

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RAIANA DA SILVA RODRIGUES**

**PAPEL DA VARIANTE M235T DO ANGIOTESINOGÊNIO E DO POLIMORFISMO  
DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
(ECA) NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.**

**UBERLÂNDIA  
ABRIL 2024**

**RAIANA DA SILVA RODRIGUES**

**PAPEL DA VARIANTE M235T DO ANGIOTESINOGÊNIO E DO POLIMORFISMO  
DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
(ECA) NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biologia da Universidade  
Federal de Uberlândia como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

**Orientadora: Prof. Dr. Elisângela Rosa da  
Silva.**

**UBERLÂNDIA  
ABRIL 2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RAIANA DA SILVA RODRIGUES**

**PAPEL DA VARIANTE M235T DO ANGIOTESINOGÊNIO E DO POLIMORFISMO  
DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
(ECA) NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.**

**Membros da Banca**

---

**Profa Dra Carine Firmino Carvalho Roel**

---

**Profa Dra Celene Maria de Oliveira Simões Alves**

---

**Profa Dra Elisângela Rosa da Silva (orientadora)**

## **Dedicatória**

*Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida.*

*Aos meus pais e avos por sempre me darem apoio.*

*A minha orientadora Elisângela por toda a ajuda.*

*E as memórias de minha irmã Tauana, que hoje não está, mas entre nós, mais está sempre presente em meu coração.*

*Aos meus Avos Maria e Jose, que me incentivaram a minha educação formal, e que hoje já estão no céu.*

*E a minha grande amiga e comadre Letícia Maria, que partiu a alguns meses e faz uma grande falta a todos nos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, pela minha família, por todas as oportunidades e por nunca ter me desamparado.

Aos meus pais Claudio e Valdite, pelo amor incondicional, e por terem me ensinado a ter dignidade, humildade e caráter. E principalmente ao meu pai Claudio por não ter medido esforços para que eu realizasse os meus sonhos.

A minha irmã Tauana, que hoje não está mais entre nós, que apesar da distância sua presença está constante em meu coração.

A meu avô Wilson Luiz e minha avó Isaura por serem a distração nos momentos de estresse e ansiedade, me acalmando sempre com o jeito cuidadosos deles.

A minha eterna amiga e comadre Letícia Maria que foi para mim um exemplo de mulher guerreira, que lutou até seu último dia de vida, agradeço ela pela vida da Ana Cecilia e em especial da minha afilhada Maitê que tenho um amor incondicional.

A minha madrinha Maria Das Graças e a Solange por sempre serem grandes amigas para mim e sempre darem conselhos.

Aos professores, por todo o conhecimento compartilhado que tive durante esses anos. E em especial à minha orientadora Elisângela Rosa da Silva, por toda paciência, apoio, dedicação, e pela amizade que se tornou possível e mais agradável a realização desse trabalho.

Aos companheiros de curso, e pelas amizades que fiz durante esses anos, por todos os momentos compartilhados, pelos momentos vividos, pelas risadas e pelo companheirismo.

Agradeço à minha família e amigos por acreditarem em mim e nos meus sonhos, e me ajudarem a realizá-los.

*"O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda.*

*Meu coração exulta de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças".*

*- Salmos*

## **Resumo**

A Doença Arterial Coronariana (DAC) é caracterizada pela formação e acúmulo de placas de gordura nas artérias coronárias, e assim diminuindo a chegada de oxigênio ao coração. Fatores genéticos parecem estar envolvidos no desenvolvimento da doença, como a variante M235T do gene do angiotensinogênio (AGT) e o polimorfismo de inserção/deleção (I/D) da enzima conversora de angiotensina (ECA). O objetivo desse trabalho foi genotipar e analisar a relação da variante M235T do AGT e do polimorfismo de I/D da ECA na (DAC). Foram selecionados 121 indivíduos, sendo 74 pacientes (caso) e 47 controles, ambos submetidos à angiografia coronariana e à análise dos fatores de risco convencionais. Amostras de sangue periférico foram obtidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (termo de Consentimento em anexo). e procedeu-se a extração de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para isolamento dos fragmentos do polimorfismo de I/D da ECA e da variante M235T do AGT, os últimos sendo submetidos à restrição enzimática, com a enzima Tth111. Após esses procedimentos foi realizada a eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio, 3,5% e 2% respectivamente para genotipagem da variante M235T e do polimorfismo I/D da ECA. Os resultados obtidos não foram estatisticamente significantes para a variante M235T e o polimorfismo de I/D da ECA em relação a ocorrência da DAC.

**Palavras-chave:** Doença Arterial Coronariana (DAC); Angiotensinogênio; Polimorfismo M235T e Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).

## **Abstraction**

Coronary Artery Disease (CAD) is characterized by the formation and accumulation of fatty plaques in the coronary arteries, thus reducing the arrival of oxygen to the heart. Genetic factors appear to be involved in the development of the disease, such as the M235T variant of the angiotensinogen gene (AGT) and the insertion/deletion (I/D) polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE). The objective of this work was to genotype and analyze the relationship between the M235T variant of AGT and the ACE I/D polymorphism in (CAD). 121 individuals were selected, 74 patients (case) and 47 controls, both undergoing coronary angiography and analysis of conventional risk factors. Peripheral blood samples were obtained at the Hospital de Clínicas of the Federal University of Uberlândia (Consent form attached). and DNA extraction and Polymerase chain reaction (PCR) were carried out to isolate fragments of the ACE I/D polymorphism and the M235T variant of AGT, the latter being subjected to enzymatic restriction, with the enzyme Tth111. After these procedures, agarose gel electrophoresis was performed, stained with ethidium bromide, 3.5% and 2% respectively, for genotyping of the M235T variant and the ACE I/D polymorphism. The results obtained were not statistically significant for the M235T variant and the ACE I/D polymorphism in relation to the occurrence of CAD.

**Keywords:** Coronary Artery Disease (CAD); Angiotensinogen; M235T Polymorphism and Angiotensin Converting Enzyme (ACE).

### **Lista de Abreviaturas:**

- DAC: Doença Arterial Coronariana;
- DCV: Doenças Cardiovasculares;
- DNA: Desoxirribonucleico Ácido, ou em português – ADN Ácido Desoxirribonucleico;
- ECA: Enzima Conversora de Angiotensina;
- SRA: Sistema Renina Angiotensina;
- HA: Hipertensão Arterial;
- HDL: É a sigla de High Density Lipoproteins, que significa lipoproteínas de alta densidade
- LDL: É a sigla de Low Density Lipoproteins, que significa lipoproteínas de baixa densidade
- PB - pares de base

## SUMÁRIO

<b>1-Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2-Objetivos.....</b>	<b>07</b>
<b>2.1- Objetivos específicos.....</b>	<b>08</b>
<b>3- Metodología.....</b>	<b>08</b>
<b>3.1 Obtenção das amostras.....</b>	<b>08</b>
<b>3.2- Grupos.....</b>	<b>08</b>
<b>3.3-Procedimentos.....</b>	<b>09</b>
<b>3.3.1-Extração de DNA.....</b>	<b>09</b>
<b>3.3.2-Amplificação da variante M235T do gene do AGT.....</b>	<b>09</b>
<b>3.3.3-Amplificação do Polimorfismo de I/D do Gene da ECA.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4-Estatística.....</b>	<b>12</b>
<b>4-Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>5-Discussão.....</b>	<b>15</b>
<b>6-Considerações Finais.....</b>	<b>16</b>
<b>7- Referências Bibliográficas.....</b>	<b>17</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>21</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>23</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, o mundo tem sofrido com o impacto das mudanças em curso, como a urbanização, a industrialização e o avanço tecnológico, as quais tem causado alterações comportamentais e culturais na vida dos indivíduos que têm adotado hábitos não saudáveis, marcados pela ingestão de alimentos processados, álcool, cigarro e o sedentarismo. Dessa forma, a saúde da população está comprometida por várias patologias entre as quais se destacam as doenças cardiovasculares (MACENO & GARCIA, 2022).

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem o conjunto de enfermidades que atingem o coração e os vasos sanguíneos e que resultam em modificações da circulação que podem resultar em doença coronariana e cerebrovascular, hipertensão arterial e arterial periférica de diferentes etiologias (VERA-REMARTÍNEZ et al, 2020).

As DCV são as responsáveis pela maior taxa de morbimortalidade, e com isso representam elevados custos sociais e econômicos. Estima-se que as DCV possam causar 17 milhões de mortes por ano, e assim representam uma das formas mais comuns de morte no mundo (DARTORA et al, 2017). As DCV são também uma das principais causas de morte no Brasil, e dentre elas a doença arterial coronariana (DAC) tem sido por muitos anos a principal causa de morte na população brasileira, exceto no ano de 2020 quando a pandemia do coronavírus (COVID-19), foi a responsável pelo maior número de óbitos seguida pela DAC (MARINHO, 2021).

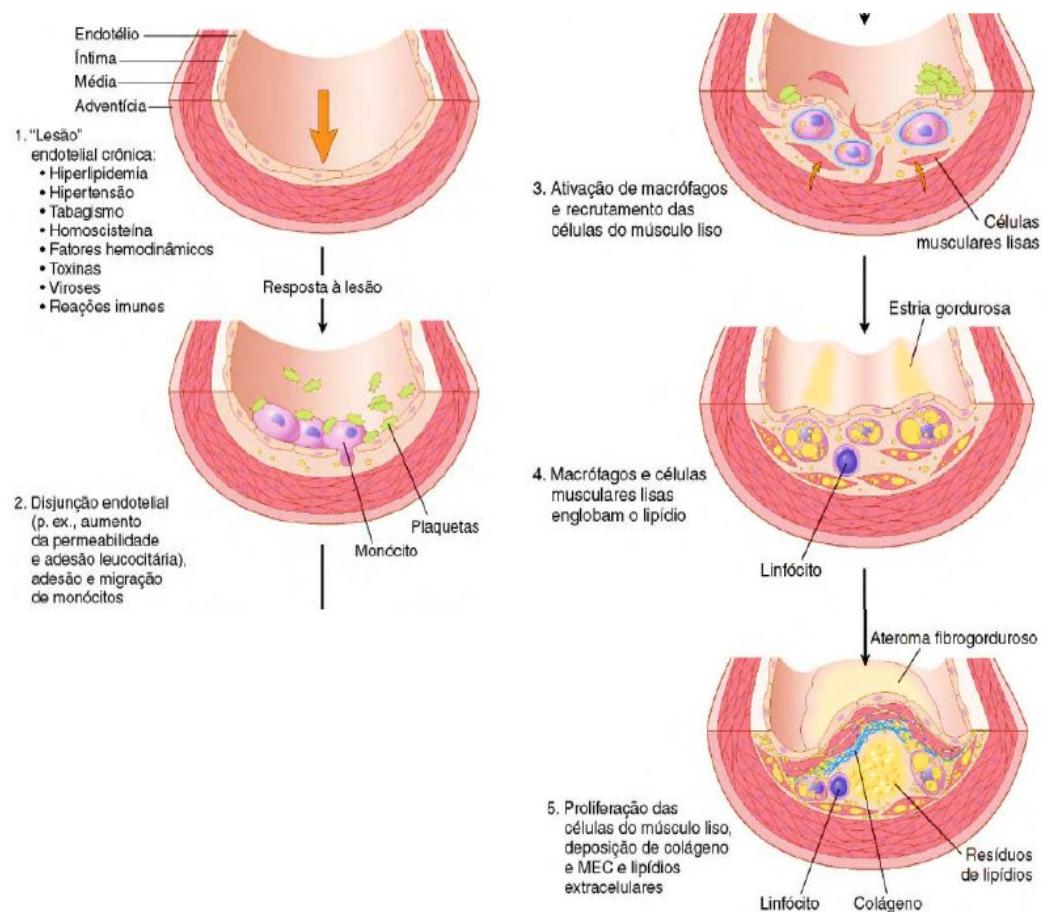
No ano de 2017, a incidência de DAC na população brasileira com idade superior a 20 anos foi estimada em 1,75% (2.500.000 de indivíduos). As regiões Sul e Sudeste apresentam a maior taxa de prevalência e essa vem aumentando desde 1990, com uma estimativa de 121 mil casos, mas com taxa padronizada de mortalidade decrescente (OLIVEIRA et al, 2020)

Existem diversas enfermidades causadas pela DCV, e entre elas uma das mais preocupantes é DAC (BOURBON et al, 2016). Inúmeros estudos indicam que sua fisiopatologia é desencadeada principalmente por uma associação de fatores genéticos e ambientais. Incluem-se nesses fatores o histórico familiar de DAC prematuro, diabetes mellitus, tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia, dietas ricas em colesterol, obesidade e alto teor de gordura/baixo teor de fibras (Jing et al; 2014). Essa doença, na maior parte das vezes, é provocada pela aterosclerose, que é o depósito de placas de gordura e cálcio no interior das artérias, que por consequência dificultam e até podem interromper a circulação sanguínea nos órgãos. A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular

devida a diversos fatores de risco como dislipidemias, fatores genéticos, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes e tabagismo (BODANESE, 2014; MALAKAR et al., 2019).

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico das artérias que perfaz na oclusão parcial ou total do lúmen vascular (figura-1), conforme o estágio aterosclerótico que as artérias se encontram (LEGEIN et al., 2013). O endotélio vascular é responsável por várias funções que mantém o funcionamento dos vasos sanguíneos, entre elas, a homeostase e o tônus vascular pelas liberações de moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (NO) (STORCH et al., 2017). A aterosclerose se desenvolve em regiões de desvio do fluxo sanguíneo, nas bifurcações, visto que nessas regiões o estresse de cisalhamento ou “shear stress” e a velocidade do fluxo sanguíneo são menores e ou turbulentas, permitindo a passagem de moléculas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e as células leucocitárias (BARBALHO et al., 2015; SOUSA; RIBEIRO, 2019).

Figura 1- Lesão aterogênica e formação da placa aterosclerótica



Fonte: <https://files.passeidireto.com/7240198e-2d9c-4aa2-aac1-fa7f3d530bd4/bg3.png>  
<https://blog.medsimpleoficial.com.br/wp-content/uploads/2023/02/Aterosclerose-3.png>

O processo se inicia em consequência da entrada de moléculas de LDL no espaço subendotelial nas regiões, que ocorrem o processo de transcitose, onde a partícula é transportada para o espaço subendotelial através de endossomos ou quando já existe uma lesão endotelial instalada na parede vascular (SOUSA; RIBEIRO, 2019; GIRIBELA et al., 2011). Uma vez na parede do vaso, a LDL oxidada (LDLox) promove a redução da biodisponibilidade de NO (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005), e o recrutamento de leucócitos para a região subendotelial, por meio da expressão de P-selectina e E-selectina na membrana da célula endotelial e ainda estimula a produção de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (GIRIBELA et al., 2011; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; MCLAREN et al., 2011). Assim, os monócitos posicionados na região da bifurcação, são transportados para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos. Nesse momento, inicia-se a síntese e a liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, que atraem mais monócitos para o espaço abaixo do endotélio. A entrada de LDL permanece constante e nesse sentido, a ativação do endotélio também é contínua, e esse processo permanece sendo modulado por estímulo anti e pró-inflamatórios, que resultam no avanço da aterosclerose (GIRIBELA et al., 2011; KURAKULA et al., 2013; OISHI et al., 2018).

A aterogênese passa por diversos estágios de variações morfológicas vasculares que evoluem do estágio inicial até o mais avançado, a hiperplasia intimal precoce (HIP), é o processo inicial para a formação da placa aterosclerótica, que a partir disso passa por diversos estágios até atingir sua fase mais avançada, que pode provocar um episódio de corrosão ou ruptura da placa e a formação de um trombo (BENTZON et al., 2014).

As associações entre o sistema renina angiotensina (SRA) e o desenvolvimento da placa aterosclerótica são amplamente estudadas. Acredita-se que a Angiotensina II (Ang II), principal produto do SRA, é um potente fator pro-inflamatório que promove a liberação de citocinas como a interleucina-6 e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral). Deste modo a Ang II está envolvida no desenvolvimento dos processos ateroscleróticos (BAHRAMALI et al.; 2014). Os genes codificadores deste sistema e suas variantes relacionam-se também com o estabelecimento da DAC (FAN & WATANABE, 2022).

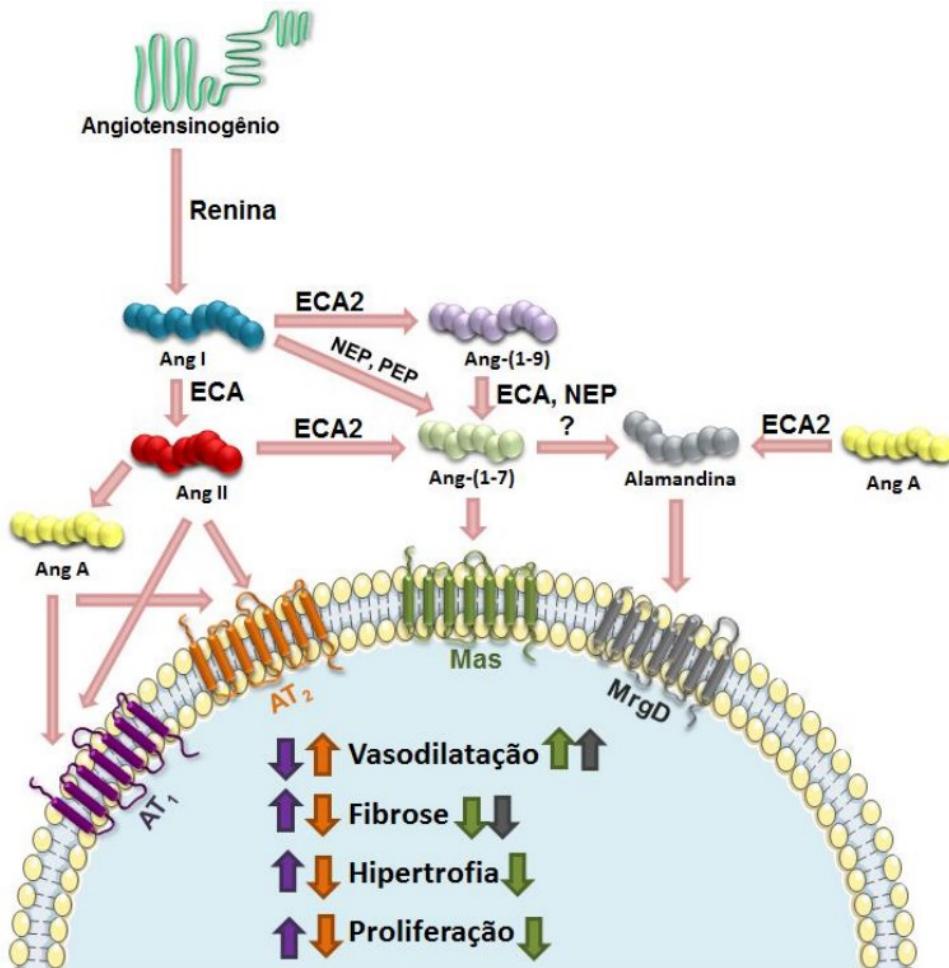
O SRA é um sistema hormonal regulador bastante complexo, pois envolve vários órgãos que interagem para regular múltiplas funções do corpo, como o balanço hidroelectrolítico, a pressão arterial e a homeostase glicêmica e lipídica (PAZ OCARANZA, 2020). A cascata peptídica (figura-2), se inicia pelo angiotensinogênio (AGT), que é clivado pela renina, em

angiotensina I (Ang I), a qual por sua vez é processada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para produzir o octapeptídeo ativo, angiotensina II (Ang II). As ações da Ang II são mediadas pela ligação a seus dois receptores, tipo 1 (AT1R) e tipo 2 (AT2R), os quais pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. A AngII exerce ações cardiovasculares como a regulação da pressão arterial com vasoconstrição, liberação de aldosterona e o equilíbrio hidroeletrolítico. Nas últimas décadas, constatou-se as importantes ações da Ang II/AT1R no metabolismo, inflamação e proliferação celular e a existência de uma via contrarreguladora com efeitos opostos a ECA/AngII/AT1R. A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e a neprilisina (NEP) são parte desse sistema de contrarregulação. ACE2 e NEP podem clivar Ang II para produzir angiotensina-(1-7) (Ang-1-7), e ACE2 cliva Ang I para gerar angiotensina-(1-9) (Ang-1-9), que também é convertida para Ang-(1-7). Ang-(1-7) liga-se ao receptor MasR, induzindo efeitos vasodilatadores, anti-hipertensivos, antiinflamatórios e anti-proliferativos (PAZ OCARANZA, 2020; GUIMARÃES JÚNIOR, 2023).

O receptor MasR é tem maior expressão em testículo e cérebro, mas também pode estar presente em outros tecidos, como no endotélio vascular humano, onde ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) via cascata fosfatidilinositol 3 quinase/ proteína quinase B (PI3K/AKT) (Sampaio et al., 2007). Assim, vários efeitos causados por este peptídeo angiotensinérgico tem sido descritos, embora pouco se saiba sobre os mecanismos moleculares envolvidos em suas propriedades biológicas (PELUSO, 2014)

Lautner et al., 2013 descreveram e caracterizaram um novo peptídeo do SRA, a Alamandina, a qual pode ser formada a partir da Ang-(1-7) ou Angiotensina A (Ang A), um peptídeo formado a partir da Ang II (Jankowski et al., 2007). O aminoácido Asp1 da Ang-(1-7) é descarboxilado em Ala1, enquanto o aminoácido C-terminal da Ang A é clivado pela ação da ECA2, formando-se a Alamandina. O mesmo trabalho também descreveu o receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas - tipo D (MrgD) como receptor para Alamandina. Dentre as ações deste peptídeo, destacam-se a vasodilatação, liberação de NO, efeitos anti-hipertensivos e anti-fibróticos (LAUTNER et al., 2013, PAZ OCARANZA, 2020).

Figura 2 - Esquema simplificado da cascata do Sistema Renina Angiotensina e formação de peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos.



Ang: Angiotensina; AT1: Receptor da Ang II tipo 1; AT2: Receptor da Ang II tipo 2; ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2; Mas: Receptor da Ang-(1-7), MrgD: Receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas tipo - D; NEP: Endopeptidase neutra; PEP: Protil-endopeptidase. Fonte: Peluso et al., 2014.

O angiotensinogênio é um pró-hormônio inativo que sob a ação da enzima conversora de angiotensina I é transformada por meio da retirada de dois aminoácidos de sua extremidade C-terminal, no octapeptídio angiotensina II. Esse pró-hormônio é um potente e multifuncional hormônio previamente envolvido na manutenção do tônus vascular e na reabsorção do sódio pelos rins (Araújo et al, 2005; GATTI, et al, 2013). Entre as suas diversas funções estão a contração e proliferação de células do músculo liso vascular pela fosforilação de tirosina quinase e consequentemente a ativação de proteínas envolvidas na transcrição do DNA. O gene angiotensinogênio pode estar atuando na patogênese da doença arterial coronariana e suas diversas síndromes (Araújo et al, 2005).

O gene do angiotensinogênio está localizado no cromossomo 1q 42-43, uma mutação denominada de variante M235T que está localizada no exon 2 do gene, que corresponde a uma transição de aminoácidos de metionina para treonina na posição 235 da proteína madura que é denominada de T235. Estudos tem demonstrado uma importante associação entre a T235 e a variante molecular no promotor proximal do gene do angiotensinogênio, e uma adenina no lugar da guanina, e seis nucleotídeos acima do local da iniciação da transcrição A (-6). A substituição de A/G no nucleotídeo seis afeta as interações entre pelo menos um fator nuclear de transcrição e do promotor do angiotensinogênio, que assim influencia a velocidade basal de transcrição do gene (JEUNEMAITRE, et al 1992; SPARKS, et al ,2014; ZHAI, et al 2019).

Figura 3 - Representação esquemática da organização do gene do Angiotensinogênio



Os retângulos representam as regiões exônicas e as linhas (horizontais) representam as intrônicas. No exon2 pode ocorrer a troca de um aminoácido Metionina (M) por um Treonina (T) na posição 235.

Fonte: <https://images.app.goo.gl/VZD5QR5Lxsp9qQHDA>

Este achado, provavelmente, explica por que os homozigotos T235 possuem níveis plasmáticos de angiotensinogênio 10% a 20% maior que os homozigotos M235. A variante T235/T235 ocorre em frequência elevada na população japonesa e na população ocidental está presente em aproximadamente 19%. Indivíduos portadores do genótipo homozigoto M235/M235 apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio plasmático; os heterozigotos M235/T235 têm níveis intermediários e os homozigotos T235/T235 possuem as médias maiores. A relação observada entre o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (TT, MT e TT), os seus produtos proteicos e os fenótipos da doença arterial coronariana sugerem a evidência de um possível papel dos níveis elevados do angiotensinogênio circulante na sua patogênese (ARAÚJO et al, 2005; DIAS FILHO, 2023).

Outro membro do SRA, a enzima conversora de angiotensina (ECA) converte angiotensina I em angiotensina II, que posteriormente afeta o tônus vascular e altera a função

renal, consequentemente controlando a pressão sanguínea (POORGHOLI, *et. al.*, 2012). Essa enzima é encontrada em vários locais, com altas concentrações principalmente nos pulmões. A ECA pode ser encontrada ligada à membrana ou na forma solúvel, tem distribuição corporal geral, sendo obtida no plasma sanguíneo, fluido amniótico, plasma seminal entre outros fluidos corporais, inclusive no Sistema Nervoso Central (FEHER *et al.*, 2013). Estudos, relacionados à infecção da covid 19, mostram que os miócitos cardíacos comportam uma grande quantidade de ECA tecidual, sendo que, no miocárdio a mesma desempenha papel crucial em vários percursos homeostáticos, incluindo crescimento celular, formação da matriz extracelular e apoptose (DE CARVALHO *et al*, 2021).

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é obtida através da clivagem de uma carboxipeptidase, entre os aminoácidos arg663 e ser664. Ela é uma megaloprotease de zinco que atua na conversão de angiotensina I em angiotensina II (BUENO *et al*, 2013). A ECA está presente no endotélio dos vasos e no plasma sanguíneo, e sua concentração está relacionada ao polimorfismo genético que possui, sendo assim indivíduos com o polimorfismo de deleção possuem maior quantidade de enzima circulante do que os demais e o aumento na quantidade da ECA influencia no desenvolvimento de cardiopatias (CASTRO; ALMEIDA; QUEIROZ, 2023).

A angiotensina I é inativa e, portanto, para que tenha algum efeito no organismo, é necessário que ela seja convertida em angiotensina II. Essa etapa acontece durante a circulação pulmonar onde a enzima conversora de angiotensina (ECA), que está presente no endotélio dos vasos pulmonares e não no plasma, catalisa a conversão de angiotensina I em angiotensina II (CASTRO; ALMEIDA; QUEIROZ, 2023).

O polimorfismo ocorre no cromossomo 17, no ítron 16 do gene da ECA sendo caracterizado pela inserção (I) ou deleção (D) do fragmento Alu com aproximadamente, 287 pb. E assim como consequência, é possível encontrar três genótipos para essa enzima: II e DD, ambos homozigotos e I/D, heterozigoto. Indivíduos com genótipo DD possuem maior concentração de ECA circulante o que resulta aumento da produção de angiotensina II. No genótipo II ocorre uma diminuição na produção da ECA enquanto no I/D essa produção é média (CASTRO; ALMEIDA; QUEIROZ, 2023).

Este estudo tem como objetivo a análise da variante M235T do gene do AGT e do polimorfismo de I/D e da ECA na doença arterial coronariana (DAC).

## 2. OBJETIVOS

Neste contexto, o presente estudo visa a análise da variante M235T do gene do angiotensinogênio e do polimorfismo de I/D da ECA na doença arterial coronariana (DAC).

### 2.1. Objetivos específicos

- ✓ Análise da integridade do DNA genômico por meio de eletroforese;
- ✓ Amplificação do fragmento do gene correspondente à variante M235T do angiotensinogênio.
- ✓ Restrição enzimática, com a enzima Tth 111 do fragmento de 165 pb resultante da amplificação da variante M235T, para obtenção dos genótipos
- ✓ Amplificação da região de I/D do gene da ECA
- ✓ Eletroforese e análise dos géis para determinação dos genótipos de cada um dos genes estudados e sua ocorrência na DAC.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1- Obtenção de amostras:

As amostras de sangue periférico foram obtidas no Setor de Cardiologia (Dor Torácica / Laboratório de Hemodinâmica) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG).

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

### 3.2-Grupos:

A: Pacientes: Foram selecionados os indivíduos com o diagnóstico de síndrome coronariana aguda (Angina Instável, IAM) baseada em eletrocardiográficos enzimáticos, dados clínicos e com a DAC comprovada pela angiografia coronária.

B: Controles: Indivíduos que passaram pelo processo e fizeram a angiografia coronária e que não apresentem lesões coronárias.

**-Critérios de exclusão:**

- Enfermidades crônicas terminais.
- Doenças malignas sistêmicas.

**3.3- Procedimentos**

**3.3.1-Extração de DNA:**

A extração do DNA foi feita através do reagente Brazol, segundo especificações do fabricante (LGC Biotecnologia Ltda) e protocolo de Chomczynski (1993).

**3.3.2- Amplificação da variante M235T do gene do AGT.**

A análise do polimorfismo M235T foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction – PCR*). O fragmento do gene do AGT com 165 pb, contido no éxon 2, códon 235 foi amplificado por meio da PCR com os seguintes primers e condições:

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

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

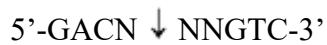
Reação de amplificação (V=30 $\mu$ L):

REAGENTES	QUANTIDADE ( $\mu$ l)
Tampão 10X	3,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mMolar)	1,0 $\mu$ l
Primer sense (5pmol)	1,6 $\mu$ l
Primer antisense (5pmol)	1,6 $\mu$ l
dNTPs (100m molar)	0,6 $\mu$ l
Taq (DNA polimerase) 5U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
DNA(150ng)	5,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O estéril	17,0 $\mu$ l

Programa utilizado:

TEMPERATURA (ºC)	TEMPO (min)	QUANT. DE CICLOS
92(desnaturação)	01:00	1
90(desnaturação)	00:40	
59(anelamento)	00:50	38
72(extensão)	00:40	
72 (extensão final)	02:00	1
4	10:00	1

Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos com a enzima Tth 111-1 (New England Biolabs) segundo especificações do fabricante. As reações foram incubadas por 12 horas a 37°C que reconhece o seguinte sítio de restrição:



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

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

O produto da restrição foi visualizado em gel de agarose 3,5% e corado com brometo de etídio, após eletroforese a 135 volts por 30 minutos.

### 3.3.3- Amplificação do Polimorfismo de Inserção/Deleção do Gene da ECA:

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

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

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

**Reação de amplificação (V=30μL):**

REAGENTES	QUANTIDADE (μl)
Tampão 10X	3,0 μl
MgCl <sub>2</sub> (25mMolar)	1,2 μl
Primer sense (5pmol)	1,6 μl
Primer antisense (5pmol)	1,6 μl
dNTPs (100m molar)	0,6 μl
Taq (DNA polimerase) 5U/μl	0,2 μl
DNA(150ng)	5,0 μl
H <sub>2</sub> O estéril	16,8 μl

**Programa utilizado:**

TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)	QUANT. DE CICLOS
93(desnaturação)	01:30	1
90 (desnaturação)	00:40	
58 (anelamento)	00:50	35
72(extensão)	00:40	
72(extensão final)	02:00	1
4	10:00	1

O polimorfismo no ítron 16 é caracterizado pela deleção/inserção de um fragmento de 287 pb no gene da ECA. Os primers dessa reação são específicos para a detecção do polimorfismo I/D, portanto após a amplificação, os produtos visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, caracterizarão os genótipos em questão. Um indivíduo homozigoto para a deleção (D/D) apresentará no gel uma banda de 190 pb, o heterozigoto (D/I) terá duas bandas de 490 pb e 190 pb cada e o homozigoto para a insersão (I/I) mosstra um fragmento de 490 pb.

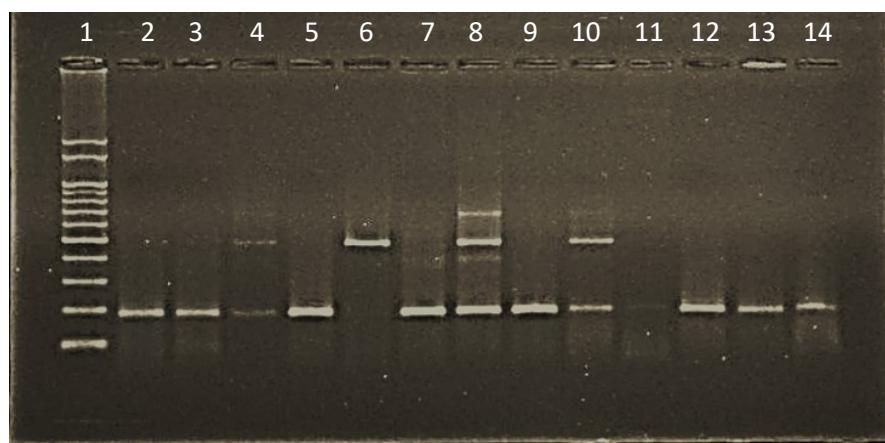
### 3.4-Estatística:

Para avaliar a frequência dos genótipos da variante M235T e do polimorfismo I/D da ECA em relação à ocorrência da DAC, utilizou-se o teste de Qui-quadrado de contingência (independência). Todos os dados utilizaram o nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). As análises foram feitas pelo programa online Social Science Statistics, disponível em <https://www.socscistatistics.com/>.

## 4. RESULTADOS

Um total de 121 amostras foram genotipadas para o polimorfismo I/D da ECA e para a variante M235T do AGT. Desses 74 são pacientes (caso), indivíduos portadores de DAC, e 47 são do grupo controle, indivíduos não diagnosticados com DAC. As figuras 4 e 5 representam os genótipos encontrados.

Figura 4 – Eletroforese representativa dos genótipos do polimorfismo I/D da ECA



Coluna 1: Marcador de peso molecular de 100pb

Colunas 2,3,5,7,9,12,13 e 14: Fragmento de 190pb referente ao genótipo D/D

Coluna 6: Fragmento de 490pb referente ao genótipo I/I

Coluna 4, 8 e 10: Fragmentos de 490 e 190 pb referente ao genótipo I/D

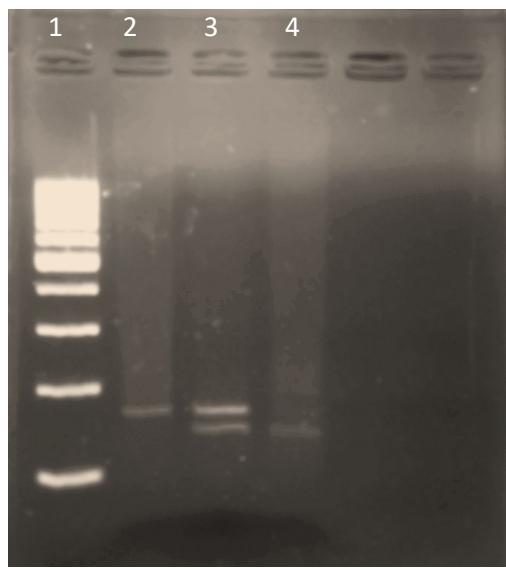
Para demonstrar se há ou não relação entre o polimorfismo de I/D da ECA e a DAC, o teste do qui-quadrado de independência, com  $p < .05$ , foi realizado (tabela-1).

Tabela-1: Frequência dos genótipos do polimorfismo de I/D da ECA nos grupos caso e controle (em relação a DAC)

	<b>DD</b>	<b>ID</b>	<b>II</b>	<b>DD+ID</b>
<b>Caso (DAC)</b>	37 (50%)	31 (41,89%)	6 (8,11%)	68(91,80%)
<b>Controle</b>	18 (38,30%)	24 (51.06%)	5 (10,64%)	42(89,36%)
<b><i>Totais de colunas</i></b>	<b>55(45,45%)</b>	<b>55(45,45%)</b>	<b>11(9,09%)</b>	

Não foi encontrada nenhuma diferença entre a porcentagem de alelos DD ( $X^2 = 1,55$ ,  $p = 0,21$ ), ID ( $X^2 = 0,90$ ,  $p = 0,34$ ) e II ( $X^2 = 0,34$ ,  $p = 0,59$ ), entre pacientes diagnosticados com DAC e grupo controle (Tabela 1). A presença do alelo D (DD + ID) também não foi diferente entre os grupos DAC e controle ( $X^2 = 0,03$ ,  $p = 0,85$ ). A maior parte da população atendida pelo HC-UFU apresentou alelos do tipo DD e DI, 45,45% cada ( $X^2 = 0$ ,  $p = 1$ ). A menor parte da população apresentou alelos do tipo II, 9,1% ( $X^2 = 24,24$ ,  $p < 0,00$ ).

Figura-5 – Eletroforese representativa dos genótipos da variante M235T gene do angiotensinogênio.



Coluna 1: Marcador de peso molecular de 100pb

Coluna 2: Fragmento de 165pb referente ao genótipo MM

Coluna 3: Fragmentos de 165, 141 e 24 pb referente ao genótipo MT

Coluna 4: Fragmentos de 141 e 24 pb (não visível) referente ao genótipo TT

Para demonstrar se há ou não relação entre a variante M235T e a DAC, o teste do qui-quadrado de independência, com  $p < .05$ , foi realizado (tabela-2).

Tabela-2: Frequência dos genótipos da variante M235T do AGT nos grupos caso e controle (em relação a DAC)

	<b>MM</b>	<b>MT</b>	<b>TT</b>	<b>MT+TT</b>
<b>Caso (DAC)</b>	10 (13,51%)	55 (74,32%)	9 (12,16%)	64 (86,49%)
<b>Controle</b>	14 (29,79%)	30 (63,83%)	3 (6,38%)	33(70,21%)
<b><i>Totais de colunas</i></b>	24 (19,83%)	85(70,25%)	12(9,92%)	

A porcentagem de alelos MM foi maior no grupo controle ( $X^2 = 6,12$ ,  $p = 0,01$ ) quando comparado a pacientes diagnosticados com DAC (Tabela 2). Não foi encontrada diferença entre a porcentagem de alelos MT ( $X^2 = 0,78$ ,  $p = 0,37$ ) e TT ( $X^2 = 1,80$ ,  $p = 0,18$ ) entre pacientes diagnosticados com DAC e grupo controle. Não foi detectada diferença entre a porcentagem do alelo T (MT+TT) para pacientes diagnosticados com DAC e grupo controle ( $X^2 = 1,69$ ,  $p = 0,19$ ). A maior parte da população atendida pelo HC-UFGU apresenta alelos do tipo MT ( $X^2 = 28,22$ ,  $p < 0,00$ ). A porcentagem de alelos MM e TT é a mesma ( $X^2 = 3,30$ ,  $p = 0,07$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A DAC é um grande problema à saúde pública, responsável por milhares de mortes e gastos públicos e que tem gerado bastante preocupação e ganhado muita atenção no meio acadêmico científico. Essa doença resulta de uma série de fatores que levam ao seu acometimento, como por exemplo diabetes mellitus, tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia, dietas ricas em colesterol, obesidade e alto teor de gordura/baixo teor de fibras (Jing et al; 2014). Segundo Araújo, 2017 a DAC é desencadeada por fatores multigênicos, pois os fatores clássicos não explicam completamente a gênese ou a história natural da doença e possíveis novos fatores de risco associados à DAC têm sido identificados, incluindo genes relacionados à renina-angiotensina (SRA).

No presente trabalho foram analisados os fatores genéticos ou hereditários correlacionados com a prevalência da DAC. Os fatores genéticos experimentados foram o polimorfismo de I/D da ECA e a variante M235T do gene do AGT.

Conforme evidenciado por meio das análises estatísticas, não houve correlação significativa entre o polimorfismo I/D da ECA e a DAC. Assim, nessa análise, indivíduos portadores dessa alteração genética não se encontram predispostos à disfunção coronariana abordada.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os estudos de Pfohl *et al.* (1998), Fonseca e Izar (2004) e Bonfim-Silva et (2016) que afirmam que não há evidências claras relacionando a DAC à presença deste polimorfismo genético.

Em 2008, Zintzaras et al. demonstraram, em um estudo de metanálise, a evidência de uma modesta associação positiva entre a variante polimórfica I/D da ECA e a DAC. Na ocasião os pesquisadores também destacaram a heterogeneidade dos resultados relatados, as lacunas consideráveis encontradas nos artigos pesquisados e a necessidade de estudos futuros focados em certas populações de pacientes de alto risco.

Em relação a análise da variante M235T do AGT os resultados não foram estatisticamente significativos, ou seja, a manifestação da DAC, na população estudada, não está relacionada à variante M235T. Considerando o efeito de codominância, analisando os genótipos (MT+TT) x MM nos indivíduos caso e controle, observamos também que não há uma associação positiva,  $\chi^2 = 1,69$  e  $p = 0,19$ , entre a presença do alelo T e a DAC.

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os estudos de Fonseca e Izar (2004) que não encontraram evidências relacionando os riscos de infarto do miocárdio e doença coronariana à presença do polimorfismo genético M235T. Esses achados também estão de acordo com Bonfim-Silva et, 2016 que relatou em seu estudo que o polimorfismo M235T do AGT em caucasianos-brasileiros não foi associado a DAC e também não foi observada associação no polimorfismo I/D da ECA com a DAC em afro-brasileiros e caucasianos-brasileiros.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No presente estudo não foi possível obter correlação estatisticamente significante entre as frequências genotípicas da variante M235T do gene do AGT, (M/M; M/T e T/T) e do polimorfismo de I/D do gene da ECA com a DAC, nos grupos, pacientes e controles, analisados.

O experimento foi realizado com um n amostral de apenas 121 indivíduos, sendo 74 pacientes e 47 controles o que ao se considerar uma população tão miscigenada, como a brasileira, pode não ser um número representativo para esse tipo de estudo.

Para se analisar fatores genéticos envolvidos e doenças multifatoriais como a DAC seria mais satisfatório um estudo realizado com um amostral mais amplo. Desta forma, devido às divergências encontradas na literatura é de suma importância que se prossiga com os estudos acerca dos componentes do SRA.

Isso pode ser justificado pela interação de mecanismos compensatórios do SRAA ainda não compreendidos ou pela maneira como os estudos são realizados, o que inclui os grupos de indivíduos selecionados e as limitações das estratégias de estudo. São necessários, portanto, novas pesquisas e abordagens para que se esclareça melhor a interferência do SRAA, das vias alternativas e dos polimorfismos, especialmente do I/D da ECA e M235T do AGT, na patogênese da doença coronariana.

## 7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, Messias Antônio et al. O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, p. 164-169, 2005.
- ARAÚJO, Messias Antonio et al. A New Investigative Approach: How the Angiotensin-Converting Enzyme Gene Interacts with Coronary Risk Factors. **Cardiovascular Diseases & Diagnosis**, v. 5, n. 6, p. 1-5, 2017.
- BAHRAMALI, Ehsan et al. Renin–angiotensin system genetic polymorphisms: Lack of association with CRP levels in patients with coronary artery disease. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 559-565, 2014.
- BARBALHO, S. M. et al. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: Tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319–327, 2015.
- BARBALHO, Sandra Maria et al. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável? **Jornal vascular brasileiro**, v. 14, p. 319-327, 2015.
- BENTZON, J. F. et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. **Circulation Research**, v. 114, n. 12, p. 1852–1866, 2014.
- BODANESE, L. C. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Pocket Book 2009-2014. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, n. 6, p. 728, 2014.
- BONFIM-SILVA, R., GUIMARÃES, L.O., SANTOS, J.S. et al. Estudo caso-controle de associação de polimorfismos nos genes do angiotensinogênio e da enzima conversora da angiotensina e doença arterial coronariana e hipertensão arterial sistêmica em afro-brasileiros e caucasianos-brasileiros. **J Genet** 95, 63–69; 2016.

BOURBON, Mafalda et al. Doenças cardiovasculares. 2016.

BUENO, S. et al. Relação entre o polimorfismo da ECA e aptidão física. **ACTA Brasileira Do Movimento Humano**; v. 3, n. 2, abril/junho 2013.

CASTRO, Melina Fernandes; DE ALMEIDA, Rafael Barbosa; QUEIROZ, Paulo Roberto Martins. Estudo da influência do polimorfismo da enzima conversora de angiotensina em casos de hipertensão. **Seven Editora**, 2023.

CHOMCZYNSKI P. Um reagente para o isolamento simultâneo de etapa única de RNA, DNA e proteínas de amostras de células e tecidos. **Biotécnicas**, 15(3):532-4, 536-7, 1993.

DARTORA, D. R., et al. Hipertensão arterial sistêmica como fator de risco para doença arterial coronariana. **Rev Bras Hipertens**, v. 24, n. 4, p. 162-9, 2017.

DE CARVALHO, Sarah Godoi et al. Os impactos da COVID-19 no sistema cardiovascular e suas implicações prognósticas The impacts of COVID-19 on the cardiovascular system and its prognostic implications. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 81268-81285, 2021.

DIAS FILHO, Carlos Alberto Alves. Construção de um aplicativo para estimar risco hipertensivo em adolescentes com histórico familiar de hipertensão, associado a polimorfismos do sistema renina angiotensina aldosterona e as possíveis alterações autonômicas cardíacas. 2023. 122 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

FAN, J.; WATANABE, T. Atherosclerosis: Known and Unknown. **Pathology International**, v. 72, n. 3, p. 151-160, 2022.

FEHER, Attila et al. Increased tissue angiotensin-converting enzyme activity impairs bradykinin-induced dilation of coronary arterioles in obesity. **Circulation Journal**, v. 77, n. 7, p. 1867-1876, 2013.

FONSECA, Francisco Antonio Helfenstein; IZAR, Maria Cristina de Oliveira. Polimorfismos em genes relacionados ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, associação com a doença arterial coronariana e suas características anatômicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, p. 371-372, 2004.

GATTI, Renata R. et al. The interaction of AGT and NOS3 gene polymorphisms with conventional risk factors increases predisposition to hypertension. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 14, n. 4, p. 360-368, 2013.

GIRIBELA, C. R. G. et al. Endothelial function and dysfunction: pathophysiology and perspectives for use in research and clinical practice. **Rev Bras Hipertens**, v. 18, n. 1, p. 27–32, 2011.

GOTTLIEB, M. G.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 203–207, 2005.

GUIMARÃES JÚNIOR, Orcione Ferreira. Avaliação da expressão de componentes do sistema Renina-Angiotensina (SRA) na placenta e no tecido adiposo de gestante com obesidade e sua correlação com parâmetros clínicos, laboratoriais, antropométricos e histológicos. 2023.

JEUNEMAITRE, Xavier et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**, v. 71, n. 1, p. 169-180, 1992.

JING, X.; CHEN, S. S.; JING, W.; TAN, Q.; YU, M. X.; TU, J. C. Diagnostic Potential of Differentially Expressed Homer1, IL-1beta, and TNF-alpha in Coronary Artery Disease. **Int J MolSci**, v. 16, n. 1, p. 535-546, 2014.

KURAKULA, K. et al. Nuclear Receptors in atherosclerosis: A superfamily with many “Goodfellas”. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 368, n. 1–2, p. 71–84, 2013.

LAUTNER, Roberto Queiroga et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin–angiotensin system. **Circulation research**, v. 112, n. 8, p. 1104-1111, 2013.

LEGEIN, B. et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 20, p. 3847–3869, 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135–1143, 2002.

MACENO, Lindhisey Kianny; GARCIA, M. dos S. Fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em jovens adultos/Risk factors for the development of cardiovascular diseases in young adults. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 2820-2842, 2022.

MARINHO, Fatima. Prognóstico da Doença Arterial Coronariana em Hospitais Públicos no Brasil: O Estudo ERICO e Uso do Conhecimento na Saúde Pública. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 986-987, 2021.

MALAKAR, A. K. et al. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16812–16823, 20 out. 2019.

MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 331–347, 2011.

OISHI, J. C. et al. Endothelial dysfunction and inflammation precedes elevations in blood pressure induced by a high-fat diet. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 558–567, 2018.

OLIVEIRA, Gláucia Maria Moraes de et al. Estatística Cardiovascular–Brasil 2020. **Arquivos brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 308-439, 2020.

PAZ OCARANZA, Maria et al. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 116-129, 2020.

PELUSO, Antonio Augusto Bastos. Efeito comparativo entre a angiotensina-(1-7) e o novo agonista do receptor MAS, CGEN 856S, nas vias AKT/eNOS e AKT/FOXO1 utilizando modelos celulares. 2014.

- PFOHL, Martin et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with coronary artery plaque calcification as assessed by intravascular ultrasound. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 987-991, 1998.
- POORGHOLI, Leila et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and its association with coronary artery disease in an Iranian population. **The Journal of Tehran University Heart Center**, v. 8, n. 2, p. 89, 2013.
- SOCIAL SCIENCE STATISTICS, disponível em <https://www.socscistatistics.com/>.
- SOUSA, J.; RIBEIRO, J. Atherosclerosis, its Causes and the Importance of Adiponectin. **Revista de saúde e desenvolvimento humano**, v. 7, n. Ldl, p. 7, 2019.
- SPARKS, Matthew A. et al. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1201, 2014.
- STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, 2017.
- VERA-REMARTÍNEZ, Enrique J. et al. Factores de riesgo cardiovascular en adultos jóvenes de un centro penitenciario. **Revista española de salud publica**, v. 92, p. e201807037, 2020.
- ZHAI C, Cong H, Zhang H, Hou K, Zhang Y, Zhang Y. M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and cardiovascular disease: An updated meta-analysis of 39 case-control comparisons. **Anatol J Cardiol**. 2019.
- ZINTZARAS, Elias et al. Variante polimórfica do gene de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina como marcador de doença arterial coronariana: metanálise. **Arquivos de medicina interna**, v. 168, n. 10, p. 1077-1089, 2008.

## Anexo I

### Termo de Consentimento Informado

**Título do estudo:** Polimorfismos de Genes do Sistema Renina-Angiotensina, do gene da eNOS e atividade das angiotensinas – II e 1,7 na Doença Arterial Coronariana.

Este estudo tem o objetivo de avaliar alguns polimorfismos gênicos do sistema renina-angiotensina, do gene da eNOS e a atividade das Angiotensinas II e 1,7, no desenvolvimento da doença aterosclerótica coronária.

Para esta investigação, é necessário a coleta de dois tubos de 3 ml 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 bioquímicos e de DNA.

É importante enfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não terapêutica.

Se você concordar em participar do estudo isto não vai implicar em nenhuma vantagem pessoal ou financeira para você ou para a sua família. Garantimos ainda que todos os seus dados são confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações que poderão ser usadas apenas para esta pesquisa e publicações científicas.

Você pode se recusar a participar do estudo ou mesmo retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isto altere o seu tratamento no Hospital das Clínicas.

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante o decorrer do estudo ou obter informações diretas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, situado na Pró-Reitoria de Pesquisas e Pós-Graduação Bloco A-Sala 224-Campus Santa Mônica Avenida João Naves de Ávila, 2121 Santa Mônica-Uberlândia-MG 38400-098. Além disso, você poderá obter com os pesquisadores, por meio do telefone : (34)- 3218 2200 ou email; os resultados conseguidos no estudo.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento e se quiser, antes de assiná-lo, poderá consultar alguém de sua confiança.

Os pesquisadores podem decidir sobre a sua saída do estudo por razões científicas, sobre as quais você será devidamente informado

**Termo de consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_ voluntariamente, aceito participar desta pesquisa, realizada no Instituto de Ciências Biomédicas e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Pelo presente termo apresentado,

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

Paciente\_\_\_\_\_

Médico responsável\_\_\_\_\_

Local e Data: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_de \_\_\_\_\_ de 2016

Testemunhas: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anexo II

Parecer do comitê de ética:

### **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Titulo da Pesquisa:** Polimorfismos Genéticos na Doença Coronariana

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Versão:** 3

**CAAE:** 01736412.9.0000.5152

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 189.679

**Data da Relatoria:** 01/02/2013