



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Kelly Teixeira dos Santos

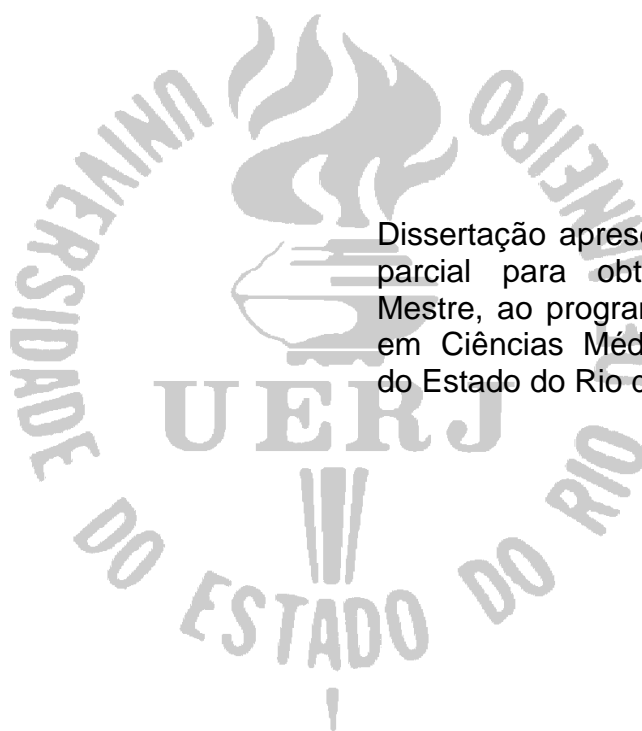
Estudo do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta adrenérgico 1 (β -ADR 1) na população do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, estratificada por cor da pele e ancestralidade genômica

Rio de Janeiro

2012

Kelly Teixeira dos Santos

Estudo do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta adrenérgico 1 (β -ADR 1) na população do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, estratificada por cor da pele e ancestralidade genômica



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Rio de Janeiro

2012

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

S237 Santos, Kelly Teixeira dos.
Estudo do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta
adrenérgico 1 (β -ADR 1) na população do Estado do Rio de Janeiro,
Brasil, estratificada por cor da pele e ancestralidade genômica / Kelly
Teixeira dos Santos. – 2012.
60 f.

Orientadora: Dayse Aparecida da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências
Médicas.

1. Polimorfismo (Genética) – Teses. 2. Genética da população
humana – Teses. 3. Receptores adrenérgicos beta 1. 4. População –
Aspectos genéticos – Teses. I. Silva, Dayse Aparecida da. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

CDU 591.151

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

Assinatura

Data

Kelly Teixeira dos Santos

Estudo do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta adrenérgico 1 (β -ADR 1) na população do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, estratificada por cor da pele e ancestralidade genômica

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de dezembro de 2012.

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dra. Andréa Araujo Brandão
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Celso Cruz Tavares
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus não me abandonou em nenhum momento, e se termino esta etapa de minha vida é por causa D'Ele e da minha família, em especial minha mãe Elzira e a minha irmã Suellen, que me apoiaram em todos os instantes orando e acreditando em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dayse Aparecida da Silva, pela oportunidade de aprendizado, pelos conhecimentos passados, pela paciência e sua dedicação.

Ao Professor Elizeu Fagundes de Carvalho, pela oportunidade de aprendizado através de sua equipe de trabalho.

A Rossana Ghessa que se tornou mais que amiga tornou-se uma irmã que espero levar para a vida toda, valeu pelos conselhos e alertas.

A Márcia Desidério pelo apoio, ensinamento e amizade em vários momentos, onde foi chamada por mim de modo carinho de “minha coorientadora”.

A Débora Beatriz pelo primeiro contato com o mundo científico quando comecei a Iniciação Científica.

Aos companheiros de laboratório: Holy, Mury, Rose e Saulo pela colaboração em todo momento e os demais companheiros de laboratório meus sinceros agradecimentos.

Aos meus familiares e amigos que entenderam esta etapa de minha vida me apoiando mesmo não podendo estar tão presente.

RESUMO

SANTOS, Kelly Teixeira dos. *Estudo do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta adrenérgico 1 (β -adr 1) na população do estado do Rio de Janeiro, Brasil estratificada por cor da pele e ancestralidade genômica*. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)–Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

As doenças cardiovasculares possuem a maior taxa de óbitos no mundo, e notavelmente nos últimos anos as pesquisas genéticas sobre as mesmas estão baseadas em estudos de associação, no qual o gene suspeito que esteja em maior frequência entre os pacientes passa a ser considerado um possível fator causal. Os polimorfismos genéticos que ocorrem no receptor beta-adrenérgico podem resultar em mudanças significativas na função do receptor, podendo acarretar fisiopatologias. Neste trabalho, o objetivo foi estimar a diversidade e a frequência do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor beta-adrenérgico 1 a partir de uma amostra de 188 indivíduos da população do Estado do Rio de Janeiro. As frequências também foram analisadas a partir da estratificação da amostra por critério fenotípico em função do padrão de cor da pele em (negros e não negros) ou ancestralidade genética em (afrodescendente e não afrodescendente), definida através da informação dos marcadores de ancestralidade Indels e SNP de cromossomo Y, para avaliar se os padrões de ancestralidade ou cor da pele são fundamentais para a diferenciação e distanciamento genético. Fragmentos de interesse foram amplificados por PCR (reação de cadeia de polimerase) com primers específicos para o marcador Ser49Gly e as reações de genotipagem foram realizadas com enzimas de restrição Eco0109I. Os valores da heterozigosidade variaram entre 0,25-0,50 e 0,20-0,41 nos grupos estratificados por ancestralidade e cor da pele, respectivamente. No que diz respeito à análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg, não houve um desvio significativo na distribuição do marcador nas amostras gerais do Estado do Rio de Janeiro, ou mesmo nas amostras estratificadas. A distribuição dos alelos na amostra dos 188 indivíduos da população geral do Rio de Janeiro (AC_RJ) mostrou uma frequência de 80,30% e 19,70% para o alelo selvagem e mutado Ser49Gly, respectivamente. A comparação das análises sobre a distribuição das frequências alélicas para este marcador mostrou a ocorrência de diferenças significativas na distribuição das frequências alélicas entre negros e não negros e afrodescendentes e não afrodescendentes. A diferença significativa observada entre os negros e afrodescendentes, foi em menor grau de distanciamento. A informação obtida em relação à ancestralidade foi crucial para a obtenção dos dados sobre o aumento da variável mutada do polimorfismo Ser49Gly nas populações negras e afrodescendentes do Estado Rio de Janeiro. Tal evidência, em combinação com estudos clínicos podem contribuir para uma análise pormenorizada do padrão de susceptibilidade à doença em questão, em falhas do mecanismo deste receptor.

Palavras-chave: Polimorfismo Ser49Gly. Gene do receptor beta-adrenérgico 1. Ancestralidade. Estudo populacional.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases have the highest death rate in the world, and notably in recent years genetic research about them are based on association studies, in which the gene suspected to be at a higher frequency among patients is now considered a possible causal factor. Genetic polymorphisms that occur in the beta adrenergic receptor can result in significant changes in the receptor function that may trigger physiopathologies. The main aim of this study was to estimate the diversity and the frequency of Ser49Gly polymorphism of Beta adrenergic 1 receptor gene in a sample of 188 individuals of the population of Rio de Janeiro. The frequencies were also analyzed from the sample stratification by phenotypic criteria due to skin color pattern (blacks and non-blacks) or by genetic ancestry (African descent and non-African descent), defined by ancestry information SNP and Indels markers from Y chromosome, to evaluate whether the ancestry criteria and/or skin color are crucial to the pattern of differentiation and genetic distance. Fragments of interest were amplified by PCR (polymerase chain reaction) with specific primers for the marker Ser49Gly and genotyping reactions performed by restriction with the enzyme Eco0109I. The values of heterozygosity ranged from 0.25 to 0.50 and 0.20 to 0.41 in the groups stratified by ancestry and skin color, respectively. Regarding the analysis of EHW, there was no significant deviation from this marker genotype distribution in Rio de Janeiro sample or even the stratified sample. The distribution of alleles in the sample of 188 individuals from the general population of Rio de Janeiro (AC_RJ) shows a frequency of 80.30% and 19.70% for the wild-type allele mutated Ser49 and Gly49, respectively. The comparison analysis showed the occurrence of significant differences in the distribution of allele frequencies of this marker between blacks and non-blacks and African descent and non-African descent. A significant difference was also observed between blacks and African descent, with a lesser degree of detachment. The information obtained in relation to ancestry was crucial for obtaining data on the increase in variable mutated polymorphism Ser49Gly in the black populations and African descent in Rio de Janeiro State. Such evidence, in combination with clinical studies may contribute to a detailed analysis of the pattern of susceptibility to disease involved in mechanism crashes of this receptor.

Keywords: Ser49Gly polymorphism. Beta 1-adrenergic receptor gene. Ancestry. Population study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ativação dos receptores adrenérgicos α -ABDR e β -ABDR pela via de Transmissão Noradrenérgica.....	17
Figura 2-	Modulação da fisiologia celular em resposta a estimulação do receptor β ABDR via proteína Gs.....	20
Figura 3-	Localização genética do polimorfismo do receptor ABDR1 no cromossomo 10.....	21
Figura 4-	Produto de amplificação do gene β -ABR 1 para o polimorfismo Ser49Gly.....	37
Figura 5-	Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos produtos de amplificação do polimorfismo Ser49Gly do gene β -ABR 1.....	37
Figura 6-	Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos de amplificação do polimorfismo Ser49Gly do gene β -ABR 1.....	38
Figura 7-	Frequência Alélica de indivíduos negros e não negros agrupados por cor da pele e por ancestralidade do Estado do Rio de Janeiro...	41
Figura 8-	Frequência Alélica de indivíduos negros e não negros agrupados por cor da pele e por cor da pele do Estado do Rio de Janeiro.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Protocolo da PCR para o polimorfismo Ser49Gly.....	30
Tabela 2-	Sequência de primers senso e anti-senso.....	30
Tabela 3-	Condições utilizadas na termocicladora.....	30
Tabela 4-	Populações mundiais cujos dados de frequência do Polimorfismo Ser49Gly foram comparados com os dados do Rio de Janeiro na análise de diferenciação e distância genética.....	33
Tabela 5-	Características da amostra de acordo com os respectivos grupos analisados para o polimorfismo Ser49Gly.....	34
Tabela 6-	Frequências Alélicas e genótípicas da população do Estado do Rio de Janeiro agrupada por ancestralidade.....	40
Tabela 7-	Frequências Alélicas e genótípicas da população do Estado do Rio de Janeiro agrupada por cor da pele.....	40
Tabela 8-	Matriz de distância genética (F_{st}) para os agrupamentos ancestrais e por cor da pele da população do Estado do Rio de Janeiro. Abaixo da diagonal são mostrados os valores de p e acima os valores de F_{st}	43
Tabela 9-	Matriz de distância genética (F_{st}) para os agrupamentos ancestrais e por cor da pele da população do Estado do Rio de Janeiro e de outras populações mundiais.....	44
Tabela 10-	Matriz de significância genética (p -value) para os agrupamentos ancestrais e por cor da pele da população do Estado do Rio de Janeiro e de outras populações mundiais.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac_Anc	-	População total de afrodescendente do Rio de Janeiro
Ac_cor	-	Fenótipo total afrodescendente do Rio de Janeiro
ADR 1	-	Receptor adrenérgico 1
ADR 2	-	Receptor adrenérgico 2
ADR 3	-	Receptor adrenérgico 3
AFR_RJ	-	População afrodescendente do Rio de Janeiro
AFR_USA	-	População de afrodescendentes da América do Norte
AGG	-	Serina
AHeFT	-	Teste de insuficiência cardíaca em afro americanos
AIMS	-	Marcadores informativos de ancestralidade
AMPc	-	Monofosfato cíclico de adenosina
Arg	-	Aminoácido arginina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
CHI	-	População da China
Cm	-	Centímetro
DCV	-	Doenças cardiovasculares
DIG	-	Digoxina
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	-	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
ECA	-	Enzima conversora de angiotensina
Fst	-	Índice de fixação de diferenciação genética entre populações
GDP		Difosfato de guanosina
GGG		Glicina
Gln	-	Glutamina
Glu	-	Ácido glutâmico
Gly	-	Aminoácido glicina
GTP	-	Adenosina trifosfato
Has	-	Hipertensão Arterial
HCL	-	Ácido clorídrico
He	-	Heterozigosidade esperada
HIS_USA	-	População Hispânica da América do Norte
Ho	-	Heterozigosidade observada
HWE	-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
i	-	Frequência do alelo i
IC	-	Intervalo de confiança
IC	-	Insuficiência cardíaca
INDELS	-	Os marcadores genéticos do tipo inserção e deleção
Kb	-	Quilobase
KCl	-	Cloreto de potássio

LDD	-	Laboratório de Diagnósticos por DNA
M	-	Molar
mg	-	Miligrama
Mg	-	Magnésio
MgCl ₂	-	Cloreto de Magnésio
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
n	-	Número total de alelos observados
<i>n</i>	-	Número de indivíduos
NaCl	-	Cloreto de sódio
NAFR_RJ	-	População não afrodescendente do Rio de Janeiro
Ng	-	Nanograma
NG_RJ	-	População de negros do Rio de Janeiro
NG_USA	-	População negra da América do Norte
NLB	-	Tampão de lise de membrana nuclear
NNG_RJ	-	População de não negros do Rio de Janeiro
NNG_USA	-	População não negra da América do Norte
PAC_USA	-	População da Ilha do Pacífico da América do Norte
pb	-	Par de Base
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PGCM	-	Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas
Ph	-	Potencial hidrogeniônico
PKA	-	Proteína quinase A
q	-	Braço longo dos cromossomos
RPM	-	Rotações por minuto
rs	-	Número de identificação do polimorfismo ABDR1
Ser	-	Alelo ser49
SNC	-	Sistema nervoso central
SNP	-	Sistema nervoso periférico
SOLVD	-	Disfunção ventricular esquerda
TAE	-	Tris acetato de EDTA
TE	-	Tampão Tris, EDTA
TLH	-	Tampão de lise de hemácias
Tris	-	Trihidroximetil aminometano
U	-	Unidades
UERJ	-	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
V-HEFT	-	Teste de vasodilatação do coração I
V-HEFT	-	Teste de vasodilatação do coração II

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	Porcentagem
()	-	Parênteses
[]	-	Colchetes
-	-	Menos
+	-	Mais
±	-	Média
≥	-	Maior igual
°C	-	Graus Celsius
μl	-	Microlitro
∞	-	Infinito
α	-	Alfa
β	-	Beta
γ	-	Gama
μg	-	Micrograma
μM	-	Micromolar
Σ	-	Síigma
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	27
1.1	Objetivo geral	27
1.2	Objetivos específicos	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Amostras	28
2.2	Extração de DNA	28
2.2.1	Determinação de concentração de DNA	29
2.2.2	Reação em cadeia de polimerase (PCR) para região Ser49Gly	29
2.2.3	<u>Eletrforese dos produtos da PCR</u>	31
2.2.4	<u>Análise do produto de amplificação (PCR)</u>	31
2.3	Análise estatística	31
3	RESULTADOS	34
3.1	Descrição da amostra	34
3.1.1	<u>Análise dos produtos de amplificação (PCR)</u>	35
3.1.2	<u>Análise da genotipagem</u>	35
3.1.2.1	Genotipagem INDEL	35
3.1.2.2	Genotipagem SNP de cromossomo Y	35
3.2	Estudo populacional	38
3.2.1	<u>Diversidade Genética do marcador Ser49Gly</u>	38
3.2.2	<u>Equilíbrio de Hardy-Weinberg</u>	39
3.2.3	<u>Análise das frequências alélicas e genotípicas</u>	39
3.2.4	<u>Análise de distância genética</u>	42
4	DISCUSSÃO	46
4.1	Marcadores genéticos e frequências alélicas	46
4.2	Distância genética	48
4.3	Genética clínica	51
5	CONCLUSÃO	53
	REFÊRENCIAS	55
	ANEXO	60

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) possuem a maior taxa de óbitos no mundo. No Brasil este índice também vigora sendo as DCV responsáveis por 32,3% dos óbitos (Rivera et al., 2004, cap. 1), o que justifica a busca por um conhecimento mais aprofundado desta doença.

Apesar da morbidade e mortalidade associadas permanecerem expressivas, as formas de tratamento para as DCV avançaram de forma notável nos últimos 15 anos e diversas drogas e procedimentos foram incorporados ao arsenal terapêutico, o que representou uma redução significativa de eventos cardiovasculares, com impacto na sobrevivência, na qualidade de vida e na redução nos custos de saúde pública e privada (Rivera et al., 2004, cap. 7-8).

Um fato significativo a ser avaliado no tratamento dos pacientes em questão está relacionado aos potenciais riscos do tratamento em si, de como se lidar com várias medicações, onde muitas vezes as doses são aumentadas na tentativa de atingir maior benefício, acarretando com este fato os riscos associados ao tratamento. Efeitos adversos relacionados ao uso de medicamentos são responsáveis por mais de 2 milhões de casos de internações hospitalares ao ano no mundo. O uso de betabloqueadores, por exemplo, pode levar à piora dos sintomas da insuficiência cardíaca (IC). Em um estudo foi demonstrado que a hipercalemia secundária ao tratamento da IC foi responsável por aumento na mortalidade de 0,03% para 0,2% e aumento de 0,24% para 1,1% das hospitalizações (Metzger et al., 2006; Jurlink et al., 2004). Portanto, apesar dos avanços na terapia de diferentes afecções cardiovasculares; o tratamento padronizado de todos os pacientes peca por não considerar a variabilidade individual à resposta aos medicamentos, algo já evidenciado na prática clínica e em diferentes estudos já publicados. (Metzger et al., 2006, Jurlink et al., 2004).

Na tentativa de se individualizar o tratamento são utilizados dados relacionados ao fenótipo do paciente, analisando, por exemplo, o peso e a superfície corporal. Porém, como já descrito, há uma variabilidade importante na resposta terapêutica e na evolução clínica mesmo em pacientes fenotipicamente semelhantes.

Diferentes estudos têm sido realizados na busca de opções para identificar fatores associados com o prognóstico e formas de aperfeiçoar o tratamento desses pacientes, afetando dessa maneira a história natural da doença (Howlett et al., 2010, Mcnamara, 2008, Taylor & Ellis, 2002, Rasool et al., 2000, Zhou et al., 1989).

Estudos recentes vêm apontando a importância de se pesquisar os fatores genéticos para se encontrar e combater diversas causas de patologias. Patologias como a displasia arritmogênica do ventrículo direito e formas de cardiomiopatia hipertrófica têm inúmeros estudos publicados descrevendo essa relação (Mcnamara, 2008).

Atualmente, o estudo genômico propõe que para um considerável número de doenças cardiovasculares, a suscetibilidade está relacionada, em parte, aos polimorfismos genéticos, particularmente àqueles relacionados aos receptores de neurotransmissores, dentre outros, os receptores adrenérgicos. Uma vez que a participação e a função dos receptores adrenérgicos têm sido amplamente reconhecidas, muito se tem pesquisado sobre a influência dos polimorfismos desses receptores na regulação cardiovascular em humanos (Nascimento et al., 2012).

Receptores adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos são membros da superfamília de receptores cujo sinal para o interior da célula ocorre via proteína Gs, estes receptores são de natureza proteica, apresentando-se sob a forma de cadeias polipeptídicas, com certa uniformidade na configuração, disposição ou domínios característicos, na extensão da membrana. Uma das configurações mais frequente é aquela representada pelo dobramento do polipeptídeo em sete domínios ou segmentos de aminoácidos, com as regiões hidrofóbicas em forma de α -hélice transmembrana, assumindo no interior da membrana um aspecto serpentiforme. Cada domínio transmembrana do tipo hepta helicoidal consiste de 20 a 30 aminoácidos hidrofóbicos. Os domínios transmembrana encontram-se interligados por três alças hidrofílicas intracelulares (Carvalho et al., 1997).

A fosforilação do receptor ocorre normalmente em sua parte citoplasmática. Além disso, as cadeias polipeptídicas dos receptores apresentam um grupo terminal

amínico extracelular e um carboxílico intracelular (Carvalho et al., 1997), constituindo de 2 a 3% do proteoma humano.

Estes receptores são essenciais na fisiologia celular no local que estão inseridos e participam ativamente dos processos metabólicos que ocorrem nos sistemas pulmonar, circulatório, digestório, renal e cardiovascular estimulando neste último o aumento do batimento cardíaco e sua força de contração e atuando também em seu processo de relaxamento. O mau funcionamento desses receptores pode resultar comumente em fisiopatologias.

A funcionalidade dos receptores adrenérgicos está diretamente ligada à ativação de catecolaminas, tais como: a adrenalina e a noradrenalina que modulam seus processos fisiológicos (Alquist, 1948).

Quando ativados pela adrenalina e noradrenalina em conjunto com dopaminas e outras catecolaminas, compõem o grupo de substâncias atuantes no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP) (González, 2011).

A maior parte das terminações simpáticas pós-ganglionares utiliza a noradrenalina como neurotransmissora, e esta por sua vez é armazenada em vesículas de aspecto granuloso a microscopia eletrônica visto no botão sináptico. Ao se gerar um potencial de ação, ocorre um influxo de cálcio para a terminação nervosa e com isto ocorre a fusão da vesícula com a membrana plasmática com posterior exocitose da noradrenalina na fenda sináptica. Quando liberado na fenda sináptica, este neurotransmissor ativa os receptores adrenérgicos α -ADR e β -ADR da membrana pós-sináptica, isto é, na célula efetora e na pré-sináptica na terminação nervosa (Rang et al., 2012), como mostra a figura 1.

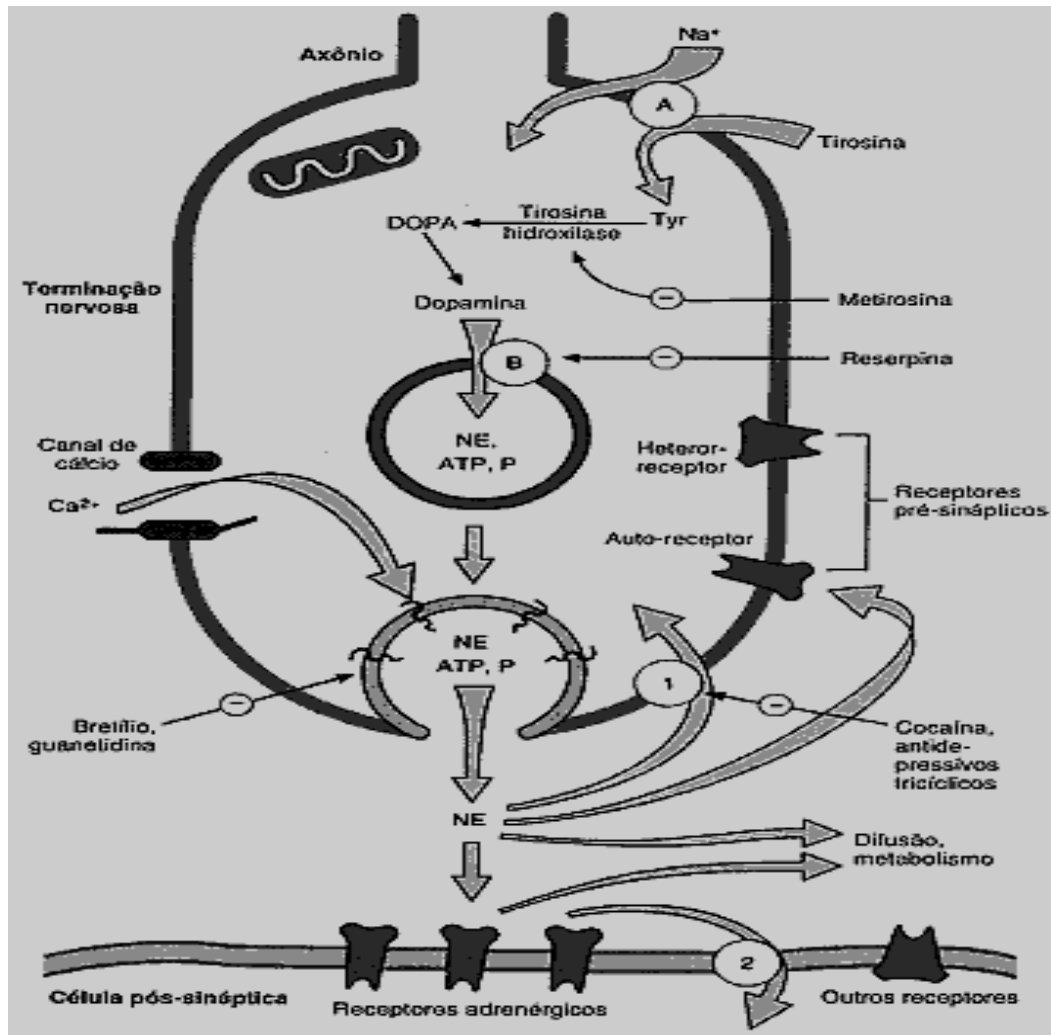


Figura 1 – Ativação dos receptores adrenérgicos através da via de Transmissão Noradrenérgica. (Fonte: <http://www.portaleducacao.com.br>)

A modulação da atividade dos receptores α -ADR e β -ADR é proporcional a resposta de inúmeras estimulações, por exemplo, em todos os tipos de musculatura lisa, exceto a musculatura do trato gastrointestinal, grandes artérias e veia, assim como as arteríolas, contraem-se em resposta à estimulação dos receptores α -ADR 1. A estimulação dos receptores β -ADR causa o relaxamento da maioria dos tipos de músculo liso através do aumento da formação de AMPc, entretanto a estimulação dos receptores β -ADR 1 exerce um poderoso efeito estimulante sobre o coração. No sistema vascular, a vasodilatação mediada por receptores β -ADR 2 é principalmente endotélio-dependente e mediada pela liberação de óxido nítrico. Diante das diferentes interações, entre eles, a do Sistema Nervoso Central e o Sistema Cardíaco acarretam diversas estimulações, por exemplo, aumento do débito

cardíaco, disposição para atividade física, stress e bradicardia (Rang et al., 2012, White et al., 2002).

Os receptores adrenérgicos se dividem em α -ADR (1 e 2) e β -ADR (1, 2 e 3). É importante ressaltar que, órgãos e tecidos adrenérgicamente inervados possuem predominância de um tipo de receptor (Leland et al., 2001).

Os receptores α -ADR 1 estão presentes na membrana dos órgãos efetores pós-sinápticos e são mediadores de efeitos clássicos, como já descrito, na constrição dos músculos lisos, no coração e no fígado, aumentando a força de contração, a glicogenólise e a gliconeogênese. Enquanto os receptores α -ADR 2 estão localizados nos terminais dos nervos pré-sinápticos, nas células beta do pâncreas e nas plaquetas, inibindo a transmissão sináptica, a liberação de insulina e a agregação plaquetária, respectivamente (Rang et al., 2012).

A intensidade da sinalização celular mediada por esses receptores α -ADR depende do tipo de catecolamina que o ativa, expressando uma ordem decrescente de modulação celular. A sensibilidade do receptor α -ADR para a epinefrina é maior ou igual à sua sensibilidade para norepinefrina e em menor sensibilidade para o isoproterenol (Rang et al., 2012).

Os receptores β -ADR possuem três subtipos (1, 2 e 3) e todos estão ligados a uma proteína Gs. Além da sua ocorrência no coração, os receptores β -ADR 1 são também encontrados nos rins, arteríolas, coronárias, músculo esquelético, pulmonares e vísceras abdominais.

Os receptores β -ADR 2 distribuem-se em diversos locais do organismo, entre eles, o sistema geniturinário, o sistema pulmonar, o tecido adiposo, além dos vasos sanguíneos e no coração. Quando os receptores β -ADR 2 estão localizados na parede dos vasos sanguíneos a sua estimulação se associa à vasodilatação, e quando no coração participam do aumento do débito cardíaco e da força de contratilidade coronariana (Atala & Consolim-Colombo, 2007).

Os receptores β -ADR 3 foram localizados nos vasos sanguíneos, e pouco se sabe de sua real importância com relação ao sistema cardiovascular.

A distribuição dos receptores β -ADR no coração ocorre nas seguintes proporções: nos átrios 60-70% de β -ADR 1 e 40-30% de β -ADR 2 e nos ventrículos 70-80% de β -ADR 1 e 30-20% de β -ADR 2. (Leineweber & Brodde, 2004).

A maior eficácia do bombeamento cardíaco ocorre pela interação proteína Gs e receptor β -ADR 1 resultando na melhoria do lusitropismo (diástole) e inotropismo (sístole).

No coração sadio há pouco ou mesmo nenhum receptor β -ADR 1 de reserva, existe exatamente a quantidade necessária para gerar o efeito máximo, de modo que uma redução em seu número resulta invariavelmente em hipossensibilidade cardíaca às catecolaminas.

Embora a população de receptores β -ADR 2 não esteja reduzida, estes receptores também podem exibir desacoplamento como os dos receptores β -ADR 1 em pacientes com insuficiência cardíaca. Estas alterações nos receptores ocorrem exclusivamente no coração, embora os efeitos da descarga simpática ocorram em todo o organismo. Então o coração insuficiente é um órgão misto β -ADR 1 / β -ADR 2, enquanto que o coração normal é predominantemente β -ADR 1.

Sinalização via proteína Gs

Quando um agonista estimula o receptor β -ADR o mesmo se acopla à proteína Gs, proteína esta que é estimulatória e contém três subunidades (α , β e γ), que antes de seu acoplamento ao receptor β -ADR se encontra ligada ao GDP em sua subunidade α . Após a estimulação agonista no receptor a proteína Gs sofre uma mudança conformacional, trocando o seu GDP por um GTP em sua subunidade α , resultando na separação da subunidade α das outras subunidades, induzindo neste processo a ativação de vários mecanismos de transdução de sinal. (Alberts et al., 2010).

A estimulação da proteína Gs ativa a enzima adenilato ciclase, que estimula a produção do AMP cíclico e o acúmulo de AMP cíclico acarreta a ativação da proteína quinase A (PKA).

A (PKA) que é dependente de AMP cíclico acarreta a alteração da função de diversas proteínas intracelulares em sua fosforilação, entre elas, a da via metabólica com eventos de sinalização para a glicogenólise e gliconeogênese e a da via de sinalização para a abertura de canais de cálcio para a ativação de proteínas que atuaram no tecido muscular (Alberts et al., 2010) como mostra a figura 2.

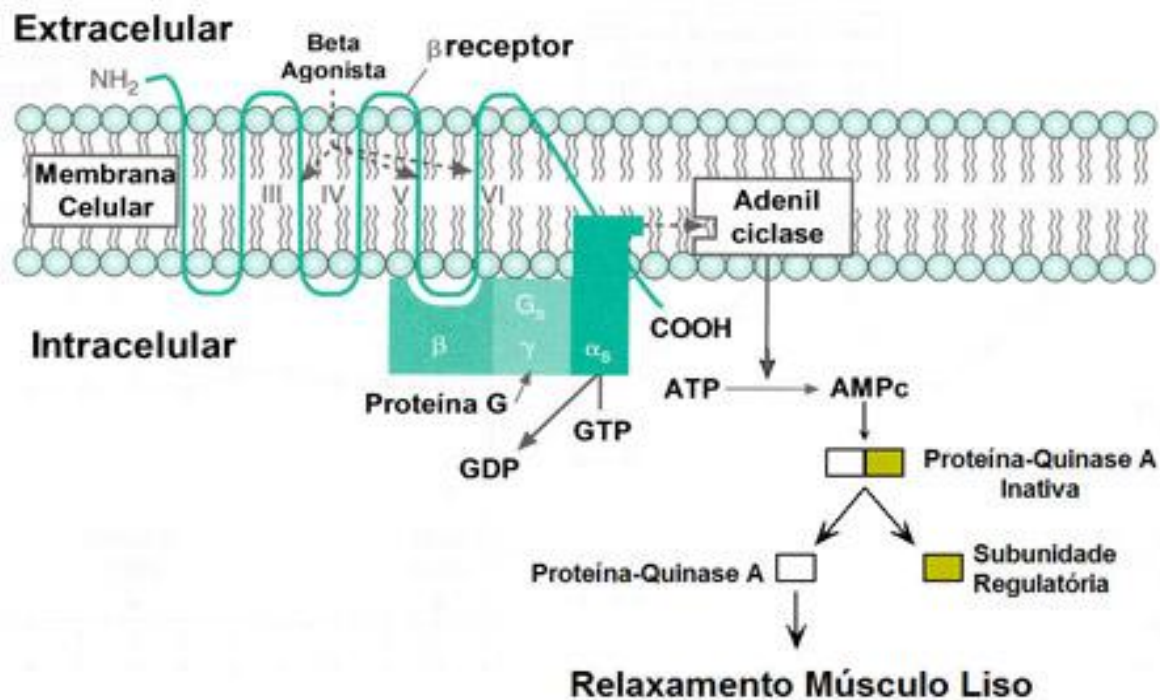


Figura 2 – Modulação da fisiologia celular em resposta a estimulação do receptor β -ADR via proteína Gs; reação em cadeia após a sinalização via proteína Gs com alteração metabólica das células-alvo. (Fonte: <http://www.asma-bronquica.com.br>).

Polimorfismo genético dos receptores adrenérgicos

Muitos genes estão envolvidos na regulação da atividade simpática e o resultado de sua expressão pode gerar uma implicação funcional diferenciada, e muito se tem pesquisado sobre a influência dos polimorfismos dos receptores adrenérgicos na regulação cardiovascular em humanos (Kitsios & Zintzaras, 2010).

Estudos realizados por Paczkowski e colaboradores (2009) descreveram a importância que receptores β -ADR desempenham na regulação da frequência e contratilidade cardíaca, seus estudos ressaltam que a expressão polimórfica e o histórico genético familiar acarretam alteração na fisiologia cardiovascular.

Estudos sobre o sistema adrenérgico vêm fortalecendo a hipótese de que variantes genéticas dos adrenoreceptores centrais ou periféricos têm um papel na fisiopatologia de doenças cardiovasculares como, por exemplo, a Hipertensão Arterial (HAS).

Marquez e colaboradores (2007) investigaram as problemáticas hipertensivas associadas aos fatores genéticos. Eles também descrevem a funcionalidade do sistema de receptores β -ADR e as subdividem em três isoformas e cada forma tem um papel específico. Os receptores β -ADR1 estão bem vinculados à estimulação cardíaca, os receptores β -ADR 2 estão bem vinculados no processo de relaxamento muscular e os receptores β -ADR 3 têm sua ação mais direcionada ao metabolismo lipídico.

Os polimorfismos mais estudados em relação ao sistema adrenérgico são os do gene do receptor beta adrenérgico 1 (β -ADR 1), mais especificamente os polimorfismos Ser49Gly e Arg389Gly (Figura 3).

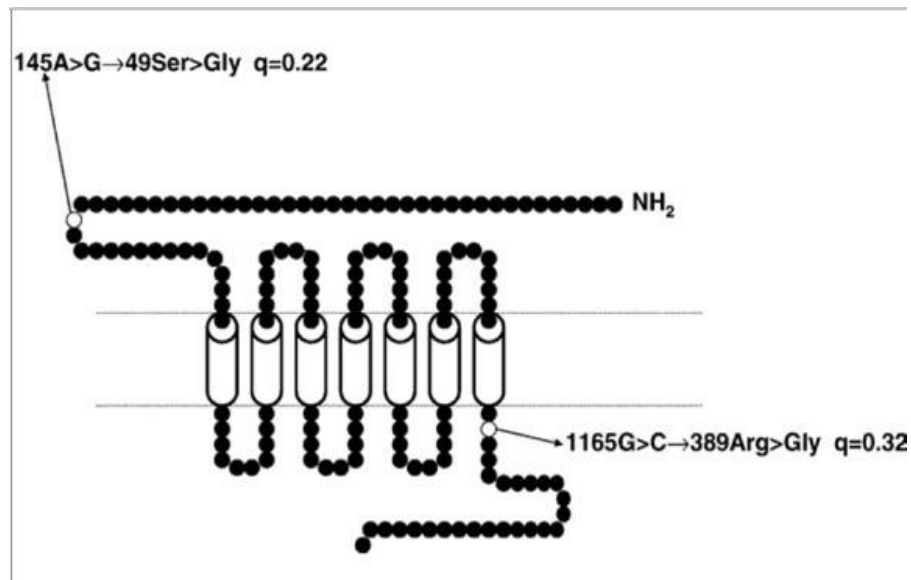


Figura – 3 Localização do receptor β -ADR 1 na membrana plasmática, destacando a ocorrência do polimorfismo do receptor β -ADR 1 no cromossomo 10; com alteração dos aminoácidos serina pela glicina no nucleotídeo 145 na posição 49 N-terminal do receptor β -ADR 1. (Fonte: www.scielo.br/pdf/abc/v94n6/19.pdf).

Os polimorfismos do gene do receptor beta adrenérgico 1 Arg389Gly e Ser49Gly têm sido relacionados à propensão, evolução e desfecho de diversas doenças cardíacas, entre elas, a insuficiência cardíaca (IC). O estudo desses polimorfismos genéticos torna-se um importante passo rumo ao melhor entendimento dessas alterações fisiológicas (Nascimento et al., 2012).

O polimorfismo Arg389Gly, rs1801253, ocorre quando se tem a substituição da variante citosina por guanina, na posição 6251 do gene do receptor β - ADR 1 (10q24-q26) no cromossomo 10 em sua região C-terminal. Com a consequente troca do aminoácido arginina pela glicina na posição 389 na formação da molécula do receptor β - ADR 1, portanto o alelo Arg389 é considerado o tipo selvagem. Existe uma diferença na função do receptor dependendo do tipo de alelo presente. A variante Arg389 quando estimulada por um agonista apresenta maior afinidade pela proteína Gs e maior ativação do sistema de sinalização intracelular dependente da via, induzindo assim a maior ativação da adenil ciclase. Esse polimorfismo foi associado com uma maior atividade basal em pacientes que usavam beta bloqueadores (Small et al., 2002).

O polimorfismo Ser49Gly ocorre devido à substituição da serina (AGC) pela glicina (GGC) no nucleotídeo 145 na posição 49 do cromossomo 10 na região N-terminal do gene receptor β ADR 1, acarretando a alteração da conformação na região transmembrana e intracelular. Essa região é responsável pela ligação com as catecolaminas e participa do processo de dessensibilização dos receptores β -ADR 1. A diminuição da capacidade de realizar a função de dessensibilização foi observada a partir de estudos experimentais, na presença da variável mutante Gly49 (Atala & Consolim-Colombo, 2007). Por outro lado, a variável selvagem Ser49 foi associada à menor mortalidade principalmente em uso de betabloqueadores (Small et al., 2002).

Os receptores adrenérgicos β -ADR 2, cujo gene localiza-se no cromossomo 5, têm papel importante na regulação da função cardiovascular. Estudos recentes demonstraram que os receptores β -ADR 2 apresentam diferentes polimorfismos (Leineweber & Brodde, 2004), um exemplo é o polimorfismo do receptor β -ADR 2 tipo Gln27Glu, em decorrência da troca da arginina pela guanina no gene do receptor β -ADR 2, resultando na substituição do aminoácido glutamina (Gln) pelo ácido glutâmico (Glu) no momento de síntese proteica. O aminoácido glutamina (Gln) é considerado o tipo selvagem e o ácido glutâmico (Glu) é considerado a mutação, sendo o alelo menos frequente na população (Leineweber & Brodde, 2004).

O gene do receptor β -ADR 3 está localizado no cromossomo 8 tendo sua maior expressão no tecido adiposo visceral. Embora os receptores β -ADR 1 e 2 apresentem respostas lipolíticas mais expressivas, estudos mostram sua

contribuição na regulação da taxa metabólica de repouso e lipólise. (Waltson et al, 1995) e sua presença e função no coração ainda está em debate.

Estudos de ancestralidade na análise de polimorfismos em populações humanas

Como visto anteriormente, as principais pesquisas genéticas sobre as DCV são baseadas em estudos de associação, no qual o gene suspeito e que esteja em maior frequência entre pacientes com DCV passa a ser considerado um possível fator causal. Estudo de caso-controle pode ser uma estratégia eficiente na busca de genes causais. Entretanto, sabe-se que frequências diferentes entre amostras nem sempre são relacionadas à genética de determinado fenótipo e sim são provenientes de estratificações populacionais (Tian et al., 2006), pois se um grupo tiver prevalência de determinada doença, esse grupo será super-representado entre os casos se comparado com os controles. Além disso, se um determinado alelo estiver mais frequente nesse grupo esse será erroneamente associado à doença em questão.

Essas associações espúrias são decorrentes da estrutura genética da população em estudo e muitas vezes não podem ser percebidas por informações fornecidas pelo objeto do estudo (Tian et al., 2006). Esse erro é marcante quando populações miscigenadas compõem a amostra, como é o caso da população brasileira. Para tal avaliação, estimativas de ancestralidade tornam-se estratégias importantes para minimizar o efeito de estruturação populacional.

A população brasileira de característica heterogênea resulta de cinco séculos de cruzamentos entre indivíduos de três continentes: os colonizadores Europeus, principalmente representados pelos portugueses, os escravos Africanos e os Ameríndios (Oliveira, 2001).

A miscigenação entre portugueses e Ameríndios começou com a chegada dos primeiros colonizadores ao continente americano. Os casamentos entre os homens Europeus e mulheres indígenas foram encorajados como uma estratégia para crescimento da população e ocupação colonial do país, já os Africanos foram

introduzidos no começo do século XVI, trazidos para o Brasil como escravos para o trabalho na agricultura (Freyre, 2006).

Com relação à imigração Europeia, a abertura dos portos brasileiros às nações amigas, o Brasil recebeu número crescente de imigrantes de várias partes do mundo. Portugal permaneceu a fonte mais importante de migrantes, seguido pela Itália, Espanha e Alemanha (Oliveira, 2001).

A contribuição dos diferentes grupos étnicos para a população brasileira atual pode ser avaliada com base em vários aspectos como: a cultura, a religião e a origem genética das populações atuais.

Atualmente, os intercâmbios migratórios têm sido intensos e os isolamentos populacionais cada vez menos duradouros. Parra e colaboradores (2003) realizaram estudos com amostras populacionais das quatro grandes regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul) e mostraram através de comparação genômica, em um painel de alelos população específicos que a população brasileira, como um todo, é extremamente miscigenada. Em diferentes regiões geográficas, estimativas da contribuição Africana na população urbana varia de 4 a 34%, enquanto a Ameríndia de 0 a 27%. Sendo assim, na população brasileira, não se pode inferir a ancestralidade genética individual simplesmente baseando-se em características físicas, como a cor da pele.

Embora dados das frequências dos polimorfismos dos receptores β -ADR 1 seja bem reportado em diferentes etnias nas populações Europeias e da Americana do Norte e Asiáticas os mesmos ainda não foram bem estudados na população brasileira, principalmente no que diz respeito a esse tipo de caracterização nas diferentes etnias brasileiras. Sendo assim o presente estudo tem por objetivo comparar as frequências alélicas e genotípicas dos marcadores Ser49Gly nas populações do Rio de Janeiro estratificadas por critério de cor da pele ou por ancestralidade genômica.

O efeito da etnia no prognóstico e na resposta terapêutica da DCV já foi evidenciado, embora com achados diferentes. Em uma análise do estudo SOLVD em pacientes usando enalapril, um inibidor da ECA, houve maior mortalidade em negros do que em brancos (13/100 pacientes/ano x 8/100 pacientes/ano) e mais internações hospitalares por IC (12/100 pacientes/ano negros x 10/100 pacientes/ano) (Dries et al., 2002, Exner et al, 2001). Por outro lado, no estudo DIG, em pacientes com digoxina, não houve diferença entre as etnias e em uma análise

de 30.000 pacientes com IC internados, em um ano, a mortalidade em negros era significativamente menor (Mathew et al., 2005, Rathore et al., 2003). A eficácia do tratamento encontrada no estudo V-HEFT com diminuição de mortalidade em pacientes com IC usando nitrato e hidralazina foi impulsionada em grande parte pela parcela do estudo composta por negros e menos evidente em brancos. O mesmo foi evidenciado no estudo AHeFT. No V-HEFT II, o enalapril foi superior à hidralazina e nitrato nesses no subgrupo de brancos (McNamara 2008, Carson et al., 1999).

A influência do padrão étnico em estudos envolvendo pacientes com DCV foi, em sua maioria, avaliada em populações de outros países e, portanto, com perfil diferente dos brasileiros.

A estrutura gênica de uma população é resultante de eventos demográficos, evolutivos ocorridos em um local, a exemplo de migrações e miscigenações. Essa estrutura gênica pode ser estimada a partir da distribuição do padrão de diversidade de marcadores ditos de ancestralidade em diferentes populações (Royal, 2010).

Marcadores de Ancestralidade

A estimativa de ancestralidade pode ser avaliada através do estudo de marcadores haplotípicos encontrados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial, ou através do uso de marcadores de cromossomos autossômicos (Royal, 2010). Tais marcadores são em sua maioria de base única (SNP) bialélicos ou do tipo inserção-deleção (INDEL). Independente do tipo de marcador, todos devem possuir frequências alélicas significativamente diferentes entre grupos populacionais distintos para serem considerados marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (Kersbergen et al., 2009).

Os AIMs oferecem um alto poder de inferência individual da proporção de miscigenação (Hoggart, 2003) e podem ser utilizados como ferramenta de controle para minimizar o efeito de estratificação populacional em estudos de associação ou de genes candidatos em populações miscigenadas (Nassir et al., 2009). A estimativa de ancestralidade também permite avaliar a influência das variações étnicas no desenvolvimento de doenças, bem como auxiliar em estudos que busca identificar se um determinado fenótipo tem influência genética (McKeigue, 2000).

Embora dados da frequência desse polimorfismo seja bem reportado em diferentes etnias nas populações da América do Norte, europeias e asiáticas, os mesmos ainda não foram bem estudados na população brasileira, principalmente no que diz respeito a esse tipo de caracterização nas diferentes etnias brasileiras. O estudo deste polimorfismo auxiliará a explicar se existem diferenças interindividuais na população brasileira e sua real inferência na distribuição da frequência do polimorfismo quanto ao padrão de suscetibilidade às doenças.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo a caracterização da diversidade e do padrão de distribuição do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor β -ADR 1 em uma amostra da população do Estado do Rio de Janeiro, estratificada por critério de cor da pele e por ancestralidade genômica, para aplicações em estudos de Genética Clínica e Populacional.

1.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a diversidade do polimorfismo Ser49Gly com base no padrão de heterozigosidade do locus;
2. Verificar se as frequências gênicas observadas estão de acordo com as esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
3. Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Ser49Gly na População geral do Estado do Rio de Janeiro e estratificada por critério de cor da pele ou por ancestralidade genômica;
4. Comparar a população do Estado do Rio de Janeiro, bem como seus grupos de estratificação por cor da pele e ancestralidade com outras populações mundiais, com base na distribuição da frequência do polimorfismo Ser49Gly.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Esse estudo utilizou um total de 188 amostras de DNA de indivíduos do Estado do Rio de Janeiro não relacionados geneticamente, coletados no Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para a realização das análises, os indivíduos foram agrupados por cor da pele em Negros (NG-RJ) ou não negros (NNG-RJ), conforme autodeclaração e por ancestralidade genética em afrodescendente (AFR-RJ) ou não afrodescendente (NAFRO-RJ), confirmada através da análise de marcadores informativos de ancestralidade SNP do cromossomo Y ou de inserção e deleção (INDELs-AIMs) de cromossomos autossomos.

A amostra de sangue periférico foi obtida com pleno consentimento livre e esclarecido por parte dos indivíduos. O DNA foi preparado a partir de amostras de sangue venoso periférico, mantidas a 4^o C até a extração do DNA, realizada em tubos tipo Vacutainer com anticoagulante EDTA.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UERJ (protocolo nº CAAE:0067.0.228.000-09) e todas as condutas adotadas seguiram rigorosamente as normas de Bioética descritas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

2.2 Extração de DNA

Alíquotas contendo 2mL das amostras foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 15mL. Acrescentou-se 10 mL de tampão de lise de hemácias (TLH) composto de NH₄Cl [155mM], KHCO₃ [10mM] e EDTA [1mM] gelado em cada amostra, homogeneizando manualmente durante 30s com posterior centrifugação de 2.500 rpm durante 5min repetindo esta etapa de 2 a 3 vezes. Foram adicionados 1ml de tampão NLB composto de Tri-Cl [10mM], NaCl [0,4M] e EDTA [2mM] para

ressuspender o precipitado formado, em seguida adicionou-se 30 μ L de solução SDS 10% e 80 μ L pronase (2,0mg/mL) homogeneizando a solução. As amostras foram mantidas em banho a 56 °C por 12-16h. Após este período 300 μ L de NaCl [6M] foram adicionados às amostras e agitadas manualmente e vigorosamente por 20 s. Depois as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min e todo seu conteúdo vertido em um novo tubo tipo Falcon devidamente rotulado, neste novo tubo adicionou-se 5ml de álcool etílico absoluto em temperatura ambiente, agitando o DNA levemente para melhor visualização, descartando após a visualização o álcool do tubo e deixando-o secar. Finalizando com a adição de 500 μ L de TE-4 para melhor dissolução.

2.2.1 Determinação de concentração de DNA

A determinação da concentração de DNA foi realizada por espectrofotometria. A leitura da concentração do DNA foi realizada com o equipamento nanodropp 2000 da Thermo scientific que possui um pedestal ótico com espectro de (190 a 840 nm).

2.2.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para região Ser49Gly

As reações de PCR foram realizadas em uma capela esterilizada por luz ultravioleta, com 50ng de DNA, 2,5mM de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfato), tampão (4X) 50mM de KCl; 4mM de MgCl₂; 10mM de Tris - HCl (pH 8,5), Taq DNA polimerase 1.0 UI, os primers 1 e 2 (2,5 μ l de cada um). O protocolo de reação da PCR, as sequências de primers utilizados e as condições termocíclicas estão nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1- Protocolo da PCR para o polimorfismo Ser49Gly.

Reagentes	Quantidade
Tampão Platinum (4x)	5,0µl
Primers (F/R 10µL)	2,0µl
Enzima Platinum (5U)	0,2µl
DMSO (5% do volume da reação)	1,0µl
Água	7,0µl
DNA [50ng]	5,0µl

Tabela 2- Sequência de primers senso e anti-senso.

Primers	Sequencia de primers
Senso	5'CCGGGCTTCTGGGGTGTTC3'
Anti-senso	5'GGCGAGGTGATGGCGAGGTAGC3'

Tabela 3- Condições utilizadas na termocicladora.

Temperatura	Tempo
94°C	3min
94°C	30s
65°C	30s
72°C	45s
} 40 ciclos	
72°C	7min
4°C	∞

2.2.3 Eletroforese dos produtos da PCR

Os produtos amplificados por reação em cadeia de polimerase eram separados por eletroforese em gel de agarose 2%. Amostras de DNA genômico foram misturadas com tampão de amostra (Glicerol 3%, Azul de bromofenol 0,025%, Xileno cianol 0,025%) e aplicadas ao gel de agarose 2% em tampão TAE 1X [Tris-acetato 40mM (pH 8,0), EDTA 1mM (pH 8,0), Ácido acético 20mM. A eletroforese foi realizada a 4 V/cm em tampão TAE 1X por 30min, as moléculas de DNA foram coradas em brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (256nm) e suas imagens foram registradas no leitor de fluorescência FMBIO II (Hitach, Co).

2.2.4 Análise do produto de amplificação (PCR)

Os produtos de PCR (10µl) foram digeridos em Tampão NEB4 1X (20mM Tris-acetato; 50mM de acetato de potássio; 10mM acetato de magnésio e 1mM de ditiotreitól pH 7.9), acrescido de 1U da endonuclease de restrição Eco 0109I (New England Biolabs, Beverly, Mass) para volume final de 25µl. Após a digestão, o padrão de bandas, característico para cada genótipo observado foi de 564pb para o genótipo homozigoto Ser/Ser; 564, 345 e 219pb para o genótipo heterozigoto Ser/Gly e 345 e 219pb para o homozigoto Gly/Gly. Analisados em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, visualizados por ultravioleta, ou gel de poliacrilamida 8%, corado por prata.

2.3 **Análise estatística**

As análises para estimativa das frequências alélicas e genóticas, diversidade genética, cálculo de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg,

diferenciação e distância genética (FST) entre pares de populações foram realizadas utilizando o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier et al., 2005).

a) As frequências alélicas e genóticas foram estimadas segundo Nei, 1987.

b) Diversidade genética da população: probabilidade de dois genótipos escolhidos ao acaso na população serem diferentes. É equivalente à heterozigosidade esperada para bases de dados diplóides (Nei, 1987), calculada por:

$$H = (1 - \sum i^2) / (n - 1) \quad (1)$$

n= Número total de alelos observados
i= frequência do alelo i

c) O teste para verificar se as frequências alélicas e genóticas encontravam-se de acordo com as esperadas para uma população no EHW foi realizado com base no teste exato de Fisher (Guo & Thomson, 1992).

d) Distância genética entre populações por comparação duas a duas: os valores de FST entre duas populações podem ser usados como medida de distâncias genéticas entre populações, pela aplicação de uma transformação que lineariza a distância com o tempo de divergência. Estes valores de FST são apresentados sob a forma de uma matriz de distâncias.

A distribuição nula destes valores FST, sob a hipótese de inexistência de diferenças entre as populações, é obtida por permutações de genótipos entre populações. O valor de P do teste é a proporção de permutações que levam a valores de FST maiores ou iguais ao observado. Os valores de P são também fornecidos sob a forma de uma matriz.

As amostras do nosso trabalho tiveram suas diferenciações e distâncias genéticas confrontadas com outras populações mundiais para melhor compreensão da distribuição do polimorfismo Ser49Gly na população do Estado de Rio de Janeiro. Segue abaixo a lista das populações mundiais utilizadas em nosso trabalho na tabela 4.

Tabela 4 - Populações mundiais cujos dados de frequência do Polimorfismo Ser49Gly foram comparados com os dados do Rio de Janeiro na análise de diferenciação e distância genética.

Estudos	População	N
Santos K. <i>et al.</i> , 2012	Negra e não negra (Brasil)	188
Kunik D. <i>et al.</i> , 2010	Negra e Não negra (Estados Unidos)	165
Ramu P. <i>et al.</i> , 2010	Indiana	533
WANG. L, 2010	Chinesa	898
NCBI (rs 48292429)	Negra, Hispânica e Ilha do Pacífico (EUA)	202

(n) número de indivíduos

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra

O polimorfismo Ser49Gly foi analisado a partir de uma amostra de 188 indivíduos do sexo masculino da população do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, estratificada por cor da pele em negros (NG_RJ) ou não negros (NNG_RJ), de acordo com a autodeclaração. Do total dos 188 indivíduos, 142 foram agrupados por ancestralidade em afrodescendentes (AFR_RJ) ou não afrodescendentes (NAFR_RJ). A tabela 5 mostra as características da amostra e dos grupos estudados.

Tabela 5- Características da amostra de acordo com os respectivos grupos analisados para o polimorfismo Ser49Gly.

Cor da Pele	<i>n</i>	Média de Idade
NG_RJ	86	32
NNG_RJ	102	36
<i>N</i> total	188	
Ancestralidade	<i>n</i>	Média de Idade
AFR_RJ	17	32
NAFR_RJ	125	36
<i>n</i> total	142	

(*n*) número de indivíduos.

3.1.1 Análise dos produtos de amplificação (PCR)

Alíquotas das preparações de DNA das amostras em estudo e também amostra de DNA padrão foram submetidas à reação de amplificação por PCR, utilizando iniciadores para análise do polimorfismo Ser49Gly do gene β -ADR 1, conforme descrito na metodologia. Os produtos de amplificação foram observados em gel de agarose 2%. A figura 4 mostra os produtos de amplificação obtidos a partir de 7 amostras do nosso trabalho.

3.1.2 Análise da genotipagem

3.1.2.1 Genotipagem INDEL

A genotipagem para marcadores de ancestralidade das amostras deste estudo foi realizada por Manta e colaboradores (2012) através de marcadores indels, utilizando o protocolo de PCR multiplex originalmente descrito por Pereira e colaboradores (2009). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese num Analisador Genético 3130 (Applied Biosystems) e os tamanhos dos fragmentos dos alelos foram determinados automaticamente usando software GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems).

3.1.2.2 Genotipagem SNP de cromossomo Y

A genotipagem para marcadores de ancestralidade (SNP de cromossomo Y) das amostras deste estudo foi realizada por Silva e colaboradores (2006), utilizando a técnica de minisequenciamento por SNApShot conforme descrito por Brión e colaboradores (2005). Os produtos do minisequenciamento foram separados por eletroforese num Analisador Genético 310 (Applied Biosystems) e a presença das

mutações foram determinados automaticamente usando software GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems).

A informação da ancestralidade das 142 amostras foi obtida a partir da análise de marcadores INDELS de cromossomos autossômicos (Manta et al., 2012, Pereira et al., 2011) ou SNP de cromossomo Y (Silva et al., 2006). Para o presente estudo após o levantamento da ancestralidade, as amostras foram divididas nos grupos Afrodescendentes (AFR_RJ) e não afrodescendentes (NAFR_RJ).

Com base nos marcadores INDELS, a caracterização dos indivíduos classificados como afrodescendentes, isto é, que apresentavam majoritariamente herança africana (AFR_RJ) se relacionam com o fato de apresentarem carga genética ancestral africana maior ou igual a 60% (Hoggart et al., 2003; Rosenberg et al., 2003) e indivíduos com carga genética ancestral africana menor que 60% foram arrolados no grupo NAFR_RJ.

Com base nos marcadores SNP de cromossomo Y, a caracterização do indivíduo com ancestralidade africana, se relacionou com o fato do mesmo ter sido classificado no haplogrupo subsaariano E3a, ou seja, apresentando a mutação M2 (Silva et al., 2006). Indivíduos arrolados no presente estudo, desprovidos da mutação M2 foram incluídos no grupo NAFR_RJ.

Após amplificação dos marcadores do gene do polimorfismo Ser49Gly do receptor β -ADR 1 e o levantamento sobre a ancestralidade das amostras do nosso trabalho, as mesmas foram digeridas com a utilização da enzima de restrição *Eco0109I* para a análise do polimorfismo do nosso trabalho. As figuras 5 e 6 mostram o padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de agarose 2% e poliacrilamida 8%, respectivamente, dos produtos de amplificação digeridos pela enzima de restrição, conforme descrito em material e métodos.

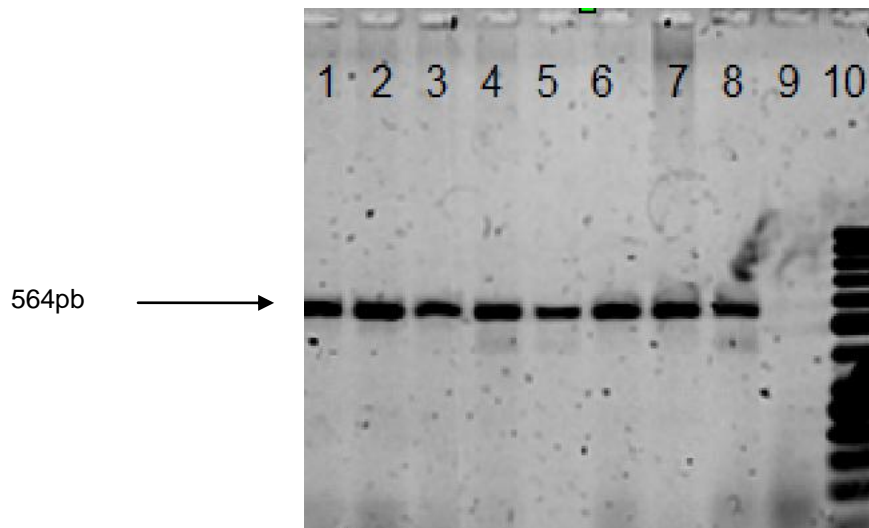


Figura 4 – Produtos de amplificação do gene β -ADR 1 para o polimorfismo Ser49Gly, com visualização do fragmento de 564 pb. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL e visualizados por UV. Colunas 1 a 7: amostras de indivíduos do estudo. Coluna 8: Controle positivo DNA K562 [50ng]. Coluna 9: Controle negativo. Coluna 10: Marcador de tamanho molecular (50 pb).

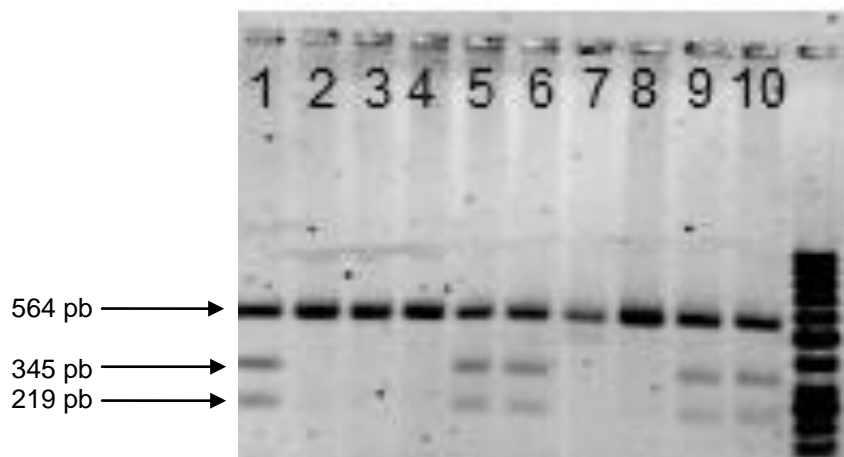


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos produtos de amplificação do polimorfismo Ser49Gly do gene β -ADR 1, digeridos pela enzima *Eco0109I*. Colunas 1 a 10: amostras de indivíduos do estudo. Colunas 1,5, 6, 9 e 10: amostras de indivíduos com genótipo Ser/Gly (564,345 e 219pb). Coluna 2,3,4,7 e 8 amostras de indivíduos com genótipo Ser/Ser (564pb). Coluna 10: Controle positivo K562 (564,345 e 219pb). Coluna _: Marcador de tamanho molecular (50 pb).

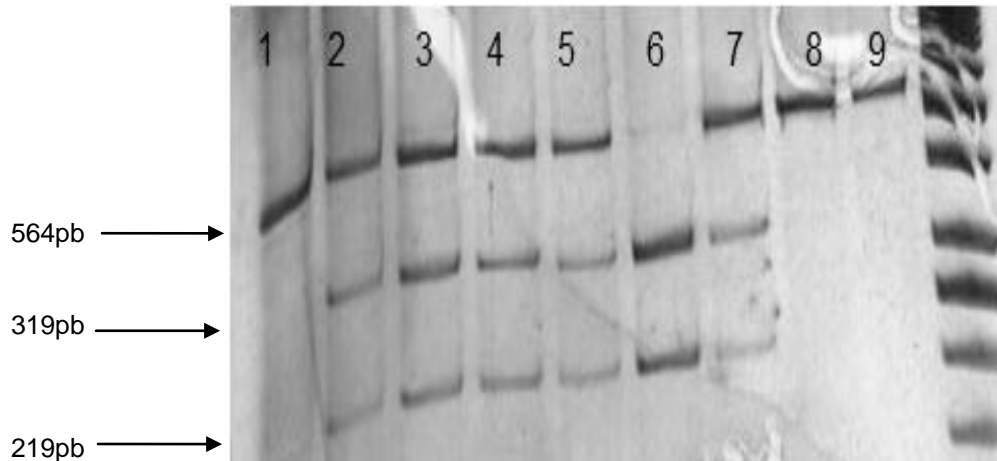


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos de amplificação do polimorfismo Ser49Gly do gene ADBR1, digeridos pela enzima *Eco0109I*. Colunas 1 a 9: amostras de indivíduos do estudo. Colunas 1,8 e 9: amostras de indivíduos com genótipo Ser/Ser (564 pb). Coluna 2,3,4,5 e 7 amostras de indivíduos com genótipo Ser/Gly (564,345 e 219 pb). Coluna 6 amostra de indivíduo com genótipo Gly/Gly (345 e 219 pb). Coluna _: Marcador de tamanho molecular (50 pb).

3.2 Estudo populacional

Os resultados de frequências alélicas e genóticas, a diversidade genética, heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e o valor de significância (p-value) para o Equilíbrio de Hardy-Wenberg (EHW) do polimorfismo Ser49Gly do gene ADBR1 na amostra da população do Estado do Rio de Janeiro e também na amostra agrupada por ancestralidade e cor da pele são mostrados nas tabelas 6 e 7.

3.2.1 Diversidade Genética do marcador Ser49Gly

A análise de diversidade desse marcador na população estudada foi calculada com base na estimativa da heterozigosidade média esperada. Os valores de heterozigosidade variaram de 0,25 a 0,50 e de 0,20 a 0,41 nos grupos da amostra estratificada por ancestralidade e por cor da pele, respectivamente (tabelas 6 e 7).

3.2.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em relação à análise do EHW, não se observou desvio significativo da distribuição genotípica desse marcador ($p > 0,05$) na amostra geral do Rio de Janeiro ($n=188$) nem após a estratificação por ancestralidade ($n=142$) como mostra as tabelas 6 e 7.

3.2.3 Análise das frequências alélicas e genotípicas

A distribuição dos alelos a partir dos 188 indivíduos da população geral do Rio de Janeiro mostra uma frequência de 80,30% e 19,70% para o alelo selvagem Ser49 e mutado Gly49, respectivamente. Esse mesmo padrão foi observado para os demais subgrupos analisados, estratificados seja por ancestralidade (Tabela 6) ou por cor da pele (Tabela 7).

Tabela 6 - Frequências Alélicas e genótípicas da população do Estado do Rio de Janeiro agrupada por ancestralidade.

<u>Frequência Alélica</u>	Agrupamento		
	AC_Anc	AFR_RJ	NAFR_RJ
Número de alelos	284	34	250
Ser49	81,70%	55,90%	85,20%
Gly49	18,30%	44,10%	14,80%
<u>Frequência Genotípica</u>			
Número de genótipos	142	17	125
Ser/Ser	65,40%	11,80%	72,80%
Ser/Gly	33,80%	88,20%	26,40%
Gly/Gly	0,80%	0%	0,80%
Diversidade	0,300204 +/-0,347752	0,508021 +/-0,490149	0,253205 +/-0,315327
Ho	0,35211	0,88235	0,28
He	0,3002	0,50802	0,2532
p-value	0,04621	0,00249	0,30733

Tabela - 7 Frequências Alélicas e genótípicas da população do Estado do Rio de Janeiro agrupada por cor da pele.

<u>Frequência Alélica</u>	Agrupamento		
	AC_RJ	NG_RJ	NNG_RJ
Número de Alelos	376	172	204
Ser49	80,30%	70,90%	88,20%
Gly49	19,70%	29,10%	11,80%
<u>Frequência Genotípica</u>			
Número de Genótipos	188	86	102
Ser/Ser	63,80%	47,70%	77,50%
Ser/Gly	34,60%	50,00%	21,60%
Gly/Gly	1,60%	2,30%	0,90%
Diversidade	0,31699 +/-0,35870	0,41479 +/- 0,42252	0,20863 +/-0,28282
Ho	0,3617	0,53488	0,21569
He	0,31699	0,41480	0,20864
p-value	0,06231	0,00796	1,00000

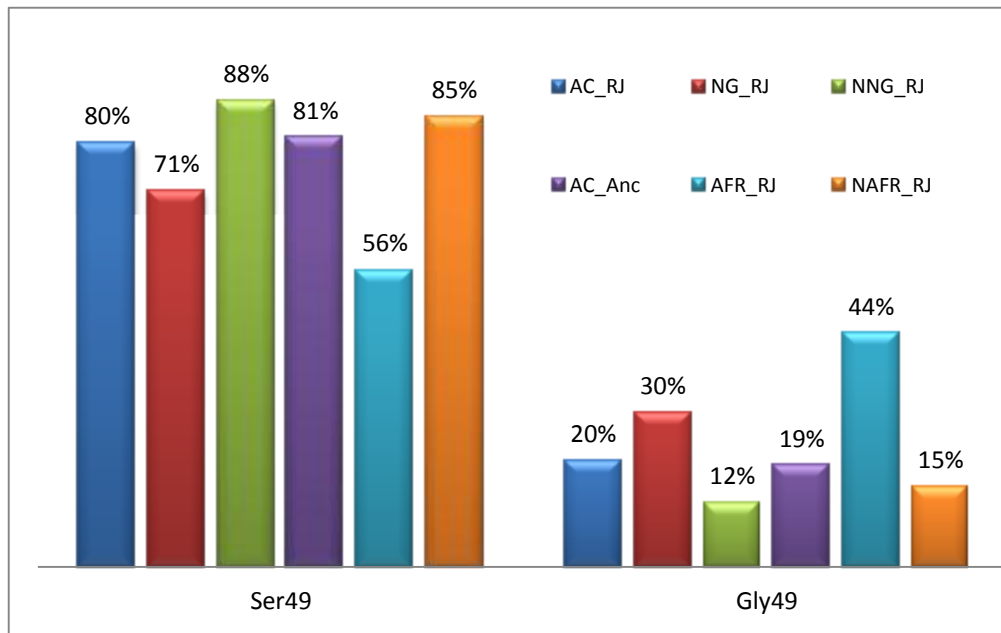


Figura 7- Frequência Alélica de indivíduos negros e não negros agrupados por cor da pele e por ancestralidade do Estado do Rio de Janeiro. Os valores decimais ≥ 5 foram ajustados para mais.

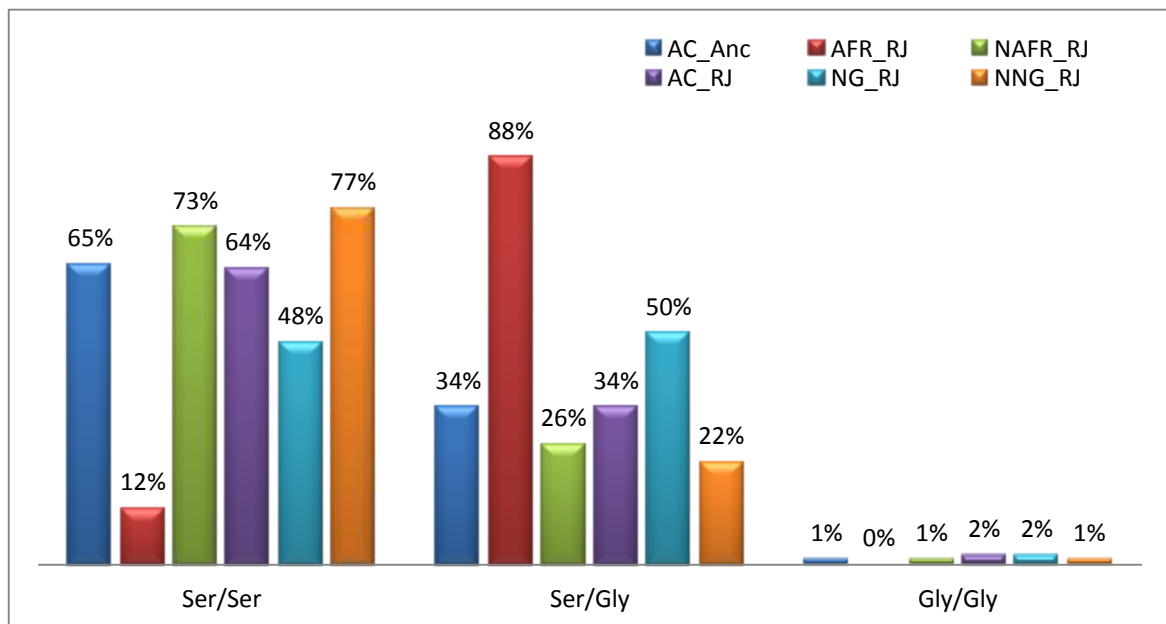


Figura 8 - Frequência Genotípica de indivíduos negros e não negros agrupados por cor da pele e por ancestralidade do Estado do Rio de Janeiro. Os valores decimais ≥ 5 foram ajustados para mais.

3.2.4 Análise de distância genética

A amostra da população do Estado do Rio de Janeiro, assim como, os grupos gerados por estratificação desta por cor da pele ou ancestralidade genômica foram comparados entre si e com outras populações mundiais com base na estimativa do índice de diferenciação e distância genética (F_{st}). Esse índice foi calculado com base na variância da frequência alélica entre pares de amostras, sendo convertidos em uma matriz de distância genética. A matriz com os valores de F_{st} e o nível de significância estatístico da análise para a amostra do Rio de Janeiro e seus agrupamentos é apresentada na tabela 8.

As matrizes com os valores de F_{st} e dos níveis de significância da análise para a amostra do Rio de Janeiro, seus agrupamentos e outras populações mundiais são apresentadas nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

As maiores distâncias genéticas e com valores significativos foram observada entre os grupos de indivíduos afrodescendentes (AFR_RJ) e não negros (NNG_RJ) do Estado do Rio de Janeiro ($F_{st}=0,286$; $p<0,05$), seguido dos grupos de indivíduos afrodescendentes (AFR_RJ) e não afrodescendentes (NAFR_RJ) ($F_{st}=0,222$; $p>0,05$).

Tabela 8 - Matriz de distância genética (Fst) para os agrupamentos ancestrais e por cor da pele da população do Estado do Rio de Janeiro. Abaixo da diagonal são mostrados os valores de p e acima os valores de Fst.

	NG_RJ	NNG_RJ	AFR_RJ	NAFR_RJ	AC_RJ	AC_Anc_
NG_RJ	0,000	0,085	0,033	0,055	0,020	0,028
NNG_RJ	0,000	0,000	0,286	0,000	0,018	0,012
AFR_RJ	0,040	0,000	0,000	0,222	0,140	0,159
NAFR_RJ	0,000	0,385	0,000	0,000	0,004	0,000
AC_cor	0,006	0,014	0,000	0,112	0,000	0,002
AC_Anc	0,002	0,042	0,000	0,257	0,671	0,000

As populações estão representadas pelas siglas: (NG_RJ) população negra, (NNG_RJ) população não negra, (AFR_RJ) população afrodescendentes, (NAFR_RJ) população não afrodescendentes (AC_RJ) população total de negros e não negros e (AC_Anc) população total de afrodescendentes e não afrodescendentes.

Tabela 9 - Matriz de distância genética (Fst) para os agrupamentos ancestrais e por cor da pele da população do Estado do Rio de Janeiro e de outras populações mundiais.

	NG_RJ	NNG_RJ	AFR_RJ	NAFR_RJ	AC_RJ	AC_ANC	CH1	USA	AFR_USA	HIS_USA	PAC_USA	NNG_USA	NG_USA
NG_RJ	0,000												
NNG_RJ	0,091	0,000											
AFR_RJ	0,008	0,237	0,000										
NAFR_RJ	0,056	0,004	0,167	0,000									
AC_RJ	0,019	0,017	0,089	0,002	0,000								
AC_ANC	0,031	0,008	0,114	0,004	-0,005	0,000							
CH1	0,228	0,010	0,439	0,036	0,082	0,065	0,000						
USA	0,076	0,006	0,204	0,006	0,009	0,002	0,024	0,000					
AFR_USA	0,007	0,039	0,031	0,011	0,010	0,005	0,149	0,025	0,000				
HIS_USA	0,062	0,015	0,179	0,013	0,003	0,005	0,014	0,014	0,017	0,000			
PAC_USA	0,172	0,019	0,403	0,042	0,074	0,063	0,005	0,030	0,133	0,029	0,000		
NNG_USA	0,103	0,010	0,263	0,000	0,025	0,014	0,002	0,004	0,052	0,014	0,010	0,000	
NG_USA	-0,010	0,058	0,017	0,027	0,000	0,007	0,177	0,043	0,018	0,033	0,143	0,070	0,000

NG_RJ - população negra do Estado do Rio de Janeiro; NNG_RJ - população não negra do Estado do Rio de Janeiro; AFR_RJ - população de afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro; NAFR_RJ - população não afrodescendente do Estado do Rio de Janeiro, AC_RJ - população de negros e não negros do Estado do Rio de Janeiro; AC_ANC - população total de afrodescendentes e não afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro; CH1 - população da China; USA - população de diferentes etnias da América do Norte; AFR_USA - população de afrodescendentes da América do Norte; HIS_USA - população Hispânica da América do Norte; PAC_USA - população da Ilha do Pacífico da América do Norte; NG_USA - população negra da América do Norte; NNG_USA - população não negra da América do Norte.

Tabela 10 - Matriz de significância genética (p -value) para os agrupamentos ancestrais e por cor de pele da população do Estado do Rio de Janeiro e de outras populações mundiais.

	NG_RJ	NNG_RJ	AFR_RJ	NAFR_RJ	AC_RJ	AC_ANC	CH1	USA	AFR_USA	HIS_USA	PAC_USA	NNG_USA	NG_USA
NG_RJ	*												
NNG_RJ	0,002	*											
AFR_RJ	0,400	0,008	*										
NAFR_RJ	0,009	0,559	0,018	*									
AC_RJ	0,092	0,080	0,065	0,293	*								
AC_ANC	0,051	0,002	0,004	0,002	0,006	*							
CH1	0,000	0,000	0,004	0,000	0,001	0,000	*						
USA	0,002	0,001	0,004	0,001	0,004	0,282	0,010	*					
AFR_USA	0,546	0,004	0,003	0,004	0,004	0,516	0,000	0,115	*				
HIS_USA	0,034	0,002	0,000	0,002	0,004	0,502	0,144	1,000	0,284	*			
PAC_USA	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003	0,018	0,557	0,077	0,008	0,153	*		
NNG_USA	0,002	0,001	0,004	0,001	0,005	0,132	0,370	0,558	0,044	0,771	0,321	*	
NG_USA	0,585	0,005	0,001	0,005	0,003	0,273	0,000	0,034	0,825	0,109	0,002	0,015	*

NG_RJ - população negra do Estado do Rio de Janeiro; NNG_RJ - população não negra do Estado do Rio de Janeiro; AFR_RJ - população de afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro; NAFR_RJ - população não afrodescendente do Estado do Rio de Janeiro; AC_RJ - população de negros e não negros do Estado do Rio de Janeiro; AC_ANC - população total de afrodescendentes e não afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro; CH1 - população da China; USA - população de diferentes etnias da América do Norte; AFR_USA - população de afrodescendentes da América do Norte; HIS_USA - população Hispânica da América do Norte; PAC_USA - população da Ilha do Pacífico da América do Norte; NG_USA - população negra da América do Norte; NNG_USA - população não negra da América do Norte.

4 DISCUSSÃO

4.1 Marcadores genéticos e frequências alélicas

O estudo de marcadores genéticos possibilita a construção de bancos de dados de frequências alélicas para análises em genética populacional, tendo como uma das aplicações à investigação de características quantitativas em estudos de associação (Salazar-Florez et al., 2009).

Populações que apresentam diferenças entre grupos de indivíduos podem apresentar diferenças nas frequências alélicas, representando tal diferença uma possibilidade de associação espúria entre um marcador e um determinado fenótipo. A interpretação correta dos dados gerados a partir da população em estudo pode diminuir esse tipo de ocorrência (Tian et al., 2006).

Neste trabalho, as frequências do polimorfismo Ser49Gly do gene do receptor β -ADR 1 foram estimadas a partir de uma amostra de 188 indivíduos da população do Rio de Janeiro. As frequências também foram analisadas a partir da estratificação da amostra por critério fenotípico em função do padrão de cor da pele como negros (NG_RJ) e não negros (NNG_RJ) ou por ancestralidade genética, definida pela informação de marcadores de ancestralidade, como afrodescendente (AFR_RJ) e não afrodescendente (NAFR_RJ). As frequências obtidas neste trabalho também foram comparadas com as de outras populações mundiais, obtidas a partir da literatura, com objetivo de avaliar se existem diferenças significativas da frequência do marcador estudado nas diferentes populações analisadas e se o critério de ancestralidade e ou cor da pele são determinantes para o padrão de diferenciação e distanciamento genético.

Inicialmente, procedemos a uma análise de diversidade desse marcador na população estudada, com base no padrão de heterozigosidade. A heterozigosidade observada foi superior a heterozigosidade esperada, podendo ser entendida esta diferença como meramente casual, pois não foi encontrado nenhum desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A distribuição dos alelos a partir da amostra de 188 indivíduos da população geral do Rio de Janeiro revelou que o alelo selvagem Ser49 (80,30%) possui uma frequência aumentada em comparação com o alelo mutado Gly49 (19,70%). Esse mesmo padrão foi observado para os demais subgrupos analisados, estratificados seja por ancestralidade (Tabela 6) ou por cor da pele (Tabela 7).

Estudos realizados em diferentes populações mundiais relacionados à distribuição dos alelos para o marcador Ser49Gly também revelam o aumento da frequência do alelo selvagem Ser49 em comparação com o alelo Gly49 nas populações europeias (Kindermann et al., 2010, Nia et al., 2010, Nieminem et al., 2005, Bengtsson et al., 2001), asiáticas (Ramu et al., 2010, Nonem et al., 2005) e da América latina (Zaroff, 2006) em concordância com os nossos resultados.

Embora o alelo Ser49 seja mais frequente em todas as populações relatadas, para a população afrodescendente (AFR_RJ) a frequência do alelo foi de 55,90%, taxa menor quando comparada a dos outros grupos.

A análise da distribuição dos genótipos na população do Rio de Janeiro, considerando o dado acumulado (AC_RJ) revelou a ocorrência dos três genótipos, com uma maior frequência do homozigoto selvagem Ser49Ser (63,80%), resultado também observado nos agrupamentos não negro (NNG_RJ) e não afrodescendente (NAFR_RJ) (Tabelas 6 e 7). Por outro lado, para os agrupamentos afrodescendente e negro observou-se a diminuição da frequência do genótipo homozigoto selvagem, com o conseqüente aumento da frequência dos genótipos heterozigotos e homozigotos mutados.

No estudo realizado por Ramu e colaboradores (2010) com uma população de indivíduos saudáveis da Índia e com dados compilados de outras populações (China, Japão, México e Suécia) se verificou que a frequência do genótipo Ser/Ser também era aumentada. Além disso, o aumento dos heterozigotos e homozigotos mutados também foi observado na amostra da população mexicana, tal como verificado em nosso resultado.

Resultado semelhante foi visto por Kurnik e colaboradores (2010) ao investigar populações negras e não negras da América do Norte, tendo com parâmetro a cor da pele. Nesse estudo também se identificou na população negra a diminuição do homozigoto Ser/Ser com o conseqüente aumento das variáveis mutadas Ser/Gly e Gly/Gly.

4.2 Distância genética

As populações nunca são puras em um sentido genético. Portanto, definir limites entre indivíduos ou populações com base nesse critério torna-se inadequado. Apesar disso, as populações tendem a formar agrupamentos de acordo com a distância geográfica e ou cultural que há entre elas (Jorde & Wooding, 2004), estando tais agrupamentos sujeitos a fatores, tais como, isolamento, deriva gênica, seleção, migração, que podem influenciar na distribuição dos marcadores genéticos, norteando um padrão de diferenciação entre as populações. Com base nisso, a variação no padrão de distribuição dos alelos entre as populações podem ser utilizadas como uma estimativa da distância genética entre tais agrupamentos (Matioli, 2001).

Neste trabalho o estimador da medida de diferenciação e distância genética utilizado foi o F_{st} , que mede a proporção da variância total das frequências alélicas que ocorre entre subpopulações.

Com base na análise do marcador Ser49Gly, as maiores distâncias genéticas foram encontradas entre os grupos de indivíduos afrodescendentes e não negros do Estado do Rio de Janeiro ($F_{st}=0,286$; $p<0,05$), seguido dos grupos de indivíduos afrodescendentes e não afrodescendentes ($F_{st}=0,222$; $p>0,05$). Em concordância com os achados de alguns trabalhos que observaram que as maiores medidas de distância genética ocorrem entre as populações africanas em relação às não africanas (Jorde & Wooding, 2004).

A análise do cálculo F_{st} revelou também que a menor distância genética foi observada entre os grupos de indivíduos não negros e não afrodescendentes com valores de ($F_{st}=0,000$; $p>0,05$). Por outro lado, o mesmo não pode ser observado para os grupos de indivíduos negros e afrodescendentes, onde se observou distância significativa ($p<0,05$). Esse resultado coloca em discussão o parâmetro cor da pele e ancestralidade em relação à etnia africana. Esses resultados sugerem que existe uma maior concordância entre os dados da amostra estratificada por ancestralidade e cor da pele em relação à herança não africana quando comparada com a herança africana.

Esses resultados também sugerem que o marcador Ser49Gly apresenta uma distribuição que é influenciada pela componente ancestral, validando que o

conhecimento ancestral é uma ferramenta a mais na diminuição do viés observado em estudos de associação em que se pode considerar a ocorrência de falha na caracterização das amostras populacionais.

Vários estudos, baseados nas análises de marcadores genéticos, vêm sendo realizados utilizando bases de dados de populações mundiais na tentativa de se avaliar o padrão das diferentes contribuições ancestrais nessas populações (Bouaziz et al., 2012, Silva-Zolezzi et al., 2010, Salazar-Florez et al., 2009, Silva et al., 2006). O uso da mesma metodologia vem sendo apontado como uma ferramenta refinada para uso em estudos de associação, visando avaliar se existe associação entre estimativas de ancestralidade genômica e patologias específicas, visando diminuir possíveis efeitos de associação espúria. No entanto, o que se verifica na literatura é que um número ainda pequeno de estudos em genética clínica agrega tal metodologia em suas análises.

Diante da impossibilidade de se proceder com uma análise da ancestralidade da amostra, visando diminuir a possibilidade de associação espúria no estudo, uma estratégia seria elaborar um questionário que levasse em conta o conhecimento do indivíduo sobre sua ascendência até pelo menos a segunda ou terceira geração, tal qual visto em estudos de associação na América do Norte (Kurnik et al., 2010). Nesse estudo, o protocolo elaborado tinha a preocupação de filtrar as informações fornecidas por autodeclaração através do conhecimento da linhagem ancestral dos pacientes. Os pesquisadores após realizarem a análise das informações e cruzarem com os dados das amostras populacionais observaram que o viés de seleção continuou elevado, mostrando que as informações obtidas por autodeclaração estavam associadas ao fator sociocultural.

No processo de desenvolvimento da nação Norte Americana, o seu Governo aprovou leis de antimiscigenação, que proibiam qualquer relacionamento interracial, de natureza íntima, entre brancos e membros de outras etnias (Pascoe, 2011). Estas leis perduraram após a independência em muitos dos seus Estados até o ano de 1967. Por esta razão os diferentes grupos étnicos marginalizados, dentre eles os afrodescendentes, buscaram sua autoafirmação no decorrer de sua formação populacional, enaltecendo suas características culturais e físicas, entre elas, a cor da sua pele. Esse posicionamento justificava também a falta de interesse em autodeclarar a ocorrência da mistura de etnias em sua linhagem familiar (Kurnik et al., 2010).

Seguindo um modelo de coleta de dados semelhante, no México, se procedeu um estudo de associação genética, onde a população foi estratificada em grupos de nativos (ameríndios) e de mestiços, através do conhecimento da linhagem ancestral até a terceira geração. Nesse estudo as populações mestiças apresentaram menores valores de distanciamento genético quando comparadas entre si, sugerindo que durante o período colonial estas localidades sofreram um intenso fluxo migratório que acarretou em um grande fluxo gênico nas populações atualmente classificadas como mestiças no México. Entretanto, o mesmo estudo quando comparou a população ameríndia com a população mestiça do México, juntamente com a população de outros continentes, observou-se o aumento da distância genética entre elas (Silva-Zolezzi et al., 2009).

Em outro estudo de associação genética realizado com amostras de cinco populações do México, de diferentes localidades, a população que possuía o maior isolamento geográfico apresentou maior distanciamento genético em relação às demais populações. Este maior distanciamento genético foi justificado em função da ancestralidade ameríndia daquela população, visto que, as demais populações por estarem mais próximas geograficamente apresentaram maiores percentuais de ancestralidade oriundas de outras etnias (Salazar-Florez et al., 2010).

Em nosso trabalho, a população do Estado do Rio de Janeiro estratificada por cor da pele e ancestralidade genética teve suas distâncias genéticas comparadas a outras populações mundias, conforme observado na matriz de distância genética (F_{st}) da tabela 9.

O distanciamento das populações negras ou afrodescendentes dos Estados Unidos da América do Norte em relação à população afrodescendentes (AFR_RJ) deixa evidente a existência da componente ancestral não africana naquelas populações.

As populações não negras (NNG_RJ) e não afrodescendentes (NAFR_RJ) do nosso estudo ficaram próximas das populações miscigenadas de outras populações mundias, indicando que este agrupamento compartilha da ancestralidade não africana.

Esses resultados sustentam a necessidade de maiores estudos para o real conhecimento da participação das outras componentes ancestrais na formação genética da população miscigenada do Estado do Rio de Janeiro e, se possíveis,

que alterações fisiológicas estariam associadas a variável mutada devido a esta contribuição ancestral.

As populações de etnia asiática ficaram isoladas, com a distribuição alélica do polimorfismo do receptor β - ADR1, em conformidade com aquelas observadas na literatura para essas populações (Ramu et al., 2010, Zaroff et al., 2006). Tal resultado evidencia também que a barreira cultural, assim como, a geográfica, são fortes componentes para o padrão de diferenciação do fluxo genético.

4.3 Genética clínica

Com a constatação da diferença no padrão de distribuição dos alelos nas diferentes populações mundias para o marcador de Ser49Gly, levanta-se um questionamento sobre a sensibilidade de resposta dos receptores β -ADR em doenças cardiovasculares em função das diferenças étnicas e se esse conhecimento pode contribuir para a melhor caracterização de possíveis fisiopatologias.

No contexto clínico, alguns estudos com o uso de betabloqueadores foram realizados em pacientes de diferentes etnias com cardiopatias que apresentaram resultados diferenciados em termos de sensibilidade à droga e do tempo para a eficácia do tratamento clínico. Destacamos o estudo com 35 indivíduos saudáveis em diferentes grupos étnicos na Malásia (chineses, indianos e malaios), onde os chineses foram menos sensíveis após os testes de esforço aos efeitos anti-hipertensivos do propranolol em relação aos indianos e malaios (Rasool et al., 2000).

Outros dois estudos que utilizaram as informações ancestrais para o tratamento clínico constataram que para a população negra a eficácia do tratamento com propranolol ocorreu quando a dosagem foi aumentada em relação à população não negra (Johnson, 1993, Johnson et al., 1995), sugerindo que o conhecimento pormenorizado dos indivíduos através da ancestralidade pode aperfeiçoar a condição terapêutica, com a consequente redução do custo do tratamento.

No contexto da análise genética, no estudo realizado por Kurnik e colaboradores (2010) se verificou a associação positiva da variável mutada com o

menor nível de reposta ao tratamento com atenolol tendo como base os resultados de eletrocardiogramas e de testes de área sob a curva (AUC).

Na análise de 144 pacientes brasileiros portadores de insuficiência cardíaca sistólica foi verificada uma associação positiva do polimorfismo Ser49Gly para fibrilação atrial (Nascimento et al., 2012).

Em outro estudo realizado para conhecer as alterações fisiológicas com a administração da droga betabloqueadora butamina, 38 indivíduos saudáveis foram submetidos a testes de frequência cardíaca (ECG), pressão sistólica (SAP) e pressão diastólica (DAP) e verificou-se uma associação negativa do polimorfismo Ser49Gly na fisiologia cardiovascular com uso desse betabloqueador (Kindernamm et al., 2010).

Neieminenn e colaboradores (2006) fizeram um acompanhamento de 890 pacientes, na Finlândia, que apresentavam o polimorfismo Ser49Gly. Os pacientes foram submetidos a teste de esforço para observação do desempenho fisiológico da interação da proteína G com receptores β -ADR 1 e se observou que os pacientes com o polimorfismo apresentaram variação em suas frequência cardíaca.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o marcador Ser49Gly apresenta uma distribuição que é influenciada pela componente ancestral, em função do aumento da variável mutada Gly49 nas populações negras e afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro, validando que o conhecimento ancestral é uma ferramenta a mais para a diminuição do provável viés observado em estudos de associação, principalmente, em populações miscigenadas, onde pode ocorrer falha na caracterização das amostras. Tais evidências, em associação com estudos clínicos, poderão contribuir para uma análise pormenorizada do padrão de suscetibilidade às doenças envolvidas com falhas do mecanismo desse receptor, uma indicação terapêutica adequada, contribuindo assim, com o melhor prognóstico da doença na população.

5 CONCLUSÃO

1. O marcador Ser49Gly utilizado em nosso trabalho apresenta uma distribuição que é influenciada pela componente ancestral.
2. O alelo selvagem Ser49 (80,30%) possui frequência aumentada em comparação com o alelo mutado Gly49 (19,70%) na população geral do Estado do Rio de Janeiro.
3. A análise da distribuição dos genótipos na população do Rio de Janeiro revelou a ocorrência dos três genótipos, com uma maior frequência do homocigoto selvagem Ser49Ser para todos os grupos analisados.
4. Para os grupos populacionais AFR_RJ e NG_RJ observou-se a diminuição da frequência do genótipo homocigoto selvagem, com o conseqüente aumento da frequência dos genótipos heterocigotos e homocigotos mutados.
5. A comparação dos dados da distribuição das frequências do polimorfismo Ser49Gly da população afrodescendente do nosso trabalho com os dados da população da afrodescendente da América do Norte mostrou-se discordante devido a não inferência real dos dados sobre a ancestralidade da população afrodescendente da América do Norte.
6. As maiores distâncias genéticas encontradas foram entre os grupos de indivíduos afrodescendentes e não negros do Estado do Rio de Janeiro, seguido dos grupos de indivíduos afrodescendentes e não afrodescendentes do Estado do Rio de Janeiro.
7. As populações não negras (NNG_RJ) e não afrodescendentes (NAFR_RJ) do nosso estudo ficaram próximas das populações miscigenadas de outras populações mundiais, demonstrando que estes grupos populacionais compartilham majoritariamente da ancestralidade não africana.

8. Este trabalho contribuiu de para a caracterização do polimorfismo Ser49Gly na população Estado Rio de janeiro estratificada por ancestralidade e cor da pele.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **Am J Physiol**, n.153, p.586-600, 1948.
- ALTUNA M. E. et al. Y-cromossômica evidências para um efeito fundador em Mbyá-Guarani índios do nordeste da Argentina. **Hum. Biol.**, v.78, n.5, p. 635-639, 2006.
- ATILA, M.A.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M. Polymorphisms of the adrenergic receptor and the influences on cardiovascular regulation and diseases. **Rev. Bras. Hipertens.**, n.4, p.258-264, 2007.
- BENGTSSON, K. et al. Polymorphism in the β 1-Adrenergic Receptor Gene and Hypertension. **Jaha**, n.104, p.187-190, 2001.
- BOUAZIZ, M. et al. SHIPS: Spectral Hierarchical Clustering for the Inference of Population Structure in Genetic Studies. **Plos One**, v.7, n.10, p. 45685-45704, 2012.
- BRIÓN, M. et al. Y chromosome SNP analysis using the single-base extension: a hierarchical multiplex design. **Methods Mol Biol.**, n.297, p.229-242, 2005.
- CARSON, P. et al. Racial differences in response to therapy for heart failure: analysis of the vasodilator-heart failure trials. Vasodilator-Heart Failure Trial Study Group. **J Card Fail**, v.5, n.3, p.178-187, 1999.
- CARVALHO W. A. et al. Biologia molecular dos receptores farmacológicos e seus sistemas efetores de interesse em anestesiologia. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.47, n.2, p.152-167, 1997.
- DRIES, D.L. et al. Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibition in reducing progression from asymptomatic left ventricular dysfunction to symptomatic heart failure in black and white patients. **J Am Coll Cardiol**, v.40, n.2, p.311-317, 2002.
- EXCOFFER et al. An integrated softwares packages for population genetics analysis. **Evol Bioinform on line**, n.1, p. 47-50, 2005.
- EXNER, D.V. et al. Lesser response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor therapy in black as compared with white patients with left ventricular dysfunction. **NEJM**, n.344, p.1351-1357, 2001.
- FREYRE, G. **Casa-grande & senzala**, 51.ed. São Paulo: Global, 2006.
- GONZÁLEZ, A. et al. Molecular Basis of Ligand Dissociation in β -Adrenergic Receptors. **PLoS ONE**, v.6, n.9, p.23815-23824, 2011.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, n.2, p.361-372, 1992.

HOGGART, C. J. Control of Confounding of Genetic Associations in Stratified Populations. **Am J Hum Genet**, n.72, p.1492-1504, 2003.

HOWLETT, J.G. et al. The 2010 Canadian cardiovascular society guidelines for the diagnosis and management of heart failure update: Heart failure in ethnic minority populations, heart failure and pregnancy, disease management, and quality improvement/assurance programs. **Can J Cardiol**, v.26, n. 4, p.185-202, 2010.

JOHNSON, J.A. Racial differences in lymphocyte beta-receptor sensitivity to propranolol. **Life Sci**, v.53, n.4, p. 297-304, 1993.

JOHNSON, J. A. et al. Racial differences in beta-adrenoceptor-mediated responsiveness. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.25, n.1, p.95-96, 1995.

JORDE, L. B.; WOODING, S. P. Genetic variation, classification and "race". **Nat Genet**, n.36, p. 28-33, 2004

JURLINK, D. N. et al. Rates of Hyperkalemia after Publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. **N Engl J Med**, n.35, p.543-551, 2004.

KERSBERGEN, P. et al. Developing a set of ancestry-sensitive DNA markers reflecting continental origins of humans. **BMC Genetics**, v.10, n.69, n.1471-2156, 2009.

KINDERMANN, M. et al. Functional effects of b1-adrenoceptor polymorphisms on the hemodynamic response to dobutamine with and without b-blocker administration. **Clin Res Cardiol**, n.100, p.129–137, 2011.

KITSIOS, G.; ZINTZARAS, E. Synopsis and data synthesis of genetic association studies in hypertension for the adrenergic receptors family genes: the CUMAGAS-HYPERT database, **Am J Hypertens**, v.33, n.3, p.305-313, 2010.

KNOKE D.; YANG S. **Social network analysis**. 2.ed. Los Angeles: SAGE Publications, 2008.

KURNIK, D. et al. β 1-adrenoceptor genetic variants and ethnicity independently affect response to β -blockade **Pharmacogenet Genomics**, v.18, n.10, p.895–902, 2008.

LEINEWEBER, K.; BRODDE, O. E. B-ABDR2-adrenoceptor polymorphisms: relation between in vitro and in vivo phenoty. **Life Sci**, n.74, p.2803-2814, 2004.

LELAND, W. K. C. et al.(Ed.) **Prostate Cancer**: biology, genetics and the new therapeutics, New Jersey: Humana Press, 2001.

MCNAMARA, D.M. Emerging role of pharmacogenomics in heart failure. **Curr. Opin. Cardiol**, n.23, p.261-268, 2008.

MACKEIGUE, P. M. et al. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. **Hum Ann Genet**, v.64, n.2, p.171-186, 2000.

MANTA, F. et al. Indel markers: genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material. **Forensic Sci. Int. Genet**, v.6, n.5, p.658-661.

MARQUEZ, M. F. et al. The Arg389Gly β 1 -Adrenergic receptor gene polymorphism and susceptibility to faint during head-up tilt test. **Europace**, v.9, p.585-588, 2007.

MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MATHEW, J. et al. Racial differences in outcome and treatment effect in congestive heart failure. **Am Heart J**, v.150, n.5, p.968-76, 2005.

METZGER, I. F. et al. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Medicina**, v.39, n.4, p.515-521, 2006.

NASCIMENTO C. B. et al. Polimorfismos Beta1-Adrenérgico Associados com Fibrilação Atrial na Insuficiência Cardíaca Sistólica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.98, n.5, p.384-397, 2012.

NASSIR, R. et al. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. **BMC Genetics**, v.10, n.39, p.1471-2156, 2009.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press: New York, EUA, 1987.

NIA. A. M. et al. Beta1-Adrenoceptor Polymorphism Predicts Flecainide Action in Patients with Atrial Fibrillation. **PLoS ONE**, v.5, n.7, p.11421- 11429, 2010.

NIEMINEM, T. et al. Effects of polymorphisms in β 1-adrenoceptor and β -subunit of G protein on heart rate and blood pressure during exercise test. The Finnish Cardiovascular Study. **J Appl Physiol**, n.100, p.507–511, 2006.

NONEN, S. et al. No positive association between adrenergic receptor variants of a 2c Del322–325,b1Ser49,b1Arg389 and the risk for heart failure in the Japanese population, **Br J Clin Pharmacol**, v.60, n.4, p.414–417, 2005.

OLIVEIRA, L.L. **O Brasil dos imigrantes**. Rio de Janeiro: J. Zahar, 2001.

PACZKOWSKA, A. Polymorphisms of the beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in Polish patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Kardiologia Pol**, v.67, n.3, p.235-241, 2009.

PASCOE, P. **What Comes Naturally**: miscegenation law and the making of race in America. Oxford University Press Inc: Nova York, EUA, 2011.

PEREIRA, et al. Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing. **PLoS ONE**, v.7, n. 1 p. 29684- 29694, 2011

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.1, p.177-182, 2003.

RAMU, P. et al. Polymorphic variants of β_1 adrenergic receptor gene (Ser49Gly & Arg389Gly) in healthy Tamilian volunteers, **Indian J Med Res**, n.132, p.62-66, 2010.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**, 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RASOOL, A. H. et al. Ethnic differences in response to non-selective beta-blockade among racial groups in Malaysia. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v.38, n. 5, p.260-269, 2000.

RATHORE, S. S. et al. Race, quality of care, and outcomes of elderly patients hospitalized with heart failure. **JAMA**, v.289, n.19, p.2517-2524, 2003.

Rivera ARQ e colaboradores Nº 1. Capítulo 1 Introdução in Souza GMR e colaboradores. **Proteína C-Reativa e doença arterial coronária**. Rio de Janeiro: Revinter, p.1-4, 2004. (Série Monografias Dante Pazzanese)

_____.Nº 1 Capítulo 7. Uso da proteína C-reativa na prática clínica. In: Souza GMR e colaboradores. **Proteína C-Reativa e doença arterial** Rio de Janeiro: Revinter, p.25-29, 2004. (Série Monografias Dante Pazzanese)

_____.Nº 1 Capítulo 8 Comentários e Conclusões. In: Souza GMR e colaboradores. **Proteína C-Reativa e doença arterial coronária** Rio de Janeiro: Revinter, p.33-39, 2004. (Série Monografias Dante Pazzanese)

ROSENBERG N. A. et al. Informatividade de marcadores genéticos para a inferência de ancestralidade. **Am J Hum Genet**, v.73, n. 6, p.1402-1422, 2003.

ROYAL, C.D. Inferring genetic ancestry: opportunities, challenges, and implications. **Am J Hum Gene**, v.86, n. 5, p. 661-673, 2010.

SALAZAR-FLOREZ J. et al. Population Structure and Paternal Admixture and scape on Present-Day Mexican-Mestizos Revealed by Y-STR Haplotypes. **Am J hum biol**, n. 22, p.401–409, 2010.

SCHNEIDER, S. et al. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneve, 2000.

SILVA D. A. et al. Cromossomo Y variação genética na população do Rio de Janeiro. **Am J hum biol**, v.18, n.6, p.829-837, 2006.

SILVA-ZOLEZZI, I. et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, n.21, p.8611-8616, 2009.

SMALL, K. M. et al. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. **N Engl J Med**, n.347, p.1135-1142, 2002.

STURROCK, K.; ROCHA, J. A multidimensional scaling stress evaluation table. **Field Methodos**. n.12, p. 49-60, 2000.

TAYLOR J. S.; Ellis G. R. Racial differences in responses to drug treatment: implications for pharmacotherapy of heart failure. **Am J Cardiovasc Drugs**, v.2, n.6, p.389-399, 2002.

TIAN, C. et al. Accounting for ancestry: Population substructure and genome-wide association studies. **Hum Mol Genet**, n.17, p.143-150, 2008.

WALTON, J. et al. Time of onset of non-insulin dependent diabetes mellitus and genetic variation in the b3-adrenergic-receptor gene. **N Engl J Med**, v.333, n.6, p. 343-447, 1995.

WANG, L. et al. Polymorphisms of b-adrenoceptor and Natriuretic Peptide Receptor Genes Influence the Susceptibility to and the Severity of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in a Chinese Cohort. **J Card Fail**, Vol. 16, n. 1, p. 36-45, 2010.

WHITE, H. L. et al. An evaluation of the β -ABDR-1 adrenergic receptor Arg389Gly polymorphism in individuals at risk of coronary events. **Eur Heart J**, n.23, p.1087-1092, 2002.

ZAROFF J.G. et al. Adrenoceptor Polymorphisms and the Risk of Cardiac Injury and Dysfunction. **Stroke**, n.37, p.1680-1685, 2006.

ZHOU, H. H. et al. Altered sensitivity to and clearance of propranolol in men of Chinese descent as compared with American whites. **N Engl J Med**, v.320, n.9, p. 565-570, 1989.

ANEXO - Lista de Soluções e Tampões Utilizados para Extração de DNA Genômico e Tipagem da População do Estado do Rio de Janeiro

Tampão de lise de Hemácias (TLH)

NH ₄ Cl	155mM
KHCO ₃	10mM
EDTA	1mM

Tampão TE (pH 7,6)

Tris-Cl pH 7,6	10mM
EDTA	1mM

Tampão de lise de núcleo (NLB)

Tris-Cl pH 8,0	10mM
NaCl	0,4mM
EDTA	2mM

Tampão NEB 04

Tris-acetato	20mM
Acetato de potássio	50mM
Acetato de Magnésio	10mM
Ditiotreitol pH 7,9	1mM

Tampão TAE 50X (pH 8,0)

Tris-base	2M
Ácido acético	1M
EDTA pH 8,0	50mM
