

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO M235T DO GENE DO
ANGIOTENSINOGENO COM A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

RAFAEL LANDIM SILVA

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

Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO M235T DO GENE DO
ANGIOTENSINOGENO COM A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

RAFAEL LANDIM SILVA

Prof^a Dr^a. Elisângela Rosa Cordeiro

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

Uberlândia – MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO M235T DO GENE DO
ANGIOTENSINOGENO COM A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

RAFAEL LANDIM SILVA

Prof^a Dr^a. Elisângela Rosa Cordeiro
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em / /

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Celine de Melo

Uberlândia – MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO M235T DO GENE DO
ANGIOTENSINOGENO COM A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA**

RAFAEL LANDIM SILVA

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Profª Dra. Elisângela Rosa Cordeiro

Uberlândia, de de

RESUMO

A Doença Arterial Coronariana (DAC) é caracterizada pela formação e acúmulo de placas de ateroma nas artérias coronárias, diminuindo assim a chegada de oxigênio ao coração. Fatores genéticos parecem estar envolvidos no desenvolvimento da doença, como a variante M235T do gene do angiotensinogênio. O objetivo deste trabalho foi analisar a associação do polimorfismo M235T com a DAC, com a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e com o Infarto do Miocárdio (IM). Foram selecionados dois grupos de indivíduos, controle e pacientes com síndrome coronária aguda, ambos submetidos à angiografia coronariana. Foi feito a análise dos fatores de risco convencionais coronarianos, e a partir da extração de DNA, *Polimerase Chain Reaction* (PCR), eletroforese e restrição enzimática, foi feito a genotipagem da variante M235T. Os resultados foram analisados estatisticamente e não houve relação entre o polimorfismo M235T e a ocorrência da DAC, tampouco de HAS e IM.

Palavras-chave: Angiotensinogênio. Doença-arterial-coronariana. Polimorfismo M235T.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Doenças Cardiovasculares (DCV)	1
1.2.	Doença Arterial Coronariana (DAC).....	2
1.3.	Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	5
1.4.	Variante M235T do angiotensinogênio	6
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1.	Liberação pelo conselho de ética	9
2.2.	Obtenção das amostras.....	9
2.3.	Critérios de inclusão	10
2.4.	Critérios de exclusão.....	10
2.5.	Procedimentos	10
2.6.	Extração de DNA	10
2.7.	PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificação dos polimorfismos–Variante M235T do gene do Angiotensinogênio.....	11
2.8.	Eletroforese.....	11
2.9.	Restrição Enzimática	11
2.10.	Estatística.....	12
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.	CONCLUSÃO	18
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	23
	ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP.....	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Cardiovasculares (DCV)

As DCV, além de representarem um dos mais altos custos em saúde pública, lideram os índices de morbimortalidade no mundo (SAYED et al., 2014). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (2016), as DCV foram as principais causas de óbitos nos últimos 10 anos, e representaram cerca de 29% das mortes de 2004 a 2013. Nos últimos cinco anos o número de mortes aumentou, foi estimado que em 2016 o número de óbitos seria de aproximadamente 350 mil (Figura 1).

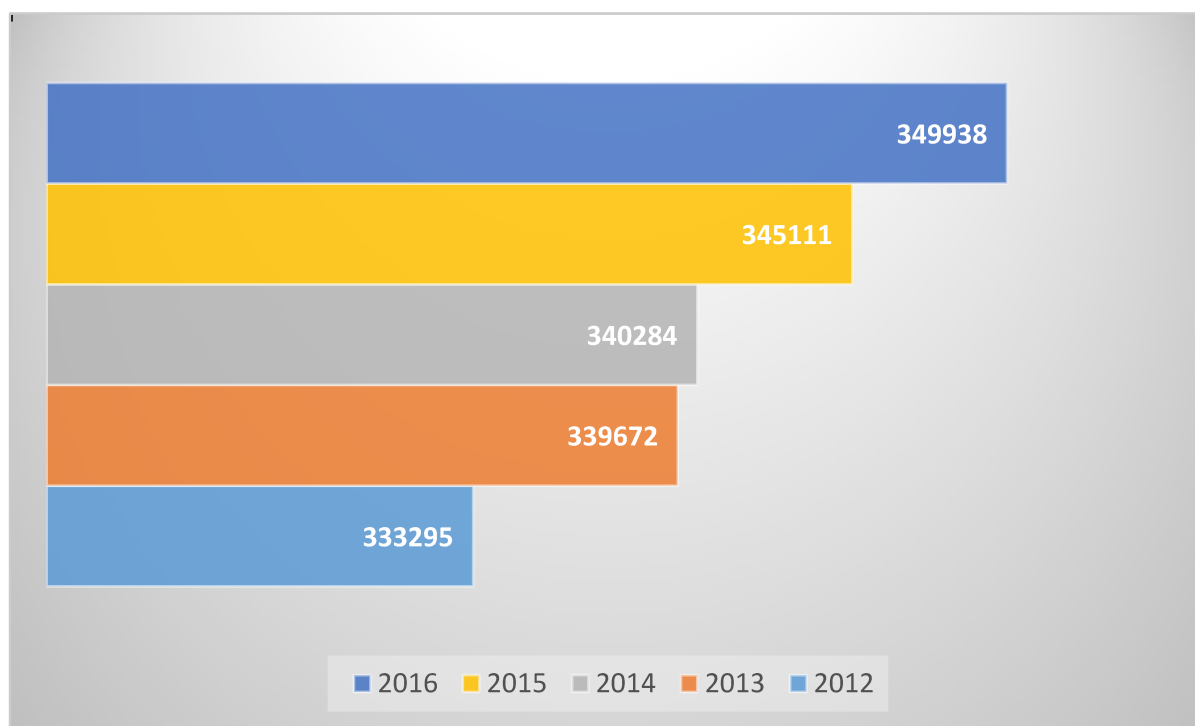


Figura 1: Número de óbitos por DCV nos últimos cinco anos no Brasil.

***Valores estimados para os anos de 2015 e 2016.**

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016.

Segundo *World Health Organization* (WHO) (2017) 17,7 milhões de pessoas morreram devido às DCV em 2015, representando 31% de todas as mortes globais. Projeções estimam que em 2030 cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão anualmente somente devido a complicações cardiovasculares.

1.2. Doença Arterial Coronariana (DAC)

A DAC é uma doença cardiovascular de caráter inflamatório-crônica (JING et al., 2014). É caracterizada pela insuficiência de irrigação sanguínea no coração por meio das artérias coronárias. Tal patologia ocorre pela presença de aterosclerose, acúmulo de placas de ateroma (gordura) nos vasos sanguíneos, que reduz o fluxo sanguíneo, diminuindo assim a chegada de oxigênio ao coração (Figura 2) (PINHO et al., 2010).

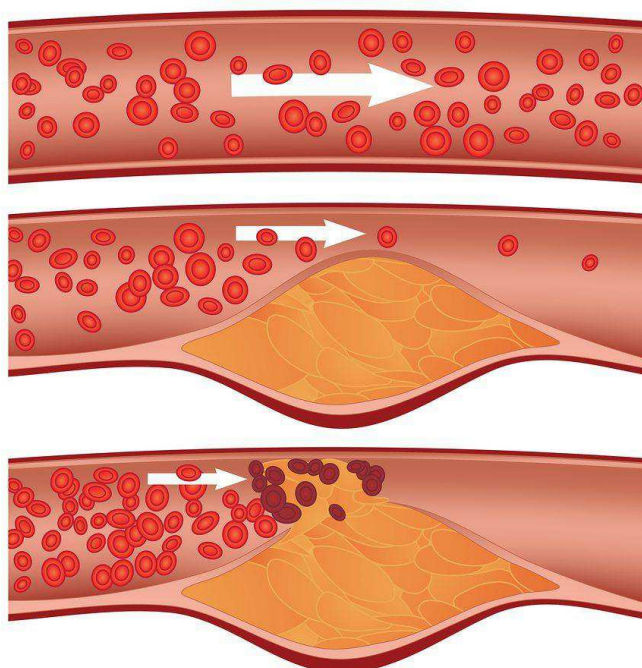


Figura 2: Formação de placas de ateroma nos vasos sanguíneos.
 Fonte: <https://biosom.com.br/blog/saude/aterosclerose/>

O processo aterogênico (formação de ateroma) se dá pelo acúmulo de diferentes moléculas e células na parede das artérias. O processo se inicia com o transporte do *Low Density Lipoproteins* (LDL) sérico através do endotélio por difusão passiva para a camada íntima da artéria. Nesta região o LDL sofre oxidação devido à presença de radicais livres, formando o LDLox, desencadeando assim uma resposta inflamatória (JORGE, 1997). O LDLox ativa o endotélio vascular que passa a expressar moléculas de adesão, E-selectina, P-selectina, ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular adhesion*

molecule-1) (MELO et al., 2007; SUASSUNA; BASTOS, 2007). A expressão elevada dessas moléculas, em especial da VCAM-1 promove a migração de monócitos e linfócitos para a túnica íntima da artéria (HANSSON; LIBBY, 2006).

Quando os monócitos e linfócitos entram em contato com as moléculas de adesão, ocorre a diapedese para a íntima da artéria. Desta vez as células endoteliais secretam M-CSF (fator estimulador das colônias de monócitos) que converte monócitos em macrófagos e ativa a expressão dos receptores *scavenger* (removedor). Assim, inicia-se o processo de fagocitose dando origem às células espumosas (*foamcells*) - macrófagos carregados de lipídeos tóxicos – as quais induzem a proliferação celular no espaço sub-endotelial formando as estrias gordurosas, evento que marca o estágio inicial da formação do ateroma (MOURA, 2006; SIQUEIRA, 2006; SANTOS, 2011).

As estrias gordurosas são consideradas precursoras da placa aterosclerótica e começam a aparecer na camada íntima da aorta aos três anos de idade (HOLMAN et al., 1958) e nas coronárias durante a adolescência, podendo progredir significativamente dos trinta à quarenta anos de idade (STARY, 1990). A formação dessas placas se dá pela maturação do ateroma, onde uma capa fibrosa, formada por colágeno e produzida por células musculares lisas que migram da túnica média para a túnica íntima da artéria, circundará as células espumosas e o colesterol, núcleo lipídico (SANTOS, 2011). O processo inflamatório não cessa e outras células imunes são encontradas nesta placa, como células dendríticas, mastócitos, linfócitos B e linfócitos NK, as quais produzem citocinas dos tipos IFN e TNF- α , contribuindo significativamente para o aumento da placa aterosclerótica (CARAMORI; ZAGO, 2000; SANTOS, 2011).

A placa aterosclerótica desenvolvida é então constituída de capa fibrosa, núcleo lipídico e componentes da matriz extracelular. As placas estáveis apresentam capa fibrosa espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis

apresentam atividade inflamatória intensa, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico elevado e capa fibrosa delgada. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007). Estudos sugerem que os fatores inflamatórios podem ter um papel importante na patogênese da DAC tanto na fase aguda, quanto na fase crônica (ROSS, 1999; BLANCHET et al., 2014).

Os pacientes portadores de DAC podem apresentar-se com angina ou com infarto do miocárdio (IM), que acomete, em geral, após à meia idade. Porém, estudos revelaram que o processo aterosclerótico pode começar a se desenvolver na infância (JING et al., 2014).

Os fatores de risco para a DAC resultam da associação de predisposição genética e fatores 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). A predisposição genética, no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, está baseada, principalmente, no fato de que indivíduos com histórico familiar para essas patologias correm um maior risco de desenvolvê-las em relação à população geral (TAVARES, 2000).

Apesar de existir controvérsias em relação à importância relativa de cada um, a redução desses fatores de risco é a principal meta para a prevenção da DAC (SANTOS; ISIDORO; CRUZ, 2012).

Dentre os fatores genéticos, os genes do Sistema Renina Angiotensina (SRA) têm sido amplamente estudados e as variações e polimorfismos dos mesmos vêm sendo associados aos processos de desenvolvimento da DAC (VAN DER MERWE et al., 2008).

1.3. Sistema Renina Angiotensina (SRA)

A associação entre o SRA e o desenvolvimento da placa aterosclerótica vem sendo amplamente estudada. Acredita-se que a angiotensina II (Ang II), principal produto do SRA, está envolvida no desenvolvimento dos processos ateroscleróticos (BAHRAMALI et al., 2014).

Além disso, os genes do SRA têm sido apontados como possíveis causas no desenvolvimento da aterosclerose e da DAC (JIA et al., 2014). Dentre eles, o gene codificador do angiotensinogênio (AGT) e sua variante M235T; o gene codificador da ectoenzimadipeptidilcarboxipeptidase de membrana (ECA), podendo apresentar o polimorfismo de inserção/deleção, que está associado aos níveis de enzima circulante (RIGAT et al., 1990); e o gene codificador ectoenzimadipeptidilcarboxipeptidase de membrana 2 (ECA 2), com evidência da associação de alguns de seus polimorfismos com alterações cardíacas (VAN DER MERWE et al., 2008).

O SRA é um complexo sistema hormonal, que tem fundamental importância no controle da pressão arterial e na homeostasia hidroeletrolítica do organismo (MENARD, 1993). A diminuição da pressão arterial, com menor estiramento da arteríola aferente; depleção de sal, com menor oferta de cloreto de sódio; e alterações de decúbito e hemorragias, faz com que os rins liberem uma substância chamada renina, sintetizada pelas células justa glomerulares (GUYTON; HALL, 2006). Na via clássica, a renina inicia a cascata do SRA a partir da quebra do peptídeo angiotensinogênio, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A Ang I, por sua vez, é hidrolisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em vários locais, com altas concentrações principalmente nos pulmões, para formar o octapeptídeo Ang II (MOURA, 2007). A Ang II atua por meio de dois receptores localizados na membrana plasmática, acoplados a proteína G, o AT1 e o AT2. Quando associada ao AT1

media ações de vasoconstrição, aumentando a pressão arterial. Enquanto que, associada ao AT2, ocasiona ações opostas e contra regulatórias (FHYRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

Na última década, estudos revelaram a existência de uma via alternativa, a qual resulta na formação de angiotensina-(1-7), um importante vasodilatador dentro do SRA (VELLOSO et al., 2007). Uma nova enzima conversora de angiotensina (ECA2) cliva a Ang I para gerar a angiotensina-(1-9), forma inativa e que posteriormente pode ser convertida em Ang-(1,7). A ECA2 também metaboliza a Ang II para gerar diretamente a Ang-(1-7) (Figura 3) (FHYRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Desse modo, esta enzima promove a contra regulação das ações da Ang II, prevenindo o acúmulo de Ang II e favorecendo a formação de Ang-(1-7), um peptídeo com propriedades vasodilatadoras e anti-proliferativas (MOURA, 2007).

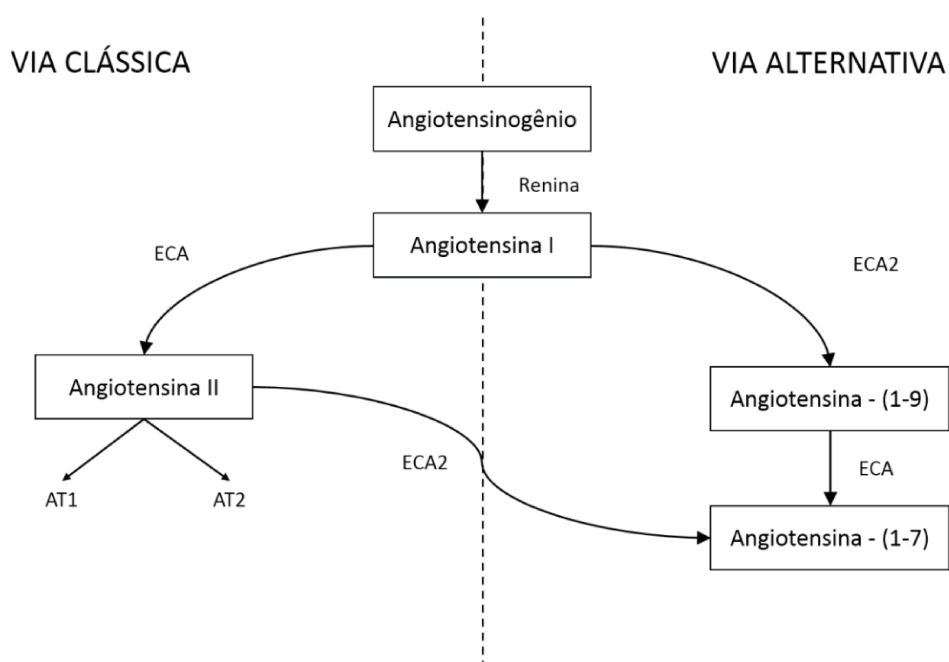


Figura 3: Esquema simplificado representando as vias de formação dos peptídeos no SRA.
Fonte: NADU, 2006, modificada.

1.4. Variante M235T do angiotensinogênio

Um dos genes mais estudados é o do AGT, de acordo com Hu et al. (2014) o AGT foi o primeiro gene mais bem estudado por seu potencial envolvimento com a hipertensão essencial, contendo até o ano de 2007 mais de 500 estudos já publicados (HU et al., 2014).

Estudos posteriores revelaram que juntamente a sua variante, o AGT é um dos candidatos mais plausíveis de intervenção farmacogenômica no tratamento de indivíduos hipertensos (KONOSHITA, 2011).

O AGT é uma glicoproteína globular codificada por um gene localizado no cromossoma 1q42 (ARAÚJO et al., 2005). É um componente importante no SRA, pois atua como precursor da Ang II que desempenha papel importante na regulação da pressão arterial (AFSHARIANI et al., 2014).

A variante T235 está localizada no éxon dois do gene do AGT (Figura 4), e corresponde a troca de aminoácidos no resíduo 235 da proteína madura, treonina no lugar de metionina (JEUNEMAITRE et al., 1992).

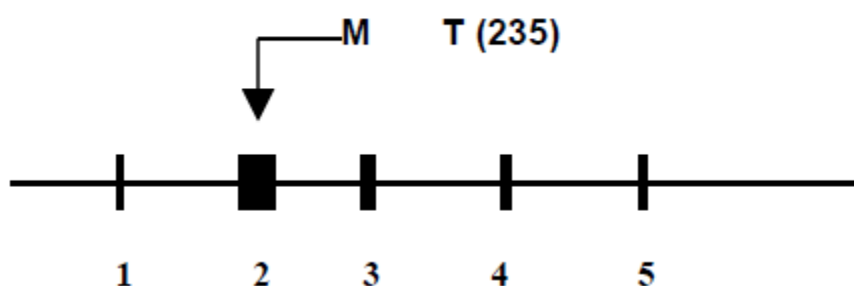


Figura 4: Variante M235T localizada no éxon 2 do gene do angiotensinogênio.
Fonte: CUNHA, 2014.

Estudos indicaram que a variante T235 está associada com a pré-eclâmpsia em mulheres caucasianas (WARD et al., 1993), nas mulheres japonesas (ARNGRIMSSON et al., 1999) e também em gestantes iranianas (AFSHARIANI et al., 2014). Além disso, pode ser transmitida geneticamente de pais hipertensos para filhos (FANG et al., 2010).

O polimorfismo M235T determina os níveis de angiotensinogênio plasmático (TAVARES, 2000). Indivíduos portadores do genótipo M235/M235 apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio plasmático; heterozigotos M235/T235 têm níveis médios intermediários (HEGELE et al., 1994); e os homozigotos T235/T235, segundo

Jeunematrie et al. (1992) e Brand et al. (2002) apresentam níveis de 10-20% mais elevados de AGT plasmático que homozigotos M235/M235.

A possível associação dos polimorfismos do gene do AGT com a hipertensão arterial essencial, fez com que em 1992, Jeunemaitre e colaboradores conduzissem o primeiro estudo que indicava o papel desse gene (TAVARES, 2000). Os resultados deste trabalho apontaram uma forte possibilidade do envolvimento do polimorfismo M235T na predisposição genética a hipertensão arterial (JEUNEMAITRE et al., 1992). Mediante a tais registros, comunidades científicas se dedicaram a reproduzir e estudar os achados encontrados por Jeunemaitre e seu grupo (MATOS, 2006).

O mecanismo pelo qual essa variante se associa ao desenvolvimento da DAC é bastante evidente em diversos estudos (WANG; PAN, 2012) que apontam que os indivíduos portadores do alelo T235/T235 possuem elevados níveis de AGT, que por sua vez ao sofrer ação enzimática da renina e ECA formam a Ang II. Tem sido demonstrado o envolvimento da Ang II no desenvolvimento de hipertrofia de cardiomiócitos, na fibrose cardíaca, na modulação do crescimento de fibroblastos cardíacos e na síntese de colágeno em modelos humanos e animais (HENRION; KUBIS; LEVY, 2001). Além disso, a Ang II ativa a apoptose das células vasculares e contribui para a remodelação vascular, perda de cardiomiócitos na isquemia-reperfusão e IM (HORIUCHI; AKISHITA; DZAU, 1999). Sendo assim a estimulação do receptor AT1 pela Ang II por resultar em vasoconstrição e disfunção endotelial, é responsável pela ocorrência de aterosclerose (WANG; PAN, 2012).

Estudos de meta-análise sugerem que a presença do genótipo T/T do polimorfismo M235T pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de IM e infarto cerebral na população asiática (LIANG et al., 2013). Wang et al. (2012) associou-o com o acidente vascular cerebral isquêmico na população chinesa. Artigos sugerem ainda que o polimorfismo M235T é significativamente associado com o desenvolvimento da DAC na China (WANG;

PAN, 2012), com o desenvolvimento da cardiopatia hipertrófica em pacientes sul indianos (POLUGARI PREM KUMAR MANOHAR et al., 2011) e com o acúmulo de cálcio nas artérias coronarianas (JOSHI et al., 2013). No entanto esses achados não foram encontrados em estudos realizados com grupos de indivíduos caucasianos, sendo possível, portanto que a diversidade populacional exerça influência sobre fatores genéticos (LIANG et al., 2013).

O presente estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo M235T do angiotensinogênio na DAC, comprovada clinicamente por angiografia, em pacientes com síndrome coronariana aguda, com o intuito de, ao final da pesquisa, fornecer dados de pesquisa básica do laboratório para a aplicação clínica. Foram analisados também a associação do polimorfismo com a presença da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e do IM.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Liberação pelo conselho de ética

O protocolo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa humana da Universidade Federal de Uberlândia (parecer: 189679).

2.2. Obtenção das amostras

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

A coleta foi realizada em tubo vacutainer de 3 mL com EDTA, mediante um termo de consentimento (Anexo A) assinado pelos pacientes e autorização do Comitê de Ética Humana da UFU (Anexo B).

2.3. Critérios de inclusão

I- Grupo de Pacientes: Foram elegíveis neste grupo os pacientes diagnosticados clinicamente e angiograficamente com síndrome coronariana aguda (angina instável, infarto agudo do miocárdio);

II- Grupo de Controle: Foram elegíveis neste grupo os pacientes submetidos à angiografia coronária e que não apresentem lesões coronárias.

2.4. Critérios de exclusão

I- Pacientes diagnosticados com doenças malignas sistêmicas.

II- Pacientes com enfermidades crônicas terminais.

2.5. Procedimentos

Foram realizados em todos os indivíduos os seguintes procedimentos:

I- Histórico clínico;

II- Análise da presença ou ausência dos fatores de risco convencionais coronarianos;

III- Diagnóstico por Angiografia Coronariana;

IV- Genotipagem da variante do angiotensinogênio M235T.

2.6. Extração de DNA

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

2.7. PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificação dos polimorfismos–

Variante M235T do gene do Angiotensinogênio.

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

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

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

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

2.8. Eletroforese

Os produtos amplificados de 165 pb foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%, sob as condições de 5 mA e 120 V, corado por *blue green* (LGC Biotecnologia Ltda.)

2.9. Restrição Enzimática

Dez (10) µL desse produto de PCR foram incubados, por 4h a 37°C, e digeridos com a enzima Tth 111 I (New England Biolabs) segundo as especificações do fabricante.

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 um de 141 pb e um 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 T235T apresentam dois fragmentos de 141 pb e dois de 24 pb, os heterozigotos M235T têm três fragmentos, um de 165 pb, um 141 pb e um 24 pb e os homozigotos M235M dois fragmentos de 165 pb. Após a restrição enzimática, os fragmentos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 4%, sob as condições de 5 mA e 120 V.

2.10. Estatística

Foi utilizado o teste de Qui-quadrado para correlacionar a frequência dos genótipos da variante M235T com a ocorrência da DAC, HAS e IM. Adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com grau de liberdade (GL) igual a 2, sendo assim o valor de χ^2 tabelado é igual a 5,991. Os dados foram analisados utilizando o *software* BioEstat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram genotipados 80 indivíduos para a variante M235T, sendo 40 pacientes controle e 40 diagnosticados com DAC. A figura 5 representa os diferentes genótipos da variante do AGT, feita em eletroforese em gel de agarose 4%.

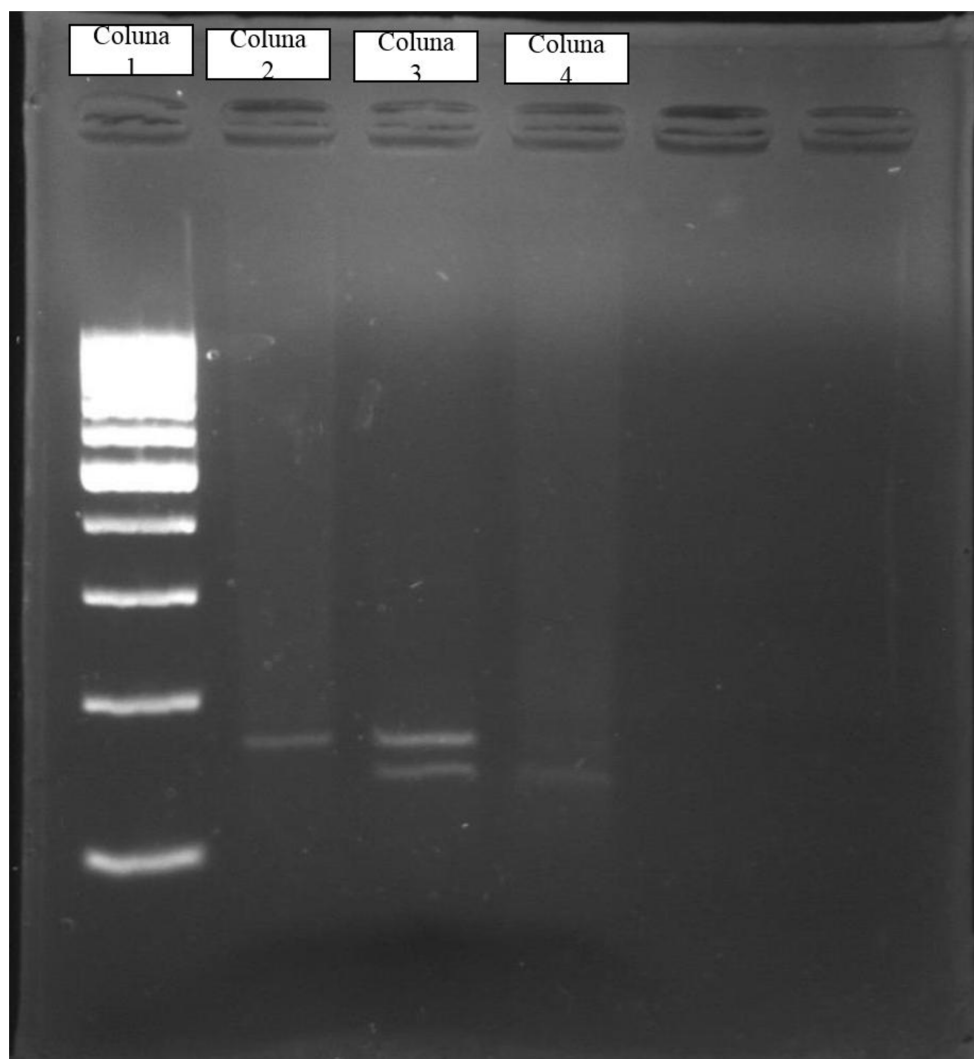


Figura 5: Eletroforese representativa dos genótipos da variante M235T do gene do angiotensinogênio.

Coluna 1: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Coluna 2: Fragmento de 165 pb referente ao genótipo MM.

Coluna 3: Fragmentos de 165, 141 e 24 pb referente ao genótipo MT, fragmento de 24 pb não é visível.

Coluna 4: Fragmentos de 141 e 24 pb referente ao genótipo TT, fragmento de 24 pb não é visível.

A partir dos resultados obtidos pela genotipagem dos indivíduos, foi feito uma análise da frequência dos genótipos associados com a ocorrência da DAC (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência dos genótipos associados a DAC.

Polimorfismo	Controle	Caso
MM	20	12
MT	18	18
TT	2	7

Utilizando o teste de Qui-Quadrado obteve-se os seguintes valores (Tabela 2):

Tabela 2: Valores da análise da frequência dos genótipos por Qui-quadrado.

Estatística χ^2	5,0085
Graus de liberdade	2
(p)	0,0817

Hipótese Ho - Se χ^2 calculado é menor que χ^2 tabelado, então não há diferença.

Hipótese HA - Se χ^2 calculado é maior que χ^2 tabelado, então há diferença.

χ^2 calculado= 5,0085

χ^2 tabelado= 5,991

Aceita-se Ho pois o valor de χ^2 calculado é menor que o valor de χ^2 tabelado. Logo, as frequências expressas pelos indivíduos nos grupos controle e caso em relação à ocorrência da DAC, não apresentam diferença estatística ao nível de 95%.

A DAC tem sido motivo de muitos estudos no meio científico por se tratar de um grande problema de saúde pública, e ser responsável por um grande número de mortes e gastos públicos. Sabe-se que vários fatores estão envolvidos no seu acometimento, alguns já bastantes conhecidos e comprovados.

O gene do angiotensinogênio associado à sua variante é um dos mais estudados no desencadeamento da DAC. Esses estudos inferem que a variante está associada com a susceptibilidade a DAC em determinadas populações como por exemplo asiática, dentre

outras (NIEMIEC; ZAK; WITA, 2008; SAUD et al., 2010; WANG; PAN, 2012; JIANG; HE; YANG, 2014). No entanto, o envolvimento da variante M235T no estabelecimento da DAC tem sido controverso. Estudos de meta-análise inferiram que a susceptibilidade ao infarto do miocárdio e isquemia cerebral não se associa com a presença do genótipo 235T em indivíduos caucasianos e brancos (LIANG, X. et al., 2013; LIANG, B. et al., 2013).

Neste trabalho foram analisados os fatores genéticos – polimorfismo M235T do gene do AGT - ou hereditários correlacionados com a prevalência da DAC, e também, a associação da presença de HAS e IAM em pacientes acometidos pela doença.

A partir dos resultados obtidos por análises estatística de Qui-quadrado, pode-se observar que o genótipo do AGT, não demonstrou contribuição significativa para o acometimento da DAC.

Contudo, na Tabela 2 onde se correlaciona a frequência dos genótipos com o grupo de pacientes acometidos pela DAC, é possível notar uma aproximação do valor encontrado (χ^2 calculado 5,0085) para o valor tabelado (χ^2 tabelado 5,991). Esse valor nos mostra uma possível tendência desta análise a um resultado significativo, o qual possivelmente poderá ser comprovado com um n amostral maior.

Outro fator importante é a diversidade étnica e o meio ambiente, os quais podem influenciar nessas variáveis. Sendo assim, estudos que fossem capazes de esclarecer o envolvimento desses fatores com o risco de desenvolvimento da DAC, seriam de suma importância para o desenvolvimento de testes que atuem como prevenção primária e secundária, bem como uma terapêutica clínica e intervencionista mais apropriada e individualizada conforme o diagnóstico molecular da DAC.

Análise da frequência dos genótipos associados a presença de HAS (Tabela 3):

Tabela 3: Frequência dos genótipos associados a HAS.

Polimorfismo	Sem HAS	Com HAS
MM	7	25
MT	5	31
TT	1	8

Utilizando o teste de Qui-Quadrado obteve-se os seguintes valores (Tabela 4):

Tabela 4: Valores da análise da frequência dos genótipos por Qui-quadrado.

Estatística χ^2	1,0119
Graus de liberdade	2
(p)	0,6029

Hipótese H_0 - Se χ^2 calculado é menor que χ^2 tabelado, então não há diferença.

Hipótese H_A - Se χ^2 calculado é maior que χ^2 tabelado, então há diferença.

χ^2 calculado= 1,0119

χ^2 tabelado= 5,991

Aceita-se H_0 pois o valor de χ^2 calculado é menor que o valor de χ^2 tabelado. Logo, as frequências expressas pelos indivíduos nos grupos controle e caso em relação à presença de HAS, não apresentam diferença estatística ao nível de 95%.

No estudo realizado por Araújo (2010), foi encontrada associação entre o genótipo homozigoto T235T no gene do AGT a um aumento no risco de HAS entre os brasileiros afrodescendentes. A análise de regressão logística multivariada mostrou que os indivíduos homozigotos para o alelo 235T no AGT apresentavam um risco cerca de 1,8 vezes maior de terem hipertensão (*Odds ratio*= 1,848; $p = 0,013$) quando comparados aos portadores do alelo 235M.

Neste estudo, os resultados obtidos por análises estatística de Qui-quadrado, observou-se que o genótipo do AGT, não demonstrou contribuição significativa para o acometimento da HAS.

Análise da frequência dos genótipos para a ocorrência de IM (Tabela 5):

Tabela 5: Frequência dos genótipos associados a IM.

Polimorfismo	Sem IM	Com IM
MM	26	6
MT	26	10
TT	4	5

Utilizando o teste de Qui-Quadrado obteve-se os seguintes valores (Tabela 6):

Tabela 6: Valores da análise da frequência dos genótipos por Qui-quadrado.

Estatística χ^2	2,5263
Graus de liberdade	2
(p)	0,2828

Hipótese Ho - Se χ^2 calculado é menor que χ^2 tabelado, então não há diferença.

Hipótese HA - Se χ^2 calculado é maior que χ^2 tabelado, então há diferença.

χ^2 calculado= 2,5263

χ^2 tabelado= 5,991

Aceita-se Ho pois o valor de χ^2 calculado é menor que o valor de χ^2 tabelado. Logo, as frequências expressas pelos indivíduos nos grupos controle e caso em relação à ocorrência de IM, não apresentam diferença estatística ao nível de 95%.

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos de Fonseca e Izar (2004) e Araújo et al. (2005) que não encontraram evidências relacionando os riscos de DAC e IM à presença deste polimorfismo genético. Porém, tinha-se como previsto, para a realização deste

estudo, a análise de um n amostral de aproximadamente 200 indivíduos. Mas, este n foi limitado ao deparar com um banco de dados contendo informações incompletas acerca dos indivíduos que participaram do estudo.

Logo, devido a miscigenação em nosso país, para avaliar fatores genéticos em indivíduos brasileiros é necessário um n amostral maior do que o utilizado. O n amostral é um fator de extrema importância, quanto maior o n amostral analisado, melhor o resultado adquirido em relação a confiabilidade dos dados gerados pelo estudo.

4. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados não demonstraram uma correlação estatística significativa entre as frequências genótípicas das variantes do gene do AGT, (M/M; M/T e T/T), com a DAC, com a HAS e IM nos grupos analisados, pacientes e controle. Portanto, é necessário que se prossiga com os estudos acerca dos componentes do SRA, para que seja determinado se há realmente uma relação íntima desses componentes e o processo de desenvolvimento da DAC e, quão expressiva é esta influência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHARIANI, R. et al. **Association between Angiotensinogen M235T Polymorphism and Preeclampsia in Iranian Pregnant Women.** Journal of Family & Reproductive Health, Tehran, Iran, v. 8, n. 4, p. 169-173, 2014.

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

ARAÚJO, M. A. et al. **O gene do angiotensinogênio (M235T) e o infarto agudo do miocárdio.** Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 164-169, 2005.

ARNGRIMSSON, R. et al. **A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-ECLAMPSIA on chromosome 2p13.** Hum. Mol. Genet., v. 8, p.1799–1805, 1999.

BAHRAMALI, E. et al. **Renin-angiotensin system genetic polymorphisms: Lack of association with CRP levels in patients with coronary artery disease.** J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, v. 15, n. 4, p. 559-65, 2014.

BIOSOM. **O que é Aterosclerose?** Disponível em: <<http://biosom.com.br/blog/saude/aterosclerose/>> Acessado em: 12/04/2017.

BLANCHET, X. et al. **Inflammatory role and prognostic value of platelet chemokines in acute coronary syndrome.** Thromb Haemost, v. 112, n. 6, p. 1277-87, 2014.

BORGES, J. P.; LESSA, M. A. **Mechanisms involved in exercise-induced cardioprotection: a systematic review.** Arq. Bras. Cardiol., v. 105, n. 1, p. 71–81, 2015.

BRAND, E. et al. **Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis.** Eur J Hum Genet, v. 10, n. 11, p. 715-23, 2002.

CARAMORI, P. R. A.; ZAGO, A. J. **Disfunção Endotelial e Doença Arterial Coronariana.** Arq. Bras. Cardiol., vol. 75, n. 2, Porto Alegre, 2000.

CUNHA, P. G. DE M. **Revisão dos Efeitos dos Polimorfismos Genéticos no Sistema Renina Angiotensina – Aldosterona na Doença Arterial Coronariana.** 2014. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Uberlândia, 2014.

FANG, P. et al. **Structural basis for the specificity of the GAE domain of yGGA2 for its accessory proteins Ent3 and Ent5.** Biochemistry, v. 49, n. 36, p. 7949-55, 2010.

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

FONSECA, F. A. H.; IZAR, M.C.O. **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, n. 5, p. 371-372, 2004.

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

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. **The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.** Nat Rev Immunol, v. 6, n. 7, p. 508-19, 2006.

HEGELE, R. A.; BRUNT, J. H.; CONNELLY, P. W. **A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate.** Circulation, v. 90, n. 5, p. 2207-12, 1994.

HENRION, D.; KUBIS, N.; LEVY, B. I. **Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation.** Hypertension, v. 38, n. 5, p. 1150-7, 2001.

HOLMAN, R. L. et al. **The natural history of atherosclerosis: the early aortic lesions as seen in New Orleans in the middle of the of the 20th century.** Am J Pathol, v. 34, n. 2, p. 209-35, 1958.

HORIUCHI, M.; AKISHITA, M.; DZAU, V. J. **Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system.** Hypertension, v. 33, n. 2, p. 613-21, 1999.

HU, D. C. et al. **Interaction of six candidate genes in essential hypertension.** Genet Mol Res, v. 13, n. 4, p. 8385-95, 2014.

JEUNEMAITRE, X. et al. **Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen.** Cell, v. 71, n. 1, p. 169- 80, 1992.

JIA, E. Z. et al. **Relationship of renin-angiotensin-aldosterone system polymorphisms and phenotypes to mortality in Chinese coronary atherosclerosis patients.** Sci Rep, v. 4, n. 4600, 2014.

JIANG, W. L.; HE, H. W.; YANG, Z. J. **The angiotensinogen gene polymorphism is associated with heart failure among Asians.** Sci Rep, v. 4, n. 4207, 2014.

JING, X. et al. **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.

JORGE, P. A. **Endothelium, lipids and atherosclerosis.** Arq Bras Cardiol, v. 68, n. 2, p. 129-34, 1997.

JOSHI, P. H. et al. **The M235T single nucleotide polymorphism in the angiotensinogen gene is associated with coronary artery calcium in patients with a family history of coronary artery disease.** Atherosclerosis, v. 226, n. 2, p. 433-9, 2013.

KONOSHITA, T. **Do genetic variants of the Renin-Angiotensin system predict blood pressure response to Renin-Angiotensin system-blocking drugs?: a systematic review of pharmacogenomics in the Renin-Angiotensin system.** CurrHypertens Rep, v. 13, n. 5, p. 356-61, 2011.

LIANG, B. et al. **AGT M235T polymorphisms and ischemic stroke risk: a meta-analysis.** J Neurol Sci, v. 331, n. 1-2, p. 118-25, 2013.

LIANG, X. et al. **Polymorphism of angiotensinogen gene M235T in myocardial infarction and brain infarction: a meta-analysis.** Gene, v. 529, n. 1, p. 73-9, 2013.

MATOS, M. F. D. **Polimorfismos do gene da ECA, angiotensinogênio e do receptor tipo 1 da angiotensina II e pressão arterial.** 2006. 146 f. Tese (Doutorado em Cardiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, 2006.

MELO, S. E. et al. **Hipertensão Arterial, Aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo.** Rev. Bras. Hipertens., v. 14, n. 4, p. 234-238, 2007.

MENARD, J. **Anthology of the renin angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists.** Journal of Hypertension, v. 11, n. 3, p. 3-11, 1993.

MOURA, M. D. **Papel do Flavonóide Diocleína no Desenvolvimento da Aterosclerose em Camundongos Deficientes no Gene que Codifica a Apolipoproteína E.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2006.

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

NADU, A. P. **Avaliação da cardioproteção em ratos que expressam uma proteína de fusão produtora de Angiotensina- (1-7) [TGR (A1-7)3292].** 2006. 118 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2006.

NIEMIEC, P.; ZAK, I.; WITA, K. **The M235T polymorphism of the AGT gene modifies the risk of coronary artery disease associated with the presence of hypercholesterolemia.** Eur J Epidemiol, v. 23, n. 5, p. 349-54, 2008.

PINHO, R. A. et al. **Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo.** Arq. Bras. Cardiol. v. 94, n. 4, p. 549-555, 2010.

POLUGARI PREM KUMAR MANOHAR, R. et al. **The M235T polymorphism of the angiotensinogen gene in South Indian patients of hypertrophic cardiomyopathy.** J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, v. 12, n. 3, p. 238-42, 2011.

RIGAT, B. et al. **An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.** J Clin Invest, v. 86, n. 4, p. 1343-6, 1990.

ROSS, R. **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** N Engl J Med, v. 340, n. 2, p. 115-26, 1999.

SANTOS, C. M. **Antropometria, perfil metabólico e acompanhamento nutricional: Um estudo em adultos atendidos ambulatorialmente em dois hospitais públicos de Recife/PE.** 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Recife, 2011.

SANTOS, C. S.; ISIDORO, L. C. R.; CRUZ, G. E. C. P. **Fatores de risco para Doença Arterial Coronária em jovens: Revisão integrativa da literatura brasileira.** Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro. v. 2, n. 2, p. 264-278, 2012.

SAUD, C. G. et al. **AGT M235T polymorphism in acute ischemic cardiac dysfunction: the gisca project.** Arq Bras Cardiol., v. 95, n. 2, p. 144-52, 2010.

SAYED, A. S. et al. **Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating mRNAs in cardiovascular diseases.** Heart Lung Circ, v. 23, n. 6, p. 503-10, 2014.

SIQUEIRA H. P. **Análise das alterações fisiológicas provenientes da massagem clássica em função do tempo de aplicação.** Revista PIBIC. v. 3, n. 2, p. 10-14, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Mortes por Doenças Cardiovasculares no Brasil.** Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/antiores.asp>> Acessado em: 23/06/2017.

SPOSITO, A. C. et al. (Coord.) **IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** Arq. Bras. Cardiol., v. 88, São Paulo, 2007.

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

SUASSUNA, P. G. DE A.; BASTOS, M. G. **Proteína C-Reativa, Aterosclerose e Estatinas na DRCT: Novas Perspectivas.** J. Bras. Nefrol., v. 29, n. 3, 2007.

TAVARES, A. **Polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares.** Rev. Bras. Hipertens. v. 7, n.3, 2000.

VAN DER MERWE, L. et al. **Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy.** Hum Genet, v. 124, n. 1, p. 57-61, 2008.

VELLOSO, E.P. et al. **Reduced Plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I –converting enzyme deletion/deletion genotype.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 40, n. 4, p. 583-590, 2007.

WANG, Y. J.; PAN, Y. **Angiotensinogen gene M235T polymorphism and risk of coronary artery disease: a meta-analysis.** Mol Med Rep, v. 6, n. 4, p. 884-8, 2012.

WANG, B. et al. **Association of AGT M235T and ACE I/D polymorphisms with the risk of ischemic stroke: meta-analysis in Han Chinese population.** J Neurol Sci, v. 320, n. 1-2, p. 79-84, 2012.

WARD, J. E. et al. **Mechanisms of suspension feeding in bivalves: Resolution of current controversies by means of endoscopy.** Limnol. Oceanogr., v. 38, p. 265-272. 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases.** Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>> Acessado em: 20/07/2017.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada Polimorfismos de Genes do Sistema Renina-Angiotensina e atividade das angiotensinas – II e 1,7 na Doença Arterial Coronariana, sob a responsabilidade dos pesquisadores.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender a função de alguns polimorfismos genéticos que possivelmente possam estar envolvidos 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.

A picada da agulha poderá gerar um pequeno desconforto no local e infrequentemente uma alteração cutânea. Não há risco adicional nestes procedimentos, pois já fazem parte da rotina clínica e laboratorial.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Prof. Dr. Messias Antônio de Araújo e/ou pelos médicos-residentes de Cardiologia sob sua orientação; durante a realização da consulta médica, realizada no Setor de Cardiologia (Dor Torácica / Laboratório de Hemodinâmica) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e/ou no Instituto do Coração do Triângulo.

Na sua participação você contribuirá com a doação da amostra de sangue, cedida após procedimento de rotina clínica e laboratorial.

O material coletado será enviado ao laboratório de Biofísica Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde serão realizados os exames bioquímicos e de DNA. Em nenhum momento você será identificado.

Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. É importante

ênfatizar que os resultados obtidos terão apenas implicação diagnóstica e não vão interferir no seu tratamento.

Não há desconforto ou risco adicional nestes procedimentos, pois já fazem parte da rotina clínica e laboratorial. Os benefícios da constatação da influência simultânea dos marcadores genéticos poderão identificar precocemente ou elucidar a natureza da doença permitindo um melhor prognóstico e um tratamento mais correto e efetivo.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores e com o Instituto de Ciências Biomédicas. Endereço: Campus Umuarama - Bloco 2H, Av. Pará, 1720 - Bairro Umuarama, Uberlândia - MG, CEP: 38400-902. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, _____ de _____ de 20____.

Assinatura dos
pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título 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