease ainda não conhecida o que pode explicar o possível mecanismo que prejudica a função da enzima^{5,7}.

Forte associação entre o polimorfismo Glu-298-Asp e o risco de desenvolvimento de DAC foi encontrado em um estudo feito por Hingorani et al⁸. O aumento do risco foi conferido aos indivíduos homozigotos para o alelo T da variante, cerca de 4 vezes o risco comparado com homozigotos para o alelo normal G. Um excesso significativo do alelo T foi também encontrado entre indivíduos com recente IAM quando comparados com controles saudáveis e o *odds ratio* para o risco de ocorrer IAM entre os homozigotos para o alelo T foi de 2,5 vezes maior do que homozigotos para o alelo G.

Segundo Hingorani et al⁸, não foi encontrada associação do polimorfismo Glu-298-Asp com hipertensão, mas que isso não excluía a possibilidade da variante codificar uma proteína hipofuncional. Entretanto, o polimorfismo foi associado como fator de risco para IAM em estudo feito por Hibi et al⁹, mas não informou sobre os mecanismos pelos quais a variante predispõe os pacientes ao IAM.

Ainda não está clara a associação entre o polimorfismo Glu-298-Asp da ecNOS como uma variante genética funcional ou um marcador para uma outra variante funcional próxima a esta ou ainda para um outro gene adjacente⁸.

Dada a importância da ecNOS na função cardiovascular, a investigação de mutações ou polimorfismos do gene da ecNOS correlacionando com o aumento do risco de doenças cardiovasculares tem sido uma área de constantes pesquisas. O alvo principal é determinar a associação do polimorfismo com as doenças cardiovasculares, especialmente com um dos fatores determinantes, a hipertensão e seu efeito associado a estímulos ambientais para obter uma melhor terapêutica e profilaxia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos de Estudo e Critérios de Inclusão

O estudo constou de amostras obtidas em colaboração com o Setor de Hemodinâmica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Instituto do Coração do Triângulo Mineiro. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica (UFU).

Foram incluídos na pesquisa 192 pacientes de raça branca (critério baseado na cor da pele ou cútis) sendo 95 homens e 97 mulheres que foram separados em 3 grupos: Grupo I : pacientes hipertensos (n=71; 33 homens e 38 mulheres); Grupo II : pacientes hipertensos infartados (n=69; 34 homens e 35 mulheres); Grupo III: controles constituídos de indivíduos normotensos (n=52; 27 homens e 25 mulheres).

Os critérios de inclusão adotados foram baseados segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)¹¹. Para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio, tomou-se por base a presença de pelo menos dois dos três critérios: 1- história clínica de dor torácica típica de isquemia; 2 - alterações do segmento ST, supra e infradesnívelamento em eletrocardiograma seriados; 3- elevações dos níveis séricos de marcadores cardíacos, sendo a enzima creatinofosfoquinase (CK-MB) o teste laboratorial usado, segundo Ryan et al¹¹. A hipertensão foi diagnosticada em indivíduos que mantiveram uma PA sistólica > 140mmHg e PA diastólica > 90mmHg. Os valores de referência dos fatores de risco convencionais como níveis elevados de colesterol total, LDL e triglicérides, níveis baixos de HDL e obesidade foram adotados conforme o III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2000)¹²: Colesterol Total >200mg/dl, LDL >159mg/dl, HDL <40mg/dl, Triglicérides > 200mg/dl e IMC >25Kg/m². Os 52 indivíduos incluídos como controle seguiram somente o critério de não ter histórico pessoal de hipertensão não excluindo a possibilidade da existência de outras enfermidades como DAC e diabetes mellitus. Para todos os grupos também foi feita a triagem de história de tabagismo e sedentarismo.

Material Biológico e Isolamento do DNA

O material biológico utilizado foi o sangue periférico obtido mediante termo de consentimento informado e coletados em tubos *Vacutainer* contendo EDTA para evitar coagulação e armazenados a 4°C.

As extrações do DNA genômico foram feitas segundo o método de isolamento de DNA adaptado de Sambrook et al¹³ seguindo o protocolo descrito anteriormente no Capítulo 1.

Todos os cuidados para evitar contaminação tanto cruzada de paciente para paciente como de outros materiais vindos do meio foram tomados.

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo Glu-298-Asp da ecNOS

A região do exon 7 do gene da ecNOS que contém a variante Glu-298-Asp foi amplificada utilizando o par de primers descrito por Hibi et al⁹: 5'- TCC-CTG-AGG-AGG-GCA-TGA-GGC-T-3' e 3'- TGA-GGG-TCA-GAC-AGG-TTC-CT-5'

As reações foram feitas nas seguintes condições: 3µL do DNA genômico, 1und de Taq Polimerase (*Phoneutria*), Tampão da Enzima (1X), 8pmols de cada primer, Dntps 200µM em um volume final de 30µL. A PCR foi realizada em m termociclador MJ. Research, Inc. seguindo o programa de 35 ciclos: 94°C-1min, 61°C-1min, 72°C-1min. O produto final amplificado de 457pb foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado por brometo de etídio (10mg/mL) utilizando marcador de 50pb como referência. A visualização foi feita em aparelho VDS (*Pharmacia Biotech*).

Os produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática utilizando a enzima *BanII* (*Qbiogene*). Na transição de G→T, a enzima perde seu sítio de restrição portanto, reconhece somente o indivíduo normal que mantém o sítio intacto. A enzima *BanII* reconhece o seguinte sítio de restrição:

5'.....GRGCY ↓ C.....3'

3'.....C ↑ YCGRG.....5'

As reações de restrição seguiram o protocolo: 10µL de produto amplificado, 4und da enzima *BanII*, Tampão da enzima (1X), em um volume final de 20µL. As

reações forma submetidas a uma temperatura de 37°C por no mínimo 4h. Posteriormente, os fragmentos digeridos foram visualizados em gel de agarose 3% corado por brometo de etídio. Para os indivíduos normais GG são visualizadas bandas de 320pb e 137pb, indivíduos heterozigotos GT apresentam bandas de 457pb, 320pb e 137pb e indivíduos homozigotos mutantes apresentam a banda original não digerida de 457pb.

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo T⁻⁷⁸⁶ → C da ecNOS

Para análise do polimorfismo contido na região promotora do gene da ecNOS denominado T⁻⁷⁸⁶ → C, utilizou-se o seguinte par de primers descrito por Nakayama et al² : 5'- ATG-CTG-CCA-CCA-GGG-CAT-CA- 3' e 3'- GTC-CTT-GAC-TCT-GAC-ATT-AGG-G- 5'.

A técnica da PCR foi utilizada para amplificar a região de 236pb que cerca a variante seguindo o protocolo: Tampão da enzima Taq polimerase (1x), 5pmols de cada primer, 200µM de Dntps, 1 und de Taq polimerase, 3µl de DNA genômico em um volume final de 30µl. O programa utilizado constou de 35 ciclos : 94°C – 1min, 62°C – 1min e 72°C – min. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Para a genotipagem utilizou-se a técnica LIS-SSPC (Conformação Polimórfica de Fita Simples em baixa força iônica) descrita por Orita et al (1989)¹⁴ na qual cada fita simples de DNA assume uma conformação específica em gel de poliacrilamida baseada da seqüência de bases internas. Utilizou-se um gel de poliacrilamida de 15% (49:1 acrilamida: bisacrilamida – 30%) nas dimensões 15:15: 0,5cm. Foram utilizados 3,5µl do produto amplificado em 20µL de tampão de Lis e cada mistura foi submetida à desnaturação das fitas duplas de DNA por 97°C por 10min. Em seguida, 18µL de cada mistura foi aplicado no gel e submetido a eletroforese vertical à temperatura ambiente e a 200V por 19h em Tampão TBE 1X. O gel posteriormente foi corado com nitrato de prata de acordo com Blum et al (1987)¹⁵ com modificações de Bassam et al (1991)¹⁶.

Análises Estatísticas

Utilizou-se o programa Statistica 5.5 para realizar as análises. Em todas elas, foi utilizado o erro α menor que 5% ($p < 0,05$) para o nível de significância.

O teste do χ^2 foi utilizado para verificar diferenças entre as freqüências gênicas e genótípicas entre os grupos de pacientes e controles. . A variáveis contínuas foram expressas em freqüência e as diferenças entre os grupos foram comparadas também pelo teste do χ^2 . O risco relativo (*Odds Ratio*) foi avaliado para a razão de chances e todas as variáveis foram transformadas em numéricas com valores atribuídos de 0 (zero) para ausência e 1 (um) para presença.

Foram utilizadas análises de regressões múltiplas com distribuição binomial para verificar a associação conjunta dos genótipos e fatores de risco convencionais na gênese da hipertensão e progressão para o IAM. Análises de correlação de Pearson com $p < 0,05$ foram realizadas para verificar as possíveis associações entre fatores de risco e o polimorfismo.

RESULTADOS

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo Glu-298-Asp da ecNOS

Utilizando a técnica PCR de acordo com o protocolo descrito e utilizando os primers indicados, o resultado da amplificação é mostrado da figura 10. Através do marcador de 50pb é possível verificar a presença do fragmento esperado de 457pb.

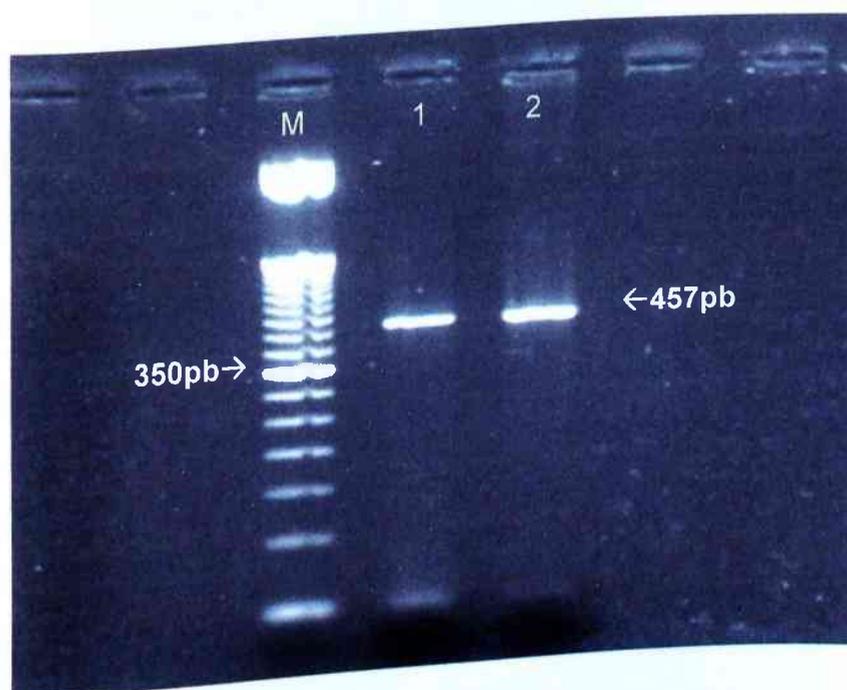


Figura 10 – Gel de agarose 1,5% evidenciando o resultado obtido pela amplificação da região de 457pb que cerca a variante Glu-298-Asp.
M = marcador de 50pb
Colunas 1 e 2 = indivíduos da pesquisa

Todos os indivíduos foram eficientemente genotipados para a variante Glu-298-Asp utilizando a enzima *BanII*. O padrão obtido é mostrado na figura 11 em gel de agarose 3%. Indivíduos homocigotos normais GG aparecem com duas bandas de tamanhos distintos: 320pb e 137pb. Indivíduos heterocigotos GT aparecem com três bandas, sendo duas correspondentes aos normais: 457pb, 320pb e 137pb e finalmente, indivíduos homocigotos mutantes TT aparecem com a única banda de 457pb que não é reconhecida pela enzima devido à transição de G→A.

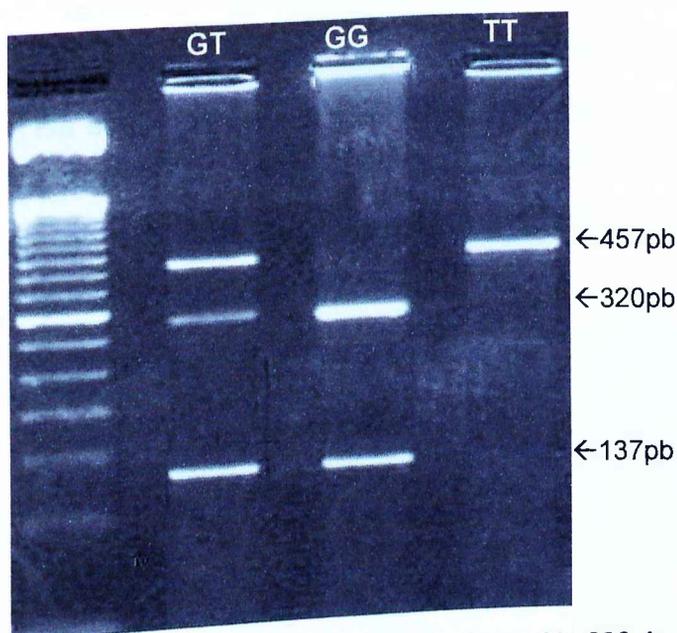


Figura 11 – Padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo Glu-298-Asp. M = marcador de 50pb, GG = indivíduo normal, GT = indivíduo heterozigoto, TT = indivíduo homozigoto mutante

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo $T^{-786} \rightarrow C$ da ecNOS

O resultado obtido pela amplificação utilizando a técnica PCR para a região que cerca a variante $T^{-786} \rightarrow C$ da ecNOS é evidenciado em gel de agarose 1,5% como mostra a figura 12. Pelo marcador de 50pb é possível verificar a presença do fragmento esperado de 236pb.

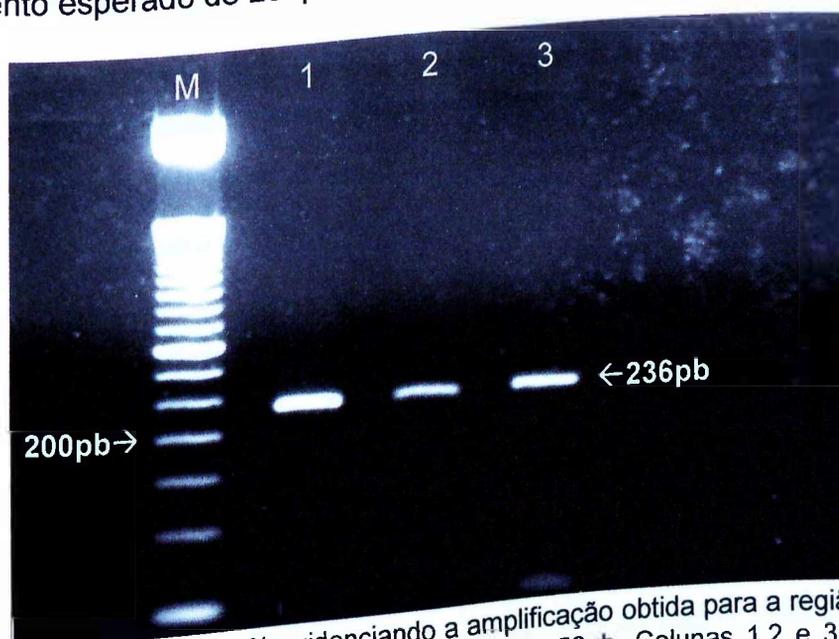


Figura 12 – Gel de agarose 1,5% evidenciando a amplificação obtida para a região de 236pb que cerca a variante $T^{-786} \rightarrow C$ da ecNOS. M= marcador de 50pb, Colunas 1,2 e 3 = indivíduos da pesquisa.

Para obter o padrão de genotipagem deste polimorfismo utilizou-se a técnica LIS-SSCP. A figura 13 demonstra o padrão obtido em gel de poliacrilamida 15%. Da esquerda para a direita, indivíduos: homozigotos normais TT, heterozigotos TC, homozigotos mutantes CC, provável mosaico M, indivíduo heterozigoto diferencial AC, indivíduo homozigoto mutante diferencial AA e indivíduo heterozigoto diferencial TA.

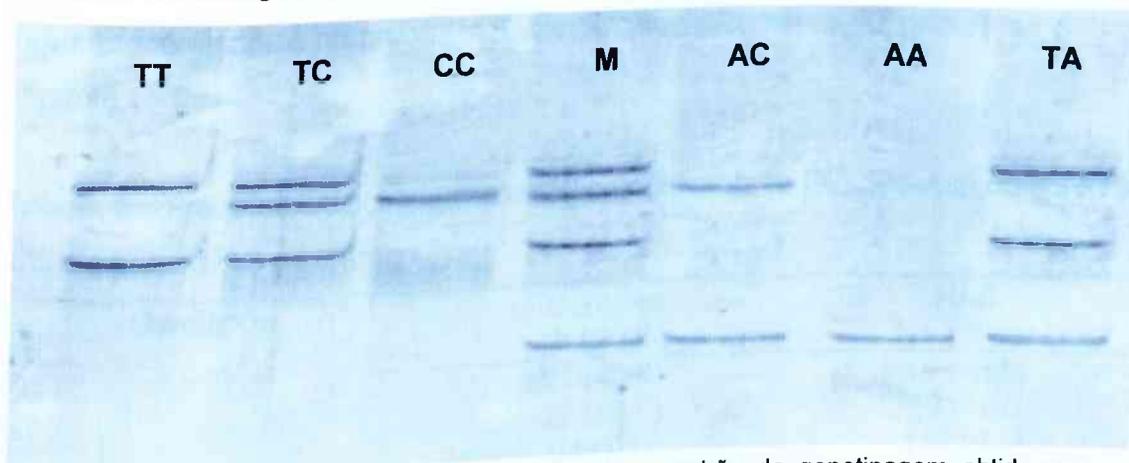


Figura 13- Gel de poliacrilamida 15% evidenciando o padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo $T^{786} \rightarrow C$. M = provável mosaico.

Análise dos polimorfismos Glu-298-Asp e $T^{786} \rightarrow C$ entre casos e controles

• Pacientes hipertensos *versus* controles

Todos os 192 pacientes envolvidos na presente pesquisa foram efetivamente genotipados para ambas as variantes da eNOS, Glu-298-Asp e $T^{786} \rightarrow C$. As características clínicas principais dos indivíduos do grupo controle comparado com o grupo de pacientes HAS estão dispostas na tabela 8.

Tabela 8 – Características clínicas entre pacientes HAS e controles

Variáveis	Controles N=52	HAS N=71	p-valor
Histórico Familiar	(40.4)	(30.9)	ns
Tabagismo	(15.4)	(38.0)	p<0.001
Sedentarismo	(48.0)	(62.0)	p<0.050
IMC >25kg/m ²	26.1 ± 3.76	(54.9) 30.2 ± 1.1	ns
Colesterol Total >200mg/dl	(44.2) 203.3 ± 27.9	(47.8) 196.0 ± 46.49	p<0.001
LDL >159mg/dl	(25.0) 115 ± 25.1	(12.6) 116.0 ± 29.6	p<0.005
HDL <40mg/dl	(5.7) 49.1 ± 7.2	(8.4) 47.6 ± 12.4	p<0.025
Triglicérides >200mg/dl	(3.8) 171.6 ± 58.7	(15.4) 172.4 ± 140.8	p<0.010

Valores expressos em frequência (%), média e desvio padrão

A média de idade entre os dois grupos foi de 60.29 ± 11.08 para o grupo de pacientes HAS e 54.75 ± 11.35 que foram estatisticamente diferentes entre si ($p=0.002$).

Dentre os fatores de risco convencionais, apenas o histórico familiar e IMC não foram significativos. Os outros fatores como tabagismo, sedentarismo, índices elevados de colesterol total, LDL e triglicérides bem como índices baixos HDL foram predominantes no grupo HAS, sendo estatisticamente superiores ao grupo controle.

Tabela 9 – Frequências genótípicas e alélicas da variante Glu-298-Asp da ecNOS entre o grupo HAS e controles.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS N= 71 (%)
GG	21 (40.4)	11 (15.5)
GT	27 (52.0)	49 (69.0)
TT	04 (7.7)	11 (15.5)
Alelos		
G	(66.4)	(50.0)
T	(33.6)	(50.0)

Dos 71 indivíduos do grupo de pacientes HAS genotipados para a variante Glu-298-Asp, 15.5% são homozigotos normais GG, 69% são heterozigotos GT e 15.5% são homozigotos mutantes TT. Pela análise do χ^2 verificou-se que há diferença entre este grupo comparado com o grupo controle onde dos 52 indivíduos, 40.4% são homozigotos normais, 52% são heterozigotos e 7,7% são homozigotos mutantes TT ($\chi^2=5.155$, $p=0.023$). Estes dados estão evidenciados na tabela 9. Com relação à frequência alélica da variante Glu-298-Asp, verifica-se uma maior presença do alelo mutante T dentro do grupo de pacientes HAS em relação ao grupo controle existindo diferença significativa ($\chi^2=12.0$, $p<0.001$).

A estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao genótipo da variante Glu-298-Asp com os respectivos intervalos de confiança foram: para o TT em relação ao GG, OR=5.25 (1.35 – 20.39), para o GT em relação ao GG, OR=3.46 (1.45 – 8.25), para TT + GT em relação ao GG, OR=3.69 (1.58 – 8,63) e para o GG + GT em relação ao TT, OR= 0.45 (0.13 – 1.51). Estes dados estão dispostos na figura 14.

Durante a genotipagem dos mesmos indivíduos para a variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS, surgiu a presença de um possível novo alelo para esta mesma variante encontrada na região promotora, aqui designado pela letra (A), gerando 3 novos genótipos: TA, AC e AA e um possível padrão mosaico. Estes resultados estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 – Frequências dos genótipos identificados entre os grupos controle, HAS e HAS/IAM.

Genótipos	Controle (n=52)	HAS (n=71)	HAS/IAM (n=69)
TT	16 (30.8)	19 (26.9)	20 (30.0)
TC	26 (50.0)	28 (39.4)	32 (46.3)
CC	02 (3.9)	04 (5.6)	03 (4.3)
TA	06 (11.5)	14 (19.7)	10 (14.5)
AC	01 (1.9)	02 (2.8)	04 (5.8)
AA	01 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Mosaico (?)	0 (0.0)	04 (5.6)	0 (0.0)

Nas distribuições gênicas e genotípicas, o alelo A foi considerado como sendo desfavorável e favorável (tabelas 11 e 12 respectivamente) e os indivíduos possivelmente mosaicos analisados juntamente com o genótipo TA. Tanto ao considerar o possível novo alelo A como sendo desfavorável e favorável, os resultados não foram significativos ($\chi^2=0.759, p>0.05$ e $\chi^2=4.06, p>0.05$ respectivamente).

Tabela 11 – Frequências genotípicas e alélicas da variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS entre o grupo HAS e controles, considerando o possível novo alelo como sendo "desfavorável".

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS N= 71 (%)
TT	16 (30.8)	19 (26.8)
TA + TC	32 (61.5)	46 (64.8)
CC + AC + AA	04 (7.7)	6 (8.4)
Alelos		
T	(61.5)	(58.5)
C	(29.8)	(26.8)
A	(8.7)	(14.7)

Tabela 12 – Freqüências genótípicas e alélicas da variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS entre o grupo HAS e controles, considerando o possível novo alelo A como sendo “favorável”.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS N= 71 (%)
TT + TA + AA	23 (44.2)	37 (52.1)
TC + AC	27 (52.0)	30 (42.3)
CC	02 (3.8)	04 (5.6)
Alelos		
T	(61.5)	(58.5)
C	(29.8)	(26.8)
A	(8.7)	(14.7)

A estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associada a variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS, com os respectivos intervalos de confiança foram: para o CC em relação ao TT, OR=1.68 (0.27 – 10.42), para o TC em relação ao TT, OR= 0.87 (0.37 – 2.05), para o CC + TC em relação ao TT, OR=0.93 (0.40 – 2.15), para o AA em relação ao TT, OR=0 (0.40 – 2.15), AC em relação ao TT, OR= 2.52 (0.23 – 26.72), para o TA em relação ao TT, OR= 2.52 (0.80 – 7.88), TA+AC em relação ao TT, OR= 2.16 (0.72 – 6.48) AA + AC + TA em relação ao TT, OR=2.21 (0.77 – 6.32), TA+TC+AA+AC+CC em relação ao TT, OR=1.21 (0.55 – 2.67), TT+TA+TC em relação ao AC+AA+CC, OR=0.76 (0.21 – 2.75), AA+AC em relação ao TA, OR=0.05 (0.06 – 3.74) e para TA em relação ao AC+AA, OR= 2 (0.26 – 14.98). Pelos resultados obtidos, não houve risco de desenvolver hipertensão associada a variante T⁻⁷⁸⁶→C em nenhuma associação realizada como mostra a figura 15.

As análises de regressões logísticas múltiplas com distribuição binomial entre cada polimorfismo associado com os fatores de risco, mostrou que o polimorfismo Glu-298-Asp é fator de risco independente para a gênese da hipertensão (p=0.026). Este resultado está evidenciado na tabela 13. Ao associar o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C com os mesmos fatores este ainda continuou não significativo (p=0.552) como mostra a tabela 14.

Tabela 13 – Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS.

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo Glu-298-Asp	1,00	4.924	0.026 *
Tabagismo	1,00	9.546	0.002 *
Sedentarismo	1,00	0.362	0.547
LDL > 159mg/dl	1,00	0.948	0.330
HDL < 40mg/dl	1,00	4.669	0.030 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.568	0.450
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.293	0.588
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.109	0.741
Histórico Familiar	1,00	0.265	0.265

Tabela 14 – Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo T ⁻⁷⁸⁶ →C	1,00	0.353	0.552
Tabagismo	1,00	9.546	0.002 *
Sedentarismo	1,00	0.362	0.547
LDL > 159mg/dl	1,00	0.948	0.330
HDL < 40mg/dl	1,00	4.669	0.030 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.568	0.450
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.293	0.588
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.109	0.741
Histórico Familiar	1,00	0.265	0.265

- **Pacientes hipertensos com infarto *versus* controle**

As características clínicas principais dos grupos de pacientes HAS/IAM e controles foram comparadas e estão dispostas na tabela 15. A média da idade dos pacientes hipertensos com infarto (HAS/IAM) foi de 60.57±11.22 anos de idade, estatisticamente diferente do grupo controle que foi de 54.75±11.35 (p=0.002).

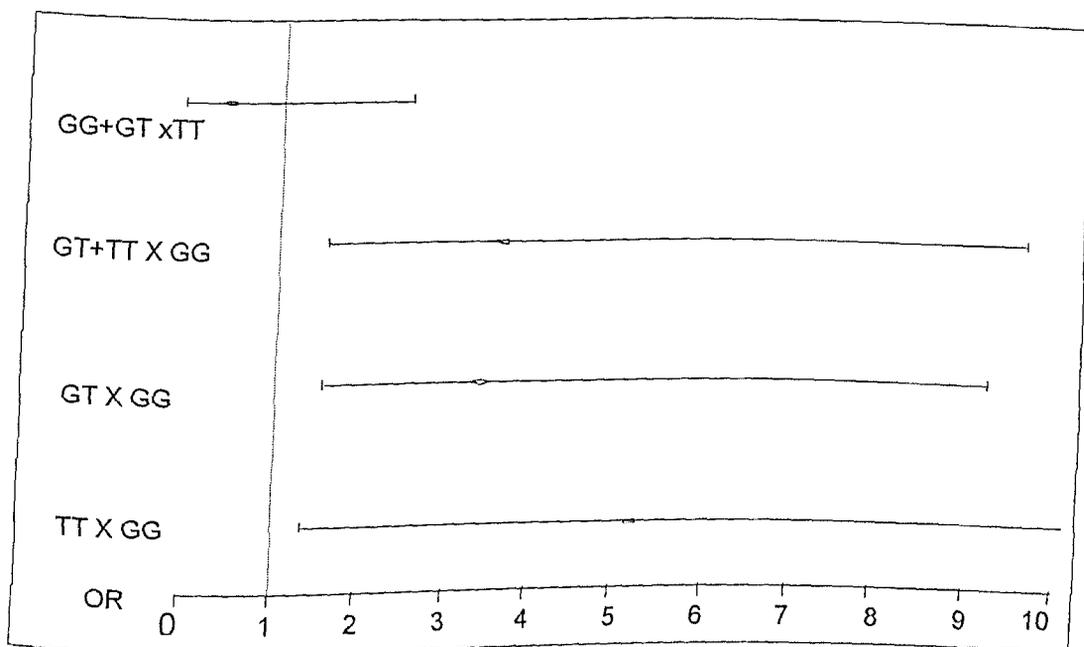


Figura 14 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo Glu-298-Asp da eNOS no grupo de pacientes HAS

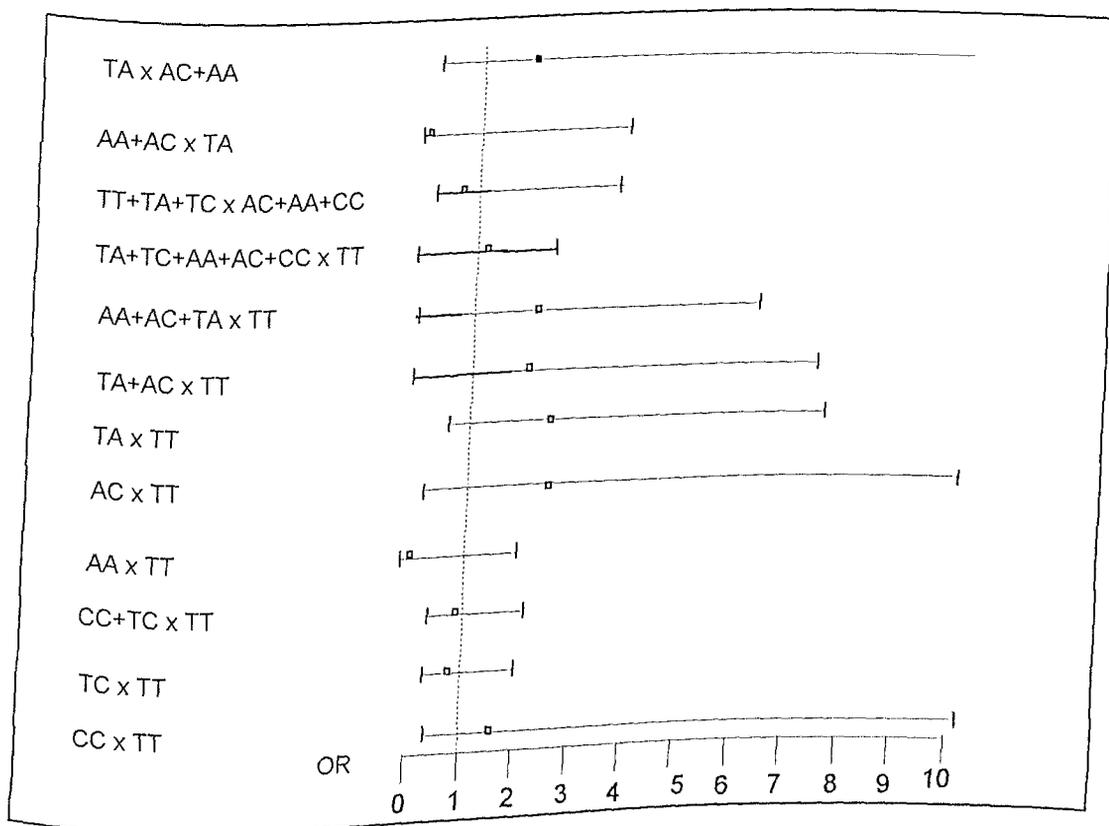


Figura 15 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associado ao polimorfismo T⁷⁸⁶→C da eNOS no grupo de pacientes HAS

Tabela 15 – Características clínicas entre pacientes HAS/IAM e controles

Variáveis	Controles N=52	HAS +IAM N=69	p-valor
Histórico Familiar	(40.4)	(44.9)	ns
Tabagismo	(15.4)	(47.8)	p<0.001
Sedentarismo	(48.0)	(72.5)	p<0.050
IMC >25kg/m ²	(44.2) 26.1 ± 3.76	(52.2) 27.7 ± 2.13	ns
Colesterol Total >200mg/dl	(25.0) 203.3 ± 27.9	(71.0) 216.8 ± 33.4	p<0.050
LDL >159mg/dl	(5.7) 115 ± 25.1	(18.8) 131.0 ± 30.6	p<0.005
HDL <40mg/dl	(3.8) 49.1 ± 7.2	(15.9) 45.5 ± 8.2	p<0.025
Triglicérides >200mg/dl	(7.7) 171.6 ± 58.7	(27.5) 181.0 ± 55.8	p<0.001

Valores expressos em frequência (%), média e desvio padrão

No grupo de pacientes hipertensos com infarto o número de indivíduos fumantes (44.9%) foi maior tanto em comparação com o grupo controle (15.4%) como no grupo de pacientes hipertensos (38%). Todos os outros fatores de risco, como níveis elevados de colesterol total (71%), LDL (18.8%), triglicérides (27.5%), bem como sedentarismo (72.5%), IMC (52.2%) e histórico familiar (44.9%) foram superiores no grupo de pacientes HAS/IAM comparado com os dois outros grupos, porém o IMC e o histórico familiar, assim como observado para o grupo de pacientes HAS, não foram significativos tanto para a gênese da hipertensão como para a progressão para o infarto agudo do miocárdio. A tabela 16 mostra os resultados obtidos em relação às frequências gênicas e genotípicas para o polimorfismo Glu-298-Asp no grupo de pacientes HAS/IAM comparado com o grupo controle.

Tabela 16 – Frequências genotípicas e alélicas da variante Glu-298-Asp da ecNOS entre o grupo HAS/IAM e controles.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS/IAM N= 69 (%)
GG	21 (40.4)	20 (29.0)
GT	27 (52.0)	41 (59.4)
TT	04 (7.7)	08 (11.6)
Alelos		
G	(66.4)	(58.7)
T	(33.6)	(41.3)

Dos 69 indivíduos do grupo de pacientes HAS/IAM genotipados para a variante Glu-298-Asp, 29% são homozigotos normais GG, 59.4% são heterozigotos GT e 11.6% são homozigotos mutantes. As freqüências encontradas para este polimorfismo dentro deste grupo não foram estatisticamente diferentes do grupo controle onde dos 52 indivíduos, 40.4% são homozigotos normais GG, 52% são heterozigotos GT e apenas 7.7% são homozigotos mutantes ($\chi^2=3.089$, $p=0.078$). Para as freqüências alélicas também não houve diferença entre os grupos embora a presença do alelo mutante T seja maior no grupo de pacientes HAS/IAM ($\chi^2=2.65$, $p>0.05$).

Considerando o risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o infarto agudo do miocárdio com os respectivos intervalos de confiança associado ao polimorfismo Glu-298-Asp, os valores encontrados foram: para o TT em relação ao GG, OR=2.10 (0.54-8.07), para o GT em relação ao GG, OR=1.59 (0.72-3.48), para o TT+GT em relação ao GG, OR=1.65 (0.77-3.54) e para o GG+GT em relação ao TT, OR=0.51 (0.14-1.80). Em nenhuma associação verificou-se risco de desenvolver hipertensão e progressão para o IAM em intervalo de confiança estatisticamente significativo como demonstrado na figura 16. Com relação ao polimorfismo T⁷⁸⁶→C, as distribuições das freqüências gênicas e genóticas para os 69 indivíduos do grupo de pacientes HAS/IAM se encontram nas tabelas 17 e 18.

Considerando o alelo A como sendo desfavorável, 29% dos indivíduos do grupo HAS/IAM possuem o genótipo homozigoto TT, 60.9% possuem os genótipos TA+TC e 10.1% possuem os genótipos CC+AC+AA. Estes resultados não foram significativos comparado com o grupo controle onde dos 52 indivíduos, 30.8% possuem o genótipo TT, 61.5% possuem os genótipos TA+TC e apenas 7.7% possuem os genótipos CC+AC+AA ($\chi^2=0.858$, $p>0.05$).

Tabela 17 – Frequências genóticas e alélicas da variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS entre o grupo HAS/IAM e controles, considerando o possível novo alelo A como sendo “desfavorável”.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS/IAM N= 69 (%)
TT	16 (30.8)	20 (29.0)
TC + TA	32 (61.5)	42 (60.9)
CC +AC+AA	04 (7.7)	07 (10.1)
Alelos		
T	(61,5)	(59.4)
C	(29,8)	(30.4)
A	(8,7)	(10.2)

Tabela 18 – Frequências genóticas e alélicas da variante T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS entre o grupo HAS/IAM e controles, considerando o possível novo alelo A como sendo “favorável”.

Genótipos	Controle N=52 (%)	HAS/IAM N= 69 (%)
TT + TA + AA	23 (44.2)	30 (43.4)
TC + AC	27 (52.0)	36 (52.2)
CC	02 (3.8)	03 (4.4)
Alelos		
T	(61.5)	(59.4)
C	(29.8)	(30.4)
A	(8.7)	(10.2)

Ao assumir que o alelo A poderia ter o mesmo efeito do alelo T, também não houve diferença significativa onde 43.4% dos pacientes do grupo de pacientes HAS/IAM possuíram os genótipos TT+TA+AA, 52.2% possuíram os genótipos TC+AC e 4.4% possuíram o genótipo CC ($\chi^2=0.109$, $p>0.05$). Ignorando a presença de genótipos contendo o alelo A ou seja, analisando somente os genótipos TT, TC e CC, também não houve diferença significativa entre o grupo de pacientes HAS/IAM comparado com o grupo controle ($\chi^2=0.318$, $p>0.05$). Em relação às frequências alélicas também não houve diferença entre os grupos ($\chi^2=0.689$, $p>0.05$).

Ao verificarmos todas as possíveis interações entre os genótipos do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C para verificar o risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o infarto, os resultados foram: para o CC em relação ao TT,

OR=1,200 (0,1784-8,0728), para o TC em relação ao TT, OR=0.98 (0.42-2.27), para o CC+TC em relação ao TT, OR=1 (0.43-2.27), para o AA em relação ao TT, OR=0 (0.43-2.27), para o AC em relação ao TT, OR=3.20 (0.32-31.53), para o AA+AC em relação ao TT, OR=1.60 (0.25-9.87), para o TA em relação ao TT, OR= 1.33 (0.39-4.45), para o TA+AC em relação ao TT, OR=1.60 (0.52-4.90), para o AA+AC+TA em relação ao TT, OR=1.40 (0.47-4.16), para o TA+TC+AA+AC+CC em relação ao TT, OR=1.08 (0.49-2.38), para o TT+TA+TC em relação ao AC+AA+CC, OR=0.73 (0.20-2.66), para o AA+AC em relação ao TA, OR=1.20 (0.16-8.65) e para o TA em relação ao AC+AA, OR=0.83 (0.11-6.01). Em nenhuma associação verificou-se o risco de desenvolver hipertensão e progressão para o IAM em intervalo de confiança estatisticamente significativo como demonstra na figura 17.

As análises de regressões logísticas múltiplas com distribuição binomial entre cada polimorfismo associado com os fatores de risco, mostrou que o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp continua sendo significativo mesmo na presença de outros fatores de risco ($p=0.010$). Este resultado está evidenciado na tabela 19. Ao verificar o efeito do polimorfismo $T^{-786} \rightarrow C$ com os mesmos fatores no grupo de pacientes HAS/IAM, este ainda continuou não significativo ($p=0.278$) como mostra a tabela 20.

Tabela 19 – Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo Glu-298-Asp	1,00	6.541	0.010 *
Tabagismo	1,00	7.163	0.007 *
Sedentarismo	1,00	0.692	0.405
LDL > 159mg/dl	1,00	1.150	0.283
HDL < 40mg/dl	1,00	4.965	0.025 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.060	0.805
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.005	0.941
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.020	0.886
Histórico Familiar	1,00	0.723	0.394

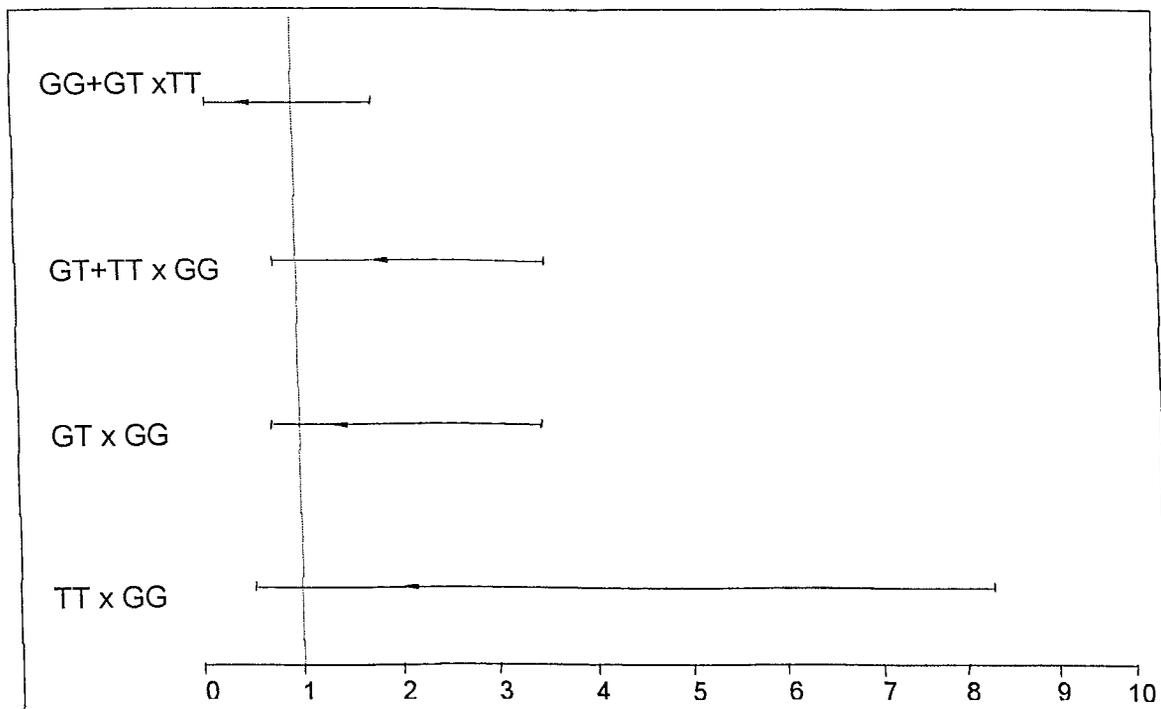


Figura 16 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o IAM associado ao polimorfismo Glu-298-Asp da eNOS no grupo de pacientes HAS/IAM

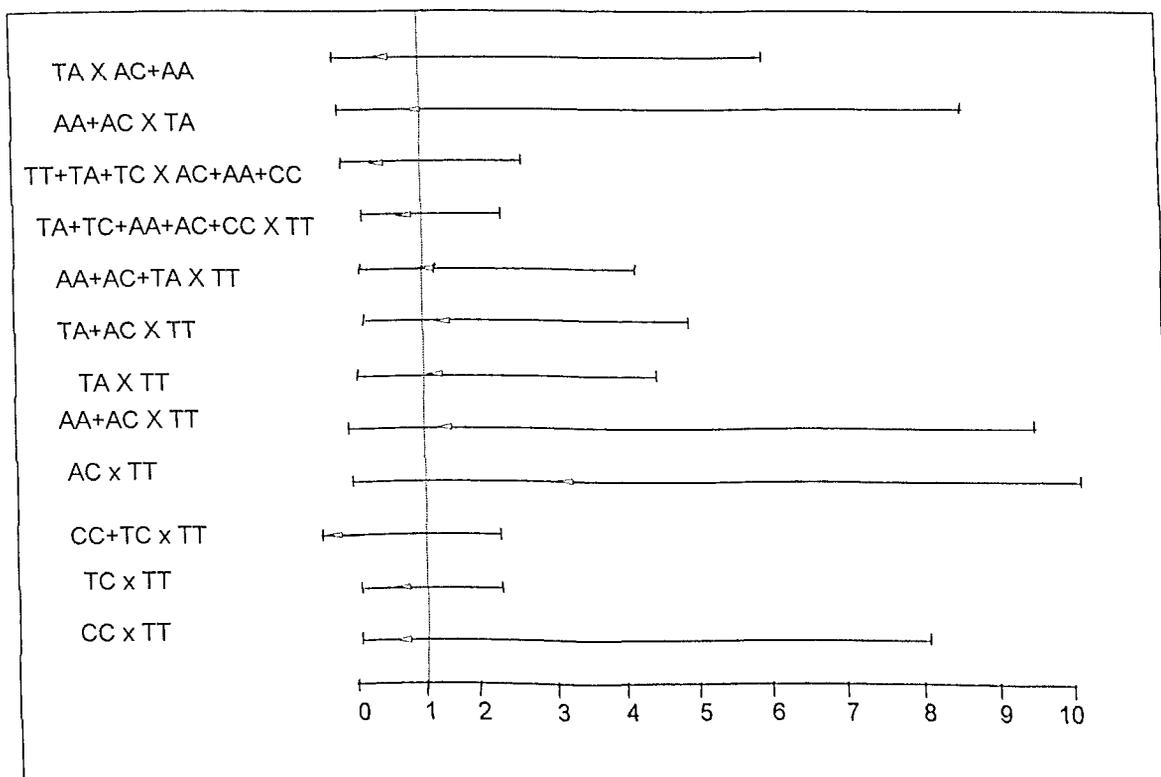


Figura 17 – Estimativa de risco de desenvolver a hipertensão e progressão para o IAM associado ao polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C da eNOS no grupo de pacientes HAS/IAM

Tabela 20 – Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo T⁷⁸⁶→C associado aos fatores de risco convencionais no grupo de pacientes HAS/IAM

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo T ⁷⁸⁶ →C	1,00	1.172	0.278
Tabagismo	1,00	7.163	0.007 *
Sedentarismo	1,00	0.692	0.405
LDL > 159mg/dl	1,00	1.150	0.283
HDL < 40mg/dl	1,00	4.965	0.025 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1,00	0.060	0.805
Triglicérides > 200mg/dl	1,00	0.005	0.941
IMC > 25Kg/m ²	1,00	0.020	0.886
Histórico Familiar	1,00	0.723	0.394

Para verificar todas as possíveis associações entre os fatores de risco e entre os polimorfismo Glu-298-Asp e T⁷⁸⁶→C, utilizou-se as análises de Correlação de Pearson com $p < 0,05$. Os resultados estão dispostos na tabela 21. Os valores em vermelho são valores significativos com $p < 0,05$.

Tabela 21 – Correlações entre todas as variáveis e entre os polimorfismos Glu-298-Asp e T⁻⁷⁸⁶→C da ecNOS.

	IAM	HAS	HAS/IAM	IDADE	GLU	TC	TABA	SED	LDL	HDL	CT	TG	IMC	
IAM	-0.104													
HAS	0.0298	0.2006												
HAS/IAM	-0.004	0.7434	0.7187											
IDADE	-0.09	0.1861	0.2166	0.17039										
GLU	-0.068	-0.065	0.1885	0.07719	0.0093									
T/C	0.0413	-0.049	0.0837	0.00923	-0.079	0.3113								
TABA	-0.052	0.2082	0.232	0.26394	0.0421	0.0935	0.058							
SED	0.0616	0.1494	0.1201	0.18278	0.2393	-0.056	0.027	0.1119						
LDL	-0.087	0.1321	0.1385	0.19834	0.1869	0.0177	0.049	0.1062	0.19799					
HDL	-0.048	-0.074	0.1589	0.0475	-0.022	-0.009	-0.09	-0.0514	-0.052	-0.008				
CT	-0.012	0.2858	0.0661	0.20348	-0.005	0.0312	0.144	-0.0149	0.09394	0.2351	-0.1945			
TG	0.0086	0.1971	0.136	0.19032	0.0027	0.0999	0.044	0.0668	0.02091	0.0507	0.1776	0.1895		
IMC	0.094	-0.04	0.0379	0.00831	-0.072	0.1352	0.153	0.0377	0.00135	-0.113	0.0155	-0.055	0.059	
HF	0.024	0.1395	-0.03	0.05507	0.0728	0.0749	0.09	0.1062	0.03904	-0.034	-0.0607	0.0689	0.047	0.134

IAM: infarto agudo do miocárdio, HAS: hipertensão, GLU: polimorfismo Glu-298-Asp, T/C: polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C, TABA: tabagismo, SED: sedentarismo, CT: colesterol total, TG: triglicérides, HF: histórico familiar.

DISCUSSÃO

Desde a identificação do óxido nítrico (NO) como importante fator relaxante endotélio derivado, tem surgido inúmeras informações a respeito dos seus papéis fisiológicos e patofisiológicos²⁶⁻²⁷. A sua produção basal contribui para o tônus vascular, regulação do fluxo e pressão sanguínea além de inibir a agregação e adesão plaquetária, proliferação das células vasculares musculares lisas e inibição da adesão leucocitária. A disfunção deste importante mecanismo pode promover aterogênese por exposição da parede endotelial a fatores vasoconstritores que atuam no vasoespasma aumentando o risco de trombose levando ao IAM⁹.

A patogênese da hipertensão é multifatorial e envolve tanto mecanismos genéticos como ambientais. Alterações no metabolismo do NO pode ser um fator que contribui para a gênese desta patologia¹⁷.

Os fatores de risco para a hipertensão foram analisados para os três grupos considerados HAS, HAS/IAM e controles, verificando uma maior prevalência dos fatores de risco nos dois grupos de pacientes.

Em relação ao tabagismo, os números encontrados foram relativamente altos nos dois grupos de pacientes comparado com o grupo controle sendo 38% dos indivíduos do grupo HAS e 47.8% dos indivíduos do grupo HAS/IAM contra apenas 15% dos indivíduos do grupo controle. Segundo Álvarez et al¹⁸, o fumo pode induzir mudanças na expressão da ecNOS e da ECA e agindo sobre polimorfismos nos respectivos genes pode modular o risco de DAC entre fumantes. Vários estudos comprovam que o consumo de cigarros por períodos relativamente longos, está associado com a diminuição dos níveis plasmáticos de NO e o aumento do estresse oxidativo levando à disfunção endotelial¹⁹.

O papel fisiológico do NO na regulação do tônus vascular pelo endotélio é diminuído durante o quadro de hipercolesterolemia que prejudica o relaxamento celular via indução de mecanismos sensíveis à oxidação²⁰. A hipercolesterolemia inclui a modificação de lipídeos, aumento da geração de radicais superóxido (O_2^-), seguida da degradação do NO além de reduzir a afinidade da ecNOS pela L-arginina pelo aumento dos níveis de antagonistas circulantes como por exemplo o ADMA.

Com relação as dislipidemias observadas tanto no grupo de pacientes HAS como no grupo de pacientes HAS/IAM apresentaram maior prevalência de quadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, sendo encontrado para o grupo de pacientes HAS 48.8% dos pacientes com níveis de colesterol total elevado, 12.6% com níveis elevados de LDL, 15.4% com níveis elevados de triglicérides e 8.4% dos pacientes com níveis baixos de HDL. Todos eles sendo estatisticamente superiores ao grupo controle. O mesmo ocorre para o grupo de pacientes HAS/IAM onde estes fatores foram ainda maiores tanto em comparação com o grupo controle como para o grupo de pacientes HAS, sendo os valores de colesterol elevado (71%), LDL (18.8%), HDL (15.9%) e triglicérides (27.5%). O LDL pode ser oxidado e ser o responsável por grandes danos na parede vascular atuando tanto no distúrbio da função relaxante como atuar diretamente sobre as substâncias vasodilatadoras.

Miyamoto et al²¹ foram os primeiros a associar polimorfismos da ecNOS com a hipertensão. O polimorfismo Glu-298-Asp na presente pesquisa, foi considerado como fator de risco independente para a hipertensão ($\chi^2=5.155$, $p=0.023$) onde observamos uma significativa diminuição da frequência do genótipo homozigoto normal GG e um aumento das frequências dos genótipos desfavoráveis GT e TT no grupo de pacientes hipertensos comparado com o grupo controle. De acordo com Hingorani et al⁸, o aumento do risco também de desenvolver DAC é conferido aos homozigotos TT onde o valor chega a ser 4 vezes maior comparado com homozigotos normais. Pelo fato do NO ser considerado ateroprotetor, o excesso de risco entre os indivíduos TT pode refletir uma redução na soma ou atividade da ecNOS entre estes mesmos indivíduos. Os resultados aqui obtidos com relação ao grupo de pacientes HAS, resultaram em um aumento do risco de 5 vezes com relação aos homozigotos mutantes TT comparado com os homozigotos normais GG em desenvolver a hipertensão. Uma diminuição no risco de desenvolver a hipertensão quando se compara o genótipo GT com o GG (3 vezes maior), sugere que o risco conferido ao alelo T não é predominantemente expresso e que o aumento do risco está confinado aos homozigotos mutantes TT. O polimorfismo Glu-298-Asp esteve aqui relacionado com a gênese da hipertensão mas não com a predisposição ao IAM. De acordo com Fairchild et al⁵ foi demonstrado que a ecNOS de pacientes portadores do

alelo T é clivada por uma protease ainda não conhecida o que pode explicar o possível mecanismo que prejudica a função da enzima. Ao ocorrer a substituição de aminoácidos Glu→Asp a enzima fica suscetível à hidrólise ácida. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes HAS/IAM e o grupo controle ($\chi^2=3.0892$, $p=0.07882$) possivelmente devido a outras interações genéticas que estão relacionadas com a manifestação do IAM e devido ao índice elevado de fatores de risco presentes neste grupo. Isto também pode ser visualizado quando são verificadas as estimativas de risco do polimorfismo em relação ao IAM onde não houve nenhum resultado estatisticamente significativo. Podemos sugerir portanto, que para se chegar a manifestação clínica do IAM não depende somente do polimorfismo Glu-298-Asp.

Durante a genotipagem dos indivíduos para a variante T⁻⁷⁸⁶→C surgiram padrões de banda que diferiram dos padrões já descritos em literatura. Esta diferença se deu em apenas uma única banda, a qual foi sugerida o termo (A). Surgiu assim, a hipótese de ser um possível novo alelo baseado nas observações de segregação de bandas entre os três novos genótipos e os três genótipos já descritos, no fato de termos usado um par de primers específico para o polimorfismo em questão e ainda na informação de que é desconhecida a presença de algum outro polimorfismo ou de uma mutação nova que esteja dentro desta mesma região que cerca o par de primers. Este fato está descrito dentro desta mesma região que cerca o par de primers. Este fato está sendo confirmado através de clonagem e sequenciamento. Em adição ao possível novo alelo A, surgiu também a possibilidade da existência de indivíduos mosaicos. Este fato foi baseado no padrão de banda que foi obtido e visualizado na figura 13, onde estes indivíduos possuem bandas correspondentes a todos os outros genótipos identificados. Isto talvez signifique que estes indivíduos possam ter clones celulares com 2 ou mais genótipos diferentes. Este fenômeno também deverá ser confirmado através de cultura celular.

De acordo com Hyndmann et al¹⁷, o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C estaria relacionado com a hipertensão e indivíduos com o genótipo CC possuem um aumento de 4,4mmHg na pressão sanguínea, mas que este fato seria mais a nível individual do que a nível de grupo. O polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C na presente pesquisa não foi associado com a gênese da hipertensão e nem com predisposição ao IAM e não foi verificado nenhum risco relacionado ao

polimorfismo em intervalo de confiança estatisticamente significativo em todas as associações possíveis. Segundo Nakayama et al²⁵, o acúmulo de evidências sugerem que o polimorfismo possa ser o responsável pelo decréscimo na produção do NO endotelial já que a variação promove redução da transcrição do gene, entretanto este fato não tem sido completamente comprovado.

Se é verdadeira esta redução na transcrição do gene ecNOS o déficit talvez possa ser suprido pela indução da transcrição da outra isoforma iNOS porém, a iNOS é expressa somente pelo estímulo de citocinas sob condições patológicas como por exemplo o estresse oxidativo e a instalação de um processo inflamatório além do que, diante do estresse oxidativo o aumento do inibidor ADMA também pode promover inibição da iNOS. Em adição, o possível novo alelo A encontrado na presente pesquisa pode ter uma participação na medida em que pode conferir papel protetor a indivíduos hipertensos embora esta análise também não tenha sido significativa. Isto pode ser sugerido pelo fato da frequência do alelo A ter sido maior no grupo de hipertensos. É conhecido que existe um fator de regulação negativo que se liga na seqüência do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C portanto, o próprio polimorfismo ou ainda o alelo A talvez possam inibir este efeito negativo sob a transcrição do gene ou que ainda nenhum dos dois, tanto o polimorfismo como o alelo A tenha efeito algum sobre a transcrição do gene não influenciando na gênese da hipertensão. O estresse oxidativo em resposta à substâncias vasoconstritoras estimula a síntese de NO porém, gera radicais superóxido (O₂⁻). Os radicais superóxido são precursores de outras espécies de oxigênio reativas (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Drummond et al²² demonstraram que H₂O₂ aumenta cerca de 3 vezes a taxa de transcrição do gene ecNOS promovendo aumento do mRNA e da expressão da proteína funcional além de estabilizar a mensagem após transcrição sugerindo um mecanismo compensatório importante. Mesmo que haja a diminuição da transcrição devido ao polimorfismo, existem vários mecanismos direcionados à compensar este déficit. Mesmo ao ignorar a presença dos genótipos contendo o alelo A ou seja, analisando somente os genótipos já descritos em literatura (TT, TC e CC), não temos também nenhuma associação com a hipertensão ($\chi^2=2.34$, $p>0.05$).

Ao verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp juntamente com fatores de risco adicionais, verificou-se que ambos são importantes para a gênese da hipertensão. A ausência de uma proteína funcional devido ao polimorfismo, expõe o endotélio a estímulos de substâncias vasoconstritoras que além de gerar radicais superóxido que contribuem para a degradação do NO, há o aumento do inibidor ADMA que compete com a L-arginina além de haver peroxidação lipídica. Agentes oxidantes, inflamatórios e citocinas comprometem a homeostase do endotélio podendo aumentar a expressão e secreção de fatores de crescimento e envolvimento de migração celular. Algumas interações podem ser verificadas nas análises de correlação onde verifica-se que há uma associação entre alguns fatores de risco que estão relacionados entre si e entre os polimorfismos.

O polimorfismo Glu-298-Asp na presente pesquisa foi considerado como fator de risco independente para a hipertensão não estando relacionado diretamente com o IAM porém, determina um passo crucial para outras interações tanto com fatores ambientais quanto genéticos para a manifestação do mesmo.

Embora o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C esteja associado com o polimorfismo Glu-298-Asp como demonstrado nas correlações, não há evidências da influência de um sobre o outro. O polimorfismo T⁻⁷⁸⁶→C poderia estar relacionado com a regulação da expressão gênica, já que existem vários fatores relacionados a esta função na região promotora e que talvez possa exercer alguma atividade sobre o polimorfismo Glu-298-Asp também no que diz respeito a sua suscetibilidade a hidrólise proteolítica intracelular. Porém, estas suposições merecem ser melhor investigadas.

Fatores como o tabagismo e sedentarismo demonstram estar relacionados no sentido de contribuir negativamente para a manifestação do fenótipo hipertensivo e IAM na medida em que o fumo reduz a geração de NO segundo Jeerooburkhan et al²⁴, estimulando a geração de radicais livres, formação de LDL-ox que diminui a atividade e expressão da eNOS além de diminuir a expressão da enzima superóxido dismutase extracelular (ecSOD) que tem papel antioxidante e ainda reduz em graus variáveis os níveis de HDL que transportam colesterol até o fígado onde esse será eliminado. As partículas de VLDL trocam triglicérides por ésteres de colesterol com as HDL e LDL conseqüentemente, a diminuição no níveis de HDL podem ter um papel no quadro de hipertrigliceridemia. O HDL

também é o responsável por levar as partículas de colesterol até o fígado onde este será degradado. Na sua ausência, os níveis de colesterol aumentam devido ao fato também de que maiores concentrações de colesterol levam a formação de derivados que inibem alostericamente a enzima HMG-CoA (hidróxi-metil glutaril-CoA redutase) que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático, aumentando também a degradação e diminuição da síntese da mesma.

Portanto, a presença de polimorfismos na eNOS como o Glu-298-Asp, pode desencadear tanto o fenótipo hipertensivo isoladamente pela suposta falta da enzima funcional ou ainda atuar juntamente com fatores de risco na manifestação de quadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia com subsequente manifestação do IAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Millat LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. **Regulatory Peptides**. 1999;81:1-10.
- 2 - Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y e Nakao K. T-786→C mutation in the 5'flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation**. 1999;99:2864-2870.
- 3 - Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P e Soubrier F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. **Circulation**. 1995;91: 96-102.
- 4 - Gewaltig MT. & Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**. 2000;55: 250-260.
- 5 - Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Grattons JP, McCabe TJ e Sessa W. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu²⁹⁸→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**. 2001;276(29):26674-26679.
- 6 - Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yaoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamisu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H e Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**. 1998;32:3-8.
- 7 - Gardemman A, Lohre J, Cayci S, Kaz N, Tillmanns H e Haberbosh W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. **Atherosclerosis**. 2002;160: 167-175.
- 8 - Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Moneith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM e Brown MJ . A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸→ Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**. 1999;100: 1515-1520.
- 9 - Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujia T, Ochiai H, Kosuge M, Watnanbe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura, Ishii M e Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. **Hypertension**. 1998;32: 521-526.

- 10 - WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. **Circulation** 1979; 59: 607-609.
- 11 - Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, Braniff BA, Brooks NH, Califf RM, Hillis LD, Hiratzka LF, Rapaport E, Riegel BJ, Russel RO, Smith EE Jr e Weaver WD. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guideline (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). **J.Am.Coll.Cardiol.** 1996;28:1328-1428.
- 12 - III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. (2001) **Arq.Bras.Cardiol.** Vol 77. 4-48.
- 13 - Sambrook J, Fritsch EF, Manitis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A. 1989; 3vols; 237p.
- 14 - Orita M, Iwahana H, Kanazawa H et al. Detection of polymorphism of human DNA by gel eletrophoresis as single strand conformation polymorphism. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 1989;86: 2766-2770.
- 15 - Blum H, Beirg H e Gross HJ. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Eletrophoresis.** 1987;8:93-99.
- 16 - Bassam BJ, Caetano-Anolles G e Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry.** 1991;196:80-83.
- 17 - Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, Lonn E, Charbonneau F e Anderson TJ. The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. **Hypertension.** 2002;39:919-922.
- 18 - Álvarez R, González P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, Cortina A, Merino E, González I, Alvarez V e Coto E. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry.** 2001;Vol5 (4): 343-348.
- 19- Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N e Baron AD . Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. **J.Clin.Invest.** 1994;94:1172-1179.
- 20 - Napoli C e Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry.** 2001;5(2): 88-97.

- 21 - Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. **Hypertension**. 1998;32:3-8.
- 22 - Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S e Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circ.Res**. 2000;86:347-354.
- 23 - Giannini SD, Diament J e Góis JM. Aterogênese: novos conceitos. **Arq.Bras.Cardiol**. 1998;51(1): 37-41.
- 24 - Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JÁ, Miller GJ, Vallance P, Humphries SE e Hingorani AD. Genetic and enviromental determinants of plasma nitrogen oxides and risk ischemic heart disease. **Hypertension**. 2001;38:1054-1061.
- 25 - Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Mizuno Y, Harada E, Nakamura S, Ito T, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y e Nakao K. T⁷⁸⁶→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocadial infaction, especially without coronary organic stenosis. **Am.J.Cardiol**. 2000; 86: 628-634.
- 26 - Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pahophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev**. 1991; 43: 109-142.
- 27 - Moncada S e Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl.J.Med**. 1993; 329: 2002-2012.

CAPÍTULO III

Interações entre Fatores de Risco Convencionais e Polimorfismos Gênicos dos Genes do AGT humano e ecNOS na hipertensão

Resumo

Interações entre fatores de risco convencionais e polimorfismos gênicos do angiotensinogênio humano (AGT) e ecNOS na hipertensão

Introdução: Variações moleculares no AGT e ecNOS podem nos levar ao conhecimento de múltiplas interações que ocorrem entre AngII e óxido nítrico na presença e na ausência de fatores de risco convencionais e suas conseqüências tanto para a saúde como para diversas patologias cardiovasculares.

Métodos e Resultados: Indivíduos de raça branca (n=192) forma consecutivamente recrutados e separados em dois grupos: pacientes hipertensos (n=140) e controles normotensos (n=52). A distribuição dos genótipos dos polimorfismos M235T e Glu-298-Asp, demonstrou que ambos são fatores de risco independentes na gênese da hipertensão ($p=0.023$ e $p=0.008$ respectivamente). Na presença simultânea de ambos os polimorfismos existiu diferença extremamente significativa ($p=0.001$) ao comparar com o grupo controle. O risco de desenvolver a hipertensão associada a presença de ambos os alelos desfavoráveis foi de 2.3 vezes maior (OR=2.26, 95% CI=1.42-3.60). Ambos os polimorfismos possuem efeito aditivo sendo os valores 1.81 para o M235T e 2.12 para o Glu-298-Asp. Neste sentido, a hipertensão é 95% explicada devido a presença de ambos os polimorfismo em um indivíduo duplo homozigoto mutante. Na presença de fatores de risco convencionais e na presença de ambos os polimorfismos, um indivíduo fumante e mutante para ambos os polimorfismos possui o risco de 102 vezes maior de ser hipertenso do que um indivíduo normal para ambos os polimorfismos e que também fume. Um risco de 8.8 em um indivíduo mutante para ambos os polimorfismos e com colesterol total acima do tolerável, nos leva a uma hipótese do envolvimento dos polimorfismos aqui estudados com os quadros de hipercolesterolemia verificado entre os pacientes.

Conclusão: A manifestação da hipertensão em um indivíduo pode ser explicada devido a presença de ambos os polimorfismos, estando também relacionada a exposição aos fatores de risco convencionais. Estes polimorfismos podem também estar atuando na origem dos quadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia que são observados entre os pacientes que são hipertensos.

Abstract

Interactions between conventional risk factors and genic polymorphisms of the angiotensinogen human (AGT) and eNOS in the hypertension

Background: Molecular variations in AGT and eNOS can take us to the knowledge of multiple interactions that happen between AngII and nitric oxide in the presence and absence of conventional risk factors and its consequences for the health as for several cardiovascular pathologies.

Methods and Results: Individuals of white race were recruited consecutively (n=192) and classified into two groups: hypertensive group (n=140) and normotense group (n=52). The distribution of the genotypes of the M235T and Glu-298-Asp polymorphisms, demonstrated that both are independent risk factors for the origin of hypertension (p=0.023 and p=0.008 respectively). The simultaneous presence of both polymorphisms was extremely significant difference (p=0.001) when compared with the control group. The risk of developing hypertension associated to presence of both unfavorable allele was 2.3 times greater (OR=2.26, 95% CI=1.42-3.60). Both polymorphisms has additive effect being the values 1.81 for the M235T and 2.12 for Glu-298-Asp. In this sense, the hypertension is 95% explained due to presence of both polymorphisms in individual double mutant homozygous. In the presence of conventional risk factors and in the both polymorphisms, a smoking individual and mutant for both polymorphisms has a risk o 102 timer greater of developing hypertension than a normal individual for both polymorphisms and that also smokes. A risk of 8.8 timer greater in na individual mutant for both polymorphisms and with serum cholesterol above tolerable it takes us here to a hypotesis of the involiment this polymorphisms studied with dyslipidemy verified among the patients.

Conclusion: The manifestation of hypertension in an individual can be explained due to presence of the M235T e Glu-298-Asp polymorphisms simultaneously, being also related the exhibition to conventional risk factors. These polymorphisms can also be acting in the origin of the dyslipidemy observed among the patients that are hipertensive.

INTRODUÇÃO

Hipertensão e outros fatores de risco cardiovasculares estão associados com a disfunção endotelial e também no remodelamento vascular. O endotélio é um órgão complexo e dinâmico que responde a estímulos ambientais e a substâncias vasoativas, incluindo vasoconstritores como a angiotensina II (AngII) e vasodilatadores como o óxido nítrico (NO). Estas substâncias vasoativas atuam no tônus vascular, estrutura e função dos vasos influenciando o crescimento das células musculares vasculares lisas (VSMC), apoptose, agregação plaquetária, adesão de monócitos e leucócitos e trombose¹.

O balanço entre vasoconstritores, os quais geralmente induzem o crescimento celular, e vasodilatadores os quais geralmente tem o efeito oposto se faz necessário para a manutenção e regulação da pressão sangüínea, fluxo coronário e injúrias cardiovasculares e renais. A disfunção nos mecanismos moleculares importantes para esta manutenção e regulação, pode promover aterogênese por exposição da parede arterial a efeitos de fatores vasoconstritores diretos como AngII, aumentando assim o risco de trombose caminhando para o infarto agudo do miocárdio^{1,2}.

AngII e NO interagem entre si a nível do endotélio. Células endoteliais geram tanto AngII como NO e os principais alvos destas duas substâncias vasoativas são as células musculares vasculares lisas (VSMC). Estas células se contraem em resposta a AngII e se dilatam em resposta ao NO. Portanto, estas duas moléculas aparentemente possuem efeitos antagonistas não somente no tônus vascular mas também no remodelamento vascular e função renal³.

A elevada atividade da AngII, a qual é fortemente correlacionada com hipertensão, é o maior disparador da disfunção endotelial em pacientes hipertensos¹. O passo inicial para a formação deste produto bioativo do RAAS, é a clivagem do angiotensinogênio pela renina. Alguns experimentos a nível genético, apontam para a influência do AGT na formação da AngII e portanto, da elevação da pressão arterial (PA). A observação de uma ligação genética significativa entre hipertensão e marcadores do *locus* do AGT sugerem que variantes moleculares neste gene podem estar associadas na patogênese da HAS^{4,5}.

A respeito de variações no gene do AGT humano, de particular interesse é o polimorfismo que consiste de uma substituição de bases T → C na posição 704

no exon 2 do gene que leva à mudança de aminoácidos de Met → Thre no códon 235⁶. Segundo Ortega et al⁷, o polimorfismo no exon 2 do gene está relacionado com a alta concentração plasmática de AGT, alta pressão sangüínea e desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

O NO atua como mecanismo protetor se opondo a ação da AngII que tem a maior parte de seus efeitos mediados pelo receptor At1 induzindo estresse oxidativo, apoptose, proliferação celular e outros. O NO regula negativamente o receptor At1. Assim, a maior parte da AngII irá atuar sobre o receptor At2 tendo efeitos principalmente antiproliferativos e vasodilatadores³.

No endotélio de animais e humanos, a síntese de NO a partir do aminoácido L-arginina é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (ecNOS, eNOS ou NOSIII), sendo constitutivamente gerada servindo como manutenção basal do tônus vascular¹². O decréscimo na produção de NO é determinante no processo hipertensivo uma vez que a inibição da síntese de NO pela injeção de N⁹-monometil - L-arginina (L-NMMA), um antagonista específico da NOS resulta em aumento da pressão arterial em humanos e animais¹³.

O gene da ecNOS apresenta-se como candidato potencial para o desenvolvimento da hipertensão. O polimorfismo encontrado no exon 7 do gene que codifica a ecNOS denominado Glu-298-Asp, leva à mudança de aminoácidos na Glutamato → Aspartato pela substituição de G→T na posição 894 do gene e tem sido analisado em populações com pacientes hipertensos, com DAC e com AVC. Este polimorfismo é de relativo interesse pelo fato da substituição ocorrer em uma região conservada de aminoácidos podendo influenciar na função da enzima¹⁴.

Resultados anteriores, demonstraram que ambos os polimorfismos: M235T e Glu-298-Asp, podem ser considerados como fatores de risco independente para a gênese da hipertensão. Neste sentido, a formação de um único grupo de hipertensos nos dará as informações dos efeitos dos dois polimorfismos na origem desta patologia e suas interações com fatores de risco convencionais. Estas variações moleculares podem nos levar ao conhecimento de múltiplas interações que ocorrem entre AngII e NO e suas conseqüências tanto para a saúde como para diversas patologias cardiovasculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de Estudo e Critérios de Inclusão

O estudo constou de amostras obtidas em colaboração com o Setor de Hemodinâmica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Instituto do Coração do Triângulo Mineiro. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica (UFU).

Os critérios de inclusão adotados foram baseados segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁵. A hipertensão foi diagnosticada em indivíduos que mantiveram uma PA sistólica > 140mmHg e PA diastólica > 90mmHg. Os valores de referência dos fatores de risco convencionais como níveis elevados de colesterol total, LDL e triglicérides, níveis baixos de HDL e obesidade foram adotados conforme o III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose¹⁶: Colesterol Total >200mg/dl, LDL >159mg/dl, HDL <40mg/dl, Triglicérides > 200mg/dl e IMC >25Kg/m².

Foram incluídos nesta análise 192 pacientes de raça branca (critério baseado na cor da pele ou cútis) sendo separados em 2 grupos: Grupo I : formado pela união dos 69 indivíduos hipertensos com IAM e 71 indivíduos hipertensos sem IAM (n=140) e Grupo II: controles constituídos de indivíduos normotensos (n=52).

Os indivíduos incluídos como controle seguiram somente o critério de não ter histórico pessoal de hipertensão, não excluída a possível presença de outras doenças como diabetes mellitus e DAC. Para todos os grupos também foi feita a triagem de história de tabagismo e sedentarismo bem como o histórico familiar de doença arterial coronariana.

Material Biológico e Isolamento do DNA

O material biológico utilizado foi o sangue periférico obtido mediante termo de consentimento informado e coletados em tubos *Vacutainer* contendo EDTA para evitar coagulação e armazenados a 4°C.

As extrações do DNA genômico foram feitas segundo o método de isolamento de DNA adaptado de Sambrook et al¹⁷ utilizando uma alíquota de 500 μ L de sangue total.

Todos os cuidados para evitar contaminação tanto cruzada de paciente para paciente como de outros materiais vindos do meio foram tomados.

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo M235T do AGT humano

O diagnóstico do polimorfismo presente no exon 2 do gene do AGT humano, foi inicialmente feito pela técnica da PCR-RFLP conforme descrito no capítulo 1 utilizando o par de primers: 5'- GGA-AGGAACA-AGA-ACT-GCA-CCT-3' (sense) e 3'- GAC-GGT-GCT-GTC-CAC-ACT-GGA-CCC-C-5' (antisense), obtido através do Software *Primer*. As reações foram feitas nas seguintes condições: 3 μ L de DNA genômico, 1und de Taq Polimerase (*Phoneutria*), Tampão da Enzima (1X), Dntps 200 μ M, 1.5mM de MgCl₂, 7 pmols de cada primers em um volume final de 30 μ L. O programa consistiu de 35 ciclos: 10 ciclos a 95°C-5min; 94°C-40 segundos; 64°C-1min; 72°C-1min seguidos por mais 25 ciclos a 94°C-40 segundos; 62°C- 40 segundos; 72°C-1min. Extensão final de 72°C por 10min e 4°C por 20min. O produto final amplificado de 332pb foi posteriormente visualizado em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio (10mg/ml) utilizando marcador de 50pb como referência. Todas as visualizações foram feitas em aparelho VDS (*Pharmacia Biotech*).

Para a identificação das formas alélicas do polimorfismo M235T, utilizou-se a enzima *Psy I* (Tth111-1) (MBI *Fermentas*) seguindo o protocolo: 10 μ l de produto amplificado foram adicionados a 2und da enzima *Psy* (Tth111-1), Tampão da Enzima (1X) em um volume final de 20 μ l e submetidos a temperatura de 37°C por 3h, sendo os produtos da restrição visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio utilizando um marcador de 50pb como referência.

Amplificação e Genotipagem do Polimorfismo Glu-298-Asp da ecNOS

A região do exon 7 do gene da ecNOS que contém a variante Glu-298-Asp foi amplificada utilizando o par de primers descrito por Hibi et al (1998)¹⁸: 5'- TCC-

CTG-AGG-AGG-GCA-TGA-GGC-T-3' e 3'- TGA-GGG-TCA-GAC-AGG-TTC-CT-5'. As reações foram feitas nas seguintes condições: 3 μ L do DNA genômico, 1 μ nd de Taq Polimerase (*Phoneutria*), Tampão da Enzima (1X), 8pmols de cada primer, Dntps 200 μ M em um volume final de 30 μ L. A PCR foi realizada em um termociclador MJ. Research, Inc. seguindo o programa de 35 ciclos: 94°C-1min, 61°C-1min, 72°C-1min. O produto final amplificado de 457pb foi visualizado em gel de agarose 1.5% corado por brometo de etídio (10mg/mL) utilizando marcador de 50pb como referência. A visualização foi feita em aparelho VDS (*Pharmacia Biotech*). A enzima de restrição *BanII* (*Qbiogene*) foi utilizada para identificar as formas alélicas da variante Glu-298-Asp seguindo o protocolo: 10 μ L de produto amplificado, 4 μ nd da enzima *BanII*, Tampão da enzima (1X), em um volume final de 20 μ L. As reações foram submetidas a uma temperatura de 37°C por no mínimo 4h. Os produtos da restrição foram visualizados em gel de agarose 3% corado por brometo de etídio.

Análise Estatística

Utilizou-se o programa Statistica 5.5 para realizar as análises. Em todas elas, foi utilizado o erro α menor que 5% ($p < 0.05$) para o nível de significância.

O teste do χ^2 foi utilizado para verificar diferenças entre as frequências gênicas e genóticas entre os grupos de pacientes e controles. As variáveis contínuas foram expressas em frequência e as diferenças entre os grupos foram também analisadas pelo teste do χ^2 . O risco relativo (*Odds Ratio*) foi avaliado para a razão de chances e todas as variáveis foram transformadas em numéricas com valores atribuídos de 0 (zero) para ausência e 1 (um) para presença.

Foram utilizadas análises de regressões múltiplas com distribuição binomial para verificar a associação conjunta dos genótipos e fatores de risco convencionais. Ainda no que diz respeito à análise de regressão logística, foi considerada a presença de ambos os polimorfismos, AGT (M235T) e ecNOS (Glu-298-Asp) na gênese da HAS.

Correlação de Pearson com $p < 0.05$ foi utilizada para verificar todas as possíveis associações entre as diferentes variáveis, fatores de risco e os polimorfismos.

RESULTADOS

Identificação das formas alélicas do M235T do AGT humano e Glu-298-Asp da ecNOS

A região amplificada contendo a variante M235T do AGT humano, resultou em um fragmento final de 332pb submetido a restrição enzimática. A figura 18 (a) mostra o gel de agarose 3% identificando indivíduos M235/M235 aparecem com apenas uma única banda de 332pb, indivíduos M235/T235 apresentando bandas de 332pb, 308pb e 24pb e indivíduos T235/T235 apresentando bandas de 308pb e 24pb. A figura 18 (b) evidencia o padrão obtido pela restrição enzimática utilizando a enzima *BanII* para o polimorfismo Glu-298-Asp em gel de agarose 3%. Indivíduos homocigotos normais GG aparecem com duas bandas de tamanhos distintos: 320pb e 137pb. Indivíduos heterocigotos GT são identificados com três bandas de 457pb, 320pb e 137pb e indivíduos homocigotos mutantes TT identificados com a única banda de 457pb.

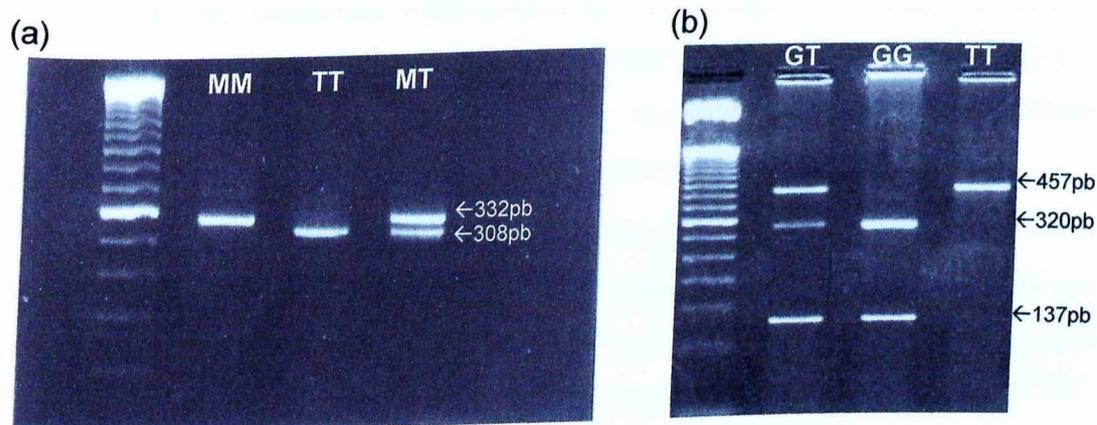


Figura 18: (a) gel de agarose 3% evidenciando o padrão de genotipagem da variante M235T do AGT humano. (b) gel de agarose 3% evidenciando o padrão de genotipagem da variante Glu-298-Asp.

Análise dos polimorfismos M235T do AGT humano e Glu-298-Asp nos pacientes hipertensos e controles

A tabela 22 resume as características clínicas dos grupos estudados. Os níveis de colesterol total foram significativamente maiores no grupo de hipertensos ($p < 0.001$) comparado com o grupo controle.

O mesmo ocorre para a presença do hábito do tabagismo e para o sedentarismo que foram predominantemente maiores no grupo de hipertensos diferindo do grupo controle estatisticamente ($p < 0.001$). Entretanto, os fatores de risco histórico familiar e IMC foram semelhantes entre os grupos, incluindo o grupo controle ($p > 0.05$).

Tabela 22 – Características clínicas entre hipertensos e controles

Variáveis	Controles N=52	Hipertensos N=140	p-valor
Histórico Familiar	(40.4)	(37.9)	ns
Tabagismo	(15.4)	(42.8)	$p < 0.001$
Sedentarismo	(48.0)	(67.1)	$p < 0.001$
IMC $> 25 \text{kg/m}^2$	(44.2) 26.1 ± 3.76	(53.6) 29.3 ± 1.62	ns
Colesterol Total $> 200 \text{mg/dl}$	(25.0) 203.3 ± 27.9	(59.3) 176.6 ± 107.3	$p < 0.001$
LDL $> 159 \text{mg/dl}$	(5.7) 115 ± 25.1	(14.3) 206.2 ± 41.7	$p < 0.025$
HDL $< 40 \text{mg/dl}$	(3.8) 49.1 ± 7.2	(13.6) 46.6 ± 10.5	$p < 0.025$
Triglicérides $> 200 \text{mg/dl}$	(7.7) 171.6 ± 58.7	(21.4) 123.7 ± 30.7	$p < 0.001$

Nível de significância pelo teste do χ^2 com $p < 0.05$. Valores expressos em frequência (%), média e desvio padrão

Dos 140 pacientes hipertensos demonstrados na tabela 23, 34.3% são homozigotos normais M235/M235, 54.3% são heterozigotos M235/T235 e 11.4% são homozigotos mutantes T235/T235, existindo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($\chi^2 = 5.12$, $p = 0,023$).

Na presente pesquisa, o polimorfismo Glu-298-Asp pode ser considerado como fator de risco independente para hipertensão onde as frequências gênicas e genotípicas evidenciadas na tabela 23, mostram que para os 140 indivíduos hipertensos da pesquisa, 22.1% são homozigotos normais GG, 64.3% são heterozigotos GT e 13.6% são homozigotos mutantes TT existindo diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle ($\chi^2 = 6.95$; $p = 0.008$).

As estimativas de risco, evidenciadas na figura 19, de desenvolver a hipertensão associada ao polimorfismo M235T com seus respectivos intervalos de confiança foram: para o T235/T235 e relação ao M235/M235: OR=2.33 (0.70-7,67), para o M235/T235 em relação ao M235/M235: OR=2.21 (1,12-4,36), para o M235/T235+T235/T235 em relação ao M235/M235: OR=2.23 (1.17-4.27). O efeito do gene é aditivo no valor de 1.81 ($p = 0,027$).

A mesma análise para o risco de desenvolver a hipertensão foi realizada para o polimorfismo Glu-298-Asp onde para o TT em relação ao GG: OR=3.21 (0.95-10.81), para o GT em relação ao GG, OR=2.25 (1.11-4.55), para o GT+TT em relação ao GG, OR=6.71 (2.92-15.41) verificando o efeito aditivo do gene no valor de 2.12 ($p=0.010$).

Tabela 23 – Frequência gênica e genotípica das variantes M235T do AGT humano e Glu-298-Asp da ecNOS entre o grupo controle e o grupo de hipertensos.

Genótipos do AGT	Controle N=52 (%)	Hipertensos N= 140 (%)
M235/M235	28 (53.8)	48 (34.3)
M235/T235	20 (38.4)	76 (54.3)
T235/T235	04 (7.8)	16 (11.4)
Alelos	(73.0)	(61.5)
M235	(27.0)	(38.5)
T235		
Genótipos da ecNOS	Controle	Hipertensos
GG	21 (40.4)	31 (22.1)
GT	27 (52.0)	90 (64.3)
TT	04 (7.7)	19 (13.6)
Alelos		(54.3)
G	(66.4)	(45.7)
T	(33.6)	

No grupo de pacientes hipertensos, a análise de regressão logística múltipla para cada polimorfismo demonstrada nas tabelas 24 e 25, foi utilizada para determinar a independência de ambos e de fatores de risco convencionais. A análise revelou que na presença de fatores de risco, o efeito do polimorfismo M235T não é significativo ($p=0.063$) ao contrário dos fatores tabagismo e HDL que foram significativos ($p=0,002$ e $p=0,044$ respectivamente). Já para o polimorfismo Glu-298-Asp, foi evidenciado que na presença de fatores de risco convencionais, o mesmo ainda é significativo ($p=0.014$) assim como também foram significativos os fatores tabagismo e HDL ($p=0.002$ e $p=0.018$ respectivamente).

Tabela 24- Efeito da presença do gene do AGT humano associado com fatores de risco na gênese da hipertensão no grupo de pacientes hipertensos

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo M235T	1.00	3.442	0.063
Tabagismo	1.00	9.429	0.002 *
Sedentarismo	1.00	1.146	0.284
LDL > 159mg/dl	1.00	1.748	0.186
HDL < 40mg/dl	1.00	4.040	0.044 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1.00	0.563	0.453
Triglicérides > 200mg/dl	1.00	0.891	0.345
IMC > 25Kg/m ²	1.00	0.313	0.575
Histórico Familiar	1.00	0.347	0.555

Tabela 25 – Regressão logística múltipla para verificar o efeito do polimorfismo Glu-298-Asp associado aos fatores de risco convencionais.

Fatores de Risco	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo Glu-298-Asp	1.00	6.006	0.014 *
Tabagismo	1.00	9.135	0.002 *
Sedentarismo	1.00	1.852	0.173
LDL > 200mg/dl	1.00	1.323	0.250
HDL < 40mg/dl	1.00	5.594	0.018 *
Colesterol Total > 200mg/dl	1.00	0.798	0.371
Triglicérides > 200mg/dl	1.00	0.625	0.429
IMC > 25Kg/m ²	1.00	0.034	0.853
Histórico Familiar	1.00	1.038	0.308

• **Efeito da associação dos polimorfismos M235T do AGT humano e Glu-298-Asp da ecNOS na hipertensão**

Ao unificar os dois grupos de hipertensos e verificando que os dois polimorfismos são fatores de risco para a hipertensão, podemos verificar a distribuição genotípica de ambos comparado com o grupo controle como mostra a tabela 26.

Tabela 26: Distribuição dos genótipos favoráveis e desfavoráveis considerando a presença simultânea de ambos os genes no grupo de pacientes hipertensos e controle.

		Controle (n=52)			Hipertensos (n=140)		
		MM	MT	TT	MM	MT	TT
ecNOS	AGT						
	GG	13 (25.0)	06 (11.5)	01 (1.9)	05 (3.6)	17 (12.1)	05 (3.6)
	GT	12 (23.1)	13 (25.0)	03 (5.8)	34 (24.3)	50 (35.7)	10 (7.1)
	TT	03 (5.8)	01 (1.9)	0 (0.0)	09 (6.4)	09 (6.4)	01 (0.7)

Analisando as distribuições das frequências dos genótipos favoráveis e desfavoráveis dentro do grupo de hipertensos, existe diferença extremamente significativa em comparação com o grupo controle. ($\chi^2=13.19$, $p=0.001$).

A estimativa de risco de desenvolver a hipertensão associada a presença dos dois polimorfismos está ilustrada na figura 19, onde para os genótipos TT+TT dos dois polimorfismos está ilustrada na figura 19, onde para os genótipos TT+TT em relação ao GG+ M235/M235, OR=2.71 (1.16-6.32), para GT+M235/T235 em relação ao M235/M235+GG, OR=2.19 (1.35-3.54), para o TT+T235/T235 e M235/T235 + GT em relação ao M235/M235+GG, OR=2.26 (1.42-3.60).

A tabela 27 mostra os dados obtidos através das análises de regressão múltipla com distribuição binomial, utilizada para verificar a independência entre as variáveis onde os dois polimorfismos em associação foram significativos para a gênese da hipertensão.

Tabela 27 – Regressão logística múltipla entre os polimorfismos M235T do AGT humano e Glu-298-Asp da ecNOS

Variável	Graus de Liberdade	Wald Stat	p-valor
Polimorfismo M235T	1	6.170	0.012 *
Polimorfismo Glu-298-Asp	1	5.889	0.015 *

Se ambos os genes possuem efeito aditivo onde para o polimorfismo M235T o valor é de 1.81 ($p=0.027$) e para o polimorfismo Glu-298-Asp é de 2.12 ($p=0.010$), pela análise de regressão logística demonstrada na figura 20, um indivíduo heterozigoto para o alelo T235 do AGT humano possui cerca de 58% de

chances de ser hipertenso e um indivíduo homocigoto para o alelo T235 possui 78% de chance de desenvolver a mesma patologia. O mesmo ocorre para o polimorfismo Glu-298-Asp onde, para o indivíduo heterocigoto GT as chances de desenvolver a hipertensão chega a 61% e para os homocigotos TT o valor chega a ser de 80%. Ao analisar a presença dos dois polimorfismos em conjunto, para um indivíduo duplo homocigoto (T235/T235 e TT) a origem da hipertensão é explicada 95% devido a presença dos dois alelos desfavoráveis em homocigose.

As análises de correlação de Pearson foram realizadas para verificar a associação entre os fatores de risco e entre estes com os polimorfismos M235T e Glu-298-Asp. Os resultados estão dispostos na tabela 28 onde valores em vermelho são valores significativos para $p < 0.05$.

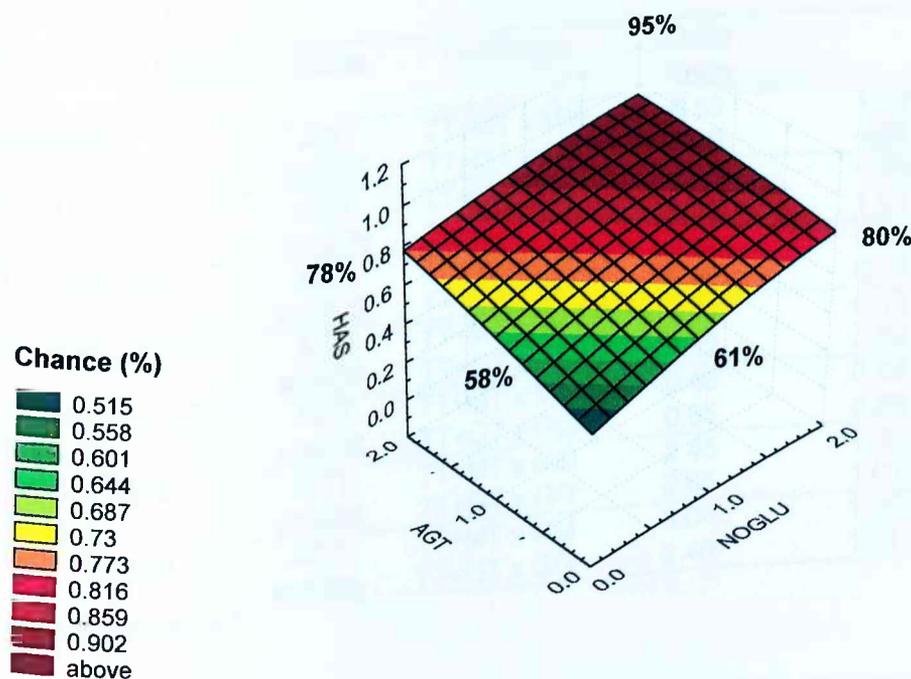


Figura 20 – Regressão logística entre os dois polimorfismos M235T e Glu-298-Asp na gênese da hipertensão

- **Interações entre fatores de risco convencionais e os genótipos desfavoráveis.**

Devido ao fato do alelo T235 da variante M235T do AGT humano e o alelo T da variante Glu-298-Asp da ecNOS estarem relacionados com o risco de

desenvolver a hipertensão, as estimativas de risco foram baseadas nos grupos M235/T235+T235/T235 versus M235/M235 e TT+GT versus GG como referência. Neste sentido, a tabela 29 demonstra os riscos de desenvolverem a hipertensão associada a presença dos alelos desfavoráveis juntamente com os fatores de risco convencionais. O tabagismo demonstrou aqui ser um fator de risco extremamente associado à gênese da hipertensão. A idade limite maior ou igual a 50 anos foi escolhida devido ao fato de ser esta a média de ocorrência de eventos coronários.

Tabela 29- Estimativas de risco de desenvolver a hipertensão associada aos alelos desfavoráveis de cada polimorfismo e a presença de fatores de risco convencionais.

Fatores de Risco	Gene	Contraste	Odds Ratio	IC
Tabagismo	AGT	TT+MT x MM	6.53	1,19 – 35,75 *
	ecNOS	TT+GT x GG	25.0	4,08 – 152,84 *
Sedentarismo	AGT	TT+MT x MM	2.25	0,90 – 5,57
	ecNOS	TT+GT x GG	2.76	1,01 – 7,48 *
LDL >159mg/dl	AGT	TT+MT x MM	3.42	0.26 – 45.02
	ecNOS	TT+GT x GG	2.66	0.17 – 39.62
HDL <40mg/dl	AGT	TT+MT x MM	1.71	0.13 – 21.33
	ecNOS	TT+GT x GG	1.12	0.08 – 14.27
Triglicérides >200mg/dl	AGT	TT+MT x MM	0.46	0.04 – 4.58
	ecNOS	TT+GT x GG	0.85	0.08 – 8.96
Colesterol Total >200mg/dl	AGT	TT+MT x MM	2.45	1.00 – 5.97 *
	ecNOS	TT+GT x GG	2.65	1.01 – 6.97 *
Idade > 50 anos	AGT	TT+MT x MM	3.04	1.35 - 6.84 *
	ecNOS	TT+GT x GG	2.46	1.07 - 5.66 *

* valores significativos

Assim como o tabagismo, o sedentarismo demonstrou ser um fator de risco associado à hipertensão juntamente na presença do polimorfismo Glu-298-Asp mas não com o M235T do AGT humano. O acúmulo de colesterol também esteve associado com o risco de desenvolver a hipertensão na presença dos alelos desfavoráveis de ambos os polimorfismos.

Em adição, foram verificados os mesmos riscos considerando agora a presença simultânea de ambos os alelos desfavoráveis que se encontram dispostos na tabela 30.

Tabela 30- Estimativas de risco de desenvolver a hipertensão associada a presença simultânea de ambos os alelos desfavoráveis (T235 e T) na presença de fatores de risco convencionais.

Fatores de Risco	Gene	Contraste	Odds Ratio	IC
Tabagismo	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	102	7.94 – 1309.69 *
Sedentarismo	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	37	3.91 – 349.52 *
LDL >159mg/dl	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	10	0.31 – 315.29
HDL <40mg/dl	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	6	0.25 – 140.05
Triglicérides >200mg/dl	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	5.33	0.25 – 110.80
Colesterol Total >200mg/dl	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	8.80	1.87 – 41.32 *
Idade > 50anos	AGT e ecNOS	TT+MT +GT+TT X GG+MM	9.72	2.68 – 35.12 *

* valores significativos

Tabela 28 – Correlação entre todas as variáveis e entre os polimorfismos M235T e Glu-298-Asp

	SEXO	IAM	HAS	HAS/IAM	IDADE	GLU	AGT	TABA	SED	LDL	HDL	CT	TG	IMC
IAM	-0,1037													
HAS	0,0298	0,2006												
HAS/IAM	-0,0038	0,7434	0,71866											
IDADE	-0,0905	0,18606	0,216559	0,170394										
GLU	-0,0683	-0,0645	0,188483	0,07719	0,009302									
AGT	-0,1085	0,03604	0,16072	0,125663	0,045022	-0,082								
TABA	-0,0516	0,20816	0,232048	0,263942	0,042093	0,0935	-0,023							
SED	0,0616	0,14935	0,120142	0,182783	0,239334	-0,056	0,0225	0,11186						
LDL	-0,0871	0,13211	0,138471	0,198336	0,186876	0,0177	-0,023	0,1062	0,198					
HDL	-0,048	-0,0745	0,158876	0,047505	-0,02169	-0,009	0,1232	-0,0514	-0,052	-0,008				
CT	-0,0121	0,28583	0,066145	0,20348	-0,00471	0,0312	0,0177	-0,0149	0,0939	0,2351	-0,1945			
TG	0,0086	0,18707	0,135972	0,190318	0,002718	0,0999	0,1091	0,06677	0,0209	0,0507	0,1776	0,1895		
IMC	-0,0936	-0,0399	0,037947	0,008312	-0,07226	0,1352	-0,014	0,03765	0,0013	-0,113	0,0155	-0,055	0,0592	
HF	0,024	0,13953	-0,02968	0,055067	0,072829	0,0749	-0,062	0,10621	0,039	-0,034	-0,0607	0,0689	0,047	0,133

GLU: Polimorfismo Glu-298-Asp, TABA: tabagismo, SED: sedentarismo, IMC: índice de massa corporal, HF: histórico familiar, TG: triglicérides, IAM: infarto agudo do miocárdio, HAS: hipertensão.

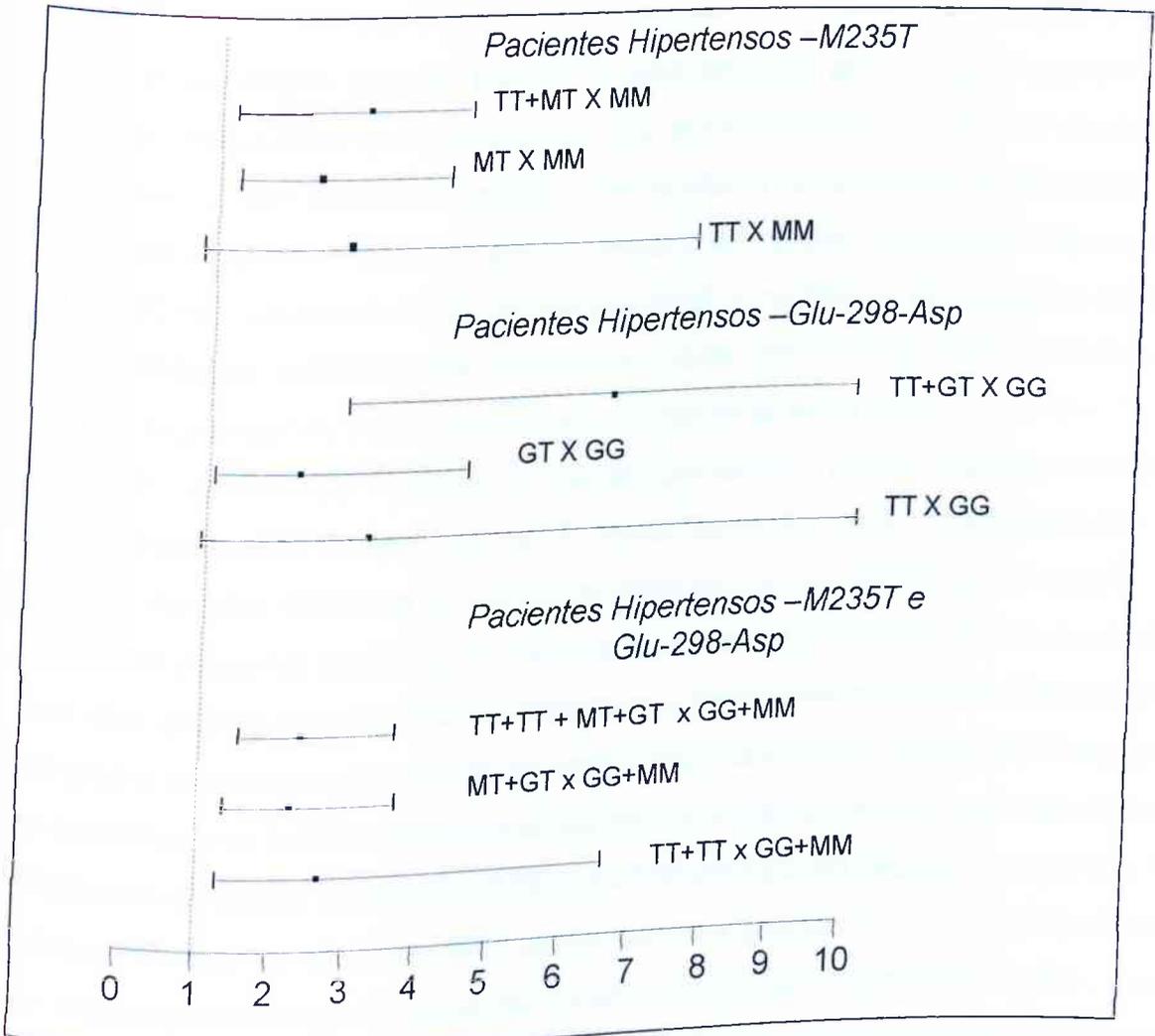


Figura 19- Estimativas de risco de desenvolver a hipertensão associada aos polimorfismos M235T do AGT humano e Glu-298-Asp isoladamente e simultaneamente.

significativa entre eles ($p=0.023$). Observou-se também que a frequência do alelo T235 do AGT humano é maior no grupo de hipertensos. Em adição, para o mesmo grupo genotipado para a variante Glu-298-Asp da eNOS, a frequência dos genótipos desfavoráveis (GT e TT) também foi maior do que no grupo controle, também com diferença estatisticamente significativa ($p=0.008$). A presença do alelo T desfavorável é também maior no grupo de hipertensos.

Com relação às estimativas de risco de desenvolver a hipertensão associada a cada polimorfismo, foi demonstrado o risco de 2.23 vezes para o alelo T235 em comparação com o alelo M235 em intervalo de confiança estatisticamente significativo. Embora o intervalo de confiança para a estimativa de risco associada ao genótipo T235/T235 em comparação com o M235/M235 esteve próximo do valor 1, o fato de não ter sido significativo não exclui a afirmação do polimorfismo estar associado a gênese da hipertensão, mesmo porque temos neste grupo de hipertensos pacientes infartados, os quais podem possuir outros fatores genéticos relacionados a esta manifestação clínica e que podem estar influenciando na expressão do gene do AGT humano.

Com relação ao polimorfismo Glu-298-Asp, o risco de desenvolver o fenótipo hipertensivo associado ao alelo desfavorável T foi de 6.71 vezes em intervalo de confiança estatisticamente significativo. Neste caso a independência do polimorfismo Glu-298-Asp não é mascarado por outros fatores o que ainda é verificado nas análises de regressão logística múltipla onde verificou-se o efeito do polimorfismo quando associado a fatores de risco convencionais. O polimorfismo Glu-298-Asp na presença de outros fatores ainda é significativo ($p=0.014$). Embora a variante M235T do AGT humano possa ser considerado como fator de risco independente, a presença de fatores de risco convencionais acabam por "mascarar" o efeito do alelo T235 desfavorável portanto, ao verificar o efeito do gene associado com os fatores de risco, o valor de $p=0,065$ acaba sendo significativo. Assim como para os polimorfismo, os fatores de risco tabagismo de níveis baixos de HDL também foram fatores independentes na gênese da hipertensão.

Segundo O'Connell e Genest⁸, altos níveis de HDL estão associados com a resposta normal vasodilatadora do endotélio à acetilcolina, um neurotransmissor que estimula a síntese de óxido nítrico (NO). O HDL reverte a diminuição do

relaxamento provocado pelo LDL modificado por atuar também como agente antioxidante.

Em concordância com a associação de cada polimorfismo com a hipertensão, para verificar os efeitos que ambos teriam simultaneamente na origem desta patologia, os genótipos desfavoráveis (M235/T235, T235/T235, GT e TT) bem como os favoráveis (MM e GG) foram distribuídos entre os grupos de hipertensos e controles, observando uma diferença extremamente significativa entre os grupos ($p=0.001$), evidenciando que a presença de ambos os polimorfismos estão associados com a manifestação do fenótipo hipertensivo. Cerca de 50% dos pacientes do grupo hipertenso possuem a presença de ambas as mutações não importando se em heterozigose ou em homozigose, contra 32.7% dos indivíduos do grupo controle. A presença de indivíduos homozigotos normais para ambos os genes simultaneamente (MM+GG) é extremamente menor no grupo de pacientes hipertensos comparado com o grupo controle (3.6% e 25% respectivamente) demonstrando que a maioria dos indivíduos que manifestam o fenótipo hipertensivo estão concentrados nos genótipos desfavoráveis os quais obtiveram um aumento em suas frequências nesse mesmo grupo de pacientes.

Em adição a análise simultânea dos dois polimorfismos, com relação a estimativa de risco associada a presença de ambos os alelos desfavoráveis (T235 e T), verificou-se o risco de 2.26 vezes em intervalo de confiança estatisticamente significativo, verificando que ambos os polimorfismos possuem também efeito aditivo. O valor aditivo do gene do AGT humano foi de 1.81 significando que um indivíduo heterozigoto para o alelo T235 tem um aumento no risco de ser hipertenso 1.81 vezes a mais em comparação com um indivíduo homozigoto normal M235/M235 e para um indivíduo homozigoto para o alelo T235 o aumento no risco é de 3.62 vezes. Tendo o polimorfismo Glu-298-Asp um efeito aditivo no valor de 2.12, um indivíduo heterozigoto para o alelo T possui um aumento no risco de 2.12 vezes de ser hipertenso comparado com um indivíduo homozigoto normal GG e um indivíduo homozigoto para o mesmo alelo desfavorável possui um aumento de 4.24 no risco de ser hipertenso. De acordo com Hingorani et al²⁶, o aumento do risco também de desenvolver DAC é conferido aos homozigotos TT

do polimorfismo Glu-298-Asp onde o risco também chega a ser 4 vezes maior comparado com os homozigotos normais.

A análise de regressão logística para verificar a independência dos polimorfismos na hipertensão demonstrou que ambos são significativos e que os mesmos possuem seus efeitos particulares que se expressam no sentido de originar a manifestação desta patologia. Neste sentido, se ambos possuem suas particularidades e ambos contribuem para a origem deste fenótipo possuindo ainda efeitos aditivos, ao verificarmos as chances de um indivíduo ser hipertenso quando na presença de pelo menos um dos dois polimorfismos, foi observado que um indivíduo heterozigoto M235/T235 possui a chance de 58% contra 61% de um indivíduo heterozigoto GT de ser hipertenso. Já para um homozigoto T235/T235 as chances aumentam para 78% enquanto para o homozigoto TT do polimorfismo Glu-298-Asp as chances de um indivíduo ser hipertenso aumenta para 80%. É fato que cada polimorfismo contribui para a manifestação do fenótipo hipertensivo. Neste sentido, a hipertensão é 95% explicada devido a presença ambos os polimorfismos em um indivíduo duplo homozigoto mutante. Estas diferenças na chance entre um gene e o outro podem talvez ser explicadas devido ao fato de que o polimorfismo do AGT humano para se manifestar sobre o endotélio, necessita ainda passar por respostas mediadas tanto pela ECA como por receptores de AngII, At1 e At2, enquanto que o NO está envolvido diretamente sobre este o qual também atua sobre os efeitos da AngII.

Foi verificado uma presença predominante de fatores de risco convencionais e que os efeitos desfavoráveis estão concentrados nos alelos T235 e T dos polimorfismos M235T do AGT humano e ecNOS respectivamente. Na intenção de verificar quais os riscos de um indivíduo ser hipertenso na presença de fatores de risco juntamente com os alelos desfavoráveis tanto em homozigose como em heterozigose, foram feitas as análises do risco relativo de cada polimorfismo e de ambos simultaneamente em conjunto com estes fatores. Muitos estudos concordam que o alelo T235 tem um efeito deletério. Segundo Frossard et al²⁴, o alelo T235 possivelmente estaria relacionado com a diminuição da expectativa de vida. Segundo Thomas et al²³ o risco de jovens hipertensos desenvolverem doenças cardiovasculares depende essencialmente do número de fatores de risco enquanto que o mesmo risco em velhos hipertensos depende em

maior grau da hipertensão (prevalendo o polimorfismo) e em menor grau dos fatores de risco embora alguns deles como diabetes e hipercolesterolemia aumente com a idade. Isto pode ser levado em consideração mesmo porque a estrutura dos vasos e artérias mudam com o aumento da idade o que aumenta a exposição dos mesmos aos danos causados pela ação da hipertensão. Se a idade aumenta, a prevalência da hipertensão, especialmente a sistólica é dramaticamente aumentada. Nesta relação, verificando os riscos de ser hipertenso associado ao aumento da idade, verificou-se que um indivíduo mutante para o gene do AGT humano e com idade superior a 50 anos, possui o risco 3.04 vezes maior do que um indivíduo na mesma faixa etária mas que seja normal para o polimorfismo. O mesmo é observado para o Glu-298-Asp onde um indivíduo mutante para este polimorfismo possui o risco 2.46 vezes maior do que um indivíduo normal para o mesmo polimorfismo e com idade superior a 50 anos. Tanto o fator idade como ambos os polimorfismos são importantes na manifestação do fenótipo hipertensivo onde um indivíduo mutante para as duas variações genéticas e com idade superior a 50 anos, o risco de ser hipertenso é 9.72 vezes maior do que um indivíduo com mesma faixa etária e normal para os dois polimorfismos.

Em adição a esta mesma análise, para um indivíduo com o hábito do tabagismo e que possui a mutação no gene do AGT humano, o risco de ser hipertenso é 6.53 vezes maior em relação a um indivíduo fumante e normal para o polimorfismo. Para o mesmo indivíduo fumante e mutante para a eNOS, o risco é extremamente maior no valor de 25 vezes em comparação com um indivíduo fumante e normal em intervalo de confiança estatisticamente significativo. Na posse das duas mutações e ainda na presença do hábito do tabagismo o risco de ser hipertenso é 102 vezes maior comparado com um indivíduo fumante e normal para ambos os polimorfismos.

O sedentarismo constitui fator de risco para a hipertensão assim, para um indivíduo sedentário e mutante para o polimorfismo M235T do AGT humano, o risco de ser hipertenso é 2.25 vezes maior do que um indivíduo sedentário e normal para este polimorfismo. O mesmo ocorre para um indivíduo sedentário e mutante para o polimorfismo Glu-298-Asp onde o risco de ser hipertenso é 2.76 vezes maior do que um indivíduo sedentário e normal para o mesmo

polimorfismo. Na presença das duas mutações nos dois genes e na presença do sedentarismo o risco de ser hipertenso é 37 vezes maior do que um indivíduo normal para ambos os genes e que seja sedentário. Estes resultados são importantes na medida em que demonstram as interações que existem entre estes polimorfismos e os fatores de risco ambientais. No mesmo grau de importância temos o risco associado aos polimorfismos e os níveis de colesterol total onde um indivíduo mutante para ambos os polimorfismos e com colesterol total acima dos níveis considerados toleráveis, possui o risco de ser hipertenso 8.80 vezes maior do que um indivíduo normal para os mesmos polimorfismos e que tenha o nível de colesterol total elevado, demonstrando uma possível interação entre os níveis de colesterol e os polimorfismos aqui estudados.

As dislipidemias aqui observadas tanto a hipercolesterolemia (aumento do LDL e/ou colesterol total) como a hipertrigliceridemia (aumento de triglicérides) podem ter possivelmente duas causas. A primeira pode ser devido a causas genéticas sendo denominada de dislipidemia primária e a segunda denominada dislipidemia secundária sendo associada a hábitos de vida inadequados. Aparentemente no presente estudo, as dislipidemias observadas entre os pacientes parecem estar relacionadas ao segundo tipo devido ao alto índice de indivíduos fumantes, sedentários e com o peso acima do normal. A presença de um mecanismo molecular que associe os polimorfismos M235T e Glu-298-Asp com as dislipidemias é desconhecido porém, podemos estabelecer aqui uma hipótese relacionando um possível caminho molecular para se chegar à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia associado a estes polimorfismos.

De acordo com as correlações realizadas entre os fatores de risco e entre os polimorfismos, o sedentarismo além de ser um fator de risco estando associado a hipertensão e ao infarto, também se associa ao aumento da idade e ao LDL e onde o exercício físico tanto de alta como de baixa intensidade reduz os níveis de triglicérides e aumentam os níveis de HDL. Além disso, há uma melhora na composição corporal, redução da obesidade e também o aumento do efeito benéfico na pressão arterial. O HDL previne a aterosclerose removendo o colesterol da periferia das células levando até o fígado onde será degradado. O estudo feito por Spieker et al⁹, forneceu a primeira evidência de que o aumento do HDL normaliza a função endotelial em pacientes com hipercolesterolemia. O LDL

que é rico em colesterol, tende a diminuir enquanto outros parâmetros lipídicos permanecem estáveis. O mecanismo pelo qual o HDL atua na mudança fenotípica do endotélio ainda não é muito bem compreendido.

Talvez um dos fatores de risco mais importantes na gênese da hipertensão seja o tabagismo. O fumo promove aumento dos radicais livres induzindo modificações no colesterol LDL prejudicando a vasodilatação associada ao endotélio. O fumo também induz resistência à insulina o que pode levar à quadros de hipertrigliceridemia²⁷.

A possível hipótese de que polimorfismos do RAAS e NOS possam estar envolvidos na hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia é baseada no fato de que células endoteliais que também podem ser encontradas no tecido adiposo, expressam receptores de colesterol de baixa densidade (LDL) e a enzima lipase lipoprotéica que é responsável pela hidrólise dos quilomícrons que transportam os lípidos da dieta e os triglicérides presentes nas partículas de VLDL, podendo iniciar um papel importante no metabolismo lipídico que geralmente é feito no fígado²⁸. Existem fortes evidências de que as LDL plasmáticas na sua relação normal com a parede arterial, adentram às células endoteliais através de mecanismos de endocitose. Simionescu e Simionescu¹⁰ demonstraram marcando partículas de LDL com ouro radioativo, carbono-¹⁴C e ¹²⁵Iβ-VLDL, a formação de invaginações na membrana da célula endotelial chamadas de *coated pits* e onde se localizariam os receptores específicos de ApoB100. Estas invaginações transformar-se-iam em vesículas de endocitose carregando as partículas de LDL para o interior da célula endotelial. Dentro da célula, as partículas de LDL seriam englobadas em lisossomas e hidrolizadas em fosfolipídios, triglicérides, proteínas, colesterol e os receptores específicos reciclados até a superfície da membrana celular. Substâncias que atuam diretamente na expressão genética das células da parede arterial como AngII, levam a alterações na especificidade do receptor da partícula de LDL e aumentam a sua afinidade para os chamados receptores de remoção. Receptores de LDL são regulados pelo teor intracelular de colesterol livre absorvendo quantidades restritas de LDL porém, os receptores de remoção localizados na superfície de células endoteliais, monócitos e macrófagos não são regulados pelo *feedback* pelo teor intracelular de colesterol absorvendo o LDL tanto nativo como o LDL oxidado de uma forma desregulada acumulando

enormes quantidades de colesterol e ésteres de colesterol¹¹. A presença de um aumento no número de receptores de LDL, determina uma maior captação das LDL em circulação.

A AngII também atua sobre um novo mecanismo recentemente elucidado e denominado de "ativação das NADH/NADPH oxidases" que promovem a produção de radicais superóxido (O_2^-)¹⁹. Tanto o aumento do efeito como dos níveis de AngII, que podem ser promovidos pelo polimorfismo M235T como demonstrado na presente pesquisa, pode estimular estas enzimas de membrana associadas a produzir excessos de radicais O_2^- que é o impulso para o início da disfunção endotelial. Os radicais O_2^- reagem com o NO para produzir peroxidonitrito que é um potente agente oxidante especialmente do LDL. Estes efeitos oxidantes em situações normais, podem ser contrabalanceados pela enzima superóxido dismutase extracelular (ecSOD) que representa um importante mecanismo na prevenção da degradação do NO mediada por O_2^- . A enzima ecSOD utiliza os radicais O_2^- para produzir peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , que segundo Farré e Casado²⁰ estabiliza o mRNA da ecNOS. NO e ecSOD competem entre si pelos radicais O_2^- porém, estes mesmos radicais reagem cerca de 3 a 6 vezes mais rápido com o NO. Em condições fisiológicas normais, a formação de peroxidonitrito é equimolar a formação de NO. Entretanto, altas concentrações de peroxidonitrito podem ser muito tóxicas para a célula promovendo além de oxidação de lipídeos, fragmentação de proteínas por nitração dos aminoácidos. A concentração de ecSOD pode ser diminuída na presença de fatores ambientais como o tabagismo que a cada tragada produz cerca de 100 mil novos radicais livres confirmando ser um importante fator de risco extremo para a gênese da hipertensão e outras doenças cardiovasculares. Tendo o aumento da formação de peroxidonitrito pela falta de agentes antioxidantes, aumenta a oxidação do LDL e diminui a estabilização do mRNA da ecNOS.

O aumento na produção de radicais O_2^- e a relativa ausência de NO suficiente tanto pelo polimorfismo como pela formação de peróxidonitrito aumentam o número das LDL oxidadas que induzem a migração de monócitos que darão início a formação das células espumosas que passam a fagocitar lipídeos disparando o processo inflamatório. A ausência de uma proteína funcional devido ao polimorfismo Glu-298-Asp, expõe o endotélio a estímulos de

substâncias vasoconstritoras que além de gerar radicais superóxido que contribuem para a degradação do NO, há o aumento do inibidor ADMA que compete com a L-arginina além de haver peroxidação lipídica. Agentes oxidantes, inflamatórios e citocinas comprometem a homeostase do endotélio podendo aumentar a expressão e secreção de fatores de crescimento e envolvimento de migração celular. Algumas interações podem ser verificadas nas análises de correlação onde verifica-se que há uma associação entre alguns fatores de risco que estão relacionados entre si e entre os polimorfismos.

Se não houver a rápida recomposição do endotélio, há a possibilidade de entrada não seletiva de macromoléculas na íntima sendo a entrada de LDL particularmente de efeito deletério. Células endoteliais diante de elevadas concentrações de LDL são estimuladas a liberar substâncias quimiotáticas e mitogênicas além de prejudicar as G-proteínas por onde atuam agonistas estimuladores da via de produção do NO levando ao comprometimento da função endotelial²¹. A presença de polimorfismos como Glu-298-Asp, pode desencadear tanto o fenótipo hipertensivo pela falta de uma enzima funcional que contrabalance os efeitos da AngII ou ainda atuar juntamente com fatores de risco na manifestação de quadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia com subsequente manifestação clínica do IAM.

Aumentando o estresse oxidativo sobre o endotélio, há o prejuízo da função vasodilatadora e a presença de peroxidonitrito citodestrutivos podem potencialmente causar lesões no endotélio e nos miócitos podendo este efeito ser um fator de apoptose de células levando ainda à rotura da placa²².

É conclusivo que a disfunção endotelial verificada em hipertensos é multifatorial e que AngII e NO aparecem como o início de um papel essencial mas não exclusivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. **Am. J. Hypertension**. 2002; 15:115S-122S.
- 2- Carey RM, Wang ZQ, e Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. **Hypertension**. 2000; 35(part2): 155-163.
- 3 - Millat LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. **Regulatory Peptides**. 1999; 81:1-10.
- 4 - Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM e Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**. 1992;71: 169-180.
- 5- Klett CPR e Granger JP. Physiological elevation in plasma angiotensinogen increases blood pressure. **Am.J. Physiol. Regulatory Integrative Comp.Physiol**. 2001; 281: R1437-R1441.
- 6- Lifton RP. Genetics determinants of human hypertension. **Proc.Nad.Acad.Sci.USA**. 1995; 92:8845-8851.
- 7 - Ortega EH, Fernandez-Aceituno AM, Rodriguez FJ, Perera OH, Nuez FM, Espinosa AD, Pérez DF, Prieto AA e Pérez JCR. The involvement of the renin-angiotensin system gene polymorphisms in the coronary heart disease. **Rev.Esp.Cardiol**. 2002;55(02): 92-99.
- 8- O'Connel BJ e Genest JJ. High density lipoproteins and endothelial function. **Circulation**. 2001;104: 1978-1983.
- 9 Spieler LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Luscher TF e Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function hypercholesterolemic men. **Circulation**. 2002; 105: 1399-1402.
- 10- Simionescu N e Simionescu M. Endothelial Cell biology in health and disease. **Plenun Press**. 1988;New York.
- 11- Jorge PAR. Endotélio, lípidos e aterosclerose. **Arq.Bras.Cardiol**. 1997; 68(2):129-134.
- 12 - Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y e Nakao K. T-786→C mutation in the 5'flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. **Circulation**. 1999;99:2864-2870.

- 13 - Bonnardeaux A, Nadaud S, Charru A, Jeunemaitre X, Corvol P e Soubrier F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. **Circulation**. 1995;91: 96-102.
- 14 - Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Grattons JP, McCabe TJ e Sessa W. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu²⁹⁸→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**. 2001;276(29):26674-26679.
- 15 - WHO (report of the joint international society and federation of cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature). Nomenclature and criteria for diagnosis of ischaemic heart disease. **Circulation**. 1979; 59: 607-609.
- 16 - III Consenso Brasileiro de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq.Bras.Cardiol**. 2001; Vol 77, 4-48.
- 17 - Sambrook J, Fritsch EF, Manitis T. Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A. 3vols.1989.
- 18 - Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujia T, Ochiai H, Kosuge M, Watnanbe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura, Ishii M e Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. **Hypertension**.1998;32: 521-526.
- 19- Raij L. Hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. **Hypertension**. 2001; 37(part2): 767-773.
- 20- Farré AL. e Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. **Hypertension**. 2001; 38: 1400-1405.
- 21- Giannini SD, Diament J e Góis J.M. Aterogênese: novos conceitos. **Arq.Bras.Cardiol**. 1998;51(1): 37-41.
- 22- Viaro F, Nobre F. & Evora PRB. Expressão das óxido nítrico sintases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. **Arq.Bras.Cardiol**. 2000; 74(4):365-379.
- 23 - Thomas F, Rudnich A, Bacri AM, Bean K, Guize L e Athanase B. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. **Hypertension**. 2001;37:1256-1261.
- 24- Frossard PM, Hill SH, Elshahat YI, Obineche EN, Bokhari AM, Lestringant GG e Addulle JA. Associations of angiotensinogen gene mutation with hypertension and myocardial infarction in a gulf population. **Clin.Genet**. 1998;54:285-293.

- 25 - Wever RMF, Luscher TF, Consentino F, Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**. 1998; 97: 108-112.
- 26 - Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Moneith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM e Brown MJ . A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸→ Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. **Circulation**. 1999;100: 1515-1520.
- 27 - Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JÁ, Miller GJ, Vallance P, Humphries SE e Hingorani AD. Genetic and enviromental determinants of plasma nitrogen oxides and risk ischemic heart disease. **Hypertension**. 2001;38:1054-1061.
- 28 - Vogel RA. Cholesterol Lowering and endothelial function. **Am.J.Med**. 1999; 107: 479-484.

ANEXO**Termo de Consentimento Informado**

A Faculdade de Medicina e o Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, estão realizando um estudo genético relacionado a doenças cardiovasculares (infarto do miocárdio). Este estudo, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e Dr. Messias Antônio Araújo, visa o estudo do polimorfismo e expressão gênica de diversos genes envolvidos no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária.

Para esta investigação, é necessária a coleta de dois tubos de 5mL de sangue periférico, empregando-se material descartável. Não há desconforto ou risco adicional nestes procedimentos, pois já fazem parte da rotina clínica e laboratorial.

O material coletado será enviado ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames de RNA e DNA. É importante enfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não terapêutica.

O paciente poderá pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, aqueles que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelo presente termo apresentado,

Eu, _____, concordo em colaborar com a pesquisa declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Médico responsável _____

Local de data: _____, _____ de _____ de 2002

Testemunhas:

