



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

**Estudo de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema
 β -adrenérgico e relações de ancestralidade em uma amostra de indivíduos
hipertensosmiscigenados da população do estado do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2015

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

Estudo de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema β -adrenérgico e relações de ancestralidade em uma amostra de indivíduos hipertensos miscigenados da população do estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M149 Machado, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz.

Estudo de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema β -adrenérgico e relações de ancestralidade em uma amostra de indivíduos hipertensos miscigenados da população do estado do Rio de Janeiro / Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado – 2015.

94 f.

Orientadora: Dayse Aparecida da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hipertensão - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Sistema renina-angiotensina - Teses. 4. Receptores Adrenérgicos beta. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

Estudo de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema β -adrenérgico e relações de ancestralidade em uma amostra de indivíduos hipertensos miscigenados da população do estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de agosto de 2015.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Dayse Aparecida da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^ª. Dra. Andrea Araújo Brandão
Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

Prof^ª. Dra. Teresa de Souza Fernandez
Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos os familiares e amigos que sempre me apoiam e confiam na minha capacidade de cumprir minhas tarefas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que através de pessoas e mensagens de incentivo, transmitiu-me forças e empenho para que eu cumprisse com sucesso mais essa etapa de evolução, superando as dificuldades que tenham surgido nesse trecho.

À Professora Dayse e ao professor Elizeu, pela oportunidade de ter recebido-me em seu laboratório para que eu desenvolvesse e ampliasse conhecimentos em nova linha de trabalho, auxiliando sempre que necessário. Agradeço a toda equipe do LDD, em especial aos amigos Holy, Silvia, Rossana, Aline Brazão, Chuck e Vanuscapelas “boas-vindas” no novo ambiente de trabalho, com direito a repassar os “bizus” da rotina do LDD, ajuda e parceriano trabalho de bancada (e fora dela também!), por serem ouvintes e bons conselheiros nas horas de socorro (rs) e descontração.

À Dr^a Andréa Brandão e a toda equipe de Cardiologia do HUPE, pela oportunidade de trabalho em parceria, que possibilitou um pouco mais de conhecimento sobre um problema de saúde que tanto afeta nossa população.

Aos meus amigos mais íntimos e família, que apesar de não compartilharem o trabalho de laboratório vivenciam nossa rotina, acompanham nosso crescimento pessoal e profissional, presenciam nossos momentos de angústia e alegria, sempre nos repassando suas próprias experiências para nos mostrar que lutas diárias e particulares todos têm, mas que nunca estamos sozinhos, pois outros também percorreram e percorrem o mesmo caminho.

Ao meu companheiro Luiz Guilherme, que apesar da rotina muito esgotante sempre procurou e procura me apoiar incondicionalmente, incentivando meu crescimento, amparando-me nas horas difíceis e proporcionando momentos de felicidade nas horas oportunas, simplesmente por querer me ver feliz.

Toda prova, seja qual for, aparece na estrada, a fim de elastecer-nos a força e aperfeiçoar-nos a experiência.

Emmanuel

RESUMO

MACHADO, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz. **Estudo de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema β -adrenérgico e relações de ancestralidade em uma amostra de indivíduos hipertensos miscigenados da população do estado do Rio de Janeiro.** 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma desordem fisiológica multifatorial de alta prevalência, disparada pela integração de fatores ambientais e genéticos. Estudos de associação utilizam marcadores moleculares (polimorfismos genéticos) para investigar uma possível predisposição. Entretanto, em populações miscigenadas, como a brasileira, associações errôneas entre um alelo e determinada doença (associações espúrias) podem ocorrer quando grupos étnicos naturalmente predispostos estão super-representados na amostra (estratificação populacional). A partir disso, avaliou-se a variação de polimorfismos de genes do metabolismo circulatório e a associação desta variação com a ancestralidade genética em uma amostra de indivíduos miscigenados saudáveis e hipertensos da população do estado do Rio de Janeiro. Amostras de DNA obtidas de 178 indivíduos normotensos e 113 indivíduos hipertensos foram genotipadas para 4 polimorfismos associados à hipertensão (I/D da enzima conversora de angiotensina I, Ser49Gly e Arg389Gly do receptor β 1-adrenérgico e M235T do angiotensinogênio) e 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs); suas frequências genótípicas, alélicas e estimativas de proporção de mistura foram calculadas e comparadas entre os grupos. Indivíduos hipertensos apresentaram média de idade maior do que indivíduos normotensos ($p < 0,05$), com indivíduos de ambos os gêneros igualmente distribuídos entre si. Em todos os grupos clínicos amostrais, os alelos europeus (48-60%) estavam mais representados, seguido dos africanos (25-39%) e, por fim, ameríndios (12-14%), exibindo uma predominância da genética europeia em indivíduos da nossa população. A presença de HAS ocorreu em 63,2% dos indivíduos afrodescendentes, 43,0% dos mestiços e apenas 27,0% dos euro-descendentes ($\chi^2 = 11,889$, $p = 0,003$). Uma maior prevalência do genótipo II do polimorfismo da ECA foi observada em hipertensos quando comparados a normotensos (21,2% X 10,7%; $\chi^2 = 7,549$ $p = 0,023$) e do genótipo MM do polimorfismo de M235T em normotensos quando comparado a hipertensos (21,9% X 8,8% $\chi^2 = 10,737$ $p = 0,005$). Não foi encontrada diferença significativa na distribuição dos genótipos dos polimorfismos Arg389Gly e Ser49Gly entre normotensos e hipertensos. Segundo a ancestralidade genética dos indivíduos, não houve diferença significativa no padrão de distribuição dos genótipos de nenhum dos polimorfismos genéticos. Indivíduos normotensos e hipertensos apresentaram diversidade genética similar tanto para os polimorfismos genéticos (44,34% e 46,11%) quanto para os AIMs (38,85% e 40,37%), refletindo um alto grau de miscigenação. Com isso, pode-se sugerir que a ancestralidade africana exerceu influência na prevalência de HAS na amostra estudada e que apesar dos polimorfismos da ECA e do M235T terem apresentado distribuições diferentes entre normotensos e hipertensos, a ancestralidade genética não influenciou na forma como todos os polimorfismos genéticos avaliados estão distribuídos.

Palavras-chave: Hipertensão arterial sistêmica. Indivíduos miscigenados. Polimorfismos genéticos. Sistema renina-angiotensina. Beta-adrenérgico. Ancestralidade genômica. AIMs-Indels.

ABSTRACT

MACHADO, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz. **Study of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and the β -adrenergic system and ancestral relationships in a sample of admixed hypertensive individuals from the population of the state of Rio de Janeiro.** 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Hypertension is a highly prevalent physiological multifactorial disorder, triggered by the integration of environmental and genetic factors. Association studies have used molecular markers (genetic polymorphisms) to investigate a possible predisposition. However, in admixed populations, such as Brazil, erroneous associations between a particular disease and an allele (spurious associations) may occur when naturally predisposed ethnic groups are over-represented in the sample (population stratification). From that, we investigated the variation of the circulatory metabolism gene polymorphisms and the association of this variant with the genetic ancestry in a sample of healthy and hypertensive admixed individuals from population of the state of Rio de Janeiro. DNA samples obtained from 178 normotensive and 113 hypertensive individuals were genotyped for four polymorphisms hypertension-associated (I/D angiotensin-converting enzyme I, Ser49Gly and Arg389Gly of beta1-adrenergic receptor and M235T of angiotensinogen) and 46 ancestry informative markers (AIMs-Indels); their genotypic, allelic frequencies and ancestry estimates were calculated and compared between the clinical groups. Hypertensive individuals had a mean age greater than normotensive ones ($p < 0.000$; $\alpha = 0.05$), with individuals of both gender equally distributed between them. In all clinical sample groups, European alleles (48-60%) were over-represented, followed by the African (25-39%) and, finally, Amerindians (12-14%), exhibiting a predominant European genetic in individuals from our population. The presence of hypertension occurred in 63.2% of individuals of African descent, 43.0% of mixed race and only 27.0% of euro-descendants ($\chi^2 = 11,889$, $p = 0.003$). A higher prevalence of the II genotype was observed in hypertensives compared to normotensives (21.2% vs. 10.7%; $\chi^2 = 0.023$ $p = 7.549$) and the MM genotype in normotensive compared to hypertension (21.9% vs. 8.8% $\chi^2 = 10.737$ $p = 0.005$). There was no significant difference in the distribution of genotypes of Arg389Gly and Ser49Gly polymorphisms between normotensives and hypertensives. According to the individual genetic ancestry, there was no significant difference in the pattern of distribution of genotypes of either genetic polymorphisms. Normotensive and hypertensive subjects had similar genetic diversity for both genetic polymorphisms (44.34% and 46.11%) and for AIMs (38.85% and 40.37%), reflecting a high degree of admixture. Thus, it may be suggested that African ancestry exerted influence on the prevalence of hypertension in the sample and that despite the ACE and M235T polymorphisms have presented different distributions between normotensive and hypertensive individuals, genetic ancestry had no effect on how all the genetic polymorphisms evaluated are distributed.

Keywords: Essential hypertension. Admixed subjects. Genetic polymorphisms. Renin-angiotensin system. Beta-adrenergic. Ancestry genomic. AIMs-Indels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	As 10 principais causas de morte no mundo no ano de 2012 e o número de óbitos registrados.....	16
Figura 2 –	Comparação no número de óbitos, em milhões, registrados para as principais causas de morte no mundo nos anos de 2000 e 2012.....	16
Figura 3 –	Dados preliminares sobre a taxa de mortalidade do ano de 2013 para doenças do aparelho circulatório e suas diferentes causas no Brasil.....	18
Figura 4 –	Dados preliminares sobre taxa de mortalidade do ano de 2013 por doenças do aparelho circulatório e suas diferentes causas (Rio de Janeiro).	18
Figura 5 –	Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	22
Figura 6 –	Localização e efeitos dos receptores β 1-drenérgicos.....	22
Figura 7 –	Eletroferograma da análise de fragmento para alguns dos marcadores informativos de ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIMs-Indels) para a amostra RO254 gerado pelo <i>software</i> GeneMapper.....	42
Figura 8 –	<i>Triangle plot</i> da representação visual da proporção de ancestralidade genética para os grupos clínicos isolados e hipertensos acumulados.....	44
Figura 9 –	<i>Bar plot</i> da representação gráfica da proporção de ancestralidade genética para os grupos clínicos isolados.....	44
Figura 10 –	Produto de PCR do polimorfismo de I/D da <i>ECA</i> genotipado em gel de agarose 2%.....	47
Figura 11 –	Produto de digestão do polimorfismo M235T do gene <i>AGT</i> genotipado em gel de poliacrilamida 6%.....	47
Figura 12 –	Produto de digestão do polimorfismo Ser49Gly do gene <i>ADRB1</i> genotipado em gel de agarose 2%.....	48
Figura 13 –	Produto de digestão do polimorfismo Arg389Gly do gene <i>ADRB1</i> genotipado em gel de agarose 2%.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Listagem e características dos Marcadores Informativos de Ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIM-Indels) utilizados no estudo.....	37
Tabela 2 –	Caracterização epidemiológica dos grupos segundo os grupos clínicos isolados.....	41
Tabela 3 –	Estimativa da proporção global de ancestralidade genética para todos os grupos clínicos considerados.....	43
Tabela 4 –	Caracterização ancestral dos grupos clínicos isolados segundo as estimativas individuais de ancestralidade.....	45
Tabela 5 –	Caracterização ancestral do grupo clínico hipertensos acumulados segundo as estimativas individuais de ancestralidade.....	45
Tabela 6 –	Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos genéticos dos grupos clínicos isolados.....	50
Tabela 7 –	Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos genéticos para o grupo clínico dos hipertensos acumulados.....	50
Tabela 8 –	Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos genéticos segundo a ancestralidade.....	52
Tabela 9 –	Resultados dos testes de Diversidade Genética para os quatro polimorfismos genéticos no grupo de normotensos.....	54
Tabela 10 –	Resultados dos testes de Diversidade Genética para os quatro polimorfismos genéticos no grupo de hipertenso-controlados.....	55
Tabela 11 –	Resultados dos testes de Diversidade Genética para os quatro polimorfismos genéticos no grupo de hipertenso-resistentes.....	56
Tabela 12 –	Resultados dos testes de Diversidade Genética para os quatro polimorfismos genéticos no grupo de hipertenso acumulados.....	57
Tabela 13 –	Resultados significativos do teste <i>Pairwise Linkage Disequilibrium</i> para os 46 AIMs-Indels de todos os grupos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ADRB1</i>	gene do receptor adrenérgico β 1 (do inglês, <i>adrenergic receptor β1 gene</i>)
AGT	gene codificante do angiotensinogênio
AIM	marcadores informativos de ancestralidade (do inglês, <i>ancestry informative markers</i>)
APS	persulfato de amônio
AVC	acidente vascular cerebral
<i>BRCA1</i>	gene do câncer de mama 1 (do inglês, <i>breast cancer 1 gene</i>)
<i>BRCA2</i>	gene do câncer de mama 2 (do inglês, <i>breast cancer 2 gene</i>)
BSA	albumina sérica bovina (do inglês, <i>bovine serum albumine</i>)
CEP/HUPE-	Comitê de Ética em Pesquisa/Hospital Universitário Pedro Ernesto
CEPH	Centro de Estudos de Polimorfismos Humanos (do francês, <i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>)
CGIAE	Coordenação Geral de Informações e Análises Epidemiológicas
dbSNP	Banco de dados de marcadores SNPs (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>)
DCV	doenças cardiovasculares
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	dinucleotídeos trifosfatados
ECA	enzima conversora de angiotensina I
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
GN	grupo de indivíduos normotensos
GH	grupo de indivíduos hipertenso-controlados
GR	grupo de indivíduos hipertenso-resistentes
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HGDP	Projeto de Diversidade do Genoma Humano (do inglês, <i>Human Genome Diversity Project</i>)
Indels	polimorfismos de inserção / deleção (do inglês, <i>Insertions and deletions</i>)

	<i>polymorphisms</i>)
ICD-9	Classificação Internacional de Doenças -9ª revisão (do inglês, <i>International Classification of Disease, Ninth Revision</i>)
ICD-10	Classificação Internacional de Doenças -10ª revisão (do inglês, <i>International Classification of Diseases, Tenth Revision</i>)
KHCO ₃	bicarbonato de potássio
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ do inglês, <i>Monte Carlo</i>
MCMC	<i>Markov Chain</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MID	Nomenclatura dos marcadores de acordo com o banco de dados <i>Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms</i>
MS	Ministério da Saúde
NaCl	cloreto de sódio
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NLB	tampão de lise de núcleo (do inglês, <i>nuclear lysis buffer</i>)
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLD	desequilíbrio de ligação em pares (do inglês, <i>Pairwise Linkage Disequilibrium</i>)
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês, <i>Restrict Fragment Length Polymorphism</i>)
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIM	Sistema de Informação Sobre Mortalidade
SISNEP	Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos
SNP	polimorfismo de base única (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona
STR	repetições curtas em tandem (do inglês, <i>Short Tandem Repeat</i>)
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde

TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
TLH	tampão de lise de hemácias
<i>TP53</i>	gene da proteína p53
Tris	trihidroxi-metil-amino-metano
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 OBJETIVOS	28
1.1 Objetivo geral	28
1.2 Objetivos específicos	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Amostras Biológicas	30
2.1.1 <u>Estratificação amostral e critérios de inclusão e de exclusão</u>	30
2.2 Extração de DNA genômico	31
2.2.1 <u>Extração por <i>Salting-out</i> (adaptado de Miller et al., 1988)</u>	31
2.2.2 <u>Determinação da concentração de DNA</u>	32
2.3 Análise molecular dos polimorfismos genéticos	32
2.3.1 <u>Polimorfismo de inserção/deleção do gene da enzima conversora de angiotensina I (adaptado de Lindpaintner et al., 1995)</u>	33
2.3.2 <u>Polimorfismo M235T do gene do codificante do angiotensinogênio (adaptado de Russ et al., 1993)</u>	33
2.3.3 <u>Polimorfismos Ser49Gly e Arg389Gly do gene codificante do receptor adrenérgico β1 (adaptado de Maqbool et al. 1999)</u>	34
2.4 Genotipagem	35
2.4.1 <u>Identificação e análise do perfil de ancestralidade</u>	35
2.5 Análise Estatística	38
3 RESULTADOS	40
4 DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	78
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
ANEXO C - Lista de soluções e tampões utilizados.....	85
ANEXO D - Valores aproximados das Estimativas Individuais de	

Ancestralidade.....	87
ANEXO E – Resultados detalhados dos testes de diversidade genética para os 46 marcadores informativos de ancestralidade.....	90

INTRODUÇÃO

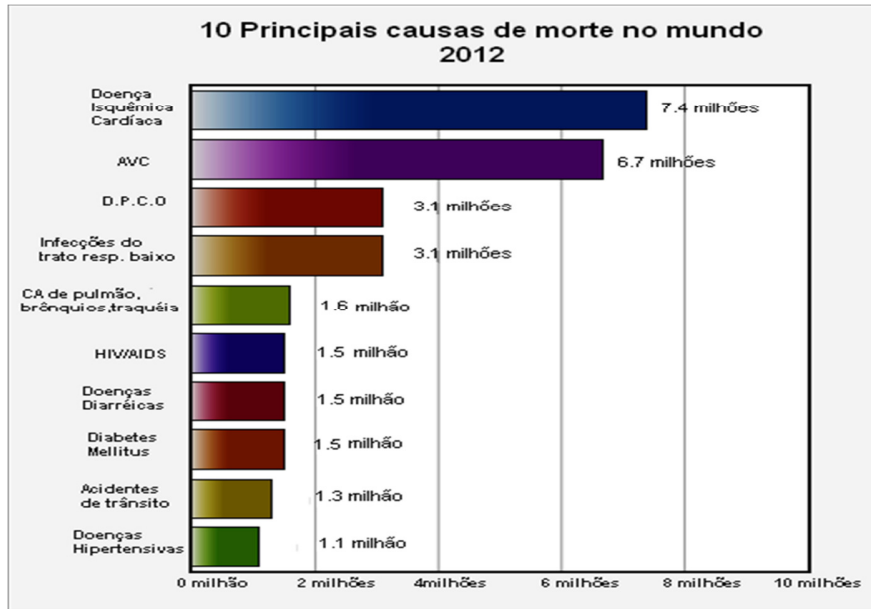
Doenças cardiovasculares e hipertensão

Doenças cardiovasculares e hipertensão: uma crise na saúde pública global

A hipertensão, ou pressão alta, como é popularmente conhecida, refere-se a uma condição em que os vasos sanguíneos estão submetidos a altas pressões de forma persistente, gerando medidas de pressão sanguínea alteradas com valores de pressão sistólica igual ou superior a 140 mmHg e de pressão diastólica igual ou superior a 90mmHg (*World Health Organization*, 2013). Essa desordem fisiológica está relacionada com eventos de infarto e acidente vascular cerebral (AVC), por exemplo, que compõem o grupo das chamadas doenças cardiovasculares (DCV). Elas integram o grupo “doenças não-comunicáveis” e tem se estabelecido como a principal causa mundial de morte prematura e invalidez segundo a *World Health Organization* (WHO).

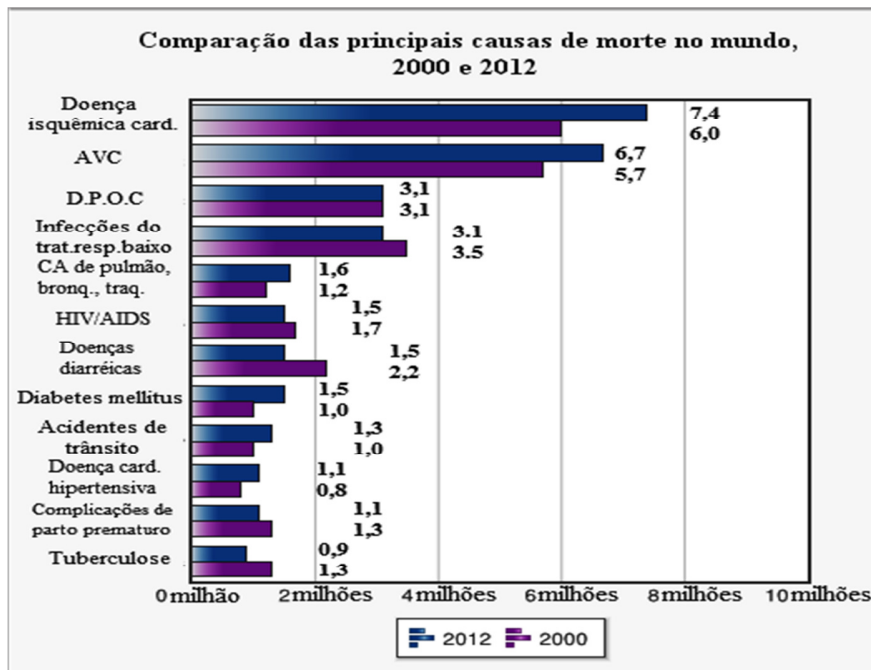
No período de 2000-2012, com base na *International Classification of Diseases-10 (ICD-10)* (WHO, 2008;WHO, 2014), observou-se que as doenças cardiovasculares continuam a liderar o *ranking* das 10 principais causas de morte no mundo (Figura 1). Durante essa década, o número de óbitos aumentou de 14,9 milhões para 17,5 milhões, dos quais 7,4 milhões por doenças isquêmicas cardíacas e 6,7 milhões por AVC, um aumento de 2,6 milhões no número de mortes (Figura 2). Doenças cardíacas hipertensivas (decorrentes do aumento da pressão sanguínea) apareceram como a quarta causa de morte dentro deste grupo com 1,14 milhão de óbitos registrados. Estratificando os dados segundo o sexo e a faixa etária para o mesmo período, as mulheres (8,8 milhões) foram mais atingidas do que os homens (8,7 milhões); em ambos os casos, a idade acima dos 70 anos foi a que registrou maior índice de mortalidade (WHO, 2014).

Figura 1 - As 10 principais causas de morte no mundo no ano de 2012 e o número de óbitos registrados



Fonte: Modificado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

Figura 2 - Comparação no número de óbitos, em milhões, registrados para as principais causas de morte no mundo nos anos de 2000 e 2012



Fonte: Modificado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.

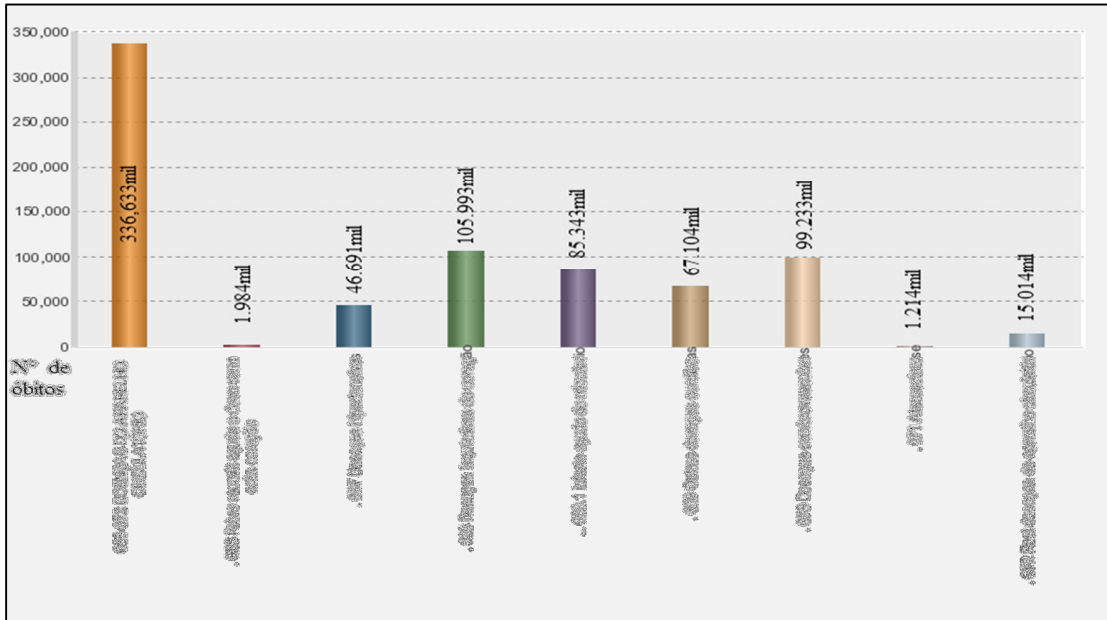
Considerando o período de 2000 e 2012 e estratificando-se os dados com base na renda média *per capita*, a mortalidade por doenças cardiovasculares no ano de 2012 foi maior em países de renda média-alta (6,86 milhões), seguido dos de renda média-baixa (5,22 milhões), renda alta (2,07 milhões) e renda baixa (998 mil). Considerando o sistema de tabulação regional da *World Health Organization* para este mesmo ano, os principais índices de mortalidade aproximados foram observados no Pacífico ocidental (5,3 milhões), Europa (4,4 milhões), Sudeste Asiático (3,7 milhões), região das Américas (1,9 milhões) e África (993 mil).

As estimativas divulgadas pela agência para o ano de 2030 com base na *International Classification of Diseases -9* (Mathers e Loncar, 2006), projetam um aumento, desde 2002, de 16,7 milhões para 23,3 milhões no número de mortes em todo mundo por doenças cardiovasculares.

Panorama brasileiro das doenças cardiovasculares

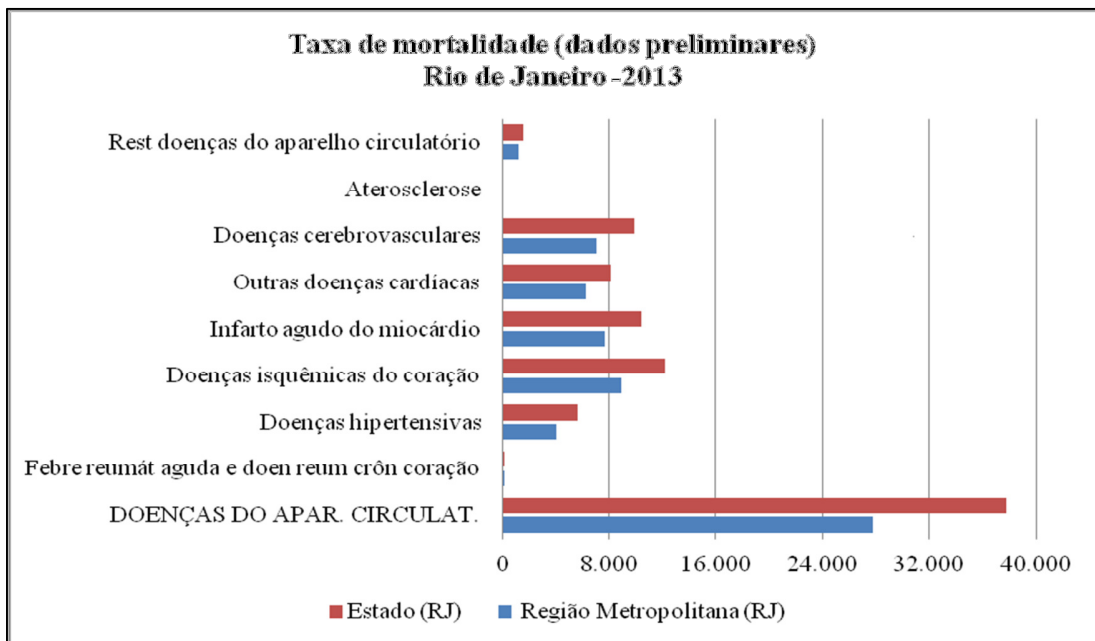
Em nosso país, as doenças cardiovasculares, principalmente a hipertensão, também são consideradas um problema de saúde pública visto que possuem uma alta incidência e baixas taxas de controle. Dados preliminares das taxas de mortalidade no ano de 2013 para o Brasil indicaram a ocorrência de mais de 336 mil óbitos em decorrência de doenças do aparelho circulatório, das quais 105 mil por doenças isquêmicas cardíacas, 99 mil por doenças cerebrovasculares e 46 mil por doenças hipertensivas cardíacas (Ministério da Saúde, 2014) (Figura 3). Destacando o estado do Rio de Janeiro, nesse mesmo período, o número de óbitos para o estado e para a região metropolitana foi de 37 mil e 27 mil por doenças cardiovasculares, sendo 12 mil e 8 mil por doenças isquêmicas cardíacas, 9 mil e 7 mil para doenças cerebrovasculares; 5 mil e 4 mil por doenças hipertensivas cardíacas, respectivamente. (Figura 4). Dados nacionais (Ministério da Saúde, 2014) mostram que 24,1% dos brasileiros adultos foram diagnosticados com hipertensão arterial; atingindo mais mulheres (26,3%) do que os homens (21,5%); os estados do Rio de Janeiro (28,7%), Recife (27,9%) e Cuiabá (26,3%) apresentaram as maiores frequências de ocorrência, enquanto Palmas (15,2%), Boa Vista (18%) e Porto Velho (19%) apresentaram as menores.

Figura 3 – Dados preliminares sobre a taxa de mortalidade do ano de 2013 para doenças do aparelho circulatório e suas diferentes causas no Brasil



Fonte: Adaptado de: MS/SVS/CGIAE – Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM.

Figura 4 - Dados preliminares sobre a taxa de mortalidade do ano de 2013 para doenças do aparelho circulatório e suas diferentes causas no Rio de Janeiro (estado e região metropolitana)



Fonte: Adaptado de: MS/SVS/CGIAE – Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM.

Com base nestas informações, justifica-se a busca por um conhecimento mais aprofundado destas patologias, em especial de seus fatores de risco e suas causas, para que possamos ampliar as medidas de prevenção. A busca de um perfil de alto risco cardiovascular deve fazer parte da avaliação rotineira de crianças e adolescentes, para permitir sua inclusão em programas de prevenção precocemente (Burke et al., 1986), a fim de prevenir o primeiro evento cardiovascular, pois ele pode ser fatal, incapacitante e representa alto custo com cuidados médicos (Pearson et al., 2002). A *World Health Organization* ressaltou que a tomada de medidas simples, como ingerir menos sal, ter uma dieta equilibrada, praticar atividades físicas regularmente, evitar o uso de tabaco e o uso nocivo do álcool, ajudam a reduzir o risco de hipertensão. Essas ações, juntamente com o acompanhamento da pressão arterial pelos indivíduos, ajudam a diminuir os custos com internações e a prevenir o surgimento de doenças cardiovasculares.

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma alteração fisiológica de característica multifatorial, ou seja, diversos fatores (genéticos e ambientais) contribuem de forma agregada para o surgimento dessa condição. Em indivíduos saudáveis, essas características relacionadas de forma independente com a ocorrência de uma determinada doença são denominadas fatores de risco (Fonseca et al., 2000). Contrariamente ao que parece, a maioria dos portadores de hipertensão não apresenta nenhum sintoma evidente, apenas algumas reações passageiras como tontura, palpitação, dor de cabeça, os quais não devem ser ignorados e sim entendidos como sinalizadores de que uma mudança de estilo de vida é necessária.

- a) Idade: maior prevalência mostrou-se em indivíduos acima dos 65 anos (Cesarino e col., 2008), em decorrência do endurecimento dos vasos sanguíneos (WHO, 2013);

- b) Gênero e etnia: os mais atingidos são os homens até os 50 anos de idade, mulheres depois dos 50 anos e indivíduos de cor não-branca, cujos índices mostram-se duas vezes maior (Lessa, 2001; Cesarino e col., 2008). Entretanto no Brasil, ainda é desconhecido o impacto da miscigenação no surgimento da hipertensão;
- c) Ingestão de sal: redução na ingestão de sal diminui efetivamente os níveis de pressão sanguínea em indivíduos hipertensos e pessoas com pressão normal, de todas as idades e etnias (WHO, 2013); populações cuja dieta é pobre em sal não setem registro de casos de hipertensão (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010)
- d) Tabagismo e Alcoolismo: em associação com a hipertensão, aumentam a morbimortalidade por doenças cardiovasculares, independente da região geográfica;
- e) Fatores genéticos: o desenvolvimento da hipertensão pode estar vinculado a alterações em genes e em sua expressão, principalmente em indivíduos afetados com idade inferior a 40 anos (WHO, 2013).

Alguns destes traços, geralmente os associados a hábitos de vida, quando modificados de forma positiva pelo indivíduo, surtem efeitos de forma mais rápida e/ou eficiente na retomada ou manutenção dos níveis normais da pressão arterial.

No Brasil, assim como no mundo todo, uma série de normas para a avaliação clínica do paciente é estabelecida e deve ser aplicada para a obtenção correta do diagnóstico de HAS e encaminhamento para o tratamento adequado, seja este medicamentoso ou não (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010), como a preparação adequada do paciente, aplicação correta da técnica padrão e equipamento calibrado. Além disso, as análises laboratoriais e a estratificação do risco cardiovascular poderão fornecer informações complementares que permitam o enquadramento preciso do paciente como um hipertenso verdadeiro.

Marcadores moleculares nahipertensão

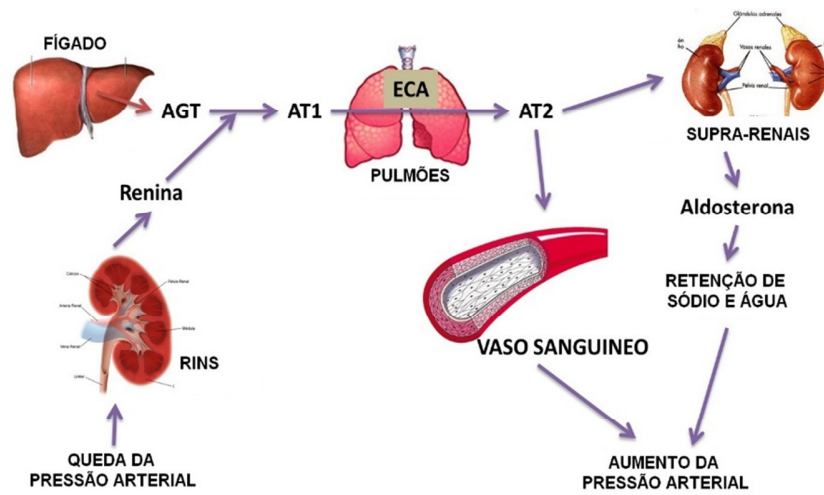
Como amplamente descrito na literatura, a predisposição genética e/ou surgimento de algumas doenças está relacionado a alterações ocorridas em alguns genes responsáveis pela homeostase de um determinado sistema biológico, como ocorre no câncer de mama e alguns genes supressores tumorais como *BRCA 1 e 2* (Hemel e Domchek, 2010) e o *TP53* (Boyle e Levin, 2008).

Como forma de pesquisar adequadamente as relações entre genoma e o surgimento de doenças, tem sido recorrente o uso dos chamados estudos de associação genética, nos quais um gene suspeito é considerado como um possível fator causal e apresenta-se em maior frequência entre pacientes afetados (Tian et al., 2008), caracterizando assim um perfil de risco associado. Tais estudos focam sua investigação na constituição genética de indivíduos afetados, levando em consideração também as variáveis clínicas, principalmente nos casos em que pacientes afetados não apresentam os fatores de risco primários ou maiores ou muito jovens (Rivera e col., 2004; Pearson et al., 2002; Smith et al., 2004).

A hipertensão é uma das patologias que tem se valido da aplicação de tais ferramentas da área da biologia molecular para desvendar os mecanismos causadores do seu surgimento. Neste contexto, tem se destacado sua associação com polimorfismos e mutações em genes relacionados aos componentes das vias de controle de pressão arterial e atividade cardíaca, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema β -adrenérgico. Esses sistemas destacam-se por coordenar os processos de vasoconstrição/vasodilatação ao sinal de alteração dos níveis de pressão (Schunkert et al., 1994; Doevendans et al., 2001; Small et al., 2002) e intermediar o equilíbrio das funções cardíacas, como a contração e a frequência cardíacas (Ranade et al., 2002) (Figura 5 e 6). Portanto, ambas as vias configuram-se como importantes alvos de atuação das drogas anti-hipertensivas.

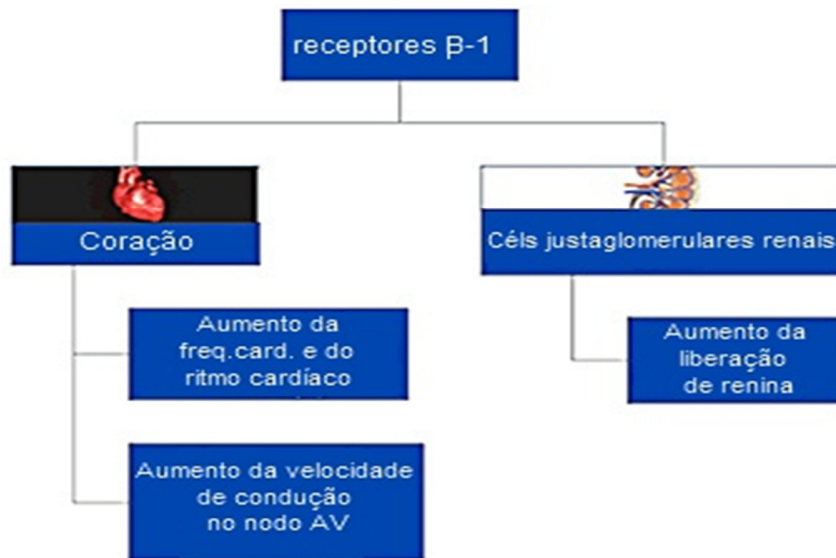
As investigações sobre essas variações genéticas envolvem a obtenção de informações a cerca do número de alelos existentes, as alterações decorrentes, suas frequências alélicas, os genótipos formados e seus padrões de distribuição em indivíduos saudáveis e em indivíduos afetados, e também sua prevalência em uma determinada população ou grupo.

Figura 5 - Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)



Fonte: Adaptado de http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/el-deportista-de-elite-nace-o-se-hace_917

Figura 6 - Localização e efeitos dos receptores β -1 adrenérgicos



Fonte: Adaptado de Pharmacology, Rang e Dale, 2006.

Um dos genes de interesse envolvidos nessa via de regulação é o gene da enzima conversora de angiotensina I humana (ECA) (NC_000017.11 (63477061..63498380)) é um dos mais estudados. Localizado na região 23.3 do braço longo do cromossomo 17 (Mattei et al., 1989), portador de 26 éxons cuja proteína é codificada em seres humanos sob duas isoformas (isoenzimas) sintetizadas por células somáticas de diversos tecidos (como células endoteliais e epitélio renal) e por células testiculares. Esta enzima é responsável pela conversão do pré-peptídeo angiotensina I em angiotensina II, forma ativa que atua fisiologicamente como vasoconstritor, e que estimula a liberação de angiotensinogênio constitutivo pelo fígado (*feedback* positivo). Sua variante alélica mais explorada é o polimorfismo de inserção/deleção ([rs1799752](#)). Ela envolve a inserção (ou deleção) da sequência repetitiva Alu de 287pb no íntron 16 desse gene (Rigat et al., 1992), produzindo alelos de comprimentos diferentes. Essa alteração está diretamente envolvida na variabilidade nos níveis plasmáticos médios dessa enzima (Tiret et al., 1992), os quais se apresentam duas vezes maiores em indivíduos homocigotos para o alelo de deleção (Rigat et al., 1990), o que favorece o aumento nos níveis de pressão arterial, com isso, de um quadro hipertensivo (Sakuma et al., 2004).

Outro gene relacionado é o *ADRB1*, gene codificante da família de receptores beta-adrenérgico tipo 1 humano (NC_000010.11 (114044047..114046908)), cuja localização se dá na região 25.3 do braço longo do cromossomo 10 (Hoehe et al., 1989). Sua proteína constitui os receptores do tipo canal e é expressa predominantemente na superfície de células cardíacas (Ranade et al., 2002) e renais atuando como receptores mediadores das funções do sistema nervoso simpático (frequência e ritmo cardíaco), além de estimular a liberação de renina pelos rins. Diante da sua importância, têm-se investigado o envolvimento desta classe de receptores com alterações em algumas disfunções cardíacas, como a insuficiência cardíaca (Nascimento e col., 2012), um dos quais resultou na identificação das duas variantes mais estudadas: Ser49Gly e Arg389Gly (Ranade et al., 2002).

A variante *missense* Ser49Gly([rs1801252](#)) apresenta uma troca do nucleotídeo A por G no códon 145, resultando na produção do aminoácido Glicina ao invés de Serina no resíduo 49 da proteína. Tal polimorfismo, que foi investigado pelo estudo citado acima, teve identificada sua associação com a frequência cardíaca em repouso, onde o genótipo dos indivíduos mostrou influência sobre o desempenho cardíaco (Ranade et al., 2002). A outra variante *missense* é a Arg389Gly ([rs1801253](#)), que exibe a troca do nucleotídeo G por C no códon 1165,

resultando na produção do aminoácido Glicina ao invés de Arginina no resíduo 389 da proteína. Experimentos *in vitro* realizados por Mason e colaboradores (1999) mostraram que a existência de modificações moleculares na estrutura do receptor, em decorrência desta alteração genética, poderiam refletir em diferenças interindividuais na resposta a tratamentos para doenças cardiovasculares. Certos estudos investigaram o efeito isolado dessa variante ou em associação com outras, em pacientes com insuficiência cardíaca tratados com betabloqueadores (Nascimento et al., 2012) e com cardiomiopatia dilatada (Iwai et al., 2002).

Outro gene averiguado é o *AGT*, gene codificante do angiotensinogênio (NC_000001.11 (230702523..230714590, complemento)), localizado na região 42.2 do braço longo do cromossomo 1 (Gaillard-Sanchez et al., 1990), mesma região do gene da enzima renina. Portador de 5 éxons, sua proteína é expressa no fígado e liberada no sangue, a fim de conjugar-se com proteínas plasmáticas. Quando há queda na pressão sanguínea, estímulos para o retorno da homeostase arterial são disparados, iniciando pela clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I pela renina secretada no sangue pelos rins, seguido da clivagem da angiotensina I em angiotensina II pela ECA, resultando numa enzima fisiologicamente ativa que atua diretamente nos tecidos.

Uma de suas cinco variantes gênicas é a M235T(rs699), a qual, em estudos de associação, tem sido relacionada ao desenvolvimento de hipertensão, pré-eclâmpsia e desordens renais, devido a altos níveis plasmáticos de angiotensinogênio e angiotensina I produzidos. A alteração decorre da substituição do nucleotídeo T por C no códon 803, resultando na formação da Metionina ao invés de Treonina na posição 268 e não 235 (embora a maioria dos trabalhos publicados referencie este SNP na posição 235, sua nomenclatura pode variar conforme o banco de dados acessado). Alguns estudos investigaram a relação de certas variantes moleculares do *AGT* com a hipertensão, como o M235T e T174M em pacientes hipertensos (Jeunemaitre et al., 1992), outras suas frequências genótípicas em diferentes grupos étnicos/populacionais (Caulfield et al., 1995).

Ancestralidade genética em estudos de associação e genética clínica

O efeito da etnia no prognóstico e na resposta terapêutica de algumas doenças cardiovasculares, já foi evidenciado, exibindo resultados afirmativos e negativos quanto a sua influência em um determinado grupo étnico (Dries et al., 2002; Mathew et al., 2005; Rathore et al., 2003), tal como observado na hipertensão e sua prevalência maior em indivíduos negros em comparação aos brancos (Bloem et al., 1995; Exner et al., 2001; Rathore et al., 2003). No entanto, esses efeitos clínicos têm sido observados em populações geneticamente homogêneas, como europeias e asiáticas, ou pouco miscigenadas (Caulfield et al., 1995; Mathew et al., 2001; Mathew et al., 2005) enquanto que em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, essa caracterização ainda não foi bem estudada, principalmente no que diz respeito às diferentes etnias que a compõem e estudos de risco e/ou predisposição a doenças e respostas a tratamentos.

A população brasileira é sabidamente uma das mais heterogêneas do mundo, cuja miscigenação envolveu: os milhões de indígenas já presentes em nosso território; milhares de imigrantes europeus oriundos inicialmente de Portugal devido ao processo de colonização e posteriormente de outros países como Itália, Espanha e Alemanha; e também os milhões de escravos vindos de diversas regiões africanas introduzidos no Brasil à força. Acrescido a esses eventos históricos é o fato que tais populações foram introduzidas ou ocupavam de diferentes formas e as diferentes regiões geográficas do território nacional, é possível inferir o quão miscigenada e complexa foi a configuração da atual população brasileira (Santos et al., 2010; de Neves Manta et al., 2013), com destaque para o envolvimento predominante do homem europeu com a mulher africana ou indígena. Com isso, alguns estudos avaliam as proporções de ancestralidade baseados nos haplótipos do cromossomo Y e sequências de DNA mitocondrial (marcadores moleculares de linhagem paterna e materna, respectivamente) [Parra et al., 1998] enquanto outros abordam o uso de marcadores autossômicos (Pereira et al., 2012; Manta et al., 2013).

Os estudos de associação ao estimarem as frequências genotípicas entre pacientes de grupos afetados devem ponderar o fato de que, muitas vezes, frequências diferentes entre amostras nem sempre são relacionadas à genética de determinado fenótipo e sim provenientes de estratificações populacionais (Tian et al., 2008), ou seja, se um grupo com prevalência de

determinada doença estiver super-representado numa amostra, o alelo que estiver mais frequente neste grupo será erroneamente associado à doença em questão (associações espúrias). Tais efeitos decorrem da estrutura genética da população amostral, cujas informações muitas vezes não podem ser percebidas pelo objeto do estudo (Tian et al., 2008), e tal erro é marcante quando a amostra é composta por populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira (Parra et al., 2003). Por isso, ao se trabalhar com amostras de populações miscigenadas, torna-se coerente à aplicação de ensaios que identifiquem e corrijam possíveis efeitos de estruturação genética (Santos et al., 2010), como os falsos resultados positivos entre indivíduos “casos e controles” (Nassir et al., 2009). Além disso, processos de miscigenação entre populações etnicamente distintas podem criar desequilíbrios de ligação entre marcadores, mesmo aqueles mais distantes (Parra et al., 1998), o que explicaria as diferentes altas prevalências de algumas doenças em determinados grupos populacionais como a diabetes *mellitus* entre hispânicos e a hipertensão entre afro-americanos.

Com essa finalidade, as estimativas de ancestralidade tornaram-se estratégias importantes ao apresentar as características supracitadas através de parâmetros específicos para estudos de associação genética (Pereira et al., 2012), ajudando a explicar se existem diferenças interindividuais numa população miscigenada e sua real interferência na distribuição da frequência do polimorfismo quanto ao padrão de suscetibilidade às doenças no indivíduo e na população. Com essa finalidade, assim como alguns polimorfismos genéticos existentes são utilizados como marcadores moleculares de uma determinada patologia, existem também os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), os quais apresentam frequências alélicas significativamente diferentes entre grupos populacionais distintos (Kosoy et al., 2009; Kersbergen et al., 2009; Santos et al., 2010). Em termos estruturais, eles podem consistir de polimorfismos de base única (SNPs) [Parra et al., 1998], repetições *in tandem* curtas (STRs) ou polimorfismos de inserção-deleção (Indels) de um ou mais segmentos de pares de base.

Notoriamente, o uso dos marcadores do tipo Indels tem se expandido devido a algumas características favoráveis como marcadores: sua propagação através do genoma humano, frequências significativamente diferentes em populações separadas caracterizando os AIMs e facilidade de genotipagem através de eletroforese com fluorocromos e que se utilizam de fragmentos pequenos (Santos et al., 2010). Marcadores moleculares de DNA, em especial os AIM-Indels, oferecem um alto poder de inferência individual e global da proporção de

miscigenação (Hoggart et al., 2003), estimando quantas e quais populações ancestrais contribuíram para o processo de miscigenação, sendo uma forma mais precisa e adequada em representar a condição genética real do indivíduo do que o método de pigmentação da pele e auto-declaração (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Cardena et al., 2013).

A maioria dos estudos que descrevem as frequências genótípicas e alélicas de marcadores polimórficos e suas possíveis consequências são realizados com indivíduos portadores de diferentes doenças cardiovasculares (Lindpaintner et al., 1995), utilizando marcadores clínicos e moleculares e em populações com um *pool* genético muito parecido em termos de estrutura genética como as europeias (Hingorani et al., 1996; Glavnik e Petrovic, 2007), asiáticas (Ranade et al., 2002; Cheng et al., 2011) ou pouco diversificada como as afro-caribenhas (Caulfield et al., 1995) ou afro-americanas (Rotimi et al., 1994; Markovic et al., 2005), que muitas vezes possuem hábitos de vida (culturais) muito parecidos, independente da região geográfica que ocupam em seu país. Já os trabalhos brasileiros que objetivam traçar um perfil de risco para doenças cardiovasculares, como a hipertensão, o fazem com o uso de, às vezes, somente variáveis clínicas e/ou sócio-demográficas, como classe social e auto-declaração, ou são coletadas numa região muito específica (Lessa, 2001; Cesarino e col., 2008; de Oliveira et al., 2008). Ademais, nesses estudos que caracterizam as frequências alélicas e genótípicas dos marcadores moleculares associados à HAS (Sakuma et al., 2004; Freitas et al., 2007a; Inacio e col., 2006; Nascimento e col., 2012), muitas vezes não é levada em consideração que a estrutura genética de indivíduos de uma dada localidade/região pode ser diferente da de outras, o que pode ocasionar uma predisposição de alguns grupos populacionais brasileiros no desenvolvimento uma determinada doença.

Logo, o correto conhecimento do background genético existente em nossa população altamente miscigenada é extremamente importante para implicações na genética clínica e na medicina genômica, possibilitando identificar a base genética de susceptibilidade às doenças complexas, a magnitude e a extensão da influência das variações étnicas no desenvolvimento de patologias e possíveis interações com os diversos fatores ambientais envolvidos (McKeigue et al., 2000; Tsai et al., 2006; Tian et al., 2008). Ademais, a utilização desses AIMS para a obtenção de estimativas de ancestralidade pode ser usada como uma ferramenta inicial de pré-avaliação de indivíduos relacionados a estudo de doenças genéticas devido ao seu baixo-custo (Pereira et al., 2012).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar a distribuição de polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e do sistema β -adrenérgico e sua associação com a ancestralidade genética em uma amostra de indivíduos miscigenados saudáveis e hipertensos da população do estado do Rio de Janeiro

1.2 Objetivos específicos

- a) Estimar as frequências alélicas e genotípicas das variantes informativas de ancestralidade (AIMs-Indels) em grupos de indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS);
- b) Determinar as frequências alélicas e genotípicas nos grupos de indivíduos saudáveis e indivíduos hipertensos dos polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina (polimorfismo de inserção/deleção (I/D) no gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) e M235T para o gene codificante do angiotensinogênio (AGT)) e do sistema β -adrenérgico (Ser49Gly e Arg389Gly do receptor adrenérgico β 1 (*ADRB1*));
- c) Analisar ocorrência de associação entre os alelos e genótipos dos polimorfismos genéticos e a hipertensão;
- d) Avaliar a influência do perfil de ancestralidade sobre o padrão de distribuição das frequências alélicas e genotípicas desses polimorfismos genéticos;
- e) Avaliar a ocorrência de estratificação amostral na população estudada;

- f) Avaliar o desequilíbrio de ligação entre esses marcadores na população estudada

- g) Avaliar a diversidade genética das populações com base nesses marcadores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras Biológicas

2.1.1 Estratificação amostral e critérios de inclusão e de exclusão

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em colaboração com a pesquisadora Dr^a Alinne Gimenez Ferreira do ambulatório de Hipertensão Arterial do Serviço/Disciplina de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). O projeto foi incluído na base de dados do Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) em 22/10/2013 sob o n° CAAE- 23753113.1.0000.5259, sendo o presente trabalho aprovado em 13/11/2013 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE (CEP/HUPE). Todos os indivíduos avaliados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e todas as condutas adotadas seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde. Ambos os documentos encontram-se nos **ANEXO A e B**.

A amostra populacional prevista incluiu 250 indivíduos não-relacionados que estudam, trabalham ou frequentam os setores e ambulatórios do HUPE da UERJ, além de pacientes atendidos nos ambulatórios de Hipertensão Arterial da Cardiologia na Policlínica Piquet Carneiro, unidade do HUPE.

Foram selecionados indivíduos brasileiros com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos e excluídos aqueles que possuíam hipertensão arterial secundária, grávidas e pacientes cujos dados clínicos estavam incompletos ou que não aderiram corretamente ao tratamento. No presente estudo, todos os indivíduos foram avaliados, seus dados antropométricos colhidos (faixa etária e gênero) e enquadrados em uma dos três grupos clínicos abaixo, segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia:

- a) Normotensos (grupo GN) - 100 indivíduos que apresentam valores de pressão arterial menor que 140/90mmHg e que não fazem uso de nenhum fármaco para controle de pressão, sendo categorizados, então, como o grupo controle;
- b) Hipertenso-controlados (grupo GH) - 100 indivíduos que apresentaram diagnóstico de hipertensão arterial com valor de pressão arterial maior ou igual a 140/90mmHg mas que efetivamente possuem controle da mesma com o uso de até 2 fármacos;
- c) Hipertenso-resistentes (grupo GR) - 50 indivíduos com diagnóstico de hipertensão arterial, mas que constantemente apresentam valores de pressão arterial maior ou igual a 140/90mmHg, mesmo com o uso de pelo menos 3 fármacos em doses plenas, sendo um deles obrigatoriamente um diurético.

2.2 Extração de DNA genômico

2.2.1 Extração por *Salting-out* (adaptado de Miller et al., 1988)

Alíquotas de 1mL de sangue periférico (armazenados em tubo com anti-coagulante EDTA) foram transferidas para tubo cônico de 15mL, às quais foram adicionadas 5 mL de tampão de lise de hemácia gelado (TLH), homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 103xg (Centrifuga Kindly modelo KC5). A seguir, o sobrenadante foi descartado, o precipitado com células foi homogeneizado com 10mL do tampão de lise de hemácia e repetiu-se a centrifugação. O sobrenadante foi removido e o precipitado com células foi ressuspensionado em 1mL de tampão de lise de núcleo (NLB), seguido da adição de 30µL de SDS 10% e de 80µL de protease a 20mg/mL (Sigma). Após homogeneização, a mistura foi incubada à 37°C por 15-18h (“*overnight*”).

Ao final do tempo decorrido, foram adicionados 300µL de NaCl 6M à solução, a qual foi agitada manualmente por 20 segundos e em seguida centrifugada por 10 minutos a 927xg. Em

seguida, todo o conteúdo foi vertido para um novo tubo cônico de 15mL, onde foi adicionado 5mL de etanol absoluto para precipitação do DNA seguido de centrifugação a 927 x g por 10 minutos. Após essa etapa, o etanol foi descartado e o DNA deixado à temperatura ambiente para secar por, aproximadamente, 10 minutos. Em seguida, adicionou-se tampão TE ao DNA precipitado (mínimo 100µL e máximo 600µL, conforme a quantidade), seguido de incubação à 37°C por 2h para estabilização e conservação da molécula. Ao término, a amostra foi armazenada em geladeira (8°C).

2.2.2 Determinação da concentração de DNA

Alíquotas (1-2µL) das amostras de DNA foram quantificadas no fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit 2–1.000 ng (Invitrogen), onde a concentração da amostra foi proporcional a intensidade de emissão de fluorescência dos fluorocromos específicos que se ligam ao DNA dupla-fita.

2.3 Análise molecular dos polimorfismos genéticos

A análise do polimorfismo de inserção/deleção da ECA foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para as variantes Ser49Gly e Arg389Gly do gene codificante do receptor adrenérgico $\beta 1$ (*ADR $\beta 1$*) e o M235T do gene codificante do angiotensinogênio (*AGT*), foi realizada a técnica da PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste na amplificação da região de interesse seguida de uma reação de digestão e análise do comprimento de seus fragmentos digeridos. Todas as soluções e tampões utilizados nas análises moleculares encontram-se descritos no **ANEXO C**.

Todas as reações foram aplicadas no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem), seguindo as condições de termociclagem descritas no item subsequente. O padrão de bandeamento dos produtos de PCR e de digestão foi avaliado por eletroforese em gel

de agarose a 2%, cujas imagens foram visualizadas e registradas pelo sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia) ou em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata (Bassam et al., 1991).

2.3.1 Polimorfismo de inserção/deleção (I/D) do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (adaptado de Lindpaintner et al., 1995)

Cada tubo de reação de PCR continha 70ng/μL de DNA de uma amostra, 5μL de tampão Platinum 4X, 1U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,14μM do iniciador *F1* (5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3'; Alpha DNA), 0,14μM do iniciador *R1* (5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'; Alpha DNA) e água deionizada q.s.p 20μL. As condições de termociclagens foram: etapa inicial de 94°C por 4 min; 35 ciclos de 94°C por 40 seg, 56°C por 30 seg, e 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min de extensão final. Posteriormente, os produtos de amplificação foram detectados e genotipados através de uma eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen), a qual foi preparada e imersa em tampão TAE 1X (Invitrogen) e submetida a uma tensão elétrica de 95V por 45-50 minutos em cuba de eletroforese horizontal (Prolab). Alíquotas de 5μL do *amplicon* foram homogeneizadas com 2μL de solução corante de ácidos nucleicos e aplicadas no gel. Também foram aplicados 3μL do padrão de escala alélica de 50 pares de base (Fermentas), misturado com solução corante fluorescente na proporção 1:4, respectivamente, como referência de tamanho molecular.

2.3.2 Polimorfismo M235T do gene do codificante do angiotensinogênio (AGT) (adaptado de Russ et al., 1993)

Cada tubo de reação de PCR continha 50ng/μL de DNA de uma amostra, 5μL de tampão Platinum 4X, 1U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,1μM do iniciador *F3*(5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC-3'; Alpha DNA), 0,1μM do iniciador *R3* (5'-

CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT-3'; Alpha DNA) e água deionizada q.s.p 20µL. As condições de termociclagens foram: etapa inicial de 94°C for 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 67°C por 45 seg, e 72°C por 90 seg; e 72°C por 10 min de extensão final. A seguir, foi realizada uma eletroforese em agarose 2% para a detecção dos produtos de amplificação nas mesmas condições descritas no item 2.3.1. Confirmada a presença dos mesmos, seguiu-se sua digestão com o uso da endonuclease de restrição *PsyI* (Tth111I – Thermo Scientific). Cada tubo de reação continha 5µL do *amplicon*, 2U da endonuclease, 2µL do tampão de reação Buffer B 10X (Thermo Scientific) e água deionizada q.s.p 15µL. A reação de digestão foi realizada em termociclador em um ciclo a 37°C por 18-20h, onde após essa etapa, o perfil alélico foi identificado através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Essa matriz foi preparada em tampão TBE 5X, imersa em tampão TBE 1X e submetida a uma tensão elétrica de 110V por 45 minutos em cuba de eletroforese vertical (BRL – Life Technologies). Alíquotas de 2µL do produto de digestão foram homogeneizadas com 1µL de solução corante de ácidos nucleicos e aplicadas no gel. Também foram aplicados 3µL do mesmo padrão de escala alélica de 50 pares de base citado no item 2.3.1.

2.3.3 Polimorfismos Ser49Gly e Arg389Gly do gene codificante do receptor adrenérgico β_1 (ADRB1) (adaptado de Maqbool et al. 1999)

Para amplificação da variante Ser49Gly, cada reação de PCR continha 50ng/µL de DNA de uma amostra, 6,25µL de tampão Platinum 4X, 1U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,24µM do iniciador *F4* (5'-CCGGGCTTCTGGGGTGTTC-3'; Alpha DNA), 0,24µM do iniciador *R4* (5'-GGCGAGGTGATGGCGAGGTAGC- 3'; Alpha DNA), 10% de DMSO e água deionizada q.s.p 25µL. As condições de termociclagens foram: etapa inicial de 94°C for 3 min; 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg, e 72°C por 45 seg; e 72°C por 7 min de extensão final. A seguir, foi realizada uma eletroforese em agarose 2,0% para a detecção dos produtos de amplificação nas mesmas condições descritas no item 2.3.1. Confirmada a presença dos mesmos, seguiu-se sua digestão com o uso da endonuclease de restrição *EcoØ109I* (New England's BioLabs). Cada tubo de reação continha 10µL do *amplicon*,

4U da endonuclease, 0,2µL de BSA 100X (New England's BioLabs), 2µL do tampão de reação NEB04 10X (New England's BioLabs) e água deionizada q.s.p 20µL. A reação foi realizada no termociclador em um ciclo a 37°C por 18-20h. Após a digestão, o perfil alélico dos produtos de digestão foi caracterizado em gel de agarose 2%, seguindo as condições descritas no item 2.3.1.

Para a amplificação do Arg389Gly, cada reação de PCR continha 70ng/µL de DNA de uma amostra, 5µL de tampão Platinum 4X, 1U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,24µM do iniciador *F2* (5'-CGTTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCC-3'; Alpha DNA), 0,24µM do iniciador *R2* (5'-TGGGCTTCGAGTTCACCTGCTATC- 3'; Alpha DNA), 7,5% de DMSO e água deionizada q.s.p 25µL. As condições de termociclagens foram: etapa inicial de 94°C por 3 min; 5 ciclos de 94°C por 30 seg, 63°C por 30 seg, e 72°C por 45 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 45seg; e 72°C por 7 min de extensão final. A seguir, foi realizada uma eletroforese em agarose 2,0% para a detecção dos produtos de amplificação nas mesmas condições descritas no item 2.3.1. Confirmada a presença dos mesmos, seguiu-se sua digestão com o uso da endonuclease de restrição BcgI (New England's BioLabs). Cada tubo de reação continha 10µL do *amplicon*, 2U da endonuclease, 1,25µL de SAM 16X (ácido sulfúrico 0,005M e etanol absoluto 10% - New England's BioLabs), 2µL do tampão de reação NEB03 10X (New England's BioLabs) e água deionizada q.s.p 20µL. A reação foi realizada no termociclador em um ciclo a 37°C por 18-20h. Após a digestão, o perfil alélico dos produtos de digestão foi caracterizado em gel de agarose 2%, seguindo as condições descritas no item 2.3.1.

2.4 Genotipagem

2.4.1 Identificação e análise do perfil de ancestralidade

Um painel de 46 marcadores autossômicos informativos de ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIMs-Indels) foi selecionado e amplificado numa única PCR Multiplex com o Qiagen Multiplex PCR kit (Applied Biosystems). Essa reação foi desenvolvida por Pereira e

colaboradores (2012) e utiliza iniciadores marcados com fluorocromos de cores diferentes, os quais permitem a visualização dos fragmentos de DNA amplificados por PCR em equipamento automático de eletroforese capilar pela detecção da fluorescência emitida. Todos os marcadores selecionados apresentam diferença de $\geq 0,40$ nas frequências alélicas entre duas populações ancestrais. A lista com os marcadores utilizados nesta reação multiplex assim como a descrição dos alelos e as localizações físicas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Listagem e características dos Marcadores Informativos de Ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIM-Indels) utilizados no estudo

Identificação	MID ¹	Cromossomo	Posição (bp)	Alelos descritos no dbSNP ²
rs2307666	MID-1470	11	64729920	-/GTTAC
rs1610863	MID-777	16	6551830	-/GAA
rs16635	MID-196	6	99789775	-/CAT
rs1610965	MID-881	5	79746093	-/ACTT
rs35451359	MID-3122	18	45110983	-/ATCT
rs140837	MID-548	6	3708909	-/CT
rs1160893	MID-659	2	224794577	-/CT
rs2308203	MID-2011	2	109401291	-/CTAGA
rs33974167	MID-2929	8	87813725	-/TA
rs1160852	MID-593	6	137345857	-/TT
rs1610884	MID-798	5	56122323	-/GGGAAA
rs2067280	MID-1193	5	89818959	-/AT
rs2308067	MID-1871	7	127291541	-/TT
rs4183	MID-17	3	3192524	-/TAAC
rs3054057	MID-2538	15	86010538	-/AACA
rs2307840	MID-1644	1	36099090	-/GT
rs60612424	MID-3854	6	84017514	-/TCTA
rs3033053	MID-2275	14	42554496	-/TCAGCAG
rs16384	MID-94	22	42045009	-/AAC
rs34611875	MID-3072	18	67623917	-/GCCCCCA
rs1610859	MID-772	5	128317275	-/TAG
rs3045215	MID-2313	1	234740917	-/ATTATAACT
rs25621	MID-397	6	139858158	-/TTCT
rs2307832	MID-1636	1	55590789	-/AA
rs16343	MID-51	4	17635560	-/TTTAT
rs3031979	MID-2431	8	73501951	-/ATTG
rs34122827	MID-2264	13	63778778	-/AAGT
rs133052	MID-2256	22	41042364	-/CAT
rs6490	MID-128	12	108127168	-/ATT
rs4181	MID-15	2	42577803	-/AAATACACAC
rs3030826	MID-2241	6	67176774	-/GTCCAATA
rs140708	MID-419	6	170720016	-/AATGGCA
rs1611026	MID-943	5	82545545	-/TGAT
rs16438	MID-159	20	25278470	-/CCCCA
rs2308161	MID-2005	10	69800909	-/AACAAT
rs16687	MID-250	7	83887882	-/CA
rs2307998	MID-1802	5	7814345	-/GGA
rs2307803	MID-1607	3	108981031	-/TG
rs2307930	MID-1734	6	84476378	-/CCAT
rs25630	MID-406	6	14734341	-/AG
rs2307582	MID-1386	1	247768775	-/AAACTATTCATTTTCACCT
rs2307922	MID-1726	1	39896964	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
rs11267926	MID-3626	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
rs25584	MID-360	12	112145217	-/AA
rs2307799	MID-1603	5	70828427	-/TTGT
rs34541393	MID-2719	20	30701405	-/AACT

Legenda: ¹MID: Nomenclatura dos marcadores de acordo com o banco de dados Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms. ²Listagem dos marcadores de acordo com dbSNP (modelo-versão 132)

As reações de PCR foram preparadas utilizando-se 1-2ng/ μ L de DNA genômico, 5 μ L do tampão Multiplex Qiagen Master Mix 2x (Qiagen Multiplex PCR Kit), 1 μ L do mix de 46 iniciadores a 1 μ M, 1 μ L do mix de reforço de sete iniciadores a 1 μ M (MID-196 e MID-881 (azul), MID-3626 e MID-2719 (vermelho), MID-943 (amarelo), MID-3854 e MID-772 (verde)), os quais apresentam perda de qualidade na amplificação com o tempo, e água deionizada em q.s.p 10 μ L. As condições de termociclagem da reação foram: etapa inicial de 95°C por 15 min; 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 90 seg, e 72°C por 45 seg; e 72°C por 60 min de extensão final.

Em seguida, foi executada uma eletroforese capilar para separação dos fragmentos de DNA, que ocorre através da migração dos mesmos em um campo elétrico em polímero (gel). Esta técnica, juntamente ao uso de iniciadores marcados com fluorocromos distintos, permite a discriminação simultânea de vários fragmentos de DNA (multiplex) ainda que de mesmo tamanho. Cada amostra amplificada por PCR foi misturada com 8,8 μ L de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystem) e 0,2 μ L de *LIZ500 Size Standard* (Applied Biosystem), um padrão interno de fragmentos de DNA de tamanho conhecido, aplicados em placa de 96 poços e submetidos a uma análise de fragmentos no sequenciador automático Genetic Analyzer ABI 3500 (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no *software* GeneMapper v4.1 (Applied Biosystem).

2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS Statistics 17.0, considerando 0,05 ou 5% ($p < 0,05$) como nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade para os testes estatísticos realizados para comparação entre os grupos amostrais: análise de variância (F), Teste do Q-quadrado (χ^2) e pós-teste de Tukey.

Os testes de Diversidade Genética foram realizados para os quatropolimorfismos genético para os 46 marcadores de ancestralidade. O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), que avalia o desequilíbrio de um *locus* a partir da comparação entre a frequência esperada e a frequência observada, e o desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* diferentes

(*Pairwise Linkage Disequilibrium* - PLD) foram geradas no *software* Arlequin v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), considerando 0,05 ($p < 0,05$) como nível de significância. Os valores que se mostraram significativos serão ajustados por correção de Bonferroni. As estimativas de ancestralidade individual e global, a partir da análise dos marcadores informativos de ancestralidade, foram geradas através do *software* Structure v2.3.4 (Pritchard et al., 2000), utilizando o painel de diversidade HGDP-CEPH (subconjunto H952) como referência para as populações ancestrais africanas, europeia e ameríndia (dados publicados por Pereira et al., 2012), com extensão de corrida de 100.000 *burn-in* e 100.000 repetições Monte Carlo Markov Chain (MCMC). As análises foram realizadas empregando o modelo de mistura relacionado às frequências alélicas, considerando $K = 1$ para $K = 3$, assumindo o valor arbitrário de 0,70 (70%) como percentual de contribuição majoritária por uma dada população ancestral.

3 RESULTADOS

Foram obtidas, no total, 291 amostras, das quais 178 (61,2%) foram inseridas no grupo de indivíduos normotensos (GN), 77 (26,5%) no grupo de indivíduos hipertenso-controlados (GH) e 36 (12,4%) no grupo de indivíduos hipertenso-resistentes (GR). Todas as amostras produziram resultados tanto para as análises dos polimorfismos genéticos quanto para as dos marcadores de ancestralidade, sem haver exclusão de nenhuma. Todas as análises moleculares e estatísticas foram também executadas com os grupos de hipertensos acumulados (GH+GR), simulando um *pool* genético de indivíduos portadores de hipertensão.

Os resultados serão apresentados nas seguintes etapas: dados epidemiológicos da amostra, caracterização do perfil ancestral da amostra com base em marcadores informativos de ancestralidade (AIM-Indels), caracterização do perfil genético dos polimorfismos genéticos, perfil ancestral da amostra estudada e sua associação com o padrão de distribuição dos polimorfismos genéticos e, por último, dados populacionais dos polimorfismos genéticos e dos marcadores informativos de ancestralidade estudadas, tais como diversidade genética, desequilíbrio de ligação (PLD), e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Perfil epidemiológico da amostra

Considerando a totalidade das amostras, a média de idade em anos foi de 46,57 (desvio padrão de 12,90 anos, limite mínimo de 18 anos e limite máximo de 76 anos); das quais 118 (40,5%) eram indivíduos do sexo masculino e 173 (59,5%) eram indivíduos do sexo feminino.

A caracterização epidemiológica das amostras pelo *software* SPSS Statistic, segundo os grupos clínicos, indicou que: no grupo de normotensos, a média de idade em anos foi de 40,85 e desvio padrão de 9,94 anos, 72 (40,4%) indivíduos são do sexo masculino e 106 (59,6%) do sexo feminino; no grupo de hipertenso-controlados, a média de idade (em anos) de 54,18 e desvio padrão de 12,70 anos, 32 (41,6%) eram do sexo masculino e 45 (58,4%) do sexo feminino; no grupo de hipertenso-resistentes, a média de idade (em anos) de 58,56 com desvio padrão de 9,31

anos, 14 (38,9%) do sexo masculino e 22 (61,1%) do sexo feminino. O teste de χ^2 indicou que não houve diferença significativa entre os grupos clínicos para variável sexo ($p=0,963$), entretanto, pelo teste F, houve diferença para a variável idade ($p<0,000$; $\alpha=0,05$), ou seja, o grupo normotenso compreende indivíduos com menor média de idade em comparação aos grupos hipertenso-controlados e hipertenso-resistentes, e que estes não apresentam diferenças entre si (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização epidemiológica dos grupos segundo os grupos clínicos isolados

Variável	Grupo GN (n=178)	Grupo GH (n=77)	Grupo GR (n=36)	Teste Estatístico	Valor de p
Sexo (M/F)	72/106	32/ 45	14 / 22	$\chi^2 = 0,074$	0,963
Idade, anos (média \pm d.p.)	40,85 \pm 9,94	54,18 \pm 12,70	58,56 \pm 9,31	F = 67,809	0,000*
Idade		GN < GH = GR		Tukey (2 a 2)	-

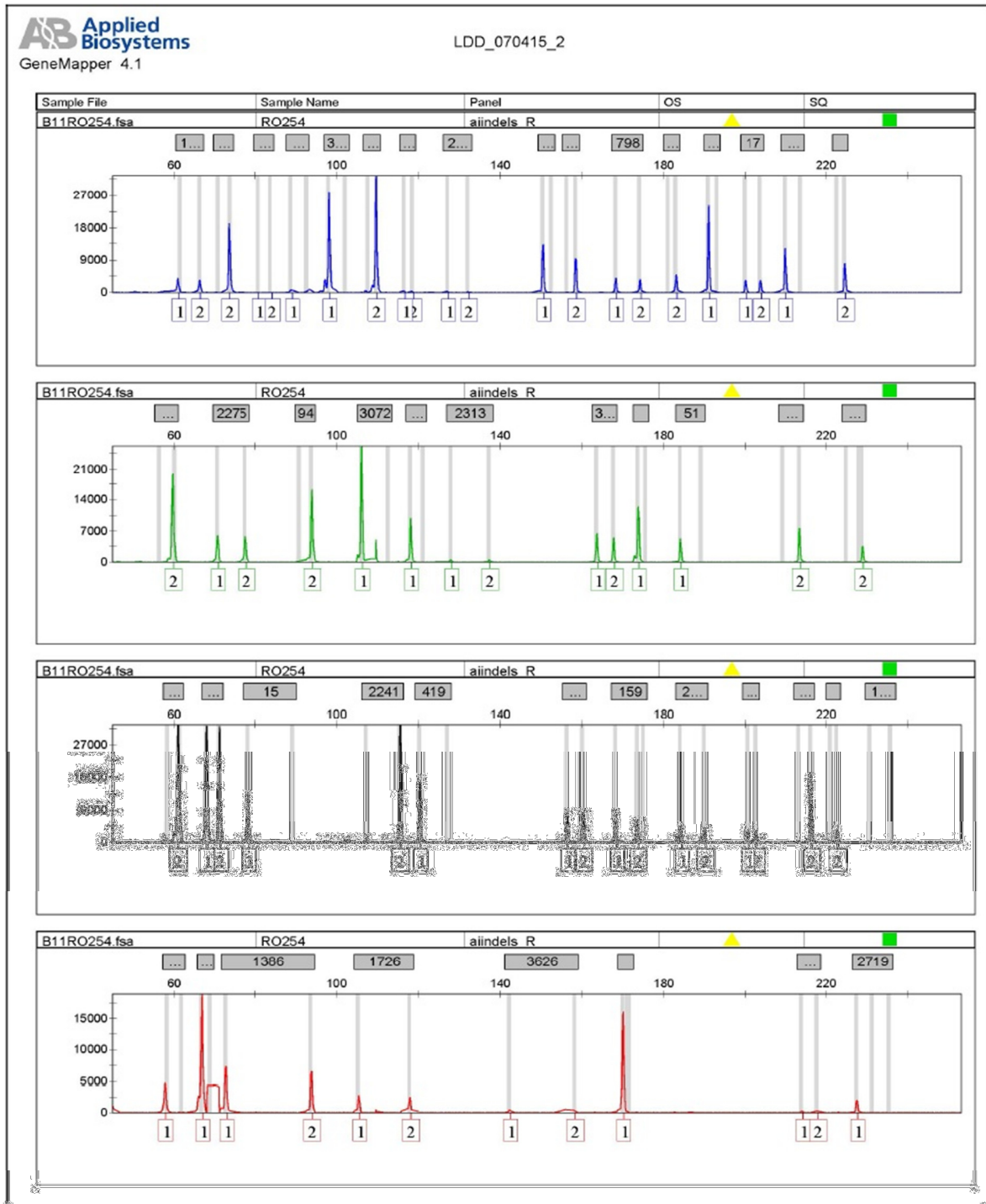
Fonte: a autora, 2015.

Nota:*Significante para $\alpha=0,05$ (GN: normotensos; GH: hipertenso-controlados; GR: hipertenso-resistentes).

Perfil ancestral da amostra

Os resultados que melhor estimaram as proporções de mistura individual e global de todas as amostras foram os que envolveram os três clusters considerados (africanos, europeus e ameríndios) na constituição das populações amostrais, sejam para os grupos clínicos isolados ($K=3$; $\text{Ln P(D)} = -29322.1$) ou para os grupos clínicos de hipertensos acumulados ($K=3$; $\text{Ln P(D)} = -29401.6$), cujo índice negativo é indicador de uma mistura de alelos de diferentes etnias nos *loci* avaliados. A figura 7 mostra um eletroferograma de alguns marcadores informativos de ancestralidades sobre uma determinada região de comprimento com a presença do alelo 1 e/ou alelo 2, diferenciados pela cor do fluoróforo e pelo tamanho dos fragmentos de DNA.

Figura 7 - Eletroferograma da análise de fragmento para alguns dos marcadores informativos de ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIMs-Indels) para a amostra RO254 gerado pelo *software* GeneMapper v4.1.



Nota: Cada alelo é representado por um pico colorido, posicionado sobre uma determinada região de comprimento (bin) associada ao marcador (retângulos cinza).

Tomando a proporção global de cada grupo clínico isolado, percebe-se que a contribuição genética da população africana foi maior no grupo de hipertenso-resistentes (39,0%) em comparação ao grupo de hipertenso-controlados (34,3%) e ao grupo de normotensos (25,7%). O percentual de contribuição europeia entre hipertenso-resistentes (48,2%) mostrou-se mais baixo em comparação aos normotensos (60,5%), porém não muito distante do valor apresentado pelos hipertenso-controlados (51,6%). Comparando-se o grupo de hipertensos acumulados (GH+GR) com os normotensos, houve uma contribuição da população africana maior naquele grupo (35,4%) do que grupo de normotensos (25,7%). Já a contribuição europeia apresentou valor mais baixo (50,4%) entre hipertensos acumulados do que em normotensos (60,5%). O percentual de contribuição da população ameríndia apresentou valores bem próximos, variando de 12% a 14%, os quais foram notavelmente inferiores ao percentual das demais populações ancestrais em todos os grupos clínicos considerados (Tabela 3).

Com relação aos índices individuais de contribuição genética de um grupo ancestral (ANEXO D), o menor e o maior índice captados dentro de cada grupo clínico foram: 3% de alelos africanos ou ameríndios e 92% de alelos europeus no grupo GN, 2% de alelos africanos e 92% de alelos europeus no grupo GH; e 3% de alelos africanos ou ameríndios e 90% de alelos europeus no grupo GRAs. Figura 8 e 9 mostram gráficos com a representação visual da proporção de associação das amostras analisadas com as populações referência, sendo o valor máximo de 1 (100%), sob as formas de *triangle plot* e *bar plot*. A porcentagem de perda de dados para amostras totais variou entre 2 e 8% em todas os testes realizados.

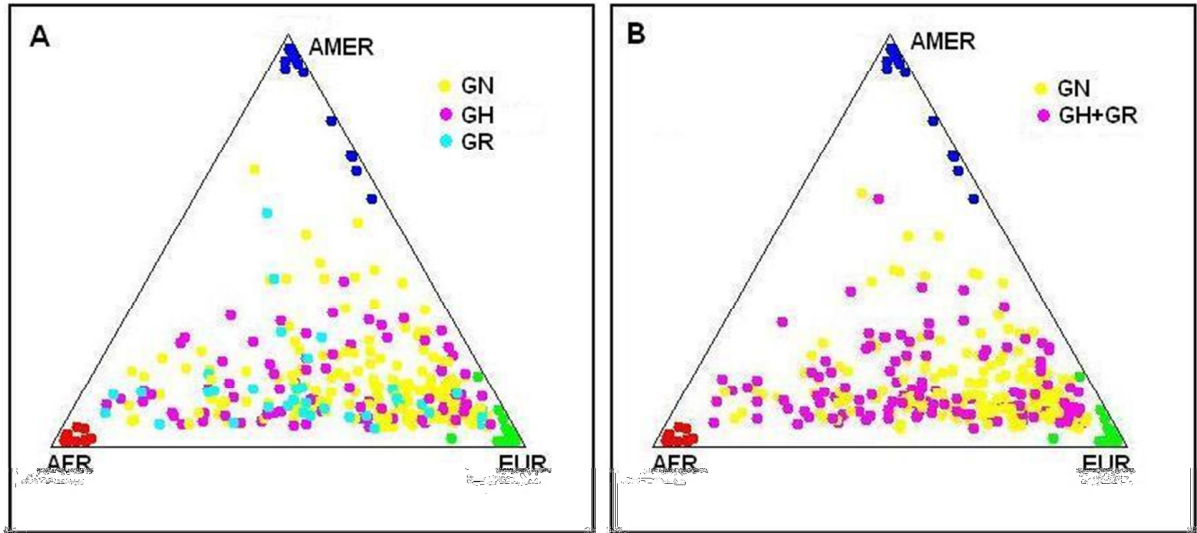
Tabela 3 - Estimativas da proporção global de ancestralidade genética para todos os grupos clínicos considerados.

Grupos Clínicos				
Pop Ancestral	Proporção Global de Mistura			
	GN	GH	GR	GH+GR
AFR	0.257	0.343	0.390	0.354
EUR	0.605	0.516	0.482	0.504
AMER	0.138	0.141	0.127	0.142
Total de indivíduos	178	77	36	113

Fonte: A autora, 2015.

Legenda: GN: normotensos; GH: hipertenso-controlados; GR: hipertenso-resistentes; GH+GR: hipertensos acumulados.

Figura 8 - *Triangle plot* mostrando a representação visual da proporção de ancestralidade genética gerado no *software* Structure

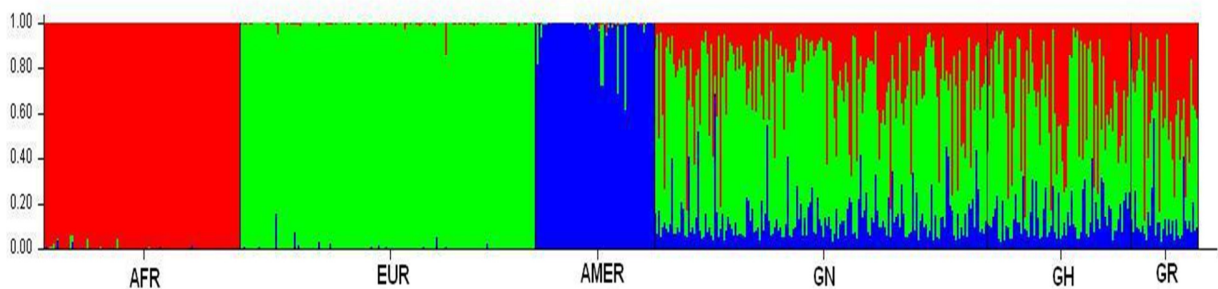


Fonte: A autora, 2015.

Nota: Cada amostra é representada por um ponto e a proporção de mistura é representada pela distância dos pontos aos vértices do triângulo, que representam as populações ancestrais referência do painel de diversidade HGDP-CEPH.

Legenda: (a) - para os grupos clínicos isolados; (b) - grupos clínicos GH e GR acumulados; AFR: africana; EUR: europeia; AMER: ameríndia.

Figura 9 - Bar plot mostrando a representação gráfica da proporção de ancestralidade genética gerado no *software* Structure para os grupos clínicos isolados



Fonte: A autora, 2015.

Nota: Cada amostra é representada por uma linha vertical, a qual é preenchida de acordo com proporção de mistura entre as populações ancestrais referência do painel de diversidade HGDP-CEPH.

Legenda: AFR: africana; EUR: europeia; AMER: ameríndia; GN: normotensos; GH: hipertenso-controlados; GR: hipertenso-resistentes; GH+GR: hipertensos acumulados.

Diferenças significativas quanto a distribuição dos indivíduos segundo sua ancestralidade (estimativas individuais de ancestralidade) foram observadas tanto entre os grupos clínicos isolados ($p=0,011$) (Tabela 4) quanto na comparação entre normotensos e hipertensos acumulados ($p=0,003$) (Tabela 5). Para os grupos clínicos isolados, indivíduos com ancestralidade europeia apareceram em maior frequência no grupo dos normotensos (73,0%) do que nos grupos de hipertenso-controlados (21,0%) e resistentes (6,0%). Indivíduos com ancestralidade africana estavam razoavelmente distribuídos entre os três grupos clínicos, com sutil predominância entre hipertenso-controlados (42,1%). mestiços mostraram relevante participação nos três grupos clínicos, principalmente no grupo dos normotensos (57,0%). Ao reunirem-se todos os indivíduos hipertensos (GH+GR), a frequência de indivíduos com ancestralidade africana (63,2%) se torna bem maior neste grupo do que nos normotensos (36,8%).

Tabela 4 - Caracterização ancestral dos grupos clínicos isolados segundo as estimativas individuais de ancestralidade

Grupos clínicos	Ancestralidade, n (%)			Teste Estatístico	Valor de p
	AFR	EUR	MEST		
Grupo GN (n=178)	7 (36,8%)	73 (73,0%)	98 (57,0%)		
Grupo GH (n=77)	8 (42,1%)	21 (21,0%)	48 (27,9%)	$\chi^2 = 13,127$	0,011*
Grupo GR (n=36)	4 (21,1%)	6 (6,0%)	26 (15,1%)		

Nota: *Significante para $\alpha=0,05$.

Legenda: AFR: africanos; EUR: europeu; MEST: mestiço; GN: normotensos; GH: hipertenso-controlados; GR: hipertenso-resistentes.

Tabela 5 - Caracterização ancestral do grupo clínico dos hipertensos acumulados segundo as estimativas individuais de ancestralidade

Grupos clínicos	Ancestralidade, n (%)			Teste Estatístico	Valor de p
	AFR	EUR	MEST		
Grupo GN (n=178)	7 (36,8%)	73 (73,0%)	98 (57,0%)		
Grupo GH+GR (n=113)	12 (63,2%)	27 (27,0%)	74 (43,0%)	$\chi^2 = 11,899$	0,003*

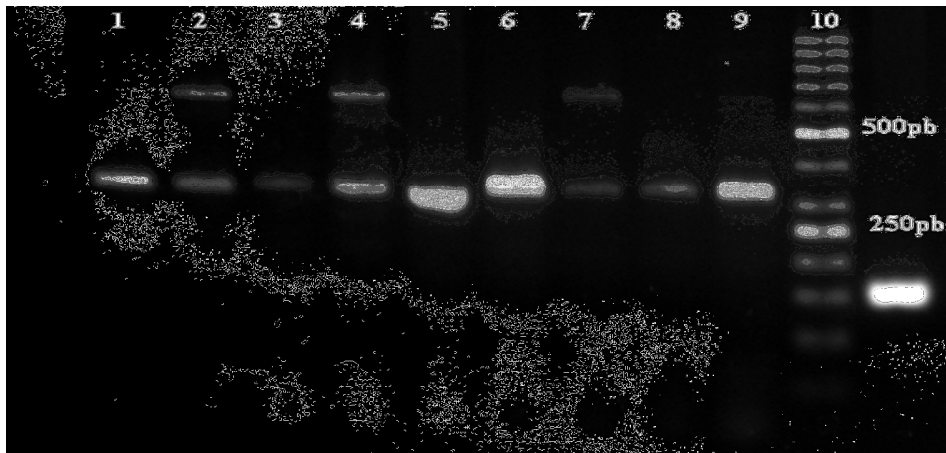
Nota: *Significante para $\alpha=0,05$.

Legenda: AFR: africanos; EUR: europeu; MEST: mestiço; GN: normotensos; GH+GR: hipertensos acumulados.

Análise dos polimorfismos genéticos

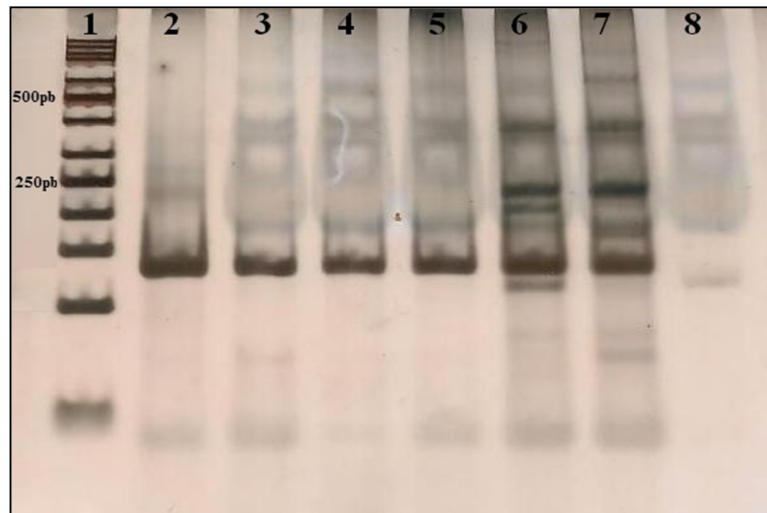
As análises do polimorfismo de inserção/deleção do gene da enzima conversora de angiotensina I (ECA) resultaram na identificação do alelo I (presença de inserção) com 597pb e do alelo D (presença de deleção) com 319pb, compreendendo três genótipos distintos: Inserção/Inserção (I/I); Inserção/Deleção (I/D) e Deleção/Deleção (D/D) (Figura 10). Para o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (AGT), foi identificado o alelo M (Metionina) com 165pb e o alelo T (Treonina) clivado em dois fragmentos com 141pb e 24pb, compreendendo três genótipos distintos: Metionina/Metionina (M/M), Metionina/Treonina (M/T) e Treonina/Treonina (T/T) (Figura 11). Com ao polimorfismo Ser49Gly foram identificados o alelo S (Serina) com 564pb e o alelo G(Glicina) clivado em dois fragmentos de 345pb e 219pb, logo três genótipos distintos: Serina/Serina (S/S), Serina/Glicina (S/G) e Glicina/Glicina (G/G) (Figura 12). Já para o polimorfismo Arg389Gly, foram identificados o alelo A (Arginina) com 530pb e o alelo G (Glicina) clivado em dois fragmentos de 342pb e 154pb, e três genótipos distintos: Arginina/Arginina (A/A), Arginina/Glicina (A/G) e Glicina/Glicina(G/G) (Figura 13).

Figura 10 - Produto de PCR do polimorfismo de I/D da ECA genotipado em gel de agarose 2%



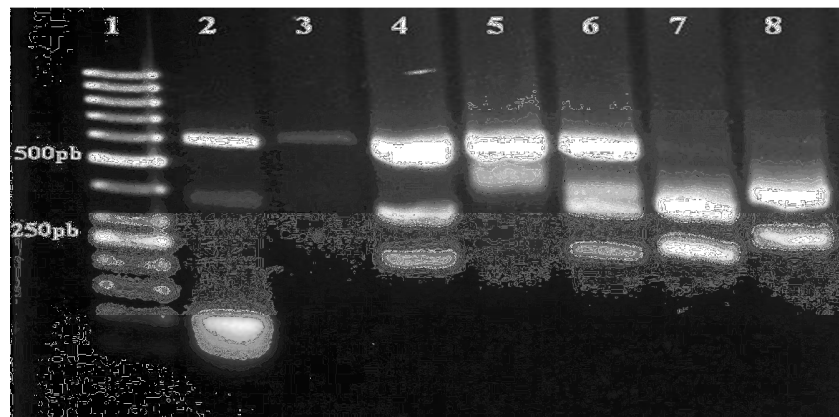
Nota: Linhas 1, 3, 5, 6, 8 e 9 - fragmento de 319pb do alelo D para o genótipo D/D das amostras RO114, RO124, RO143, RO152, RO154 e controle positivo; linhas 2, 4 e 7 - fragmentos de 597pb e de 319pb do alelo I e alelo D, respectivamente, para o genótipo I/D para as amostras RO122, RO142 e RO153; linha 10 - escala alélica de 50 pares de base.

Figura 11 - Produto de digestão do polimorfismo M235T do gene *AGT* genotipado em gel de poliacrilamida 6%



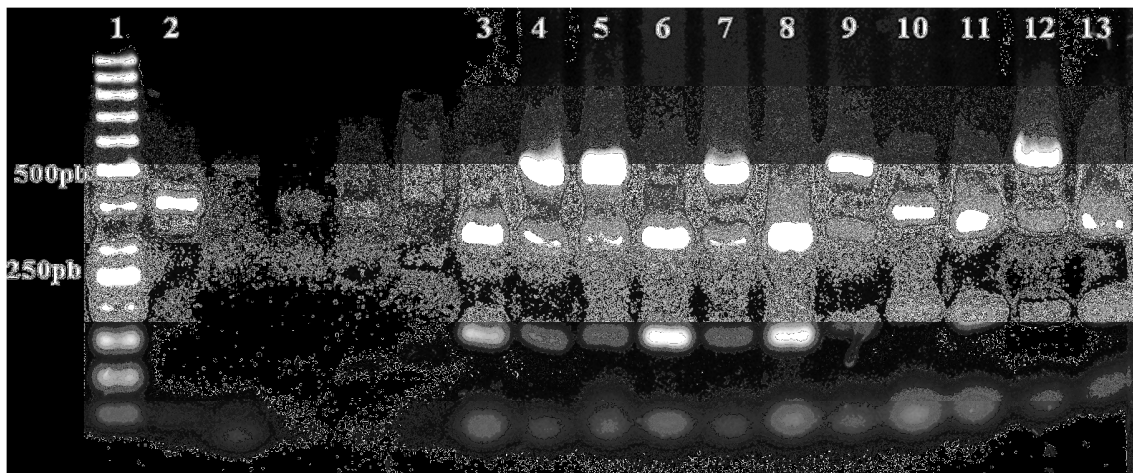
Nota: Linha 1- escala alélica de 50 pares de base; linha 2 - controle positivo não-digerido; linhas 3, 4, 5 e 7 - fragmento de 165pb do alelo M para o genótipo M/M das amostras RO15, RO58, RO97e RO113; linha 6 - fragmentos de 165pb, 141pb e 24pb (não-visível) do alelo M e do alelo T clivado, respectivamente, para o genótipo M/T da amostra RO112; linha 8 - fragmento de 141pb e 24pb (não-visível) do alelo T clivado para o genótipo T/T da amostra RO191.

Figura 12 - Produto de digestão do polimorfismo Ser49Gly do gene ADR β 1 genotipado em gel de agarose 2%



Nota: Linha 1- escala alélica de 50 pares de base; linha 2- controle positivo não-digerido; linhas 3 e 5 - fragmento de 564pb do alelo S para o genótipo S/S das amostras RO09 e RO139; linhas 4 e 6 - fragmentos de 564pb, 345pb e 219pb do alelo S e do alelo G clivado, respectivamente, para o genótipo S/G das amostras RO137 e RO140; linhas 7 e 8 - fragmentos de 345pb e 219pb do alelo G clivado para o genótipo G/G das amostras RO141 e RO142.

Figura 13 - Produto de digestão do polimorfismo Arg389Gly do gene ADR β 1 genotipado em gel de agarose 2%



Nota: Linha 1 - escala alélica de 50 pares de base; linha 2 - controle positivo não-digerido; linhas 4, 5, 7, 9 e 12 - fragmentos de 530pb, 342pb e 154pb do alelo A e do alelo G clivado, respectivamente, para o genótipo A/G das amostras RO160, RO161, RO163, RO165 e RO168; linhas 3, 6, 8, 10, 11 e 13 - fragmentos de 342pb e 154pb do alelo G clivado para o genótipo G/G das amostras RO143, RO162, RO164, RO166, RO167 e RO169.

Comparação entres os grupos com base nos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos aqui estudados foram comparados entre os três grupos clínicos estabelecidos neste trabalho (Tabela 6). Além desta análise, como mencionado inicialmente, também foram realizadas comparações entre o grupo dos normotensos e o grupo de hipertensos acumulados (GH+GR), que reúne todos os pacientes hipertensos(Tabela 7).

Na comparação entre os grupos clínicos isolados, afrequência dos genótipos do polimorfismo I/D da ECA foi significativamente diferente ($p=0,024$; $\alpha=0,05$), onde afrequência do genótipo I/I foi notoriamente alta entre os hipertenso-resistentes (30,6%) em contraste ao observado entre normotensos (10,7%) e hipertenso-controlados (16,9%). A frequência de 30,6% do genótipo I/D entre resistentes foi inferior à observada nos demais grupos, com 48,3% para normotensos e 39,0% para hipertenso-controlados. Diferença significativa também foi observada com relação ao polimorfismo M235T ($p=0,025$; $\alpha=0,05$), onde o perfil genotípico M/M ocorreu com frequência maior entre normotensos (21,9%) comparativamente aos hipertenso-controlados (10,4%) e, principalmente, aos resistentes (5,6%). Uma altíssima frequência do genótipo M/T, acima de 75%, foi também observada em todos os grupos. Já na comparação entre normotensos e hipertensos acumulados (Tabela 7), o perfil de distribuição das frequências genotípicas desses polimorfismos foram similares aos anteriores, inclusive para aqueles que apresentaram diferenças significativas: ECA ($p=0,023$; $\alpha=0,05$) e M235T ($p=0,005$; $\alpha=0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas na distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos Arg389Gly e Ser49Gly, tanto para os grupos clínicos isolados quanto para o grupo que reúne todos os hipertensos.

Tabela 6 – Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos genéticos entre os grupos clínicos isolados

Variável	Genótipo	Grupo GN	Grupo GH	Grupo GR	Teste Estatístico	Valor de p
Arg389Gly	A/A	42 (23,6%)	15 (19,5%)	8 (22,2%)	$\chi^2 = 0,840$	0,933
	A/G	89 (50,0%)	43 (55,8%)	19 (52,8%)		
	G/G	47 (26,4%)	19 (24,7%)	9 (25,0%)		
Alelos	A	173 (48,59%)	73 (47,40%)	35 (48,61%)		
	G	183 (51,41%)	81 (52,60%)	37 (51,39%)		
Ser49Gly	S/S	116 (6,2%)	46 (59,7%)	23 (63,9%)	$\chi^2 = 0,980$	0,913
	S/G	47 (26,4%)	25 (32,5%)	10 (27,8%)		
	G/G	15 (8,4%)	6 (7,8%)	3 (8,3%)		
Alelos	S	279 (78,37%)	117 (75,97%)	56 (77,77%)		
	G	77 (21,63%)	37 (24,03%)	16 (22,23%)		
ECA	I/I	19 (10,7%)	13 (16,9%)	11 (30,6%)	$\chi^2 = 11,213$	0,024*
	I/D	86 (48,3%)	30 (39,0%)	11 (30,6%)		
	D/D	73 (41,0%)	34 (44,2%)	14 (38,8%)		
Alelos	I	124 (34,83%)	56 (36,36%)	33 (45,83%)		
	D	232 (65,17%)	98 (63,63%)	39 (54,16%)		
M235T	M/M	39 (21,9%)	8 (10,4%)	2 (5,6%)	$\chi^2 = 11,147$	0,025*
	M/T	136 (76,4%)	69 (89,6%)	34 (94,4%)		
	T/T	3 (1,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
Alelos	M	214 (60,11%)	85 (55,20%)	38 (52,77%)		
	T	142 (39,89%)	69 (44,80%)	34 (47,22%)		

Fonte: a autora, 2015.

Nota: *Significante para $\alpha=0,05$.

Legenda: GN: normotensos; GH: hipertenso-controlados; GR: hipertenso-resistentes.

Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos genéticos para o grupo clínico de hipertensos acumulados

Variável	Genótipo	Grupo GN	Grupo GH+GR	Teste Estatístico	Valor de p
Arg389Gly	A/A	42 (23,6%)	23 (20,4%)	$\chi^2 = 0,712$	0,701
	A/G	89 (50,0%)	62 (54,9%)		
	G/G	47 (26,4%)	28 (24,8%)		
Alelos	A	173 (48,59%)	108 (47,78%)		
	G	183 (51,41%)	118 (52,21%)		
Ser49Gly	S/S	116 (65,2%)	69 (61,1%)	$\chi^2 = 0,713$	0,700
	S/G	47 (26,4%)	35 (31,0%)		
	G/G	15 (8,4%)	9 (8,0%)		
Alelos	S	279 (78,37%)	173 (76,54%)		
	G	77 (21,63%)	53 (23,46%)		
ECA	I/I	19 (10,7%)	24 (21,2%)	$\chi^2 = 7,549$	0,023*
	I/D	86 (48,3%)	41 (36,3%)		
	D/D	73 (41,0%)	48 (42,5%)		
Alelos	I	124 (34,83%)	89 (39,38%)		
	D	232 (65,17%)	137 (60,61%)		
M235T	M/M	39 (21,9%)	10 (8,8%)	$\chi^2 = 10,737$	0,005*
	M/T	136 (76,4%)	103 (91,2%)		
	T/T	3 (1,7%)	0 (0,0%)		
Alelos	M	214 (60,11%)	123 (54,43%)		
	T	142 (39,89%)	103 (45,57%)		

Fonte: A autora, 2015.

Nota: *Significante para $\alpha=0,05$. Legenda: GN: normotensos; GH+GR: hipertensos acumulados.

Quanto às frequências alélicas entre os grupos isolados (Tabela 10), a frequência global para a amostra foi cerca de 39,10% para o alelo I e 60,90% para o alelo D do polimorfismo I/D da ECA. As maiores frequências do alelo I foram encontradas entre hipertensos controlados e resistentes, com destaque para os 45,83% dos resistentes; as frequências do alelo D em torno de 63% mostraram-se próximas entre todos os grupos, com exceção dos 54,16% no grupo dos resistentes. Para o polimorfismo M235T, frequência global para a amostra foi cerca de 55,63% para o alelo M e 44,37% para o alelo T. O alelo M foi mais frequente entre normotensos (60,11%) do que nos demais (55,20% nos hipertensos-controlados e 52,77% nos resistentes), enquanto que o alelo T foi encontrado em maior frequência entre hipertensos, com destaque para os resistentes (47,22%). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas do polimorfismo Arg389Gly, com frequência global para a amostra em torno de 48,10% para o alelo A e 51,90% para o alelo G, e do polimorfismo Ser49Gly, com frequência global para a amostra em torno de 77,16% para o alelo S e de 22,38% para o alelo G.

Já na comparação entre os normotensos e os hipertensos acumulados (Tabela 11), as frequências alélicas globais se mostraram similares as encontradas anteriormente para todos os polimorfismos avaliados: alelo A com 47,78% e alelo G com 52,21% do Arg389Gly; alelo S com 76,54% e alelo G com 23,46% do Ser49Gly; alelo I com 39,38% e alelo D com 60,61% do ECA e alelo M com 54,43% e alelo T com 45,57% do M235T.

Perfil ancestral da amostra estudada e sua associação com o padrão de distribuição dos polimorfismos genéticos

Visando avaliar se o padrão de distribuição dos polimorfismos genéticos das amostras estudadas era influenciado pelo padrão ancestral, os indivíduos de cada grupo clínico amostral (normotensos, hipertenso-controlados e hipertenso-resistentes) foram estratificados nos grupos africano, europeu e mestiços, a partir dos resultados individuais de ancestralidade genética obtidos pela análise no *software* Structure (**ANEXO D**). Essa estratificação foi arranjada seguindo o valor mencionado no item 5, onde os grupos africano e europeu eram, portanto, constituídos por indivíduos que apresentaram em sua ancestralidade genética valores acima de 70% da contribuição africana e europeia, respectivamente. Indivíduos que não apresentaram

qualquer contribuição ancestral acima do ponto de corte definido foram incluídos em um grupo denominado “mestiço”.

Os resultados das frequências alélicas e genótípicas segundo os grupos ancestrais (Tabela 8) para todos os polimorfismos avaliados não mostraram diferenças significativas quanto a sua distribuição. O alelo I ocorreu com mais frequência no grupo de africanos (42,10%) e com menos no de europeus (32,50%), enquanto o alelo D foi mais frequente entre europeus (67,50%) e menos frequente entre africanos (57,89%). Já no polimorfismo M235T, o alelo M foi mais frequente no grupo de europeus (61,0%) e menos frequente entre africanos (52,63%), enquanto o alelo T foi mais frequente entre africanos (47,37%) e menos entre europeus (39,0%). Para o polimorfismo Arg389Gly, o alelo A mais frequente entre africanos (52,63%) e menos frequente entre europeus (47%) e para o polimorfismo Ser49Gly, o alelo S foi mais frequente entre europeus (83%) e menos frequente entre africanos (71,05%) e o alelo G mais frequente entre africanos (28,95%) e menos frequente entre europeus (16,5%). Nas comparações entre grupos ancestrais, mestiços apresentaram frequências genótípicas e alélicas intermediárias para todos os polimorfismos avaliados.

Tabela 8 – Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos genéticos segundo os grupos ancestrais

Variável	Genótipo	AFR	EUR	MEST	Teste Estatístico	Valor de p
Arg389Gly	A/A	7 (36,8%)	17 (17,0%)	41 (23,8%)	$\chi^2 = 6,829$	0,145
	A/G	6 (31,6%)	60 (60,0%)	85 (49,4%)		
	G/G	6 (31,6%)	23 (23,0%)	46 (26,7%)		
Alelos	A	20 (52,63%)	94 (47,0%)	167 (48,54%)		
	G	18 (47,36%)	106 (53,0%)	177 (51,45%)		
Ser49Gly	S/S	10 (52,6%)	71 (71,0%)	104 (60,5%)	$\chi^2 = 5,733$	0,220
	S/G	7 (36,8%)	25 (25,0%)	50 (29,1%)		
	G/G	2 (10,5%)	4 (4,0%)	18 (10,5%)		
Alelos	S	27 (71,05%)	167 (83,5%)	258 (75%)		
	G	11 (28,95%)	33 (16,5%)	86 (25%)		
ECA	I/I	5 (26,3%)	11 (11,0%)	27 (15,7%)	$\chi^2 = 4,290$	0,368
	I/D	6 (31,6%)	43 (43,0%)	78 (45,3%)		
	D/D	8 (42,1%)	46 (46,0%)	67 (39,0%)		
Alelos	I	16 (42,10%)	65 (32,5%)	132 (38,37%)		
	D	22 (57,89%)	135 (67,5%)	212 (61,63%)		
M235T	M/M	1 (5,3%)	23 (23,0%)	25 (14,5%)	$\chi^2 = 5,458$	0,243
	M/T	18 (94,7%)	76 (76,0%)	145 (84,3%)		
	T/T	0 (0,0%)	1 (1,0%)	2 (1,2%)		
Alelos	M	20 (52,63%)	122 (61,0%)	195 (56,7%)		
	T	18 (47,37%)	78 (39,0%)	149 (43,3%)		

Fonte: a autora, 2015.

Legenda: AFR: africanos; EUR: europeus; MEST: mestiços.

Diversidade Genética dos polimorfismos estudados

Observando os resultados gerados pelo *software* Arlequin primeiramente relacionados aos polimorfismos, o grupo de normotensos apresentou índice de diversidade molecular de 0,44348 (44,34%), associações significativas foram observadas para todos os *loci* avaliados ($p < 5.E-06$) no teste de desequilíbrio de ligação entre pares (*Pairwise Linkage Disequilibrium* – PLD) e *locus* M235T mostrou-se em significativo desequilíbrio no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p < 5.E-06$), em decorrência da heterozigosidade observada de 0,76404 frente à heterozigosidade esperada de 0,48090 (Tabela 9). O grupo de hipertenso-controlados apresentou 0,45825 (45,82%) de diversidade molecular, associações significativas no PLD foram observados para todos os pares de *loci* avaliados ($p < 5.E-06$), exceto para o par de *loci* (Ser49Gly, *I/D* ECA), e somente *locus* M235T apresentou significativo desequilíbrio de ligação devido à heterozigosidade observada de 0,89610 que contrasta com a heterozigosidade esperada de 0,49784 (Tabela 10). No grupo de hipertenso-resistentes, o índice de diversidade foi de 0,47036 (47,03%), o par de *loci* (Arg389Gly, M235T) foi o único que apresentou significativa associação no PLD apenas o *locus* M235T apresentou significativo desequilíbrio de ligação devido à heterozigosidade observada de 0,9444 que contrasta com a heterozigosidade esperada de 0,50548 (Tabela 11). Os resultados para o grupo de hipertensos acumulados (GH+GR) indicaram um índice de diversidade de 0,46110 (46,11%), também foram significativos os valores de associação observados no PLD para todos os pares de *loci* avaliados, exceto para o par de *loci* (Ser49Gly, *I/D* ECA), significativo desequilíbrio de ligação foi observado para os *loci* *I/D* ECA ($p = 0,01139$) e M235T ($p < 5.E-06$), cujos valores de heterozigosidade observada para cada *loci* foram de 0,36283 e de 0,91150 enquanto a heterozigosidade esperada era de 0,47957 e de 0,49829, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 9 - Resultados dos testes de Diversidade Genética; quatro polimorfismos genéticos; grupo GN (n=178)

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): $0,44348 \pm 0,28477$

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
<i>Arg389Gly</i>	356	2	0,50000	0,50101
<i>Ser49Gly</i>	356	2	0,25843	0,33676
<i>I/D ECA</i>	356	2	0,48315	0,45526
<i>M235T</i>	356	2	0,76404	0,48090
<i>Média</i>	356,000	2,000	0,50140	0,44348
<i>d.p.</i>	0,000	0,000	0,20684	0,07357

Pairwise Linkage Disequilibrium (PLD)

<i>Pares de Loci</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Par (Arg389Gly, Ser49Gly)</i>	$p=0,00148^*$	0,00035
<i>Par (Arg389Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Arg389Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (I/D ECA, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

<i>Locus#</i>	<i>Genótipo (n)</i>	<i>Heteroz. Obs.</i>	<i>Heteroz. Esp.</i>	<i>Valor de p ± d.p.</i>
<i>Arg389Gly</i>	178	0,50000	0,50101	$1,00000 \pm 0,00000$
<i>Ser49Gly</i>	178	0,25843	0,33676	$0,00324 \pm 0,00006$
<i>I/D ECA</i>	178	0,48315	0,45526	$0,51263 \pm 0,00052$
<i>M235T</i>	178	0,76404	0,48090	$0,00000^{**} \pm 0,00000$

Nota: *Significativo para $\alpha < 0,05/6$ (corrigido por Bonferroni; 6 testes de *pairwise* executados/grupo); ** $p < 5.E-06$

Tabela 10 - Resultados dos testes de Diversidade Genética; quatro polimorfismos genéticos; grupo GH (n=77)

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): $0,45825 \pm 0,29311$

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
<i>Arg389Gly</i>	154	2	0,55844	0,50101
<i>Ser49Gly</i>	154	2	0,32468	0,36746
<i>I/D ECA</i>	154	2	0,38961	0,46583
<i>M235T</i>	154	2	0,89610	0,49784
<i>Média</i>	154,000	2,000	0,54221	0,45826
<i>d.p.</i>	0,000	0,000	0,25568	0,06265

Pairwise Linkage Disequilibrium (PLD)

<i>Pares de Loci</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Par (Arg389Gly, Ser49Gly)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Arg389Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,05198$	0,00160
<i>Par (Arg389Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (I/D ECA, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

<i>Locus#</i>	<i>Genótipo (n)</i>	<i>Heteroz.Obs.</i>	<i>Heteroz.Esp.</i>	<i>Valor de p ± d.p</i>
<i>Arg389Gly</i>	77	0,55844	0,50191	$0,36506 \pm 0,00046$
<i>Ser49Gly</i>	77	0,32468	0,36746	$0,35043 \pm 0,00047$
<i>I/D ECA</i>	77	0,38961	0,46583	$0,21432 \pm 0,00042$
<i>M235T</i>	77	0,89610	0,49784	$0,00000^{**} \pm 0,00000$

Nota: $^{**}p < 5.E-06$

Tabela 11 - Resultados dos testes de Diversidade Genética; quatro polimorfismos genéticos; grupo GR (n=36)

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): 0,47036 ±0,30124

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
<i>Arg389Gly</i>	72	2	0,52778	0,50665
<i>Ser49Gly</i>	72	2	0,30556	0,36581
<i>I/D ECA</i>	72	2	0,30556	0,50352
<i>M235T</i>	72	2	0,94444	0,50548
<i>Média</i>	72,000	2,000	0,52083	0,47036
<i>d.p.</i>	0,000	0,000	0,30121	0,06972

Pairwise Linkage Disequilibrium (PLD)

<i>Pares de Loci</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Par (Arg389Gly, Ser49Gly)</i>	<i>p=0,00990</i>	0,00086
<i>Par (Arg389Gly, I/D ECA)</i>	<i>p=0,64485</i>	0,00388
<i>Par (Ser49Gly, I/D ECA)</i>	<i>p=0,40425</i>	0,00520
<i>Par (Arg389Gly, M235T)</i>	<i>p=0,00000**</i>	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, M235T)</i>	<i>p=0,01039</i>	0,00101
<i>Par (I/D ECA, M235T)</i>	<i>p=0,00861</i>	0,00085

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

<i>Locus#</i>	<i>Genótipo (n)</i>	<i>Heteroz. Obs.</i>	<i>Heteroz. Esp.</i>	<i>Valor de p± d.p.</i>
<i>Arg389Gly</i>	36	0,52778	0,50665	1,00000±0,00000
<i>Ser49Gly</i>	36	0,30556	0,36581	0,36567 ±0,00047
<i>I/D ECA</i>	36	0,30556	0,50352	0,02208 ± 0,00014
<i>M235T</i>	36	0,94444	0,50548	0,00000**±0,00000

Nota: ***p*<5.E-06

Tabela 12 - Resultados dos testes de Diversidade Genética; quatro polimorfismos genéticos; grupo GH+GR (n=113)

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): $0,46110 \pm 0,29393$

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
<i>Arg389Gly</i>	226	2	0,54867	0,50124
<i>Ser49Gly</i>	226	2	0,31858	0,36531
<i>I/D ECA</i>	226	2	0,36283	0,47957
<i>M235T</i>	226	2	0,91150	0,49829
<i>Média</i>	226,000	2,000	0,53540	0,46110
<i>d.p.</i>	0,000	0,000	0,26983	0,06458

Pairwise Linkage Disequilibrium (PLD)

<i>Pares de Loci</i>	<i>Valor de p</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Par (Arg389Gly, Ser49Gly)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Arg389Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, I/D ECA)</i>	$p=0,02831$	0,00116
<i>Par (Arg389Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (Ser49Gly, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000
<i>Par (I/D ECA, M235T)</i>	$p=0,00000^{**}$	0,00000

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

<i>Locus#</i>	<i>Genótipo (n)</i>	<i>Heteroz. Obs.</i>	<i>Heteroz. Esp.</i>	<i>Valor de p ± d.p.</i>
<i>Arg389Gly</i>	113	0,54867	0,50124	$0,35113 \pm 0,00047$
<i>Ser49Gly</i>	113	0,31858	0,36531	$0,19635 \pm 0,00042$
<i>I/D ECA</i>	113	0,36283	0,47957	$0,01139^* \pm 0,00010$
<i>M235T</i>	113	0,91150	0,49829	$0,00000^{**} \pm 0,00000$

Nota: *Significativo para $\alpha < 0,05/4$ (corrigido por Bonferroni; 4locus testados/grupo); ** $p < 5.E-06$

Já os resultados referentes aos 46 marcadores informativos de ancestralidade estão detalhados nas tabelas suplementares 1,2,3,e 4 (ANEXO E).

Esses testes mostraram que todos os grupos clínicos testados apresentaram média de diversidade genética superior às populações ancestrais referenciadas [africana: 0,2897 (28,97%); europeia: 0,3249(32,49%); ameríndia: 0,2629 (26,29%)], com índice de diversidade molecular em torno de 0,38858(38,85%) no grupo de normotensos, 0,40378 (40,37%) no grupo de hipertenso-controlados, 0,40160 (40,16%)no grupo de hipertenso-resistentese 0,40372 (40,37%)no grupo de hipertensos acumulados. No teste de EHW, somente *locus* MID-2264 no grupo hipertenso-controladosapresentou-se em significativo de equilíbrio para o nível de significância corrigido por Bonferroni ($p= 0,00005$; $\alpha=0,001$). No mesmo teste, nenhum outro *locus* em nenhum outro grupo apresentou resultado significativo.

No teste de equilíbrio de ligação entre pares, em todos os grupos clínicos considerados foram observadas associações significativas entre 11 pares de *loci*, mesmo para o nível de significância corrigido ($\alpha=0,00008$). (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados significativos do teste *Pairwise Linkage Disequilibrium*; 46 AIMs-Indels, todos os grupos

<i>Pairwise Linkage Disequilibrium (PLD)*</i>		
Pares de Loci	Valor de <i>p</i>	Erro padrão
MID3122 - MID3072	0,00000	0,00000
MID2011 - MID3072	0,00003	0,00000
MID2538 - MID3072	0,00001	0,00000
MID3854 - MID3072	0,00002	0,00000
MID94 - MID2256	0,00000	0,00000
MID3854 - MID2241	0,00000	0,00000
MID2011 - MID419	0,00000	0,00000
MID881 - MID943	0,00000	0,00000
MID1644 - MID1802	0,00004	0,00000
MID2005 - MID1802	0,00002	0,00000
MID1644 - MID1726	0,00001	0,00000

Nota: Nível de significância corrigido por Bonferroni ($\alpha<0.05/1035$; 1035 testes de *pairwise* executados/grupo).

4 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma desordem fisiológica multifatorial diretamente vinculada ao grupo das chamadas doenças cardiovasculares (DCV), que continuamente lideraram o *ranking* mundial e nacional das 10 principais causas de morte prematura e invalidez (*World Health Organization*, 2013). No Brasil, ela se caracteriza por uma alta prevalência e baixas taxas de controle, visto que o sistema público de saúde muitas vezes não fornece um suporte adequado de tratamento e diagnóstico para a população, principalmente em localidades distantes dos centros urbanos favorecendo a subnotificação de casos. Dados nacionais recentes (Ministério da Saúde, 2014) mostram que cerca de 24,1% dos brasileiros adultos foram diagnosticados com hipertensão, sendo a maioria mulheres (26,3%) e o estado do Rio de Janeiro com a maior prevalência (28,7%). Com isso, fica evidente a necessidade de se aprofundar o conhecimento de seus fatores de risco e suas causas, visando ampliar as medidas de prevenção e a identificação de um perfil de alto risco cardiovascular, a fim de prevenir o primeiro evento cardiovascular, pois ele pode ser fatal, incapacitante e representa alto custo com cuidados médicos (Pearson et al., 2002). Suas condições de risco integram fatores de risco ambientais/comportamentais quanto genéticos, o qual é interessante em indivíduos afetados com idade inferior a 40 anos (*World Health Organization*, 2013) ou que não apresentam nenhum dos fatores de risco primários (Rivera e col., 2004; Pearson et al., 2002; Smith et al., 2004). Baseados nisso, estudos de associação têm visado a composição genética de individual, onde se examina um gene suspeito como possível fator causal que se acredita estar em maior frequência entre pacientes afetados (Tian et al., 2008), caracterizando assim um perfil de risco associado. Para a HAS, algumas variantes genéticas que são comumente investigadas são as do sistema renina-angiotensina, como o polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e o M235T do gene do angiotensinogênio, e os do receptor β 1-adrenérgico, como o Ser49Gly e o Arg389Gly, todos relacionados a vias de controle de pressão arterial (Schunkert et al., 1994; Doevendans et al., 2001; Small et al., 2002) e da atividade cardíaca (Ranade et al., 2002).

O fato de a etnia influenciar no prognóstico e na resposta terapêutica de doenças cardiovasculares tem sido reconhecido (Dries et al., 2002; Mathew et al., 2005; Rathore et al., 2003), entretanto, em populações geneticamente homogêneas, cujo background genético é diferente do de populações altamente miscigenadas como a brasileira. Esta peculiaridade pode se tornar uma dificuldade adicional em estudos nacionais, pois associações errôneas entre um

alelo e determinada doença (associações espúrias) podem ocorrer caso grupos populacionais naturalmente predispostos estejam super-representados na amostra (estratificação populacional) (Tian et al., 2008). A partir disso, este trabalho procurou avaliar a variação de polimorfismos genéticos do metabolismo circulatório e a associação desta variação com a ancestralidade genética em uma amostra de indivíduos miscigenados saudáveis e hipertensos da população do estado do Rio de Janeiro.

A construção dos grupos amostrais nesse trabalho procurou investigar não somente a estrutura genética de indivíduos hipertensos como também daqueles que apresentavam a hipertensão arterial resistente, uma variação clínica caracterizada pela manutenção dos níveis de pressão elevados mesmo em tratamento com o uso de pelo menos três fármacos, um dos quais é um diurético e todos em dosagem ótima (Lotufo et al., 2015), e que tem mostrado uma prevalência relativamente alta, segundo a *American Heart Society*. Com isso, foram desenhados três grupos clínicos amostrais: indivíduos normotensos (GN), hipertenso-controlados (GH) e hipertenso-resistentes (GR), cuja proporção entre hipertenso-controlados e resistentes mostrou-se em acordo com o considerado para essa variante (Lotufo et al., 2015), ainda que a real prevalência da hipertensão resistente seja de difícil detecção. Além disso, o local de origem das amostras coletadas (hospital universitário) pode representar uma certa variabilidade na qualidade das mesmas visto que é frequentado por pessoas de diversas localidades geográficas e condições socioeconômicas, o que pode indicar que tal moléstia atinge indivíduos independentemente de tais características demográficas.

Ponderando sobre os parâmetros utilizados na metodologia de genotipagem para ancestralidade genética, ressaltamos que os marcadores escolhidos levaram em consideração a informação *a priori* da dinâmica do processo de miscigenação tri-híbrido que formou a maioria das populações brasileiras, envolvendo três populações étnicas geograficamente diferentes (Africana, Europeia e Ameríndia) e que foi comprovado pelo resultado de que o modelo de mistura $K=3$ foi o que melhor retratou o background genético das amostras, assim como utilizado por outros trabalhos brasileiros (Santos et al., 2010, Pereira et al. 2012; de Neves Manta et al., 2013; Manta et al., 2013). Além disso, a quantidade selecionada (46) e o seu tipo (Indels) já se mostraram capazes de identificar e distinguir populações étnicas parentais diferentes (Bastos-Rodrigues et al., 2006; Kosoy et al., 2009; Santos et al., 2010, Pereira et al., 2012) por apresentar características como baixa taxa de heterozigidade intrapopulacional e frequências alélicas marcadamente diferentes entre os grupos representativos, sem a criação de um viés por contribuições inadequadas (Parra et al., 1998), além do baixo custo, rapidez e simplicidade em sua reprodutibilidade em comparação ao uso

de SNPs (Pereira et al., 2012). Além disso, esses marcadores revelaram um alto poder de inferência individual ao captarem contribuições ancestrais com valores inferiores a 5%, permitindo a identificação de indivíduos discrepantes. A escolha do *software* Structure v.2.3.4 para o cálculo das estimativas de ancestralidade mostrou-se adequada pela simplicidade de manipulação, resultados precisos, satisfatórios e similares aos de outros programas que utilizam o mesmo algoritmo para inferir a estrutura populacional como testado por Santos e colaboradores (2010).

Com relação ao perfil epidemiológico das nossas amostras, a variável idade que se mostrou significativamente diferente entre os grupos clínicos ($p < 0,05$), mostrou que a média de idade de hipertensos-controlados (54 anos) e resistentes (58 anos) foram superiores a de normotensos (40 anos), como visto em Freitas e colaboradores (2007a) e em Mondry e colaboradores (2005), confirmando uma conexão entre essa patologia e o envelhecimento (*World Health Organization*, 2013), apesar da média de idade encontrada ser inferior a de 65 anos responsável por uma prevalência de HAS superior a 60% segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010). Quanto à variável gênero, embora ela não tenha mostrado significativamente diferente entre os grupos clínicos ($\chi^2 = 0,074$; $p = 0,963$), em todos estavam numericamente mais presentes indivíduos do sexo feminino, o que pode refletir o comum hábito de que mulheres tendem a cuidar mais da saúde do que os homens. No entanto, estudos brasileiros desde a década de 70 apontam uma prevalência maior entre homens (Lessa, 2001), com uma inversão na proporção gênero/idade a partir dos 50 anos (Cesarino e colaboradores, 2008).

O perfil ancestral da amostra avaliada indicando uma predominância global de alelos de origem europeia (48-60%), frente aos alelos de origem africana (25-39%) e ameríndia (12-14%), exposta no *triangle plot* (Figura 8A), mostram-se em acordo com o observado através de análises moleculares para a população do Rio de Janeiro (Pena et al., 2011; Manta et al., 2013) ou para a maioria das populações brasileiras (de Neves Manta et al., 2013). Esse resultado reflete a marcante permanência ao longo dos séculos do componente ancestral europeu na constituição genética de nossa população em tempos atuais. A forte presença do imigrante europeu homem frente ao escravo africano e ao homem indígena durante os eventos populacionais históricos em nosso território – imigrações europeias, tráfico de escravos e dizimação de tribos indígenas.

Apesar desse painel global da predominância de alelos europeus e africanos, convém mencionar que 13 indivíduos estudados apresentaram substanciais contribuições de alelos ameríndios, variando entre 40 e 69%. Tais indivíduos podem ser representantes de localidades geográficas ou grupos populacionais muito particulares onde devido a fatores culturais, que proporcionaram um baixo grau de miscigenação e uma forte preservação de uma ascendência específica, haverá proporções de mistura diferenciadas, tal como na comunidade de Santa Isabel e da tribo Terena (de Neves Manta et al., 2013), comunidade de afrodescendentes na região da Amazônia (Santos et al., 2010).

Apesar das maiores médias globais de alelos africanos terem sido encontradas entre hipertensos controlados e resistentes (34% e 39%, respectivamente), quando agrupamos e analisamos esses hipertensos em um único *pool* genético (GH+GR) a porcentagem contributiva destes alelos não apresenta efeito cumulativo, com sua média global em torno de 35% próxima às médias globais quando os grupos foram analisados separadamente (Tabela 2). Em paralelo, foi notado um aumento muito sutil da presença de alelos ameríndios para 14,2% e sustentação do comparecimento médio de alelos europeus em torno de 50%.

As estimativas individuais de ancestralidade ao revelarem que 12 dos 19 indivíduos com ancestralidade africana apresentavam hipertensão em comparação aos portadores de ancestralidade europeia ou mestiços (63%; $\chi^2=11,899$; $p=0,003$) parecem coerentes com uma prevalência maior da HAS observada entre indivíduos negros ou afrodescendentes (Bloem et al., 1995), região geográfica portadora da maior taxa de incidência (*World Health Organization*, 2013). Importante mencionar que essas considerações são mais apropriadas para populações com estrutura genética bem definida, onde a auto declaração tem uma correlação real com sua origem étnica (Kosoy et al., 2009). Para estudos com a população brasileira, fazer uso de tais considerações deve ser evitado, pois apresentamos uma ampla gradação na pigmentação da pele, que muitas vezes não corresponde a real estrutura genética em termos de composição étnica (Parra et al., 2003; Leite et al., 2011; Cardena et al., 2013), e pelo fato de que também são considerados variáveis sem valor no contexto molecular, como os socioeconômicos e culturais (Lins et al., 2011). Apesar dessas observações conceituais, como a presença da genética africana se fez significativa em indivíduos hipertensos em nossa amostra, ainda assim faz-se necessário um número maior de amostras de indivíduos hipertensos, tanto controlados quanto resistentes, para a realização de análises comparativas para que essa associação seja reforçada.

Nas análises comparativas entre os grupos amostrais com base na distribuição dos polimorfismos genéticos, a maior prevalência do genótipo homozigoto II do polimorfismo da ECA encontrada em hipertensos do que em normotensos (21% contra 10% na análise para hipertensos acumulados; $\chi^2=7,549$ $p=0,023$), chegando a 30% em hipertenso-resistentes, pode sugerir um motivo pelo qual alguns indivíduos, principalmente negros, não respondem adequadamente a tratamentos anti-hipertensivos com inibidores de ECA, pois o alelo I configura uma menor produção de enzima conversora de angiotensina I que estará menos susceptível a uma resposta farmacológica. Essa menor resposta aos inibidores de ECA por indivíduos negros pode ser estendida para outras doenças cardiovasculares, onde tratamentos para insuficiência cardíaca com esse medicamento observou-se que pacientes negros em comparação a brancos não apresentaram diminuição nos níveis de pressão arterial (Exner et al., 2001), piores prognósticos e manutenção de riscos aumentados de desenvolvê-la (Dries et al., 2002; Rathore et al., 2003). Por consequência, as maiores frequências do alelo I foram observadas entre hipertensos, com destaque para os 45% entre os resistentes na análise isolada. Observando especialmente as frequências em hipertenso-resistentes para este polimorfismo, elas se mostram parecidas com as relatadas por Freitas e colaboradores (2007b) num estudo brasileiro que este grupo apresentou a maior frequência do genótipo II (14,3%) e do alelo I (39,5%) em comparação aos normotensos.

Por outro lado, os genótipos ID e DD, cujo alelo D está associado com níveis plasmáticos fisiologicamente altos dessa enzima conversora (Rigat et al., 1990), que não se mostraram significativamente diferentes entre hipertensos e normotensos mostraram-se em acordo com as proporções genótípicas encontradas na maioria das regiões geográficas brasileiras numa amostragem aleatória obtida de um banco de sangue (Inacio et al., 2006). No entanto, neste mesmo trabalho não estejam descritas as condições clínicas destes indivíduos (principalmente status de hipertensão). Este genótipo DD também esteve mais fortemente associado do que os genótipos ID e II em homens normotensos portadores de hipertrofia ventricular esquerda, onde níveis de pressão arterial não exerceram influência no risco dessa doença (Schunkert et al., 1994). Ainda assim, alguns trabalhos não relataram uma associação do alelo D ou genótipo DD com níveis de pressão arterial em indivíduos normotensos (Berge e Berg, 1994), hipertensão (Mondry et al., 2005) ou até com infarto do miocárdio em norteamericanos (Lindpaintner et al., 1995).

Mesmo que os resultados para os genótipos do polimorfismo da ECA pareçam incoerentes é importante lembrar que sua importância como marcador molecular não deve ser avaliada isolada, pois o sistema renina-angiotensina ao qual ela pertence depende também da

integração de outros elementos morfofisiológicos (enzimas, hormônios, estrutura celular e tecidual) não avaliados neste trabalho e que talvez sejam mais influentes no favorecimento da condição hipertensiva. Um exemplo disso são as diferenças fisiológicas entre indivíduos brancos e negros, em que estes por apresentarem maior retenção de sódio, baixa atividade de renina e menor liberação de aldosterona mostram-se mais susceptíveis a desenvolverem a hipertensão (Sagnella, 2001), justificando o porquê da resposta terapêutica e prognóstico diferenciados para alguns medicamentos.

Quanto às diferenças significativas observadas na distribuição dos genótipos do polimorfismo M235T, onde o genótipo MM foi o mais frequente entre normotensos que hipertensos (21% contra 8%, $\chi^2=10,737$ $p=0,005$), assim como o alelo M (60% contra 54%) parecem estar em acordo com relatos de que este genótipo/alelo são mais frequentes entre não-hipertensos do que o genótipo TT e o alelo T, associados a níveis plasmáticos elevados de angiotensinogênio (Sagnella, 2001) e também mais frequentes entre indivíduos negros (Bloem et al., 1995; Barbaro et al., 2014). Como tal, em nossa amostra o alelo T mostrou-se mais presente entre hipertensos do que normotensos (45% contra 39%), como encontrado também por Jeunemaitre e colaboradores (1992). Porém, essa presença do alelo T em maior frequência entre hipertensos não obteve significância estatística, pois ela se deu pela grande frequência de indivíduos heterozigotos e não homozigotos TT, o que enfraquece uma tentativa de associação isolada. Além disso, essa maior frequência de alelos T observada pode estar relacionada a presença de indivíduos com ancestralidade africana e não a condição clínica, onde indivíduos negros o apresentam em maior frequência do que brancos mesmo sendo normotensos (Bloem et al., 1995). Alguns estudos caso-controle não reportaram uma associação isolada desse marcador com a hipertensão (Fornage et al., 1995; Hingorani et al., 1996) e uma meta-análise envolvendo populações europeias encontrou uma maior frequência de homozigotos T/T em normotensos do que hipertensos e um menor risco associado para hipertensão comparada ao genótipo MM (Mondry et al., 2005), embora mencionem que tal descoberta possa ser um traço característico da população específica estudada. No geral, as suposições com respeito a esse polimorfismo não puderam ser extrapoladas devido a altíssima frequência de heterozigose de somente 3 indivíduos homozigotos TT, que acabaram criando um certo desequilíbrio nas análises estatísticas.

Alterações não significativas na distribuição genotípica dos polimorfismos Ser49Gly ($\chi^2=0,980$; $p=0,913$) e Arg389Gly ($\chi^2=0,840$; $p=0,933$), onde os genótipos mais frequentes foram o homozigoto S/S (59-65%) e o heterozigoto S/G (26-32%) para o Ser49Gly e o heterozigoto A/G (50-56%) e o homozigoto G/G (25-26%) para o Arg389Gly tanto entre

normotensos quanto entre hipertensos, parecem não indicarem nossa amostra uma ligação destes marcadores com a condição hipertensiva. Bengtsson e colaboradores (2001) também não encontraram associação do polimorfismo Ser49Gly com hipertensão, mas encontraram para homozigotos A/A do Arg389Gly, associado a um risco quase duas vezes maior de desenvolver essa doença. Considerável parte dos estudos que envolvem estes marcadores também investiga sua relação com outras doenças cardiovasculares, que não a hipertensão, ou esta representa uma das covariáveis consideradas. Por exemplo, na insuficiência cardíaca Ranade e colaboradores (2002) encontraram não só uma associação significativa ($p=0,0004$) entre o polimorfismo Ser49Gly e a frequência cardíaca, independentemente de outras variáveis como a etnia autodeclarada, como uma relação direta do genótipo com os valores de frequência cardíaca medidos, em que heterozigotos S/G possuíam valores intermediários aos valores elevados e baixos de homozigotos S/S e G/G, respectivamente. Iwai e colaboradores (2002) não verificaram diferença significativa na distribuição dos genótipos de Arg389Gly entre indivíduos saudáveis e pacientes com cardiomiopatia dilatada, além da falta de associação de qualquer um dos genótipos com diversas características clínicas, como níveis de pressão arterial. Já alguns estudos verificam uma ação conjunta entre estes marcadores do receptor β_1 e de outros receptores do sistema β -adrenérgico, como a ação combinada de homozigoto Arg389 e $\alpha_2cDel322-325$ em aumentar o risco de insuficiência cardíaca (Small et al., 2002). Como essa categoria de marcadores está relacionada de forma mais direta com o desempenho das funções cardíacas do que com os mecanismos de controle dos níveis de pressão arterial, esse fato pode justificar porque na amostra avaliada não foi verificada através de análise univariada uma associação significativa entre a condição hipertensiva e esses marcadores.

Quando avaliamos o perfil ancestral da amostra estudada e sua associação com o padrão de distribuição dos polimorfismos genéticos associados à HAS, nota-se que não ocorrem alterações significativas na forma como eles se distribuem entre indivíduos africanos, europeus e mestiços da amostra estudada (Arg389Gly $\chi^2=6,829$, $p=0,145$; Ser49Gly $\chi^2=5,733$, $p=0,220$; I/D ECA $\chi^2=4,290$, $p=0,368$; M235T $\chi^2=5,458$, $p=0,243$), independente de sua condição clínica, ressaltando que pelo arranjo ancestralidade encontram-se misturados normotensos, hipertenso-controlados e hipertenso-resistentes. Até mesmo entre os indivíduos africanos, onde a HAS se mostrou mais prevalente, não se verificaram diferenças significativas nas proporções de distribuição dos genótipos destes marcadores. Com isso, pode-se inferir que em nossa amostra miscigenada de indivíduos normotensos quanto hipertensos, a estrutura genética ancestral dos mesmos não está influenciando sobre como

estes marcadores moleculares estão distribuídos, sendo apropriado considerar que não há efeito de estruturação populacional para estes marcadores.

Quanto à diversidade genética entre os grupos, seus testes baseiam-se em comparações das frequências de heterozigosidade esperadas e observadas segundo o princípio da segregação independente dos alelos, em que, numa dada população, as frequências alélicas e genotípicas permanecem na mesma proporção através das gerações. Todos os grupos clínicos apresentaram índice de diversidade com valores próximos entre si, seja para os polimorfismos genéticos (variação em torno de 45%) seja para os AIMS (variação em torno de 40%), indicam que quase metade dos indivíduos dentro de cada grupo possuía diferentes padrões de distribuição destes marcadores, sugerindo ser este o percentual médio de diversidade de nossa amostra miscigenada, independente da condição clínica apresentada. Ainda que mais diversosem relação à distribuição dos polimorfismos genéticos, o grupo dos hipertenso-resistentes equipararam-se ao dos hipertenso-controlados quando observada sua diversidade para os marcadores de ancestralidade genética (40,16% e 40,37%, respectivamente), sugerindo que ambos os grupos não se apresentam muito diferentes na sua constituição genética ancestral.

Essa alta diversidade genética provavelmente refletiu nos testes de desequilíbrio de ligação em pares (*Pairwise Linkage Disequilibrium* – PLD) para os polimorfismos genéticos em nossa amostra, que mostrou uma particular diversidade nos aspectos de equilíbrio de ligação entre os pares de *loci*. Em quase todos os grupos amostrais, a exceção dos hipertenso-resistentes, associações significativas foram observadas para todos os seis pares de *loci* testados ($p < 5.E-06$), com exceção do par de *loci* (Ser49Gly, I/D ECA), que não foi significativo em hipertensos controlados e em hipertensos quando acumulados com nível de significância corrigido ($p = 0,05198$ e $p = 0,02831$; $\alpha = 0,008$). Já hipertenso-resistentes apresentaram comportamento contrário, apresentando significativo desequilíbrio de ligação somente no par de *loci* (Arg389Gly, M235T) com nível de significância corrigido ($p < 5.E-06$; $\alpha = 0,008$).

O polimorfismo M235T do angiotensinogênio foi o único que, em todos os grupos clínicos avaliados, estava em desequilíbrio no teste de Hardy-Weinberg ($p < 5.E-06$), com frequência de heterozigosidade observada em torno de 90% quase duas vezes maior que a esperada de cerca de 45%, a exceção dos normotensos que alcançou 76%. Já o polimorfismo I/D da ECA apresentou-se em desequilíbrio significativo somente para o grupo de hipertensos acumulados ($p = 0,0113$) e com valor limitante ao nível de significância corrigido ($\alpha = 0,0125$). Esse *status* de desequilíbrio para o M235T também foi relatado por Mondry e colaboradores

(2005) em uma particular população caucasiana e justificado pela alta frequência de indivíduos heterozigotos normotensos e hipertensos, assim como ocorrido em nossa amostra. Logo, uma tentativa de se verificar em nossa amostra uma associação significativa entre esse marcador e a hipertensão não pode ser bem definida. Caulfield e colaboradores (1995) em estudos com afro-caribenhos normotensos e hipertensos ao relatar uma associação do marcador de repetição GT (e não do marcador M235T) com a hipertensão demonstra a importância que outros marcadores no gene do angiotensinogênio podem apresentar na susceptibilidade dessa doença. Por outro lado, este desequilíbrio apresentado pelo polimorfismo M235T pode estar associado à atuação de outras variantes alélicas neste gene, como o T174M (Jeunemaitre et al., 1992) ou a um SNP na região do promotor do gene *AGT* mencionado por Barbaro e colaboradores (2014), cujo efeito em conjunto pode configurar um haplótipo de risco. A partir dessa informação, seria interessante a investigação em conjunto das variáveis examinadas neste trabalho e em maior número de amostras para avaliação de seus efeitos.

Essa diversidade genética na amostra avaliada também se estendeu para os marcadores de ancestralidade, pois, diferentemente das populações ancestrais que não apresentam traços de associação entre esses marcadores (Pereira et al., 2012), foram observadas em todos os grupos clínicos consideradas associações significativas entre 11 pares de *loci* para nível de significância corrigido ($\alpha=0,00004$). Além disso, cinco pares (MID3122-MID3072, MID94-MID2256, MID3854-MID2241, MID881-MID943, MID1644-MID1726) representam combinações de marcadores localizados em posições muito próximas no mesmo cromossomo (1,5,6,18 e 22), fato que aumenta a probabilidade de serem herdados juntos, e não de forma aleatória, acusando um desequilíbrio de ligação. Associações significativas entre alguns marcadores de ancestralidade que foram previamente relatadas numa amostragem do Rio de Janeiro (Manta et al., 2013) indicam que nossa amostra está em acordo com o perfil de diversidade da localidade geográfica em que foi coletada.

Curiosamente, o único marcador de ancestralidade que estava em desequilíbrio no teste de Hardy-Weinberg foi o *MID-2264* no grupo de hipertenso-controlados ($p= 0,00005$, $\alpha=0,001$) com uma heterozigosidade observada de 46,75% inferior a esperada de 54,79%, o qual pode ser resultado da ocorrência significativa de sua outravariante alélica 2-T. Ela apresenta o nucleotídeo T deletado na sua sequência no alelo longo e parece ser específica de populações da Europa (Pereira et al., 2012). A única menção mais descritiva sobre este marcador encontrada foi numa dissertação de mestrado, que relata sua alta frequência em amostras de judeus e de sefardistas portugueses remanescentes em Portugal (termo que se refere à descendentes de judeus originários da Península Ibérica). A partir dessa informação, a

presença desta terceira forma alélica em nossa amostra pode indicar a presença de indivíduos descendentes deste grupo populacional em nosso território.

No geral, pode-se inferir que, além da alta diversidade genética observada, os diferentes pares de *loci* dos polimorfismos genéticos fortemente associados encontrados em nossa amostra possam ter surgido em decorrência de processos recentes de miscigenação ocorridos em nossa população moderna (em comparação às antigas como europeias), que podem estar forçando um desequilíbrio de ligação entre esses marcadores (Kosoy et al., 2009), assim como já exercem influência sobre os marcadores de ancestralidade (McKeigue et al., 2002).

CONCLUSÕES

- a) As estimativas das frequências alélicas e genotípicas das variantes informativas de ancestralidade do tipo inserção/deleção (AIMs-Indels), obtidas com sucesso em uma amostra de indivíduos miscigenados saudáveis e hipertensos, mostraram que globalmente os alelos europeus, em comparação aos africanos e os ameríndios, estabelecem-se como um forte componente na constituição da estrutura genética de nossa população;
- b) A maior frequência da hipertensão arterial sistêmica (HAS) em indivíduos com ancestralidade africana, em comparação aos com ancestralidade europeia e mestiços que em sua maioria eram saudáveis, mostra-se em acordo com a alta prevalência dessa doença observada em indivíduos de origem ou descendência africana, o que sugere algum grau de envolvimento desse grupo étnico com essa desordem;
- c) Indivíduos hipertensos com média de idade em anos superior aos indivíduos saudáveis e com equivalência na proporção de indivíduos de ambos os gêneros parecem confirmar um aumento da prevalência dessa doença conforme a idade sem distinção de gênero;
- d) Os genótipos I/D e D/D do polimorfismo de inserção/deleção da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) que em nossa amostra foram mais frequentes em indivíduos normotensos do que em hipertensos mostraram-se em acordo com as proporções genotípicas observadas na maioria das regiões geográficas brasileiras;
- e) Mesmo com a maior frequência do genótipo M/M do polimorfismo M235T em indivíduos saudáveis do que em hipertensos, a grande proporção de heterozigotos M/T presentes em todos os grupos clínicos, que pode representar um traço característico da população amostral, pode ter enfraquecido a tentativa de se verificar uma associação com a HAS;
- f) A ausência de diferença significativa na distribuição dos genótipos dos polimorfismos Ser49Gly e Arg389Gly entre indivíduos saudáveis e hipertensos parece indicar que em nossa amostra não houve relação destes marcadores com a hipertensão;

- g) Devido a uma não diferença significativa no perfil de distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos genéticos segundo a ancestralidade dos indivíduos, independentemente de sua condição clínica, parece indicar a não-ocorrência de estratificação amostral;
- h) Todos os indivíduos miscigenados amostrados, tanto saudáveis quanto hipertensos, ao apresentarem um alto de índice de diversidade genética para as variantes informativas de ancestralidade em comparação as populações ancestrais reforça o traço de elevado grau de mistura de nossa população, evidenciado também pelos diferentes e significativos padrões de desequilíbrio de ligação encontrados para os polimorfismos genéticos.

REFERÊNCIAS

- Barbaro NR, Fontana V, Moreno, H. Angiotensinogen Variants among Resistant Hypertensive Patients. *International journal of hypertension*. 2014.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet*. 2006; 70: 658-665.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1991; 196(1), 80-83.
- Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L, Groop L. Polymorphism of the b1-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation*. 2001; 104:187–190
- Berge KE, Berg, K. No effect of insertion/deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level or variability. *Clinical genetics*. 1994; 45(4), 169-174.
- Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(3), 948.
- Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008*. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. IARC Press. 2008.
- Burke GL, Cresanta JL, Shear CL, Miner MH, Berenson GS. Cardiovascular risk factors and their modification in children. *Cardiol Clin*. 1986;4(1):33-46.
- Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PloS one*. 2013; 8(4), e62005.
- Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar, S, Daniel H et al. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J. Clin. Invest*. 1995; 96: 687-692.
- Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRP, Cordeiro JA, Rodrigues IC. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. *Arq Bras Card* 2008; 91(1): 31–35
- Cheng JL, Wang AL, Wan J. Association between the M235T polymorphism of the AGT gene and cytokines in patients with hypertension. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012; 3(3), 509-512.
- de Neves Manta, FS, Pereira R, Vianna R, de Araújo ARB, Gitaí DLG, da Silva DA et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-indels. *PloS one*. 2013; 8(9), e75145.

de Oliveira CM, Pereira AC, de Andrade M, Soler JM, Krieger, JE. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. *BMC Medical Genetics*. 2008; 9(1), 32.

Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2001; 80(2-3):161-172.

Dries DL, Strong MH, Cooper RS, Drazner MH. Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibition in reducing progression from asymptomatic left ventricular dysfunction to symptomatic heart failure in black and white patients. *Journal of the American College of Cardiology* ,2002;40(2), 311-317.

Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 2010; 10(3), 564-567.

Exner DV, Dries DL, Domanski MJ, Cohn JN. Lesser response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor therapy in black as compared with white patients with left ventricular dysfunction. *New England Journal of Medicine*.2001; 344(18), 1351-1357.

Fonseca LAM, Laurenti R. Cap 1: Epidemiologia das cardiopatias nas duas últimas décadas: dados internacionais, dados brasileiros. In: Giannini SD, Forti N, Diamant J. *Cardiologia preventiva: prevenção primária e secundária*. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 3-8.

Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum. Genet*. 1995; 96: 295-300.

Freitas SRS, Cabello PH, Moura-Neto RS, Dolinsky LC, Bóia MN. Combined analysis of genetic and environmental factors on essential hypertension in a Brazilian rural population in the Amazon region. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2007; 88(4), 447-451.

Freitas SRS, Cabello PH, Moura-Neto RS, Dolinsky LC, Lima, AB, Barros M, Cordovil IL. Analysis of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in resistant hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007; 40(3), 309-316.

Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum. Genet*. 1990; 84: 341-343.

Glavnik N, Petrovic D. M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-1 converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians. *FOLIA BIOLOGICA-PRAHA*.2007;53(2),69.

Hemel D, Domchek SM. Breast cancer predisposition syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010; 24(5):799-814.

Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ. Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension*. 1996; 28(5), 907-911.

Hoehe M, Berrettini W, Leppert M, Lalouel JM, Byerley W, Gershon E, White R. Genetic mapping of adrenergic receptor genes. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 45 (suppl.): A143.

Hoggart CJ PE, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG. Control of Confounding of Genetic Associations in Stratified Populations. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1492-1504.

Inacio J, Goulart Filho LR, Vieira GS. Frequencias genotipicas e alelicas do gene do polimorfismo da ECA I/D na populacao brasileira. *Bioscience Journal.* 2006; 20(1).

Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M et al. Suppressive effect of the gly389 allele of the 1-adrenergic receptor gene on the occurrence of ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ.* 2002; J. 66: 723-728.

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams, CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992; 71(1), 169-180.

Kersbergen P, van Duijn K, Kloosterman AD, den Dunnen JT, Kayser M, de Knijff P. Developing a set of ancestry-sensitive DNA markers reflecting continental origins of humans. *BMC genetics.* 2009;10:69.

Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Seldin MF. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Human mutation.* 2009; 30(1), 69-78.

Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *New England Journal of Medicine.* 1995; 332(11), 706-712.

Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ, Pereira RW. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *Journal of epidemiology/Japan Epidemiological Association.* 2011; 21(4), 240-245.

Leite TK, Fonseca RM, De França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PloS one.* 2011; 6(11), e27162

Lessa I. Epidemiologia da insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial sistêmica no Brasil. *Rev Bras de Hipertens* 2001; 8: 383–392.

Lotufo PA, Pereira AC, Vasconcellos PS, Santos IS, Mill JG, Bensenor IM. Resistant Hypertension: Risk Factors, Subclinical Atherosclerosis, and Comorbidities Among Adults—The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *The Journal of Clinical Hypertension.* 2015; 17(1), 74-80.

Manta FSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Annals of human biology.* 2013; 40(1), 94-98.

Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *The Lancet*. 1999; 353(9156), 897

Markovic D, Tang X, Guruju M, Levenstien MA, Hoh J, Kumar A, Ott, J. Association of angiotensinogen gene polymorphisms with essential hypertension in African-Americans and Caucasians. *Human heredity*. 2005; 60(2), 89-96.

Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta-1-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 12670-12674.

Mathew J, Basheeruddin K, Prabhakar, S. Differences in frequency of the deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in different ethnic groups. *Angiology*. 2001; 52(6), 375-379.

Mathew J, Wittes J, McSherry F, Williford W, Garg R, Probstfield J et al.. Racial differences in outcome and treatment effect in congestive heart failure. *American heart journal*. 2005;150(5), 968-976.

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e4421.

Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 1989; 51: 1041.

McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. *Annals of human genetics*. 2000; 64(02), 171-186.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HFRN. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3), 1215.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Informações e Análises Epidemiológicas - Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM [acesso em 2014 out 20] Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/pobt10>

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. 2014. [acesso em 2014 out 20] Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2013.pdf

Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC nephrology*. 2005; 6(1), 1.

Nascimento BC, Pereira SB, Ribeiro GS, Mesquita ET. Polimorfismos Beta1-Adrenérgico Associados com Fibrilação Atrial na Insuficiência Cardíaca Sistólica. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2012; 98(5), 384-389.

Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, et al.. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC genetics*. 2009; 10(1), 39.

Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*; 1994. 330:1634-1638.

Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SLR, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of β 1- and α 2c adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1135-1142.

Smith SC Jr, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Fadhil YY, Koenig W, Libby P et al. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the clinical practice discussion group. *Circulation*. 2004 Dec 21;110(25):e550-3.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(1 supl.1): 1-51

Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, et al.. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *The American Journal of Human Genetics*. 1998; 63(6), 1839-1851.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(1), 177-182.

Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP et al. AHA guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. *Circulation*. 2002;106(3), 388-391.

Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FSG. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoS ONE*. 2011; 6: e17063.

Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, Dos Santos SE, Amorim A et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*. 2012; 7(1), e29684.

Pritchard JK SM, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945-959

- Ranade K, Jorgenson E, Sheu WHH, Pei D, Hsiung CA, Chiang FT, et al.. A polymorphism in the β 1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;70(4), 935-942.
- Rathore SS, Foody JM, Wang Y, Smith GL, Herrin J, Masoudi FA et al. Race, quality of care, and outcomes of elderly patients hospitalized with heart failure. *Jama*. 2003; 289(19), 2517-2524.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*. 1990; 86(4), 1343.
- Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier, F.. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic acids research*. 1992; 20(6), 1433.
- Rivera ARQ, Carvalho CCF, Arantes MK. Introdução. In: Souza GMR, Piegas LS, Souza JENR. *Proteína C-reativa e doença arterial coronária*. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. p. 1-4. Série Monografias Dante Pazzanese.
- Rotimi C, Morrison L, Cooper R, Oyejide C, Effiong E, Ladipo, M et al.. Angiotensinogen gene in human hypertension. Lack of an association of the 235T allele among African Americans. *Hypertension*. 1994; 24(5), 591-594.
- Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated met235-to-thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum. Molec. Genet*. 1993; 2: 609-610.
- Sagnella GA. Why is plasma renin activity lower in populations of African origin?. *Journal of human hypertension*. 2001;15(1), 17-25.
- Sakuma T, Hirata RDC, Hirata MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2004;18(6):309–316.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos ÂK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human Mutation*. 2010;31(2), 184-190.
- Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Human molecular genetics*. 2008; 17(R2), R143-R150.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *American journal of human genetics*. 1992; 51(1),197.

Tsai HJ, Kho JY, Shaikh N, Choudhry S, Naqvi, M, Navarro D, Burchard EG. Admixture-matched case-control study: a practical approach for genetic association studies in admixed populations. *Human genetics*. 2006; 118(5), 626-639.

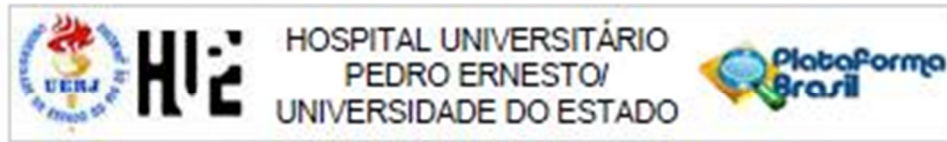
World Health Organization. A global brief on hypertension: Silent killer, global public health crisis, 2013.

World Health Organization. Causes of death 2008: data sources and methods. [acesso em 2014 nov 8] Disponível em:
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf

World Health Organization. Global health estimates for deaths by cause, age, and sex for years 2000-2012. Geneva: WHO. [acesso em 2014 nov 8] Disponível em:
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html

World Health Organization. WHO methods and data sources for global causes of death 2000-2012. Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE/2014.7 [acesso em 2014 nov 8] (Disponível em:
http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalCOD_method_2000_2012.pdf)

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise das Frequências Alélicas e Genótipica das Variantes Polimórficas da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), Angiotensinogênio, Receptor Adrenérgico β_1 e Óxido Nítrico numa População de Hipertensos Resistentes, Hipertensos Controlados e Normotensos.

Pesquisador: Aline Gimenez Ferreira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 23753113.1.0000.6259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 760.506

Data da Relatoria: 22/08/2014

Apresentação do Projeto:

Emenda para aprovação de documentação e alterações no protocolo

Objetivo da Pesquisa:

Emenda para aprovação de documentação e alterações no protocolo

avaliação dos Riscos e Benefícios:

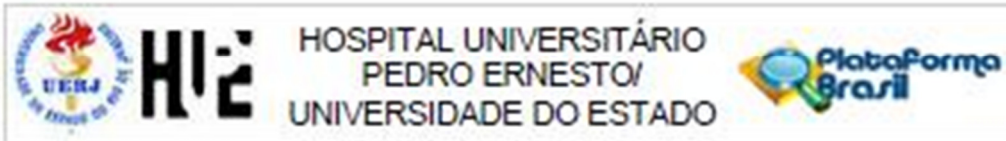
Emenda para aprovação de documentação e alterações no protocolo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

A razão deste adendo e novo TCLE é incorporar avaliação não invasiva da rigidez arterial ao protocolo, mantendo os procedimentos propostos anteriormente, bem como os mesmos desenho e população do estudo.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tênis
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.561-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2066-6253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 700.506

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram encaminhados a este Comitê.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram analisados as documentações e as mesmas se encontram dentro das normas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

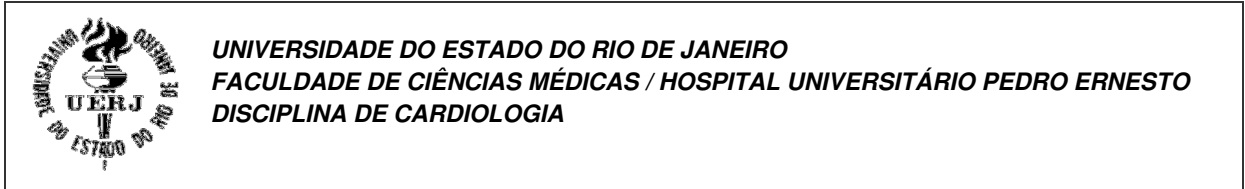
Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 21 de Agosto de 2014

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tênia
Bairro: Vila Isabel CEP: 20.561-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2068-5253 Fax: (21)2254-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR
 DE PROJETO DE PESQUISA**

PROJETO: Análise das Frequências Alélicas e Genotípica das Variantes Polimórficas da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), Angiotensinogênio, Receptor Adrenérgico β 1 e Óxido Nítrico numa População de Hipertensos Resistentes, Hipertensos Controlados e Normotensos

Pesquisadores Responsáveis: Alinne Gimenez Ferreira
 Dr.^a. Andréa Araújo Brandão
 Dr.^a.Dayse Aparecida da Silva

Local de Realização: Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo. Antes de você decidir participar, é importante que você entenda porque a pesquisa está sendo feita, quais as etapas do estudo e possíveis benefícios e riscos, quando existirem. Leia com calma as informações abaixo e converse com seu médico esclarecendo todas as dúvidas que tiver. O seu médico discutirá estas informações com você e explicará todas as suas dúvidas. Depois de ler e entender todas as informações e decidir participar, favor assinar o termo de consentimento no local indicado. Você receberá uma cópia deste documento de consentimento.

1. O que é Hipertensão Arterial Sistêmica, Hipertensão Arterial Resistente e Normotenso?

O diagnóstico de Hipertensão Arterial é definido por valores de Pressão arterial $\geq 140 \times 90$ mmHg, em medidas de consultório, em pelo menos duas ocasiões. Aqueles pacientes hipertensos que utilizam três remédios para controle da pressão, sendo um desses remédios obrigatoriamente um diurético (furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona, indapamida) e ainda assim estiverem com a pressão maior que 140x90mmHg são considerados hipertensos resistentes.

Um paciente é considerado normotenso quando não apresenta pressão alta, ou seja, quando as medidas de sua pressão arterial no consultório forem sempre menor que 140x90mmHg, não fazendo uso de nenhuma medicação que reduza a pressão.

2. Qual o papel da genética na Hipertensão Arterial?

Ao estudar o perfil genético dos pacientes hipertensos, poderemos compreender melhor a doença em questão, assim como identificar marcadores genéticos que representem maior gravidade, podendo atuar de forma mais eficaz no tratamento e, assim, oferecer melhor qualidade de vida aos pacientes hipertensos e redução da mortalidade.

3. Fundamentos e objetivos deste estudo:

Este estudo pretende identificar quais as alterações genéticas (polimorfismos), estão presentes na população do estudo, assim como sua distribuição e frequência. Ao estudarmos o perfil genético dos participantes deste estudo, iremos correlacionar os dados genéticos com os dados clínicos, laboratoriais e fatores de riscos cardiovasculares, assim como entender melhor como essas questões contribuem para a existência da Hipertensão Resistente. Participarão do estudo 100 pacientes considerados normotensos, 100 pacientes hipertensos controlados, ou seja, pacientes que usam até dois remédios para controle da hipertensão e assim conseguem manter sua pressão menor que 140 x 90mmHg e 50 pacientes hipertensos resistentes. Todos os pacientes terão entre 35 e 65 anos.

4. Voluntariedade:

Você tem o direito de não participar deste estudo ou de se retirar do estudo a qualquer momento. Sua participação não prejudicará o seu atendimento e tratamento de sua doença neste hospital. Caso você não seja hipertenso, sua participação não faz com que você se torne

nosso paciente, assim como o fato de não querer participar não lhe prejudicará em possíveis atendimentos futuros neste hospital.

5. Riscos e Desconfortos:

Este estudo não oferece quaisquer riscos aos participantes; apenas o desconforto relacionado a coleta de sangue.

6. Benefícios da pesquisa:

Aquele que participar deste estudo contribuirá para melhorar o conhecimento da influência genética na Hipertensão Arterial, sobretudo nos hipertensos resistentes. Adicionalmente, após correlacionarmos o perfil genético com dados clínicos, laboratoriais e fatores de riscos, compreenderemos melhor quais são os pacientes expostos a maiores riscos cardiovasculares, podendo propor num futuro próximo, um tratamento mais eficaz, o que proporcionará aos pacientes uma melhor qualidade de vida e redução da mortalidade.

7. Confidencialidade:

Qualquer informação relacionada a esse projeto, tais como história médica, exame físico, resultados de exames complementares, serão mantidos em sigilo e apenas as pessoas envolvidas neste estudo e seu médico terão acesso.

8. Custos:

A participação neste estudo não tem objetivo de submeter você a um tratamento, e não terá custo nenhum para você. Pelo fato da sua participação neste estudo ser voluntária, nem você ou os médicos que dele participam receberão qualquer compensação financeira.

9. Direitos pela participação neste estudo:

Você entende que a participação neste estudo é voluntária e, que se não participar, você não sofrerá nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Se resolver participar, você poderá mudar de idéia sobre continuar no estudo. Caso isso aconteça, você entende que terá que informar seu médico sobre essa decisão imediatamente. A sua decisão de não mais participar do estudo, não terá nenhuma influência sobre o seu tratamento neste hospital ou cuidados médicos futuros.

10. As informações coletadas no estudo serão confidenciais?

Sim. Você está ciente de que todos os registros médicos e materiais de pesquisa que poderiam identificá-lo (a) serão mantidos em segredos e que, dentro do que é permitido pelas leis e/ou regulamentos aplicáveis, não estarão disponíveis publicamente. Se os resultados deste estudo forem publicados em revistas médicas, sua identidade não será revelada jamais.

11. Contato:

Se você tiver alguma dúvida durante o estudo, entre em contato com os médicos da Disciplina de Cardiologia/ Departamento de Hipertensão Arterial na Av. 28 de Setembro, número 77 – 2º andar no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e no telefone (21) 2868-8382.

Se você tiver dúvidas em relação aos seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto na Av. 28 de Setembro, 77 – Térreo e no telefone (21) 2868-8253.

12. O que acontecerá com você se decidir participar deste estudo?

O médico irá ler este Termo de Consentimento junto contigo para esclarecer qualquer dúvida que você tenha. Após assinatura do mesmo, será feita uma única coleta do seu sangue por um profissional especializado do nosso serviço. Esta coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o seu tratamento e, caso você seja normotenso, sua participação não fará com que você se torne um paciente nosso, ou seja acompanhado regularmente por nosso serviço neste momento. Nada impede que, quando o senhor necessitar de avaliação cardiológica no futuro, possa ser atendido em nosso serviço.

A amostra de sangue coletada será encaminhada para análise genética ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Geral, onde será guardado e utilizado no período de três anos, que é o tempo de duração desta pesquisa.

Em sua consulta médica, serão avaliados seus dados de identificação, sua história médica, sua história familiar, outras doenças que o senhor (a) possua, quais remédios você está usando, se o senhor (a) usa os remédios corretamente. Também iremos avaliar seus exames que nos mostre o seu colesterol, creatinina, potássio, ácido úrico, hemograma e glicose. Serão considerados válidos os exames que estiverem sido realizados no último ano. Caso você não

tenha realizado estes exames no último ano, iremos relizar estes exames aproveitando o sangue já coletado para ser enviado para análise genética.

O Sr.(a) concorda em participar?

Declaro que me foram dadas as informações descritas acima e que concordo em participar do estudo.

Participante

Pesquisador

Testemunha

Local e Data: -----/-----/201---

ANEXO C - Lista de soluções e tampões utilizados

Solução corante de ácidos nucleicos

Gel Red ® (Biotium) diluído 10.000X e *Loading Buffer* 6x na proporção 1:1

Tampão de lise de hemáceas(TLH) 10X

NH ₄ CL pH 7,4	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	1 mM

Tampão de lise de núcleo (NLB) 1X

Tris-Cl pH 8	10mM
NaCl pH 8,2	400mM
EDTA	2mM

Tampão TE

Tris-Cl	10mM
EDTA pH 7,5	0,2mM

Tampão Platinum 4X

Platinum® PCR SuperMix 10X (Invitrogen)	400µL
MgCl ₂ 6mM	120µL
dNTPs 0,8mM	80µL
Água deionizada	q.s.p. 1000µL

TBE 5X pH 8

Tris-Base	440mM
Ácido bórico	440mM
EDTA pH 8	10mmM
Água deionizada	q.s.p. 500mL

Acrilamida 30%

Acrilamida	29g
Bis-acrilamida	1g
Água deionizada	q.s.p. 100mL

Poliacrilamida 6%

Acrilamida 30%	2mL
TBE 5X	2mL
Água deionizada	5,8mL
APS 10%	100µL
TEMED	10µL

Tampão de reação Buffer B 10X

Tris-HCl pH 7,5	10mM
MgCl ₂	10mM
BSA	0,1mg/mL

Tampão de reação NEB04 10X

Acetato de potássio	50 mM
Tris-acetato	10 mM
Acetato de magnésio	10 mM
BSA	0,1mg/mL

Tampão de reação NEB03 10X

NaCl	100mM
Tris-HCl	50mM
MgCl ₂	10mM
BSA	0,1mg/ml

Tampão Multiplex Qiagen Master Mix 2x

HotStarTaq^R DNA Polimerase

Multiplex PCR Buffer pH 8,7

dNTP Mix

**ANEXO D - Valores aproximados das Estimativas Individuais de Ancestralidade (EIAs)
geradas no *software* Structure**

Ancestralidade (%)				
Amostra(ID)	Grupo Clínico	AFR	EUR	AMER
AB03	GN	11%	73%	16%
AB04	GN	5%	89%	6%
ABP05	GH	57%	32%	11%
AB06	GN	51%	32%	17%
AB08	GN	4%	91%	5%
AB09	GN	40%	50%	10%
ABP11	GH	27%	63%	10%
AB12	GN	73%	15%	12%
AB13	GN	10%	81%	9%
ABP15	GH	11%	79%	10%
ABP16	GH	41%	44%	15%
ABP17	GH	7%	75%	18%
AB18	GN	6%	86%	8%
AB19	GN	13%	75%	12%
ABP20	GH	3%	73%	24%
ABP21	GH	18%	77%	5%
AB22	GN	5%	55%	40%
AB23	GN	18%	76%	6%
AB24	GN	24%	69%	7%
AB25	GN	21%	70%	9%
AB26	GN	16%	77%	7%
AB27	GN	19%	60%	21%
AB28	GN	12%	70%	18%
AB30	GN	19%	75%	6%
AB31	GN	82%	13%	5%
AB32	GN	34%	25%	41%
AB33	GN	11%	81%	8%
AB34	GN	37%	53%	10%
AB35	GN	63%	31%	6%
AB36	GN	24%	62%	14%
AB38	GN	5%	81%	14%
AB41	GN	45%	47%	8%
AB42	GN	8%	88%	4%
AB43	GN	8%	87%	5%
ABP44	GH	5%	92%	3%
AB45	GN	3%	80%	17%
AB48	GN	13%	80%	7%
AB49	GN	50%	40%	10%
ABP50	GH	3%	75%	22%
AB53	GN	9%	85%	6%
AB60	GN	59%	37%	4%
AB62	GN	24%	7%	69%
AB71	GN	41%	42%	17%
ABP80	GN	5%	90%	5%
AB85	GN	81%	10%	9%
ROP001	GH	31%	65%	4%
ROP002	GH	40%	50%	10%
RO003	GN	24%	60%	16%
RO005	GN	4%	92%	4%
RO006	GN	41%	51%	8%
RO007	GN	17%	69%	14%
RO008	GN	8%	80%	12%
RO009	GN	9%	82%	9%
RO010	GN	13%	81%	6%
RO011	GN	20%	68%	12%
ROP012	GH	78%	12%	10%
RO013	GN	10%	84%	6%
RO014	GN	20%	74%	6%
ROP015	GH	11%	84%	5%
RO016	GN	10%	83%	7%
RO017	GN	19%	75%	6%
RO018	GN	17%	77%	6%
RO019	GN	37%	40%	23%
ROP020	GH	72%	24%	4%
RO021	GN	29%	49%	22%
RO022	GN	21%	66%	13%
ROP023	GR	21%	66%	13%
RO024	GN	38%	44%	18%
RO025	GN	7%	86%	7%
ROP026	GR	26%	66%	8%
ROP027	GH	46%	41%	13%
RO028	GN	39%	53%	8%
RO029	GN	19%	71%	10%
RO030	GN	5%	92%	3%
ROP031	GH	24%	51%	25%
RO032	GN	32%	46%	22%
RO033	GN	42%	50%	8%
RO034	GN	6%	78%	16%
RO035	GN	7%	38%	55%
RO036	GN	42%	45%	13%
RO037	GN	3%	91%	6%
RO038	GN	26%	67%	7%
RO39	GN	60%	30%	10%
RO040	GN	9%	78%	13%
RO041	GN	17%	75%	8%
RO042	GN	9%	81%	10%
RO043	GN	14%	80%	6%
RO044	GN	46%	48%	5%
RO045	GN	11%	78%	11%
RO046	GN	21%	37%	42%
RO047	GN	18%	76%	6%
RO048	GN	22%	73%	5%
RO049	GN	22%	70%	8%
RO050	GN	16%	74%	10%
RO051	GN	6%	66%	28%

RO052	GN	11%	76%	13%	RO106	GN	61%	30%	9%
RO053	GN	5%	75%	20%	ROP107	GH	36%	33%	31%
RO054	GN	30%	64%	6%	RO108	GN	44%	47%	9%
RO055	GN	18%	67%	15%	ROP109	GH	31%	56%	13%
RO056	GN	6%	88%	6%	RO110	GN	38%	49%	13%
RO057	GN	17%	64%	19%	RO111	GN	45%	45%	10%
RO058	GN	8%	71%	21%	ROP112	GR	21%	69%	10%
RO059	GN	7%	65%	28%	ROP113	GR	16%	75%	9%
RO060	GN	14%	78%	7%	ROP114	GH	54%	41%	5%
RO061	GN	12%	81%	7%	RO115	GN	30%	64%	6%
RO062	GN	9%	68%	23%	RO116	GN	26%	51%	23%
RO063	GN	7%	79%	14%	ROP117	GH	25%	69%	6%
RO064	GN	6%	84%	10%	ROP118	GR	3%	89%	8%
RO065	GN	12%	83%	5%	RO119	GN	82%	13%	5%
RO066	GN	12%	74%	14%	RO120	GN	14%	51%	35%
RO067	GN	62%	27%	11%	RO121	GH	7%	75%	18%
RO068	GN	8%	77%	15%	RO122	GH	33%	40%	27%
RO069	GN	8%	84%	8%	RO123	GH	18%	77%	5%
RO070	GN	26%	71%	3%	RO124	GR	21%	68%	11%
RO071	GN	42%	51%	7%	RO125	GN	25%	63%	12%
RO072	GN	59%	22%	19%	RO126	GH	48%	44%	8%
RO073	GN	28%	68%	4%	RO127	GR	87%	6%	7%
RO074	GN	21%	67%	11%	RO128	GH	82%	7%	11%
RO075	GN	30%	58%	12%	RO129	GN	42%	43%	15%
RO076	GN	34%	53%	13%	RO130	GN	30%	54%	16%
RO077	GN	17%	77%	6%	RO131	GN	8%	82%	10%
RO078	GN	26%	56%	18%	ROP132	GR	6%	90%	4%
ROP079	GH	7%	82%	11%	RO133	GN	36%	35%	29%
RO080	GN	58%	19%	23%	RO134	GN	44%	40%	16%
RO081	GN	68%	11%	21%	ROP135	GH	3%	69%	28%
ROP082	GH	7%	82%	11%	ROP136	GH	39%	54%	7%
RO083	GN	5%	89%	6%	ROP137	GR	60%	23%	17%
ROP084	GH	65%	28%	7%	RO139	GN	33%	61%	6%
ROP085	GH	24%	43%	33%	RO140	GN	28%	67%	5%
RO086	GN	6%	86%	8%	ROP141	GH	67%	28%	5%
RO087	GN	61%	34%	5%	RO142	GN	6%	88%	6%
ROP088	GH	86%	5%	9%	RO143	GN	67%	26%	7%
RO089	GN	25%	53%	22%	RO144	GN	21%	45%	34%
ROP090	GH	12%	80%	8%	RO145	GN	21%	71%	8%
RO091	GN	15%	43%	42%	RO146	GN	36%	38%	26%
RO092	GN	40%	46%	14%	RO147	GN	21%	75%	4%
RO093	GN	30%	52%	18%	RO148	GN	15%	72%	12%
ROP094	GH	31%	63%	6%	RO149	GN	33%	51%	16%
ROP095	GH	3%	80%	17%	RO150	GN	32%	59%	9%
RO096	GN	20%	55%	25%	RO151	GN	10%	79%	11%
RO097	GN	15%	77%	8%	RO152	GN	4%	90%	6%
RO098	GN	17%	77%	6%	ROP153	GR	44%	46%	10%
RO099	GN	17%	69%	14%	RO154	GN	4%	88%	8%
RO100	GN	19%	70%	11%	RO155	GN	10%	61%	29%
ROP101	GR	30%	44%	26%	RO156	GN	8%	88%	4%
RO102	GN	3%	63%	34%	ROP157	GH	46%	29%	25%
ROP103	GH	17%	52%	31%	ROP158	GH	44%	51%	4%
RO104	GN	38%	44%	18%	RO159	GN	19%	66%	15%
ROP105	GH	30%	64%	6%	RO160	GN	33%	61%	6%

ROP161	GH	62%	32%	6%
RO162	GN	70%	25%	5%
RO163	GN	24%	62%	14%
RO164	GN	6%	79%	15%
ROP165	GH	75%	13%	12%
RO166	GN	25%	65%	10%
ROP167	GH	73%	21%	6%
RO168	GN	21%	34%	45%
RO169	GN	30%	29%	41%
RO170	GN	22%	58%	20%
ROP171	GH	45%	38%	17%
RO172	GN	76%	6%	18%
ROP173	GH	14%	75%	11%
ROP174	GH	15%	59%	26%
ROP175	GH	2%	87%	11%
RO176	GN	15%	79%	6%
RO177	GN	27%	69%	4%
RO178	GN	74%	10%	16%
ROP179	GH	6%	84%	10%
ROP180	GH	4%	92%	4%
ROP181	GR	38%	34%	28%
RO182	GN	12%	84%	4%
RO183	GN	55%	35%	10%
ROP184	GH	58%	37%	5%
ROP185	GH	7%	85%	8%
ROP186	GH	60%	13%	27%
ROP187	GR	26%	16%	58%
ROP188	GH	9%	59%	31%
RO189	GN	53%	41%	6%
RO190	GN	60%	24%	16%
RO191	GN	26%	68%	6%
RO192	GN	6%	74%	20%
RO193	GN	64%	18%	18%
ROP194	GH	52%	41%	7%
ROP195	GH	11%	84%	5%
ROP196	GH	8%	80%	12%
ROP197	GH	18%	42%	40%
RO198	GN	21%	57%	22%
RO199	GN	38%	52%	10%
ROP200	GH	72%	21%	7%
ROP201	GH	36%	43%	21%
ROP202	GH	76%	11%	13%
ROP203	GH	6%	85%	9%
ROP204	GH	47%	21%	32%
ROP205	GH	15%	55%	30%
ROP206	GH	56%	30%	14%
RO207	GN	10%	47%	43%
RO208	GN	9%	65%	26%
ROP209	GH	40%	50%	10%
ROP210	GR	30%	64%	6%
RO211	GN	39%	54%	7%
RO212	GN	28%	63%	9%
ROP213	GH	45%	36%	19%
ROP214	GR	7%	81%	12%
ROP215	GR	83%	5%	12%
ROP216	GR	30%	67%	3%
ROP219	GH	37%	44%	19%
RO220	GN	27%	67%	6%
RO221	GN	14%	74%	12%
ROP222	GH	47%	49%	4%
ROP223	GH	26%	66%	8%
ROP224	GR	46%	45%	9%
ROP225	GH	31%	61%	8%
ROP226	GH	61%	26%	13%
ROP228	GH	55%	25%	20%
ROP229	GH	50%	43%	7%
ROP230	GR	42%	44%	14%
ROP232	GR	4%	90%	6%
ROP233	GH	29%	49%	22%
ROP234	GR	52%	35%	13%
ROP236	GR	43%	50%	7%
ROP237	GR	61%	26%	13%
ROP238	GR	77%	19%	4%
ROP239	GR	41%	46%	13%
ROP240	GR	34%	60%	6%
ROP241	GR	60%	35%	5%
ROP242	GR	43%	51%	6%
ROP243	GR	33%	26%	41%
ROP244	GR	77%	11%	12%
ROP245	GR	50%	41%	9%
ROP247	GR	62%	26%	12%
ROP248	GR	16%	77%	7%
ROP249	GR	36%	43%	21%
ROP250	GR	39%	53%	8%
ROP251	GR	41%	50%	9%
ROP252	GH	62%	13%	25%
ROP253	GH	33%	49%	18%
ROP254	GH	7%	67%	26%

Fonte: a autora, 2015.

ANEXO E – Resultados detalhados dos testes de diversidade genética para os 46 marcadores informativos de ancestralidade

Tab. Supl.1 – Resultados dos testes de Diversidade Genética; 46 AIMs; grupo GN (n=178).

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): 0,38858 ± 0,19154					
<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>	
MID-1470	356	2	0,47753	0,49304	
MID-777	356	2	0,50000	0,44252	
MID-196	352	2	0,41477	0,48587	
MID-881	352	2	0,44578	0,44029	
MID-3122	356	2	0,16854	0,18231	
MID-548	356	2	0,38202	0,41937	
MID-659	354	2	0,18644	0,19662	
MID-2011	356	2	0,42697	0,49508	
MID-2929	356	2	0,34270	0,41239	
MID-593	356	2	0,32584	0,33024	
MID-798	356	2	0,43258	0,49152	
MID-1193	354	2	0,28249	0,28233	
MID-1871	356	2	0,26966	0,31682	
MID-17	356	2	0,48876	0,50063	
MID-2538	356	2	0,49438	0,44817	
MID-1644	356	2	0,30899	0,38163	
MID-3854	352	2	0,28409	0,32634	
MID-2275	356	2	0,32584	0,33024	
MID-94	356	2	0,25843	0,26586	
MID-3072	354	2	0,36723	0,38304	
MID-772	356	2	0,13483	0,14534	
MID-2313	356	2	0,39326	0,39500	
MID-397	356	2	0,32584	0,37322	
MID-1636	356	2	0,41573	0,42823	
MID-51	356	2	0,51124	0,50063	
MID-2431	354	2	0,18079	0,20973	
MID-2264	354	3	0,45198	0,53570	
MID-2256	352	2	0,31250	0,30198	
MID-128	356	2	0,36517	0,42163	
MID-15	356	2	0,47191	0,48520	
MID-2241	356	2	0,42697	0,44817	
MID-419	356	2	0,28090	0,28846	
MID-943	356	2	0,48876	0,46936	
MID-159	356	2	0,47191	0,48520	
MID-2005	356	2	0,47753	0,49949	
MID-250	356	2	0,43258	0,46025	
MID-1802	356	2	0,20225	0,23396	
MID-1607	352	2	0,38636	0,38170	
MID-1734	352	2	0,30682	0,34596	
MID-406	354	2	0,41243	0,45475	
MID-1386	356	2	0,33708	0,36158	
MID-1726	354	2	0,52542	0,48701	
MID-3626	278	2	0,43885	0,50139	
MID-360	356	3	0,38764	0,37435	
MID-1603	342	2	0,43860	0,48603	
MID-2719	356	2	0,46067	0,44817	
Média	352,739	2,043	0,37437	0,39450	
d.p.	11,995	0,206	0,10078	0,09934	

Fonte: a autora, 2015.

Tab. Supl.2 – Resultados dos testes de Diversidade Genética; 46 AIMs; grupo GH (n=77).

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): 0,40378 ± 0,19940

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs</i>	<i>Heterozigosidade Esp</i>
MID-1470	152	2	0,50000	0,48100
MID-777	154	2	0,37662	0,41635
MID-196	148	2	0,50000	0,48787
MID-881	134	2	0,38806	0,45427
MID-3122	154	2	0,24675	0,25575
MID-548	154	2	0,45455	0,39326
MID-659	152	2	0,26316	0,23005
MID-2011	154	2	0,48052	0,50021
MID-2929	154	2	0,38961	0,43188
MID-593	154	2	0,28571	0,34632
MID-798	154	2	0,38961	0,49639
MID-1193	154	2	0,31169	0,31576
MID-1871	154	2	0,38961	0,36058
MID-17	154	2	0,45455	0,50327
MID-2538	154	2	0,40260	0,43672
MID-1644	154	2	0,44156	0,45022
MID-3854	154	2	0,32468	0,36746
MID-2275	154	2	0,45455	0,42687
MID-94	154	2	0,22078	0,23708
MID-3072	154	2	0,41558	0,46583
MID-772	154	2	0,14286	0,21772
MID-2313	154	2	0,40260	0,39326
MID-397	154	2	0,37662	0,44589
MID-1636	154	2	0,41558	0,48892
MID-51	154	2	0,38961	0,49639
MID-2431	154	2	0,27273	0,27375
MID-2264	154	3	0,46753	0,54792
MID-2256	154	2	0,25974	0,31576
MID-128	154	2	0,33766	0,36058
MID-15	154	2	0,49351	0,47874
MID-2241	154	2	0,29870	0,46218
MID-419	154	2	0,14286	0,23708
MID-943	154	2	0,57143	0,49911
MID-159	154	2	0,53247	0,46218
MID-2005	154	2	0,44156	0,49300
MID-250	154	2	0,36364	0,45022
MID-1802	154	2	0,29870	0,30770
MID-1607	154	2	0,36364	0,34632
MID-1734	152	2	0,30263	0,38402
MID-406	154	2	0,37662	0,49784
MID-1386	154	2	0,28571	0,33138
MID-1726	150	2	0,45333	0,48322
MID-3626	122	2	0,42623	0,50400
MID-360	154	3	0,37662	0,35642
MID-1603	154	2	0,49351	0,47874
MID-2719	148	2	0,47297	0,48272
<i>Média</i>	152,391	2,043	0,37933	0,40983
<i>d.p.</i>	5,588	0,206	0,09648	0,08957

Fonte: a autora, 2015.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

<i>Locus#</i>	Genótipo (n)	Heteroz. Obs.	Heteroz. Esp.	Valor de p	d.p.
<i>MID-2264</i>	77	0,46753	0,54792	0,00005*	0,00001

Fonte: a autora, 2015.

Nota: *Significativo ao nível de significância corrigido por Bonferroni ($\alpha < 0,05/46$; 46 *locus* testados).

Tab. Supl. 3 – Resultados dos testes de Diversidade Genética; 46 AIMs; grupo GR (n=36).

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): $0,40160 \pm 0,19994$

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
MID-1470	72	2	0,47222	0,45970
MID-777	72	2	0,41667	0,44092
MID-196	68	2	0,55882	0,49649
MID-881	66	2	0,57576	0,50023
MID-3122	72	2	0,19444	0,17801
MID-548	72	2	0,36111	0,47535
MID-659	72	2	0,25000	0,30008
MID-2011	72	2	0,47222	0,49726
MID-2929	72	2	0,41667	0,41901
MID-593	72	2	0,44444	0,48200
MID-798	72	2	0,41667	0,47535
MID-1193	72	2	0,33333	0,31768
MID-1871	72	2	0,41667	0,41901
MID-17	72	2	0,55556	0,46792
MID-2538	72	2	0,27778	0,24257
MID-1644	72	2	0,38889	0,48200
MID-3854	72	2	0,44444	0,45070
MID-2275	72	2	0,50000	0,43036
MID-94	72	2	0,25000	0,26252
MID-3072	72	2	0,50000	0,45070
MID-772	72	2	0,08333	0,08099
MID-2313	72	2	0,33333	0,38028
MID-397	72	2	0,33333	0,35055
MID-1636	72	2	0,44444	0,49296
MID-51	72	2	0,47222	0,50352
MID-2431	72	2	0,11111	0,10642
MID-2264	72	3	0,47222	0,53482
MID-2256	72	2	0,27778	0,24257
MID-128	72	2	0,50000	0,43036
MID-15	72	2	0,44444	0,48200
MID-2241	72	2	0,52778	0,49726
MID-419	72	2	0,30556	0,30008
MID-943	72	2	0,55556	0,50078
MID-159	72	2	0,47222	0,47535
MID-2005	72	2	0,47222	0,48787
MID-250	72	2	0,38889	0,43036
MID-1802	72	2	0,30556	0,36581
MID-1607	72	2	0,36111	0,39397
MID-1734	72	2	0,27778	0,24257
MID-406	72	2	0,41667	0,50352
MID-1386	72	2	0,33333	0,38028
MID-1726	72	2	0,55556	0,50704
MID-3626	60	2	0,26667	0,49944
MID-360	72	3	0,41667	0,46440
MID-1603	70	2	0,40000	0,43727
MID-2719	72	2	0,61111	0,45070
Média	71,478	2,043	0,39966	0,40846
d.p.	2,041	0,206	0,11860	0,11035

Fonte: a autora, 2015.

Tab. Supl. 4 – Resultados dos testes de Diversidade Gênica; 46 AIMs; grupo GH+GR (n=113)

Índice de Diversidade Molecular (Média de diversidade gênica sobre todos os loci): $0,40372 \pm 0,19900$

<i>Locus#</i>	<i>Nº de cópias do gene</i>	<i>Nº de alelos</i>	<i>Heterozigosidade Obs.</i>	<i>Heterozigosidade Esp.</i>
MID-1470	224	2	0,49107	0,47305
MID-777	226	2	0,38938	0,42258
MID-196	216	2	0,51852	0,48837
MID-881	200	2	0,45000	0,47111
MID-3122	226	2	0,23009	0,23127
MID-548	226	2	0,42478	0,42258
MID-659	224	2	0,25893	0,25236
MID-2011	226	2	0,47788	0,49746
MID-2929	226	2	0,39823	0,42608
MID-593	226	2	0,33628	0,39992
MID-798	226	2	0,39823	0,48948
MID-1193	226	2	0,31858	0,31497
MID-1871	226	2	0,39823	0,37888
MID-17	226	2	0,48673	0,49829
MID-2538	226	2	0,36823	0,38753
MID-1644	226	2	0,42478	0,45939
MID-3854	226	2	0,36283	0,39587
MID-2275	226	2	0,46903	0,42608
MID-94	226	2	0,23009	0,24417
MID-3072	226	2	0,44248	0,45939
MID-772	226	2	0,12389	0,17652
MID-2313	226	2	0,38053	0,38753
MID-397	226	2	0,36283	0,41900
MID-1636	226	2	0,42478	0,48802
MID-51	226	2	0,41593	0,49656
MID-2431	226	2	0,22124	0,22470
MID-2264	226	3	0,46903	0,54155
MID-2256	226	2	0,26549	0,29263
MID-128	226	2	0,38938	0,38324
MID-15	226	2	0,47788	0,47764
MID-2241	226	2	0,37168	0,47355
MID-419	226	2	0,19469	0,25676
MID-943	226	2	0,56637	0,49746
MID-159	226	2	0,51327	0,46442
MID-2005	226	2	0,45133	0,48948
MID-250	226	2	0,37168	0,44240
MID-1802	226	2	0,30088	0,32566
MID-1607	226	2	0,36283	0,36063
MID-1734	224	2	0,29464	0,34333
MID-406	226	2	0,38938	0,49746
MID-1386	226	2	0,30088	0,34612
MID-1726	222	2	0,48649	0,49309
MID-3626	182	2	0,37363	0,50124
MID-360	226	3	0,38938	0,39174
MID-1603	224	2	0,46429	0,46621
MID-2719	220	2	0,51818	0,47202
<i>Média</i>	223,870	2,043	0,38586	0,40973
<i>d.p.</i>	7,559	0,206	0,09587	0,09063