

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

KÁTIA CRISTINA ALONSO

**POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS DO SUL DO BRASIL**

Ponta Grossa

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

**POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA  
EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS DO SUL DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Ponta Grossa

2012

Orientadora

Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

Orientador

Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

A454p Alonso, Kátia Cristina  
Polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina em indivíduos hipertensos do sul do Brasil / Kátia Cristina Alonso. Ponta Grossa, 2012.  
118 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Viviane N. Vicari  
Orientador : Prof. Dr. Carlos R. M. Malfatti

1. Hipertensão arterial sistêmica. 2. Gene ECA. 3. Exercícios aeróbicos.  
4. Efeito hipotensor e tratamento medicamentoso. I. Vicari, Viviane N.  
II. Malfatti, Carlos R. M. III.T.

CDD: 575



### Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



#### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 13/2012

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **KÁTIA CRISTINA ALONSO**.

Aos nove do mês de março de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti e da Dr<sup>a</sup> Viviane Nogaroto Vicari, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **KÁTIA CRISTINA ALONSO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti (orientador), Dr<sup>a</sup> Viviane Nogaroto Vicari (Orientadora), Dr. Mario Augusto Cray da Costa e Dr. Rogério Pincela Mateus. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Polimorfismo do Gene da Enzima Conversora de Angiotensina em Indivíduos Hipertensos do Sul do Brasil Submetidos a Treinamento Físico e/ou Tratamento Medicamentoso"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS DO SUL DO BRASIL.

Ponta Grossa, 09 de março de dois mil e doze.

Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Viviane Nogaroto Vicari

Prof. Dr. Mario Augusto Cray da Costa

Prof. Dr. Rogério Pincela Mateus

Dedico este trabalho à minha querida família, ao meu pai, Roberto Ferreira Artoni, pelo incentivo que sempre me deu desde criança, à minha mãe, Claide Domingues Barbosa Artoni, à minha irmã Kelly Cristina de Oliveira por sempre me apoiarem e me aconselharem, principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida, ao meu afilhado amado, Matheus e ao meu avô querido, Mario, infelizmente não está mais entre nós, mas sei que torce por mim onde quer que esteja.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus, pelo caminho que traçou pra mim, sempre me iluminando e me abençoando.

Aos meus pais Roberto e Claide pela confiança e principalmente pela paciência que tiveram durante todo este tempo. Graças à vocês estou finalizando mais uma etapa de minha vida e sei que isto é só o começo de muitas outras que irei enfrentar e com certeza terei vocês ao meu lado sempre para me darem incentivo e apoio.

Aos meus avós Maria e Dercy pelos conselhos e orações e aos meus familiares que eu tanto amo e sinto muitas saudades, vó Zefa, tia Clarice, tio Luís e a Letícia.

À minha querida e dedicada prima Luana, pela ajuda na elaboração de planilhas que facilitaram a interpretação dos resultados clínicos.

Ao Professor Roberto Ferreira Artoni e à minha orientadora Professora Viviane Nogaroto Vicari pela paciência que tiveram para me ensinarem, orientarem e a confiança que depositaram em mim, devido às dificuldades que passamos juntos.

Aos professores Marcelo Ricardo Vicari, Mara Cristina de Almeida Matiello, Fábio André dos Santos, Giovani Favero e Sabrina Grassioli pelo auxílio e explicações, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Mario Augusto Cray da Costa por contribuir na elaboração e no transcorrer desta pesquisa e ao professor Rogério Pincela Mateus pelas contribuições nas análises estatísticas.

À minha querida e grande amiga Tajiana pela companhia nas viagens,

pelo auxílio nas avaliações físicas e nas técnicas laboratoriais, mas principalmente pelos conselhos e experiência de vida que pude compartilhar.

Aos meus amigos de laboratório Priscila, Leonardo e Fernanda pelo companheirismo nas nossas aulas particulares de inglês e principalmente pelos momentos tristes e alegres que passamos juntos. E ao amigo Paulo, que não podia deixar de agradecer pelo auxílio que me deu nas primeiras extrações de DNA e técnicas de PCRs.

À colega de trabalho Luciana, que me ajudou muito no Programa de exercícios físicos aplicados aos participantes do estudo na cidade de Irati-PR.

À querida secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Zoli, nos auxiliando nas declarações, matrículas e documentos solicitados.

Aos meus alunos da academia que sempre foram compreensivos nos dias em que o meu cansaço “falava” mais alto nas aulas de hidroginástica e natação.

Às minhas companheiras de trabalho na academia, Aline, Roseli e Lucimara que algumas vezes precisarem me substituir, mas principalmente a Ir. Edites que compreendeu a minha vontade de trabalhar e estudar ao mesmo tempo, ajustando os meus horários de aulas.



*“Os dois testes mais duros no caminho espiritual são a paciência para esperar o momento certo e a coragem de não nos decepcionar com o que encontramos”.*

**Paulo Coelho**

*“É triste falhar na vida, porém mais triste ainda é não tentar vencer”.*

**Franklin Delano Roosevelt**

*“O professor só pode ensinar quando está disposto a aprender”.*

**Janoí Mamedes**

## Resumo

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada como sendo um distúrbio multifatorial, influenciada por fatores genéticos e ambientais. Os fatores ambientais são os maiores responsáveis pelo crescimento acelerado da doença. O exercício físico é considerado um modelo muito importante não farmacológico de tratamento para a hipertensão. Na verdade, vários genes estão sendo estudados para melhor esclarecer o papel da genética no controle da pressão arterial (PA). Um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) de aproximadamente 287 pares de base no íntron 16, do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi recentemente relacionado com a HAS em diferentes populações. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível associação do polimorfismo da ECA frente ao diagnóstico clínico de hipertensão em uma amostra da população do sul do Brasil, submetidos ao treinamento físico e/ou tratamento medicamentoso. Assim, foi possível avaliar e verificar um efeito positivo sobre o controle da PA, sob a influência de exercício aeróbio de curto prazo (dois meses), em 10 indivíduos hipertensos heterozigotos para ECA (genótipo ID). Além disso, foi avaliada a possível relação entre o polimorfismo inserção/deleção (I/D) com a HAS em um grupo constituído de 78 indivíduos hipertensos, e esses não mostraram relação direta com a doença. Os grupos não apresentaram estruturação genética e as classes genotípicas apresentaram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo D foi menos frequentes e novos alelos foram descritos. É sugestivo que outros mecanismos pós-transcricionais estejam envolvidos na regulação do gene e função da ECA.

Palavras-chave: ECA; Exercícios físicos; Tratamento medicamentoso.

## **Abstract**

The arterial hypertension is characterized as a multifactorial disorder, influenced by genetic and environmental factors. Environmental factors are most responsible for the accelerated growth of this disease. The physical exercise is considered a very important non pharmacological model of treatment for the hypertension. Actually, how much genes are studying for better clarified the real relationship between the genetic and blood pressure (BP) control. The insertion/deletion (I/D) polymorphism, with 287 base pairs at the intron 16, of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene has recently been related with HBP in different populations. Therefore, the aim of the present study was to investigate possible association of the polymorphism of the ACE forward clinical diagnosis of hypertension in a sample population from southern Brazil, submitted to physical training and / or drug treatment. Thus, it was possible to evaluate and verify a positive effect on BP control, under the influence of aerobic exercise short-term (two months) in 10 hypertensive individuals heterozygous for ACE (genotype ID). Furthermore, we evaluated the possible relationship between the polymorphism insertion/deletion (I/D) with hypertension in a group consisting of 78 hypertensive individuals, and these showed no direct relationship with the disease. The groups were not showed genetic structure and the genotypic classes presented out of equilibrium of Hardy-Weinberg. The D allele was minor frequent, and new alleles was descript. It is suggest that other mechanisms post-transcriptions are linked in the gene regulation and ECA function.

**Keywords:** ACE; Physical exercises; Drug treatment.

## Lista de Abreviaturas

**AGT** – Angiotensinogênio

**ANG** – Angiotensina

**ANG I** – Angiotensina I

**ANG II** – Angiotensina II

**AT1** – receptor tipo 1 da Angiotensina II

**AVC** – Acidente Vascular Cerebral

**AVE** – Acidente Vascular Encefálico

**cDNA** – DNA complementar

**D** – Deleção (alelo)

**DCV** – Doenças Cardiovasculares

**DD** – Deleção (genótipo)

**DM2** – Diabetes Mellitus Tipo 2

**ECA** – Enzima Conversora de Angiotensina

**FC** – Frequência Cardíaca

**FC<sub>máx</sub>** – Frequência Cardíaca Máxima

**GRA** – *Glucocorticoid-remediable Aldosteronism*

**HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica

**HDL** – *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)

**I** – Inserção (alelo)

**I/D** – Inserção/Deleção

**IAM** – Infarto Agudo do Miocárdio

**ID** – Inserção e Deleção (genótipo heterozigoto)

**II** – Inserção (genótipo)

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**LDL** – *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Baixa Densidade)

**PA** – Pressão Arterial

**PAD** – Pressão Arterial Diastólica

**PAS** – Pressão Arterial Sistólica

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PTA** – Programa de Treinamento Aeróbico

**RCQ** – Relação Cintura Quadril

**SINE** – *Short Interspersed Nuclear Elements* (Elemento Nuclear Curto Interespaçado)

**SM** – Síndrome Metabólica

**SRA** – Sistema Renina Angiotensina

**UTR** – *Untranslated Region* (Região não traduzida)

**VLDL** – *Very-Low-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Muita Baixa Densidade)

**VO<sub>2</sub>máx** – Consumo Máximo de Oxigênio

## Lista de Figuras

### Introdução

**Figura 1:** Esquema representando os componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, bem como os resultados das diferentes etapas das proteínas envolvidas no processo.....**31**

**Figura 2:** Representação esquemática da localização e da estrutura do gene da ECA. Em **(A)**, um cariótipo masculino evidenciando os pares de cromossomos homólogos 17; **(B)** representação do cromossomo 17, evidenciando a localização do gene da ECA no braço longo, especificamente na região 17q23.3 (seta).....**34**

**Figura 3:** Esquema representativo ilustrando uma provável estrutura da ECA ancestral, a qual originou a ECA somática e a germinativa.....**35**

**Figura 4:** Representação esquemática da ECA não circulante, presa à membrana plasmática das células.....**36**

**Figura 5:** Representação esquemática demonstrando os níveis de concentração de Ang II, resultantes dos três genótipos apresentados para o polimorfismo do íntron 16 da ECA (II, ID e DD).....**38**

## Resultados

### Capítulo I: RESPOSTA AO PROGRAMA DE TREINAMENTO AERÓBICO DE CURTO PRAZO NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL EM PACIENTES PORTADORES DO GENÓTIPO I/D DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

**Figura 1.** Gel de Agarose 1.5% evidenciando o padrão de bandas resultantes das ampliações da região polimórfica I/D do gene da ECA. M: marcador de peso molecular; 1-10: produto da PCR dos indivíduos.....76

**Figura 2.** Gráficos demonstrando a média dos valores de PAS e PAD (em mmHg) de cada indivíduo verificadas 5 minutos antes de iniciar a sessão de exercícios físicos e após 10 minutos da execução das atividades: **A)** Valores de PAS; **B)** Valores de PAD.....76

**Figura 3.** Gráficos demonstrando valores dos exames clínicos verificados antes e 2 meses após execução do PTA. **A)** Valores de Glicemia em jejum; **B)** Valores de Colesterol Total; **C)** Valores de Triglicerídeos.....77

### Capítulo II: INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO I/D DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS

**Figura 1.** Gel de agarose 1,5% evidenciando os perfis encontrados para a amplificação da região polimórfica I/D da ECA nos pacientes hipertensos estudados. **(M)** Marcador de peso molecular; **(ID>)** inserção/deleção variante 600pb/250pb; **(ID<)** inserção/deleção variante 350pb/250pb; **(DD)** deleção 250pb em homozigose; **(II<)** inserção em homozigose variante 350pb; **(II>)** inserção em homozigose variante 600pb.....92

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Considerações Gerais.....	17
1.2 Definição e causas da HAS.....	19
1.3 Panorama Mundial, Brasileiro e Paranaense da HAS e implicações para a morbimortalidade e qualidade de vida da população.....	22
1.4 Conduta clínica e medicamentosa usual no tratamento da HAS.....	25
1.5 Exercícios Físicos no tratamento de Hipertensos.....	27
1.6 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	29
1.7 Bases Estruturais e Genéticas da ECA.....	32
1.7.1 Polimorfismo do Gene da ECA e envolvimento com a PA.....	36
1.7.2 Sequências repetitivas <i>Alu</i> .....	41
1.7.3 Outros genes candidatos.....	43
1.8 Polimorfismo do gene da ECA e tratamento medicamentoso.....	44
1.9 Polimorfismo do gene da ECA e exercícios físicos.....	46
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 Gerais.....	49
2.2 Específicos.....	49
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1 Caracterização dos participantes do estudo.....	50
3.2 Coleta e armazenamento de Sangue e Exames Laboratoriais.....	54
3.3 Extração de DNA Genômico de sangue total.....	55
3.4 Análise genética do polimorfismo I/D presente no gene da ECA.....	55
3.5 Avaliação Biométrica: Teste de Impedância Bioelétrica, IMC, RCQ e PA de repouso.....	56
3.6 Programa de Treinamento Aeróbico (PTA).....	58
3.7 Análises Estatísticas.....	58
<b>4. RESULTADOS</b>	
Capítulo I.....	61
Capítulo II.....	78
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	93
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94
<b>7. ANEXOS</b>	
Anexo 1: Parecer COEP.....	109
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
Anexo 3: Protocolo de Extração de DNA de sangue.....	111



Anexo 4: Gel de Agarose 1.5% na verificação da integridade das amostras de DNA.....	112
Anexo 5: Tabelas de Quantificação das Amostras de DNA.....	112
Anexo 6: Resumo Expandido.....	115
Anexo 7: Certificado.....	117

## **8. APÊNDICES**

Apêndice 1: Tabela de RCQ.....	118
Apêndice 2: Tabela Escala de Borg.....	118

## **1. Introdução Geral**

---

### **1.1 Considerações Gerais**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos componentes da Síndrome Metabólica (SM) e caracterizada como um distúrbio multifatorial, no qual estão presentes tanto fatores genéticos quanto fatores ambientais. Os fatores ambientais são os maiores responsáveis pelo crescimento drástico desta doença, decorrentes de hábitos de vida desregrados, como dieta alimentar hipercalórica, preparação de alimentos com excesso de sódio, sedentarismo e estresse, entre outros. Como medidas preventivas contra esta doença, hábitos de vida saudáveis como uma dieta balanceada e com menor teor de sal, aliados a exercícios físicos regulares, contribuem para a reversão do quadro de hipertensão. Além disso, a administração de medicamentos que agem em alguns sistemas responsáveis pelo controle da pressão arterial (PA), também podem ser utilizados. Porém, não são todos os hipertensos que respondem favoravelmente a estes medicamentos, possivelmente em indivíduos em que a genética teria um peso maior no controle da PA, do que a contribuição dos fatores ambientais.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS (*World Health Organization*, 2000), são considerados hipertensos indivíduos que possuem pressão arterial sistólica (PAS) igual ou maior que 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) igual ou maior que 90 mmHg. Fisiologicamente, ocorre uma maior força exercida pelo sangue contra as paredes vasculares das artérias, devido à vasoconstrição das mesmas.

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) envolve uma cascata de eventos responsáveis pela regulação da PA e controle do volume de líquido extracelular. A renina é uma proteína liberada pelos rins quando os níveis pressóricos estão abaixo do normal, corrigindo assim a queda da PA. Esta proteína circula na corrente sanguínea atuando enzimaticamente sobre o Angiotensinogênio (AGT), liberando um peptídeo com dez aminoácidos, a Angiotensina I (Ang I) (Guyton e Hall, 2011). Na presença da enzima conversora de angiotensina (ECA), ocorre a remoção de dois aminoácidos da Ang I formando assim um peptídeo com oito aminoácidos, a Angiotensina II (Ang II), a qual tem como função a atividade vasoconstritora, elevando assim os níveis pressóricos. A Ang II age sobre os rins fazendo a retenção de sal e água e as glândulas supra-renais secretam aldosterona, aumentando a reabsorção de sal e água pelos túbulos renais (Guyton e Hall, 2011).

Com o objetivo de elucidar a contribuição da genética no processo hipertensivo, há vários genes relacionados à HAS sendo estudados, porém muitos ainda não estão completamente elucidados (Gonçalves, 2002). Alguns desses genes serão apresentados mais adiante em uma sessão especial.

Desta forma, atualmente alguns estudos relacionados à biologia molecular e a farmacogenética estão em processo para um melhor entendimento desta doença, com o objetivo de se obter, por exemplo, tratamentos medicamentosos eficazes para controle da PA (Gonçalves, 2002). Um exemplo de gene relacionado à hipertensão muito estudado é o que codifica a ECA. O gene da ECA está localizado no braço longo do cromossomo 17 e é composto por 26 éxons. Especificamente no íntron 16, são observados

alguns polimorfismos de inserção (I) ou deleção (D) de aproximadamente 287 pares de bases (Rigat *et al.*, 1990). Segundo Moleda *et al.* (2006), níveis aumentados de ECA circulantes, observados em indivíduos com o alelo D, resultam em elevação da PA quando comparado a indivíduos que apresentam o alelo I.

## **1.2 Definição e causas da HAS**

Cada ciclo de contração cardíaca propulsiona aproximadamente 70 mL de sangue ao sistema arterial, abastecendo os órgãos com oxigênio e nutrientes. Este tipo de propulsão transmite a pressão para a parede dos vasos, o qual fornece certa resistência à passagem deste sangue. Desta forma, os níveis de pressão dependem tanto da eficiência da bomba cardíaca (quantidade de sangue que o coração impulsiona) quanto da resistência aplicada pela vasculatura (Guyton e Hall, 2011). A PA é definida pela força exercida pelo sangue na parede vascular, refletindo a interação do débito cardíaco com resistência periférica sistêmica. Por causa destes episódios de ejeção de sangue pelo coração, a pressão nos vasos sofre variações periódicas, sendo mais alta no pico de passagem de sangue (associada à sístole ventricular cardíaca) e menor depois desta passagem (diástole ventricular cardíaca), sendo assim, o pico e a passagem de sangue correspondem a PAS e a PAD, respectivamente (Guyton e Hall, 2011).

A HAS é uma doença multifatorial relacionada a diversas doenças cardiovasculares e renais, o que aumenta muito a morbimortalidade, considerada, desta forma, um grave problema de saúde pública. Segundo

dados de 2008, a população de hipertensos no Brasil era estimada em aproximadamente 15 milhões de pessoas (Rola e Ferreira, 2008). A VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) destaca que a HAS vem aumentando drasticamente nos últimos anos no Brasil e que os tratamentos disponíveis para controle desta doença não estão sendo eficazes para o controle da PA.

De acordo com Sherwood (2011), há duas amplas classes de HAS, a primária e a secundária. A hipertensão primária, conhecida também por essencial ou idiopática, é considerada quando a causa subjacente é desconhecida e representa 90% dos casos de hipertensão. Sabe-se que há uma forte predisposição genética no desenvolvimento da doença, podendo ser agravada ou acelerada por fatores ambientais, como obesidade, estresse, fumo, sedentarismo ou hábitos alimentares. Por outro lado, a hipertensão secundária, ocorre em apenas 10%, nestes casos existe uma causa claramente estabelecida, como por exemplo, anormalidades renais, endócrinas ou neurogênicas. Apesar de intensa pesquisa sobre os diferentes mecanismos envolvidos no controle da PA, as principais causas da hipertensão primária ou essencial ainda não foram bem esclarecidas (Chobanian *et al.*, 2003).

Os fatores genéticos e ambientais relacionados à HAS resultam em um fenótipo final extremamente complexo, influenciado pelo meio ambiente e por múltiplos sistemas regulatórios redundantes como o controle do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (Barreto-Filho e Krieger, 2003). Além disso, indivíduos com o mesmo nível de PA podem não apresentar as mesmas alterações genéticas (Turner e Boerwinkle, 2000), dificultando ainda mais o

diagnóstico e tratamento desta síndrome. O papel da genética nesta síndrome multifatorial pode ser observado em estudos com gêmeos monozigóticos, os quais apresentaram alta taxa de concordância frente à eventos de hipertensão (Feinleib *et al.*, 1977), além de estudos populacionais que demonstraram uma similaridade maior de PA dentro das famílias do que entre diferentes famílias (Longini *et al.*, 1984).

Mutações em genes únicos podem ser observadas em raras formas mendelianas de alteração da PA (Lifton, 1996), nas quais já foram descritos pelo menos 8 genes diferentes causadores de alteração da PA. Um exemplo é a GRA (do inglês, *glucocorticoid-remediable aldosteronism*), uma síndrome de herança autossômica dominante com características de aparecimento precoce de hipertensão no paciente e é devida a produção constitutiva de elevados níveis de aldosterona, mesmo na ausência de estímulo da renina (Sutherland *et al.*, 1966).

Na tentativa de se definir a patogênese da variação da PA entre diferentes indivíduos, estudos epidemiológicos relataram uma série de fatores que podem contribuir com estes quadros, tais como idade, sexo e IMC (Índice de Massa Corporal) (Stanton *et al.*, 1982), além de uma dieta rica em sal, potássio e cálcio (Appel *et al.*, 1997). De acordo com Marte e Santos (2007) há uma correlação entre o perfil lipídico e a PA. Altos níveis de lipoproteínas ricas em colesterol no sangue (hipercolesterolemia) colaboram para a progressão da HAS, ativando o SRA e reduzindo a disponibilidade de óxido nítrico, tendo este último função vasodilatadora fisiológica, diminuindo a PA (Flora-Filho e Zilberstein, 2000). Ainda, níveis pressóricos variáveis podem estar associados

à adiposidade abdominal, à níveis séricos elevados de triglicerídeos no sangue (hipertrigliceridemia), à baixos níveis de HDL (*High Density Lipoprotein*), além de glicemia de jejum alterada (Marte e Santos, 2007). Assim, frequentemente indivíduos hipertensos apresentam níveis elevados de colesterol, obesidade e hipertrigliceridemia, sendo que em alguns casos a glicemia alterada e o desenvolvimento de resistência à insulina podem levar ainda a um quadro de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) no indivíduo (Brett *et al.*, 2000).

### **1.3 Panorama Mundial, Brasileiro e Paranaense da HAS e implicações para a morbimortalidade e qualidade de vida da população**

A HAS, que é vista em pelo menos 15% das populações da maioria dos países desenvolvidos, é um fator de risco importante relacionado às doenças cardíacas, ao acidente vascular encefálico (AVE) ou acidente vascular cerebral (AVC) e a doenças renais. Embora a HAS não apareça como causa isolada entre os óbitos cardiovasculares está associada a 60% dos infartos agudos do miocárdio (IAM) e a 85% do AVE (Boing e Boing, 2007). Números da OMS (2011) indicam que há cerca de 600 milhões de hipertensos no mundo e, ainda de acordo com o Ministério da Saúde (2011), as estatísticas da hipertensão mostram que 7,6 milhões de pessoas morrem por ano, devido às suas complicações como AVC, IAM, entre outras.

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortalidade no Brasil, dentre elas destacam-se o AVE e o IAM, os quais ocorrem em faixas etárias mais jovens que nos países mais desenvolvidos (Rondinelli e Moura-Neto, 2003).

De acordo com o DATASUS (2011), no ano de 2009 as internações por doenças do aparelho circulatório foram de 10,2% no Brasil, 12,8% na região Sul do Brasil, 10,5% na capital paranaense (Curitiba) e 13,9% no município de Ponta Grossa, município situado na Região dos Campos Gerais, estado do Paraná. Em Ponta Grossa, doenças do aparelho circulatório constituem a terceira causa de internações, sendo precedidas apenas por internações por doenças do aparelho respiratório e atendimento às gestantes (parto e puerpério) (DATASUS, 2011). Considerando ainda no ano de 2009, 31,8% das mortalidades no Brasil são decorrentes de doenças relacionadas ao aparelho circulatório, na região Sul este índice chega a 31,9%, na capital paranaense a 30,2% e no município de Ponta Grossa-PR a 30,7% (DATASUS, 2011).

O Ministério da Saúde (2011) mostra que cerca de 30 milhões de brasileiros têm hipertensão e há outros 12 milhões que ainda não sabem que possuem a doença. No Brasil, a HAS é responsável por 300.000 mortes ao ano. Uma pesquisa divulgada recentemente pelo Ministério da Saúde (2011) apontou que a proporção de brasileiros diagnosticados com pressão alta cresceu de 21,5% em 2006 para 24,4%, em 2009. No ano de 2011, a doença já foi relacionada à cerca de 25% da população brasileira, chegando a mais de 50% na terceira idade e, surpreendentemente, a 5% dos 70 milhões de crianças e adolescentes no Brasil. De acordo com dados do Ministério da Saúde (2011), o Rio de Janeiro (RJ) aparece como a primeira capital na proporção de hipertensos, com 28% de casos, seguida de Recife (PE) com 27,6% e com 26,5% em Campo Grande (MS) e São Paulo (SP). A tabela 1 a seguir resume esses dados:



**Tabela 1:** Proporção de hipertensos nas capitais do Brasil e no Distrito Federal.

<b>Localidade</b>	<b>Hipertensos (em %)</b>
Rio de Janeiro (RJ)	28,0
Recife (PE)	27,6
Campo Grande (MS)	26,5
São Paulo (SP)	26,5
Salvador (BA)	26,2
Porto Alegre (RS)	25,4
Belo Horizonte (MG)	25,1
Rio Branco (AC)	24,9
João Pessoa (PB)	24,8
Cuiabá (MT)	23,9
Vitória (ES)	23,3
Natal (RN)	23,0
Aracajú (SE)	22,7
Teresina (PI)	22,0
Maceió (AL)	21,8
Porto Velho (RO)	21,8
Curitiba (PR)	21,5
Distrito Federal	21,2
Goiânia (GO)	21,2
Fortaleza (CE)	20,7
Florianópolis (SC)	19,3
Belém (PA)	18,8
Manaus (AM)	18,6
São Luis (MA)	18,5
Macapá (AP)	16,8
Boa Vista (RR)	15,8
Palmas (TO)	14,9

*Fonte:* Ministério da Saúde (2011)

Embora tenha ocorrido um aumento drástico da população com hipertensão nestes últimos anos, a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) estima que apenas 10% da população faça regularmente acompanhamento médico e siga corretamente as orientações médicas (Ministério da Saúde, 2011).

A PA elevada tem aumentado o risco de DCV para milhões de pessoas no mundo, e há evidências de que o problema vem aumentando (Carretero e

Oparil, 2000a). Alguns estudos relatam projeções para o ano de 2025, os quais apontam que o quadro de HAS irá se agravar, alcançando neste ano um total 1,56 bilhões de pessoas, representando cerca de 29,2% da população (Boing e Boing, 2007).

#### **1.4 Conduta clínica e medicamentosa usual no tratamento da HAS**

A disponibilidade de estratégias de tratamento mais eficazes, como o uso de anti-hipertensivos, reduzirão globalmente o risco de DCV e, assim, sua morbidade e mortalidade (Carretero e Oparil, 2000b).

De acordo com VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) há as seguintes classes de anti-hipertensivos disponíveis para uso clínico: *i)* inibidores adrenérgicos, dentre eles: os agonistas alfa-2 (ação central), os bloqueadores beta-adrenérgicos (betabloqueadores) e os bloqueadores alfa-1 adrenérgicos (alfabloqueadores); *ii)* vasodilatadores diretos; *iii)* bloqueadores dos canais de cálcio; *iv)* inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs); *v)* bloqueadores do receptor tipo 1 (AT1) da Ang II (BRA II) e *vi)* inibidor direto da renina. Um dos pontos mais importantes hoje no tratamento da HAS envolve a regulação da atividade da Ang II e o uso de inibidores de ECA para o controle de doenças cardíacas (Dell'Italia *et al.*, 2002).

Em geral, os diuréticos agem diminuindo o volume extracelular, devido seus efeitos diuréticos e natriuréticos. Especificamente, os inibidores adrenérgicos têm função de ação central estimulando os receptores alfa-2 adrenérgicos, os quais são receptores pré-sinápticos e agem no sistema nervoso central, reduzindo o tônus simpático. O mecanismo anti-hipertensivo

dos betabloqueadores envolve diminuição inicial do débito cardíaco, redução da secreção de renina, readaptação dos barorreceptores e diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas. Os alfabloqueadores apresentam efeito hipotensor discreto a longo prazo, têm a vantagem de propiciar melhora discreta no metabolismo lipídico e glicídico e nos sintomas de pacientes com hipertrofia prostática benigna, portanto devem ser associados com outros anti-hipertensivos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Os Vasodilatadores diretos atuam sobre a musculatura da parede vascular, promovendo relaxamento muscular com consequente vasodilatação e redução da resistência vascular periférica, e são utilizados em associação com diuréticos e/ou betabloqueadores. Bloqueadores dos canais de cálcio ou antagonistas dos canais de cálcio decorrem da redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. Os IECAs inibem a ECA, bloqueando a conversão da Ang I em Ang II no sangue e nos tecidos, enquanto que o BRA II impede a ação da Ang II por meio do bloqueio específico de seus receptores AT1. O Inibidor direto da renina bloqueia a ação da renina e, conseqüentemente, diminui a produção de Ang II (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Além da alta prevalência, outro fator agravante é que, apesar da grande variedade de medicamentos anti-hipertensivos disponíveis, menos de 40% dos hipertensos tratados têm a PA adequadamente controlada (Meissner *et al.*, 1999), indicando que esta variação individual na resposta à certas drogas possa ser influenciada por fatores genéticos. Arnett *et al.* (2005) afirmam que estudos prévios têm relatado que a resposta da PA para medicamentos anti-

hipertensivos é influenciada pela variação genética do sistema renina-angiotensina-aldosterona, mas não há ensaios clínicos diretos testando se o polimorfismo de inserção/deleção (I/D) modifica a associação entre o tipo de medicação e múltiplos fenótipos cardiovasculares e renais. Porém, sabe-se que o alelo D está associado com o aumento da ativação da renina-angiotensina em algumas populações (McNamara *et al.*, 2001).

Em uma avaliação da relação entre o tratamento com inibidores da ECA e o polimorfismo I/D da ECA, foi constatado um pior prognóstico nos pacientes com a presença do genótipo homozigoto deleção (DD) (McNamara *et al.*, 2004). O tratamento medicamentoso especificamente com os anti-hipertensivos com ação de inibir a ECA permite uma recuperação significativa da variabilidade da frequência cardíaca (FC) para valores próximos ao de indivíduos normais, levando a melhoria da atividade de modulação autonômica e um prognóstico cardiovascular mais satisfatório no manejo da HAS (Menezes Júnior *et al.*, 2004).

### **1.5 Exercícios Físicos no tratamento de Hipertensos**

Certamente, a prática de exercícios físicos é fundamental no tratamento terapêutico de várias doenças e distúrbios metabólicos (Carnevali e Lima, 2009). Adotar um estilo de vida saudável é condição para a prevenção de elevação da PA e indispensável para os indivíduos hipertensos (Leitão *et al.*, 2005). Sendo assim, exercícios físicos regulares são uma das principais medidas, aliados a um estilo de vida saudável, para a prevenção ou tratamento da hipertensão. Porém, de acordo com Bryan *et al.* (2007) apesar de bem

esclarecida a relação entre hipertensão, sedentarismo, morbidade, mortalidade e fatores que interferem num estilo de vida saudável, como a prática de exercícios físicos a longo prazo, não têm sido observados a adoção deste hábito saudável na grande maioria da população. Intervenções efetivas para aumentar a prática de exercícios físicos são extremamente importantes, porém para o desenvolvimento de tais intervenções exige-se a realização de pesquisa básica para identificação dos benefícios dos exercícios físicos a curto e longo prazo e, para isso, se faz necessário à compreensão de aspectos psicológicos, comportamentais, genéticos, fisiológicos e do desenvolvimento e manutenção deste comportamento (Bryan *et al.*, 2007).

A inatividade física vem sendo constatada há muitos anos como uma relação direta com o excesso de peso corporal e às doenças que atribuem ao indivíduo sedentário um alto risco cardiovascular (Ferreira *et al.*, 2005). De acordo com Ferreira *et al.* (2005), estudos epidemiológicos no ano de 1960 já apresentavam uma forte relação do sedentarismo com o risco cardiovascular. Atualmente este papel protetor do exercício físico sobre uma série de doenças, principalmente as metabólicas e cardiovasculares, está muito difundido na literatura científica e leiga (Ferreira *et al.*, 2005).

Sabe-se que o exercício físico traz ao indivíduo hipertenso vários benefícios. Um deles, e considerado o principal, é o efeito hipotensor pós-exercício, reduzindo a PA, diminuindo o débito cardíaco e a resistência vascular periférica, além da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o óxido nítrico, ligado a este efeito hipotensor (Nunes *et al.*, 2009). Além do efeito hipotensor, vários outros efeitos benéficos são atribuídos aos

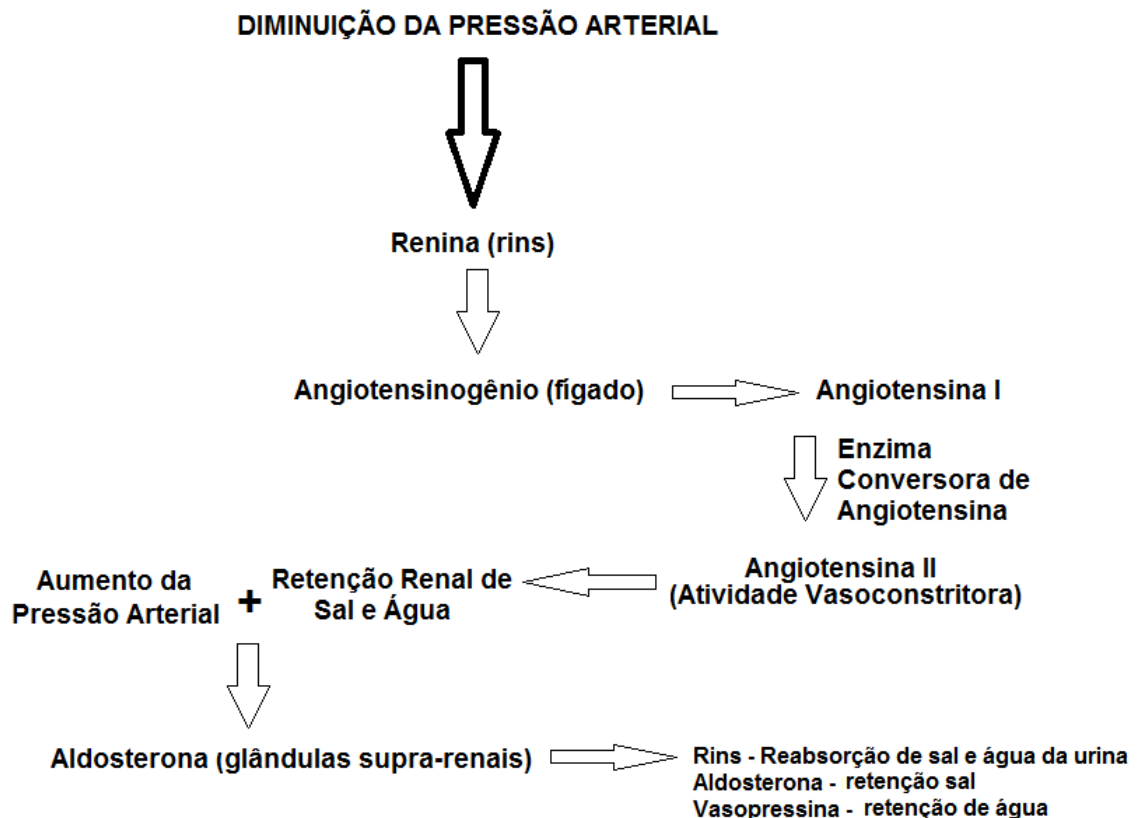
praticantes de exercícios físicos, sendo eles: manutenção do peso corporal; aumento da sensibilidade à insulina; elevação dos níveis de HDL; diminuição do risco de DM2 e DCV; hipertrofia da musculatura esquelética; redução de perda de massa óssea; melhora do sistema imune; além da redução da depressão e ansiedade, determinando um bem-estar geral no indivíduo (Ferreira *et al.*, 2005).

Os exercícios físicos aeróbicos têm uma prescrição mais frequente para os indivíduos hipertensos do que os exercícios anaeróbicos, pois os exercícios anaeróbicos causam a elevação rápida da PA, sendo que nos indivíduos hipertensos estes podem provocar eventos cardiovasculares, como IAM (Ferreira *et al.*, 2005). A VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) prescreve, pelo menos cinco vezes por semana, 30 minutos de exercícios físicos moderados de forma contínua ou acumulada, desde que em condições de realizá-los. Em hipertensos, a sessão de treinamento não deve ser iniciada se a PAS e PAD estiverem superiores a 160 e 105 mmHg, respectivamente. Para os indivíduos hipertensos são recomendados exercícios aeróbicos leves a moderados, ou seja, até 70% da frequência cardíaca máxima ( $FC_{máx}$ ) para exercícios leves e, no caso dos exercícios moderados, entre 70% e 80% da  $FC_{máx}$  ou de pico.

### **1.6 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona**

O SRA trata-se de um conjunto de proteínas envolvidas no controle da PA e estabilidade hemodinâmica (Figura 1) (Feitosa e Carvalho, 2000). Este sistema constitui-se de uma cascata hormonal coordenada, iniciada pela

biossíntese da renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais (Santos, 2007). A renina é liberada por estas células por meio de exocitose, com função de aumentar a reabsorção de sal e água pelos rins, além de agir enzimaticamente sobre o AGT hidrolisando-o em um decapeptídeo inativo, a Ang I (Santos, 2007). Na presença da ECA, produzida no endotélio vascular de vários órgãos, a Ang I é convertida em Ang II, um octapeptídeo biologicamente ativo, tendo como função a atividade vasoconstritora (Santos, 2007), e conseqüentemente, levando a diminuição de bradicinina e de óxido nítrico, componentes responsáveis pela vasodilatação (Feitosa e Carvalho, 2000). A Ang II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos, pois induz a vasoconstrição, elevando assim os níveis pressóricos, sendo então considerada como o principal componente deste sistema (Santos, 2007). A Ang II age também sobre os rins fazendo a retenção de sal e água, além disso, as glândulas supra-renais secretam aldosterona, a qual estimula os rins a reabsorverem mais sódio e água da urina pela ação direta da Ang II, aumentando assim a pressão sanguínea pelo aumento de fluido no sangue (Guyton e Hall, 2011). Contudo, a produção exagerada crônica de Ang II pode resultar em remodelação dos vasos sanguíneos e do coração (Feitosa e Carvalho, 2000).



**Figura 1:** Esquema representando os componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, bem como os resultados das diferentes etapas das proteínas envolvidas no processo.

Quando há a liberação de aldosterona e vasopressina na cascata hormonal, ocorre o boqueio de sódio e água no sistema. Sendo assim, aldosterona é um hormônio que faz a retenção de sódio pelos rins e vasopressina tem a função de reter água pelos rins (Guyton e Hall, 2011).

A atividade plasmática de renina em indivíduos hipertensos deve ser considerada como elevada, e a razão para essa atividade elevada pode ser atribuída, em parte, à estimulação da liberação de renina pela maior atividade simpática (Zanella, 2005). A atividade simpática é modulada por pelo menos três arcos reflexos maiores que regulam o tônus vascular, o débito cardíaco e o volume de sangue, sendo que estes arcos estão ligados aos barorreceptores



arteriais (receptores da pressão hidrostática), aos receptores cardiopulmonares e aos quimiorreceptores arteriais (Nunes *et al.*, 2009). Os barorreceptores arteriais fazem parte de um importante mecanismo pelo qual o sistema nervoso central regula a PA, provocando alterações na atividade vagal e no fluxo simpático para o coração e vasos sanguíneos. Assim, na hipertensão, há uma adaptação dos barorreceptores arteriais reduzindo sua sensibilidade e conseqüentemente apresentando uma deficiência na regulação da PA (Nunes *et al.*, 2009).

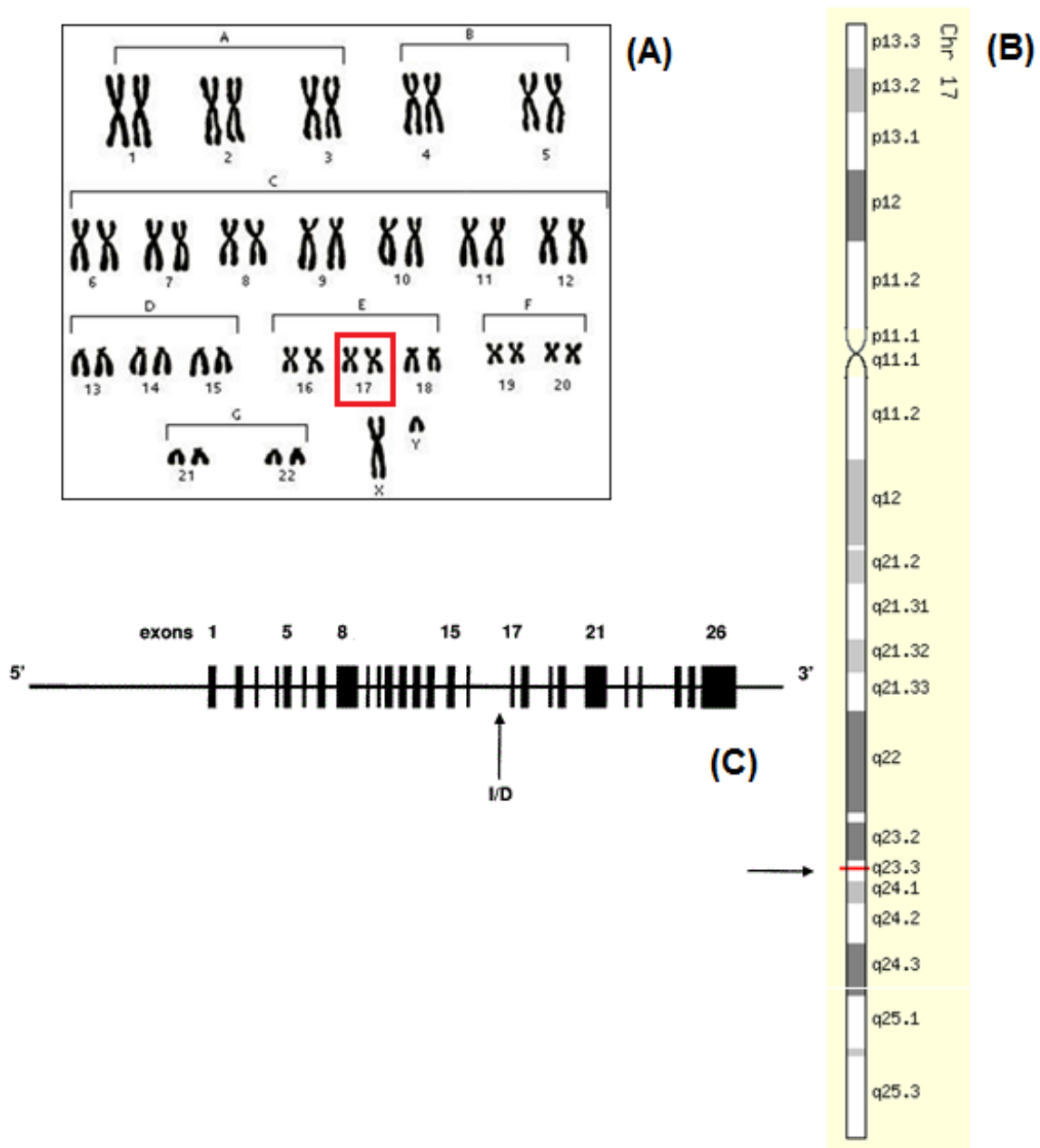
### **1.7 Bases Estruturais e Genéticas da ECA**

A dificuldade de se definir as causas da hipertensão, utilizando-se somente de estudos fisiológicos, motivou a área de pesquisas genéticas para estudo desta patologia. Utilizando-se de ferramentas da biologia molecular, alguns trabalhos iniciaram estudos objetivando um melhor entendimento da participação de genes envolvidos na variação da PA. Estima-se que mais de 15.000 genes sejam expressos em qualquer célula do sistema cardiovascular (Hwang *et al.*, 1997) e que a contribuição específica do elemento genético para controle da pressão sanguínea seja de 30 a 50% (Tanira e Balushi, 2005). Estudos epidemiológicos sugerem que muitas variantes genéticas aumentam o risco de hipertensão (Izawa *et al.*, 2003) e muitos genes hoje em dia são alvos de estudos, como os componentes do SRA, envolvidos na regulação da pressão sanguínea (Lee *et al.*, 1993).

O gene que codifica a ECA é um dos principais alvos de estudo e algumas variantes genéticas apontam sua relação com a hipertensão. A

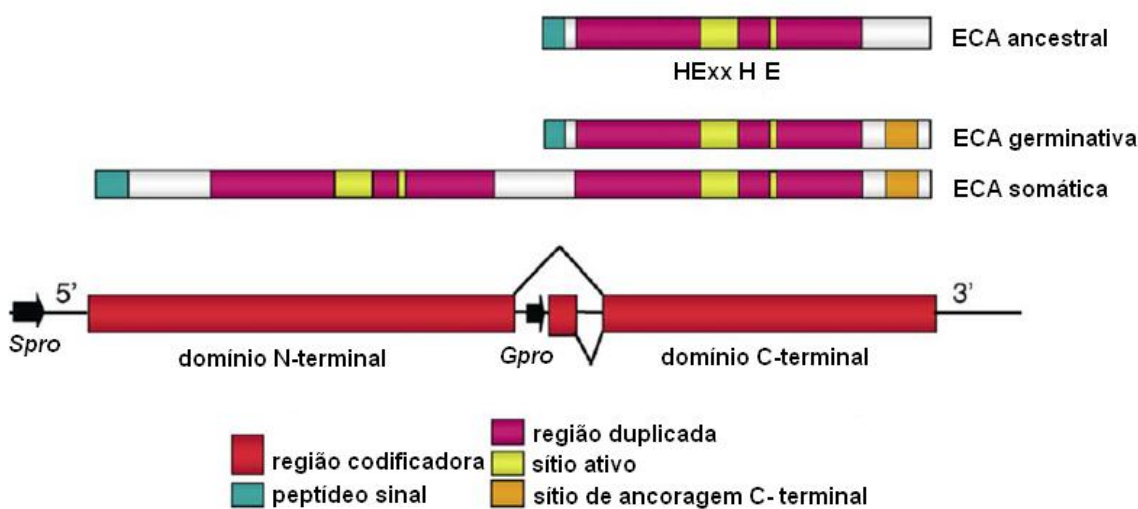
sequência de cDNA da ECA humana foi determinada em 1989 e a sua sequência e estrutura, em 1991 (Corvol *et al.*, 1995). O gene está localizado no braço longo do cromossomo humano 17 (17q23.3), possui 21 quilobases e é composto de 26 éxons, gerando 1306 aminoácidos (Figura 2).

O gene da ECA pode codificar duas isoformas distintas: a somática (peso molecular de 170 kDa, expressa no tecido somático) e a forma germinativa (peso molecular de 100 kDa, expressa somente nas células germinativas dos testículos) (El-Dorry *et al.*, 1982). Estas duas formas resultam da presença de dois promotores diferentes. A ECA somática é transcrita por um promotor presente na região 5' do primeiro éxon, levando a transcrição dos 26 éxons, com exceção do éxon 13, o qual sofre *splicing*. Já a ECA germinativa é transcrita a partir de um promotor presente no íntron 12, sendo formada então pelos éxons 13 a 26 (Howard *et al.*, 1990). Enquanto a ECA somática apresenta dois sítios ativos, a ECA germinativa tem apenas 1 (Jaspard *et al.*, 1993). Diversos estudos já relataram a função da ECA somática, porém a função detalhada da ECA germinativa ainda é desconhecida, embora alguns trabalhos evidenciem sua contribuição para a reprodução masculina (Krege *et al.*, 1995).



**Figura 2:** Representação esquemática da localização e da estrutura do gene da ECA. Em **(A)**, um cariótipo masculino evidenciando os pares de cromossomos homólogos 17; **(B)** representação do cromossomo 17, evidenciando a localização do gene da ECA no braço longo, especificamente na região 17q23.3 (seta) (fonte: *Gene Cards: The Human Gene Compendium, Version 3* (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE>)); **(C)** localização da região polimórfica presente no íntron 16 (seta) (fonte: modificado de Keavney *et al.*, 1998).

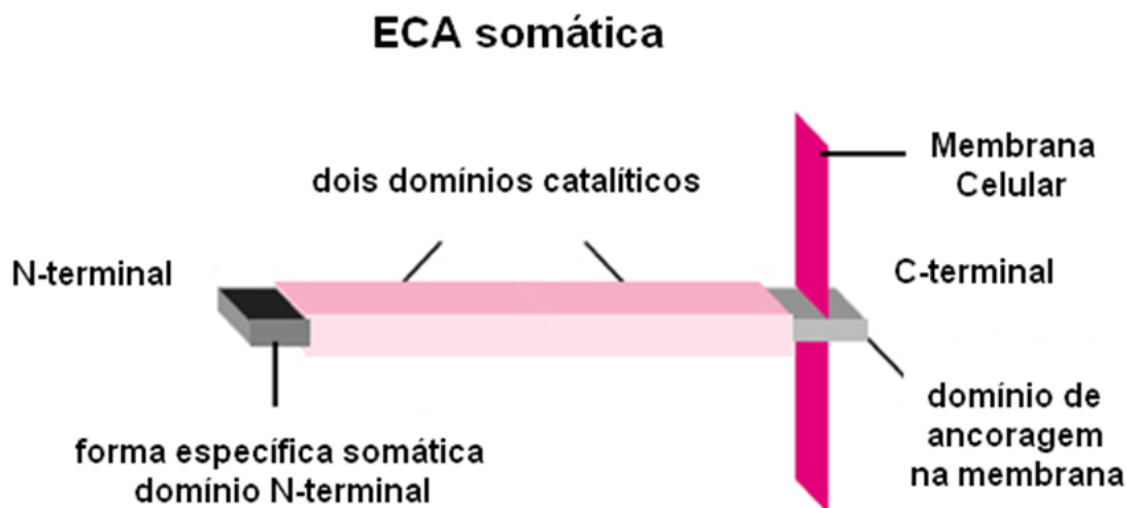
Acredita-se que a estrutura do gene da ECA somática seja resultado da amplificação de um gene ancestral, visto que os éxons 4 a 11 e 17 a 24, os quais codificam dois domínios homólogos da molécula da ECA somática, são muito similares em tamanho e sequência (Hubert *et al.*, 1991) (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema representativo ilustrando uma provável estrutura da ECA ancestral, a qual originou a ECA somática e a germinativa. (Fonte: modificado de Coates, 2003).

Grande parcela da atividade enzimática da ECA está ligada à membrana celular e pode ser encontrada no endotélio vascular, pulmões, rins, coração, cérebro, intestino e glândulas adrenais (Wuyts *et al.*, 1997). Ensaio utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica mostraram que a ECA é fortemente expressa em muitas células endoteliais das arteríolas e pequenas artérias musculares, além de células endoteliais de capilares nos pulmões (Danilov *et al.*, 1994). A ECA é uma proteína integral da membrana plasmática, presa a esta estrutura pelo seu domínio C-terminal, e cujos sítios ativos estão dispostos para o meio extracelular (Figura 4). A forma solúvel circulante da ECA é resultado de uma clivagem proteolítica realizada por uma carboxipeptidase,

nesta região C-terminal que a prende à membrana (entre os aminoácidos Arg663 e Ser664), liberando assim a ECA para a circulação (Zisman *et al.*, 1998; Turner e Hooper, 2002;).



**Figura 4:** Representação esquemática da ECA não circulante, presa à membrana plasmática das células. (Fonte: adaptado de Niu *et al.*, 2002).

### 1.7.1 Polimorfismos do gene da ECA e envolvimento com a PA

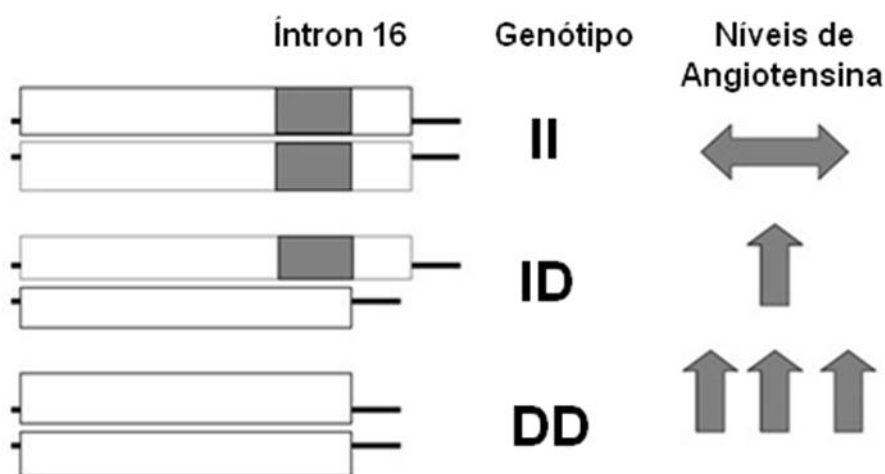
A variabilidade genética é uma característica das populações naturais e encontra suas fontes na recombinação gênica, nas alterações cromossômicas e nas mutações que, em última análise, consistem no modo em que os genes se diversificam em alelos. Como polimorfismo genético deve ser entendido uma forma especial de variação verificada ao nível populacional. De acordo com Ford (1940), duas ou mais formas variantes geneticamente devem ser entendidas como polimórficas se apresentarem frequência maior do que a taxa de mutação para estes alelos. Assim, um loco gênico pode ser dito polimórfico

quando dois ou mais alelos forem verificados e aparecem em pelo menos 1% da população, como observado no sistema sanguíneo ABO, por exemplo. Diferenças alélicas no DNA do gene resultam em variações polimórficas de seus produtos, as proteínas; sendo que vários polimorfismos podem ser encontrados nos genes e podem apresentar ou não algum significado funcional.

O gene da ECA pode ser considerado como polimórfico visto que apresenta três variantes genéticas com frequências significativas e com características populacionais independentes e comparáveis (Niu *et al.*, 2002).

No íntron 16 do gene da ECA, há uma região que pode apresentar uma deleção (alelo D) ou inserção (alelo I) de um fragmento *Alu* de aproximadamente 287 pares de base (pb), sendo a inserção considerada como fenótipo normal no paciente (Rigat *et al.*, 1990). A primeira PCR (*Polymerase Chain Reaction*) baseada na detecção do polimorfismo I/D foi descrita por Rigat *et al.* (1992), os quais selecionaram oligonucleotídeos flanqueadores da região de inserção para genotipagem dos indivíduos. Os genótipos resultantes desta região polimórfica podem ser de três tipos: *i*) homocigoto para inserção (II); *ii*) homocigoto deleção (DD); ou *iii*) heterocigoto (ID). Embora este polimorfismo esteja presente em um íntron, o qual não é expresso, este pode ser considerado funcional. Diversas pesquisas relacionam a presença do polimorfismo no íntron 16 e a sua influência na atividade da ECA no plasma (Rigat *et al.*, 1990), em tecidos (Danser *et al.*, 1995) e em patologias cardiovasculares (Rieder *et al.*, 1999).

Trabalhos relatam que em algumas populações o polimorfismo do gene da ECA pode estar associado à HAS em humanos, sendo que indivíduos apresentando o genótipo DD teriam valores aumentados de PA, o genótipo II teriam PA considerada normal e os heterozigotos ID apresentariam os valores intermediários (Matos, 2006) (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática demonstrando os níveis de concentração de Ang II, resultantes dos três genótipos apresentados para o polimorfismo do íntron 16 da ECA (II, ID e DD). Fonte: adaptado de Biolo e Rohde (2004).

Contudo, alguns trabalhos são controversos ao relacionar o polimorfismo apresentado pelo gene da ECA e a HAS. Alguns autores mostram em seus estudos que o genótipo DD resulta em aumento da PA (Rigat *et al.*, 1990; O'Donnell *et al.*, 1998; Agachan *et al.*, 2003; Rondinelli e Moura-Neto, 2003; Freitas *et al.*, 2007). Por outro lado, outros autores concluem que não há relação alguma entre gene da ECA e a pressão elevada ou mesmo hipertensão nas populações analisadas (Jeunemaitre *et al.*, 1992a; Lindpaintner *et al.*,

1995; Malik *et al.*, 1997; Ohmichi *et al.*, 1997; Crisan e Carr, 2000; Arnett *et al.*, 2005).

Agachan *et al.* (2003) mostraram em seu estudo que o genótipo de DD do gene da ECA foi maior em indivíduos hipertensos do que nos indivíduos controle. Segundo, Rigat *et al.* (1990) indivíduos com o genótipo DD apresentaram maiores níveis circulantes de ECA. Além disso, Rondinelli e Moura-Neto (2003) concluíram que indivíduos que apresentam o genótipo DD exibem aproximadamente o dobro da concentração de ECA circulante, em relação a indivíduos com genótipo II, enquanto que o heterozigoto apresenta níveis intermediários de ECA. O'Donnell *et al.* (1998) encontraram evidências de associação entre o gene da ECA e quadros de hipertensão e variação da PAD em homens, mas não em mulheres. Desta forma, consideraram o gene da ECA como um gene candidato sexo-específico para a hipertensão. Outro estudo em uma amostra de oitenta e dois indivíduos hipertensos e setenta e oito indivíduos normotensos na região amazônica, mostraram que os indivíduos que possuem o alelo D da ECA apresentaram valores mais elevados de PAS e PAD (Freitas *et al.*, 2007). Em um experimento com homens normotensos, Ueda *et al.* (1995) observaram que a injeção de Ang I nos indivíduos acarretava o aumento de Ang II nos mesmos, com maiores níveis de pressão sanguínea em indivíduos DD, comparados com indivíduos II.

Já é bem documentada a associação positiva entre o alelo D e a HAS (Kario *et al.*, 1999; Giner *et al.*, 2000; Agachan *et al.*, 2003), porém este alelo também foi encontrado em estudos envolvendo outros aspectos patológicos. Em um trabalho com 9833 indivíduos, Sayed-Tabatabaei *et al.* (2003)



encontraram uma associação positiva entre o alelo D com eventos de aterosclerose, medindo-se o espessamento da camada íntima e média das artérias carótidas. Estudos relacionam ainda o alelo D com IAM e AVC isquêmico (Maeda *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998). O polimorfismo de I/D do gene da ECA foi ainda associado com a existência de SM em Chineses com DM2, visto que 86,1% dos diabéticos tipo 2 tinham o genótipo DD de ECA e apresentavam SM, sugerindo que o SRA tinha relação com danos metabólicos em diabéticos tipo 2 (Lee *et al.*, 2002). O alelo D foi associado de maneira significativa com riscos aumentados de nefropatia diabética, doença renal progressiva causada por angiopatia dos capilares nos glomérulos renais (Staessen *et al.*, 1997). Montgomery *et al.* (1997) relataram mudanças na massa ventricular esquerda do coração associada ao alelo D, sendo que portadores deste alelo podem desenvolver hipertrofia cardíaca atribuída a uma menor eficiência metabólica. Como dito anteriormente, alguns estudos mostram associações significativas entre o polimorfismo I/D com diferentes condições fisiopatológicas, enquanto outros não. Alguns estudos demonstram não haver ligação ou relação do polimorfismo do gene da ECA com o controle da PA, quadros de hipertensão e DCV (Jeunemaitre *et al.*, 1992a; Lindpaintner *et al.*, 1995; Malik *et al.*, 1997; Ohmichi *et al.*, 1997; Crisan e Carr, 2000; Arnett *et al.*, 2005).

Além do polimorfismo de I/D do gene da ECA descrito por Rigat *et al.* (1990), outros 77 polimorfismos já foram descritos para este mesmo gene (Oliveira *et al.*, 2003). A descoberta que os níveis da ECA são regulados geneticamente (Cambien *et al.*, 1988) abriu uma nova frente de investigação

sobre as causas da HAS. Um grande número de estudos têm sido realizados a partir da caracterização do polimorfismo I/D (Rigat *et al.*, 1990), como marcador funcional para este polimorfismo. Podem existir ainda outros polimorfismos funcionais atribuídos a outras regiões do gene da ECA, como no íntron 18, região 3' não traduzida - UTR (*untranslated region*) e região 5' do gene (Sayed-Tabatabaei *et al.*, 2006).

Pode-se dizer que estudos envolvendo o gene da ECA ainda não permitem uma explicação objetiva da sua influência à PA elevada. Todavia deve-se considerar a possibilidade deste gene não estar atuando sozinho, podendo desta forma, estar atuando em conjunto com outros genes. Além disso, esses outros genes também podem apresentar polimorfismos já documentados, como, por exemplo, o polimorfismo presente no gene do AGT, nos receptores da angiotensina (ANG), entre outros. Além disso, o meio ambiente e a diversidade da população são fatores relevantes para explicar os resultados controversos (Oliveira *et al.*, 2003).

### **1.7.2 Sequências repetitivas *Alu***

A sequência *Alu* presente no gene da ECA apresenta alta similaridade com outros elementos *Alu* de humanos (Batzer *et al.*, 1994). Uma PCR realizada com DNA extraído de chimpanzé revelou a ausência desta sequência *Alu* no íntron 16 da ECA (Dufour *et al.*, 2000), dados que sugerem que a inserção *Alu* tenha ocorrido depois da divergência evolutiva ( $\pm 5$  m.a.) entre os ramos que deram origem ao gênero *Homo* e dos demais primatas atuais, dentre estes os chimpanzés.

Entre as diferentes famílias de elementos repetitivos, as sequências *Alu* são as mais abundantes no genoma humano. Elas estão presentes em mais de 1 milhão de cópias e representam aproximadamente 11% do genoma humano (Cordaux e Batzer, 2009). As sequências *Alu* pertencem à família de elementos repetitivos SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*) e apresentam um tamanho aproximado de 300 pb (Batzer *et al.*, 2002). Dentre as muitas funções deste DNA repetitivo, podemos citar a sua habilidade em gerar novos elementos reguladores a alguns genes vizinhos, por isso a estas sequências são atribuídas a geração de novos *enhancers* ou sequências promotoras (Tomilin, 1999; Brosius, 1999). Embora a maior parte das sequências *Alu* esteja presente nas regiões intrônicas, parte destas sequências, de maneira completa ou parcial, podem estar presentes nas regiões exônicas e podem levar a disrupção da função gênica (Nekrutenko e Li, 2001). Inserções da região 3' não codificante do gene são comumente encontradas e parecem exercer pouca influência na expressão gênica (Deininger e Batzer, 1999). A maioria das inserções *Alu* que levam a manifestação de doenças estão inseridas nas regiões exônicas ou em íntrons próximos à éxons, alterando o *splicing* daquele gene (Deininger e Batzer, 1999).

Um estudo sugere que o íntron 16 do gene da ECA apresenta um elemento *AluYa5* no sentido *antisense*, o qual apresenta muitas sequências auxiliares de *splicing* que facilitariam a sua “exonização” posterior (Lei *et al.*, 2005), o que possivelmente auxiliaria no entendimento de indivíduos com o genótipo II apresentando níveis menores de ECA circulante, segundo alguns estudos. Assim, indivíduos DD teriam a sequência gênica intacta (sem a

sequência *Alu* fazendo parte das regiões exônicas) e, conseqüentemente a proteína resultante exibiria sua forma selvagem (conservada). Outros estudos sugerem que embora o polimorfismo I/D esteja presente em uma região intrônica, sendo funcionalmente neutra, acredita-se que o alelo I esteja em forte desequilíbrio de ligação com outra região favorável do gene da ECA, porém ainda não conhecida (Niu *et al.*, 2002).

### **1.7.3 Outros genes candidatos**

Outros genes também merecem destaque na associação com a HAS. A análise do gene que codifica a AGN mostrou que variantes moleculares podem predispor o paciente à hipertensão (Jeunemaitre *et al.*, 1992b), como a substituição de uma metionina por uma treonina na posição 235 (Kunz *et al.*, 1997). Outro gene muito estudado e que possui associação com fatores relacionados à PA é o gene do *AT1*. Em humanos, o polimorfismo A1166C para o gene *AT1* foi associado com a HAS, hipertrofia ventricular esquerda, doença coronária, IAM e progressão de nefropatia diabética (Matos, 2006).

No polimorfismo C825T, que ocorre no gene *GNB3*, há a substituição de uma citosina por uma timina na posição nucleotídica 825 no éxon 10 (Benjafiel *et al.*, 1998; Siffert *et al.*, 1998). Estudos epidemiológicos demonstram uma associação entre o alelo T825 e a HAS, indicando que esta variante poderia contribuir na susceptibilidade à hipertensão nestes indivíduos (Roskopf *et al.*, 2003; Sandrim e Santos, 2006). No ano de 2008, um grupo de cientistas dos Estados Unidos identificou o gene *STK39* (serina-treonina quinase), o primeiro gene de suscetibilidade da hipertensão a ser descoberto com uma nova técnica

conhecida como estudo de associação genômica em larga escala. Este gene é responsável por produzir uma proteína que ajuda no processamento do sal pelos rins, papel fundamental na determinação da pressão sanguínea (Wang *et al.*, 2009).

Estes estudos têm como principal objetivo tratamentos eficazes e específicos para cada paciente hipertenso, ajudando no combate desta doença, que é um sério problema de saúde mundial. Entretanto, pode-se concluir que o estudo dos polimorfismos genéticos poderá, em breve, ser utilizado na prática clínica para diagnóstico mais precoce de indivíduos hipertensos, fazendo com que estes tenham um tratamento específico e eficiente, proporcionando melhor resposta clínica e menor probabilidade de complicações decorrentes dessa tão prevalente doença (Rola e Ferreira, 2008).

### **1.8 Polimorfismo do gene da ECA e tratamento medicamentoso**

Os anti-hipertensivos devem não só reduzir a PA, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, e, se possível, a taxa de mortalidade. Os percentuais de controle de PA são muito baixos, apesar das evidências de que o tratamento anti-hipertensivo é eficaz em diminuir a morbidade e mortalidade cardiovascular, devido à baixa adesão ao tratamento (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

A farmacogenética considerada como influência do genótipo como determinante das respostas individuais ao tratamento farmacológico tem uma forte interação entre o polimorfismo I/D da ECA e o tratamento com betabloqueadores. A mudança nas estratégias de priorização de determinado

tratamento, pode ser realizada de acordo com a avaliação genotípica (Biolo e Rohde, 2004). Além disso, para alguns betabloqueadores parece haver uma diferença na resposta em relação à raça do indivíduo, por haver diferenças genotípicas entre as raças (Yancy *et al.*, 2001), sendo que estas características genéticas podem influenciar as respostas terapêuticas. Por exemplo, observações clínicas demonstram uma maior eficiência dos inibidores da ECA em brancos do que em negros (Cohn *et al.*, 1991; Carson *et al.*, 1999).

Um outro estudo com tratamento medicamentoso, avaliou a relação entre o tratamento com inibidores da ECA e o polimorfismo da ECA (I/D), concluiu-se que o pior prognóstico foram naqueles pacientes com o genótipo DD, principalmente no grupo que recebia baixas doses de ECA (McNamara *et al.*, 2004).

Em um estudo com japoneses hipertensos tratados com o medicamento anti-hipertensivo Imidapril, um tipo de inibidor da ECA, mostrou que a atividade da ECA plasmática em pacientes com o genótipo DD ou genótipo ID foi significativamente maior do que em pacientes com o genótipo II, além da maior redução da PAD ocorrer em pacientes com genótipo II. Desta forma, concluiu-se neste estudo que a PAS foi inversamente correlacionada aos níveis plasmáticos de ECA e a resposta ao Imidapril em pacientes hipertensos é determinada pelo menos em parte pelo genótipo da ECA (Ohmichi *et al.*, 1997).

Embora haja controversas entre os poucos estudos encontrados em relação a tratamentos medicamentosos e o genótipo da ECA, a farmacogenética ajudará muito futuramente para a avaliação genotípica (diagnóstico), a prevenção e o tratamento adequado da HAS e/ou das DCV.

### **1.9 Polimorfismo do gene da ECA e exercícios físicos**

Para hipertensos os exercícios físicos são considerados uma forma de tratamento não farmacológica eficaz, a longo prazo, devido a ação hipotensora (diminuição da PA) pós-exercício. A hipotensão pós-exercício ocorre devido à liberação de fatores relaxantes do endotélio, como o óxido nítrico, além de alguns fatores neurais e humorais relacionados às alterações hemodinâmicas, responsáveis pela diminuição da PA no período de recuperação (pós-exercício) (Nunes *et al.*, 2009). Outro fator que contribui para este efeito hipotensor pós-exercício é o controle dos barorreflexores arteriais, o qual tem função de reduzir a PA média pós-exercício, pois ao início do exercício físico ocorre aumento na atividade nervosa simpática e na PA média (Nunes *et al.*, 2009).

A resposta da ECA a diferentes intensidades e durações de exercício ainda não é clara, nem é conhecido o estímulo interno pelo qual a sua atividade é aumentada. De acordo com Arsa *et al.* (2009), as seguintes ações benéficas do exercício físico em indivíduos diabéticos hipertensos podem ser observadas: aumento da liberação de bradicinina, aumento da captação da glicose durante e após realização de exercícios físicos e hipotensão, destacando ainda que estas ações foram também apresentadas em indivíduos com o genótipo DD. A associação entre o polimorfismo da ECA e a resposta ao exercício físico foi investigada em um estudo de Zhang *et al.* (2002), os quais observaram que após 10 semanas de um programa de exercícios físicos em cicloergômetro, os níveis de PAS, PAD e PA média diminuiram apenas nos indivíduos portadores do genótipo ID e II. As mesmas observações ocorreram no estudo de Hagberg *et al.* (1999), após nove meses de treinamento físico.

O genótipo DD poderá ser um indicador preditivo da obesidade abdominal e aumento no peso corporal e PA em homens (Strazzullo *et al.*, 2003). Segundo Montgomery *et al.* (1999), estudos apontam uma maior sustentação de energia induzida pelo genótipo II do gene da ECA, promovendo no organismo uma eficiência metabólica otimizada na função contrátil do músculo-esquelético pela maximização do uso dos ácidos graxos livres.

O polimorfismo da ECA está associado também ao desempenho físico de atletas. De acordo com alguns estudos, atletas portadores do genótipo II estão associados a maior eficiência muscular em desempenhos aeróbicos, enquanto que atletas portadores do genótipo DD apresentam ganhos superiores de força e massa muscular, ou seja, o alelo I está presente com maior frequência em atletas de resistência e o alelo D em atletas de força e explosão muscular (Hagbeg *et al.*, 1998; Myerson *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2009). De forma geral, os estudos mostram que atletas portadores do alelo I têm uma maior eficiência contrátil, beneficiando atletas de provas de longa duração e os atletas portadores do alelo D têm maior capacidade hipertrófica, beneficiando-os em provas de força e potência muscular (Dias *et al.*, 2007).

Trinta e três voluntários saudáveis do sexo masculino, sem experiência de treinamento de força, foram submetidos a 9 semanas de treinamento específico de força (isométrica ou dinâmica). Neste estudo, foram observadas mudanças na força do músculo quadríceps, sendo que os maiores ganhos de força foram observados nos indivíduos com o alelo D (Folland *et al.*, 2000). Charbonneau *et al.* (2008) analisando a variabilidade da força muscular em resposta ao treinamento de força e relacionando com o polimorfismo da ECA,



em homens e mulheres idosas, observaram diferenças entre os grupos sendo que indivíduos portando o alelo D apresentaram maior força muscular. Neste estudo, o teste de repetição máxima foi utilizado para avaliar a força muscular na extensão do joelho, além de tomografia computadorizada para medir o volume de músculos do quadríceps.

Hagberg *et al.* (1998) avaliaram o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ) de mulheres pós menopáusicas com diferentes níveis habituais de atividade física. Estes autores observaram maiores valores de  $VO_{2máx}$  nas mulheres de genótipo II do que nas mulheres com genótipo DD e ID. Um estudo relacionando a fibras musculares de contração lenta e rápida, respectivamente, fibras do tipo I e tipo II, mostrou uma associação entre o polimorfismo da ECA e as fibras contráteis. Foi observado nos 41 indivíduos analisados que aqueles portadores do genótipo II apresentam uma maior média percentual de fibras do tipo I e menor média percentual de fibras do tipo IIb, não havendo diferença no percentual das fibras do tipo IIa (Zhang *et al.*, 2003). Os mesmos resultados foram obtidos no estudo de Williams *et al.* (2000), com 58 homens brancos recrutados do exército, dentre eles 35 com genótipo II e 23 com genótipo DD, em um programa de 11 semanas de treinamento aeróbico.

De uma maneira geral, menores concentrações plasmáticas de ECA estão associadas ao genótipo II, apresentando melhor eficiência muscular em desempenho aeróbico, enquanto que maiores concentrações plasmáticas de ECA, associadas ao genótipo DD, estão relacionadas à ganhos superiores de força e massa muscular (Costa *et al.*, 2009).

## **2. Objetivos**

---

### **2.1 Gerais:**

Estudar possíveis consequências de inserções e deleções no íntron 16 do gene da ECA frente ao diagnóstico clínico de hipertensão arterial em dois grupos de hipertensos do Sul do Brasil, submetidos a treinamento físico e/ou tratamento medicamentoso.

### **2.2 Específicos:**

Visando a caracterização genética do paciente hipertenso, em relação ao gene da ECA, e sua resposta após a prática de exercício aeróbico e/ou tratamento medicamentoso, os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- Caracterizar estes indivíduos em relação ao polimorfismo genético I/D, presente no íntron 16 do gene da ECA, utilizando técnica de PCR e avaliar possíveis benefícios gerados pela prática de exercício físico aeróbico de curto período em relação à hipertensão arterial sistêmica (HAS);
- Comparar a evolução clínica da PA em um grupo de pacientes hipertensos submetidos a tratamento medicamentoso frente ao polimorfismo da ECA com vistas a inferir sobre a influência de variáveis genéticas no controle da HAS.

### **3. Material e Métodos**

---

#### **3.1 Caracterização dos participantes do estudo**

O presente projeto teve autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - COEP (parecer nº 116/2011, protocolo 13664/11) (*Anexo 1*). Os participantes do estudo foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após explanação dos objetivos da pesquisa (*Anexo 2*).

Para realização deste trabalho participaram do projeto dois grupos: um nomeado como Grupo E, com indivíduos que foram submetidos a um programa de exercícios físicos aeróbicos e o outro nomeado como Grupo M, indivíduos sob tratamento clínico e medicamentoso. O Grupo E era constituído de 16 indivíduos, porém foram incluídos no estudo somente os indivíduos diagnosticados com o genótipo heterozigoto para o gene da ECA, sendo 10 indivíduos ( $58,9 \pm 9,5$  anos) hipertensos, heterozigotos para o polimorfismo da ECA, apresentavam sobrepeso ou obesidade de grau I, sendo que 5 deles eram diabéticos tipo 2. Alguns dados gerais desses 10 indivíduos podem ser encontrados nas Tabelas 2, 3 e 4. O grupo M era constituído de 78 indivíduos ( $59,8 \pm 10,61$  anos) hipertensos arranjados em três grupos segundo tratamento clínico e medicamentoso: fácil controle (FaC), moderado controle (MC) e difícil controle (DC). O grupo FaC era composto por indivíduos que estabilizam a PA com o uso de até dois medicamentos, o grupo MC era composto por usuários de três classes de medicamentos para o controle da PA, enquanto no grupo DC faziam parte indivíduos usuários de mais de 4 classes de medicamentos e que

mesmo assim apresentavam difícil controle clínico da PA. Alguns dados gerais desses 78 participantes podem ser encontrados na Tabela 5.

**Tabela 2:** Caracterização dos participantes do grupo E por gênero, idade e patologia

INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	DM2
1	Feminino	38 anos	SIM
2	Feminino	65 anos	SIM
3	Feminino	64 anos	SIM
4	Feminino	62 anos	NÃO
5	Masculino	61 anos	NÃO
6	Feminino	75 anos	SIM
7	Masculino	54 anos	SIM
8	Feminino	57 anos	NÃO
9	Feminino	57 anos	NÃO
10	Feminino	56 anos	NÃO

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

**Tabela 3:** Caracterização dos participantes do grupo E utilizando-se parâmetros biométricos.

IND	IMC	RCQ	GORDURA (%)	ÁGUA (%)	PA-R (mm/Hg)
1	Obesidade I	Muito Alto	40	43,9	140/85
2	Sobrepeso	Muito Alto	40,2	43,8	158/100
3	Sobrepeso	Alto	40,7	43,4	136/72
4	Sobrepeso	Alto	41,6	42,7	152/73
5	Sobrepeso	Moderado	31,2	50,4	152/78
6	Obesidade I	Alto	48	38,1	130/70
7	Obesidade I	Alto	37,6	45,7	150/90
8	Sobrepeso	Muito Alto	37,8	45,5	136/86
9	Obesidade I	Alto	43	41,7	120/82
10	Sobrepeso	Muito Alto	40,8	43,3	134/80

IND: Indivíduo; IMC: Índice de Massa Corporal; RCQ: Relação Cintura- Quadril; PA-R: Pressão Arterial de Repouso

**Tabela 4:** Caracterização dos participantes do grupo E por meio de parâmetros clínicos.

INDIVÍDUO	GLICOSE (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)
1	181	137	205,7
2	217	180	75
3	158	191	121
4	86	129	115
5	91	147	54
6	91	202	63
7	207	163	243
8	85	127	125
9	93	205	90
10	79	162	421

Valores de Referência: Glicemia em jejum <100 mg/dL; Colesterol <200 mg/dL; Triglicerídeos <150 mg/dL (Sociedade Brasileira de Cardiologia: I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica, 2005).

**Tabela 5:** Caracterização dos participantes do grupo M por meio de parâmetros biométricos e descrição do grupo de tratamento clínico medicamentoso.

IND	Sexo	Idade (anos)	DM2	PA-R (mmHg)	GRUPO
1	F	61	N	150/80	DC
2	F	77	S	120/80	MC
3	M	53	N	140/80	MC
4	M	60	N	180/80	DC
5	M	42	N	120/80	FaC
6	F	42	N	170/120	DC
7	F	60	N	130/80	FaC
8	F	38	S	140/85	DC
9	M	48	N	220/100	DC
10	M	67	N	160/110	DC
11	F	70	S	180/80	DC
12	F	69	S	180/80	DC
13	F	70	N	120/80	MC
14	M	51	N	140/100	DC
15	F	72	S	140/80	DC
16	F	55	N	140/70	MC
17	F	78	N	160/90	DC
18	F	44	N	130/80	MC
19	F	59	N	180/100	FaC
20	F	56	S	140/80	DC

**Tabela 5:** Continuação

<b>IND</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>DM2</b>	<b>PA-R (mmHg)</b>	<b>GRUPO</b>
21	F	68	N	145/95	DC
22	F	44	S	140/90	DC
23	F	76	N	140/90	DC
24	M	50	N	120/80	MC
25	F	69	S	120/80	MC
26	M	58	S	160/100	DC
27	F	62	S	110/70	MC
28	F	50	N	170/90	DC
29	F	78	S	110/70	MC
30	M	53	N	160/100	DC
31	M	77	S	100/70	FaC
32	M	41	S	120/80	DC
33	F	65	S	158/100	DC
34	F	64	S	110/70	FaC
35	M	54	N	120/80	FaC
36	M	68	N	120/80	FaC
37	M	54	N	150/80	FaC
38	F	60	S	140/80	MC
39	M	53	S	140/90	DC
40	M	67	S	120/80	FaC
41	M	62	S	170/90	DC
42	F	60	N	130/70	FaC
43	F	49	N	120/80	FaC
44	M	49	N	140/90	FaC
45	F	67	N	160/90	DC
46	M	62	N	120/80	FaC
47	F	81	S	210/100	DC
48	M	34	S	220/120	DC
49	M	58	S	130/80	FaC
50	M	57	S	130/90	DC
51	M	58	N	120/80	FaC
52	F	64	S	136/72	MC
53	F	62	N	152/73	DC
54	M	61	N	152/78	DC
55	F	75	S	130/70	MC
56	M	54	S	150/90	DC
57	F	58	S	120/80	FaC
58	M	63	N	120/70	FaC
59	F	72	S	120/70	MC
60	M	58	N	140/80	FaC
61	M	67	N	120/70	FaC
62	F	76	N	190/90	MC
63	F	62	N	190/120	DC

Tabela 5: Continuação

IND	Sexo	Idade (anos)	DM2	PA-R (mmHg)	GRUPO
64	M	59	S	110/70	FaC
65	M	38	N	140/80	FaC
66	M	67	N	100/60	FaC
67	M	46	N	110/70	FaC
68	F	53	N	140/90	FaC
69	M	55	N	140/90	FaC
70	F	44	N	120/80	FaC
71	M	74	N	120/80	FaC
72	M	56	N	130/90	FaC
73	F	68	S	130/80	FaC
74	F	68	S	130/70	FaC
75	F	70	N	130/80	FaC
76	F	57	N	136/86	MC
77	F	57	N	120/82	MC
78	F	56	N	134/80	MC

**IND:** Indivíduo; **DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2; **PA-R:** Pressão Arterial de Repouso; **FaC:** Grupo de Fácil controle da PA; **MC:** Grupo de Moderado controle da PA; **DC:** Grupo de Difícil controle da PA

### 3.2 Coleta e armazenamento de Sangue e Exames Laboratoriais

Foram coletados 5 mL de sangue total do Grupo E em tubo contendo K<sub>3</sub> EDTA (*vacuum tube*, Labor Import<sup>®</sup>), em um laboratório clínico (Clinisul) na cidade de Irati-PR. Do total de 5 mL, 2,5 mL de sangue foram armazenados a -20°C para posterior extração de DNA e os outros 2,5 mL foram centrifugados para separação do plasma, o qual foi utilizado para os exames de Glicemia, Colesterol Total e Triglicérides realizados antes e após 60 dias do Programa de Treinamento. Também foram coletados 5 mL de sangue total do Grupo M em tubo contendo K<sub>3</sub> EDTA, os quais foram armazenados a -20°C para posterior extração de DNA.

### **3.3 Extração de DNA Genômico de sangue total**

A extração de DNA de sangue total foi realizada nos Grupos E e M, no Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, utilizando-se kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (Kit de Extração Mini Spin, BioPur<sup>®</sup>) (*Anexo 3*). Após eluição do DNA, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1.5% (Invitrogen<sup>®</sup>), para verificação da integridade das amostras, por 45 minutos a 70v (*Anexo 4*). Ao DNA, bem como ao marcador de peso molecular (*Low Ranger* 100 bp DNA Ladder, marca: Norgen Biotek<sup>®</sup>), foi adicionado o corante fluorescente para ácidos nucléicos GelRed (Biotium<sup>®</sup>), para visualização das amostras em transiluminador. Os géis foram documentados em fotodocumentador MF CHEMIBIS (DNR Bio Imaging Systems Ltd<sup>®</sup>).

As quantificações das amostras de DNA foram realizadas no equipamento NanoVue (GE Healthcare<sup>®</sup>) (*Anexo 5*).

### **3.4 Análise genética do polimorfismo I/D presente no gene da ECA**

A região polimórfica I/D presente no íntron 16 do gene da ECA foi avaliada utilizando-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), objetivando-se ampliações de fragmentos de DNA com diferenças de aproximadamente 250 pb para alelo D (-250 pb) e para alelo I (+350 pb e +600pb). Os oligonucleotídeos empregados nesta análise foram obtidos de acordo com Lindpaintner *et al.* (1995), e apresentam as seguintes sequências: ACE 1F: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATG-3' e ACE 1R: 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'.



A reação de amplificação foi realizada utilizando-se os seguintes componentes: 1.5 µL de tampão de reação (10X), contendo 200 mM de Tris, pH 8,4 e 500 mM de KCl; 0.25µL de enzima *Taq* DNA Polymerase (2U) (Invitrogen®); 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1µL de dNTP (2 µM) (Ludwig Biotec®); 0.8µL de *primer forward* e *reverse* (10 µM) (Ludwig Biotec®), além de 40 ng/µL do DNA molde obtido dos participantes do estudo. As reações de polimerização foram realizadas em um termociclador (Biocycler®), sob o seguinte programa: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C; 5 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C e 45 segundos a 72 °C; seguidos por 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 45 segundos a 72 °C; finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, para verificação da amplificação dos fragmentos de DNA, por 1 hora a 70v. Vale salientar que foram realizadas várias reações de PCR, o qual foram empregadas diversas mudanças em concentrações, volumes de reagentes e gradientes de temperaturas até a obtenção deste protocolo final, no sentido de se padronizar e otimizar os resultados das amplificações obtidas neste trabalho.

### **3.5 Avaliação Biométrica: Teste de Impedância Bioelétrica, IMC, RCQ e PA de repouso**

Esta avaliação foi realizada apenas nos indivíduos do Grupo E antes e após 2 meses do programa, foram aferidos o peso do paciente utilizando-se balança mecânica (Wellmy®) e a altura em um estadiômetro (Sanny®), além do aparelho tetrapolar de Impedância Bioelétrica marca Maltron®, modelo BF-906,

o qual foram registradas no aparelho o peso, altura, idade e a caracterização física (sedentário, praticante de exercícios físicos ou atleta). O avaliado foi colocado em posição deitada, conectou-se então os dois eletrodos na mão direita e os outros dois eletrodos no pé direito, sendo que o cabo de pólo positivo deve estar conectado ao eletrodo próximo do punho e tornozelo, e o cabo de pólo negativo próximo do dedo médio da mão e pé, quando foi acionado o botão para iniciar o teste, passando uma corrente elétrica de 50 KHz, ao final obtém-se resultados de IMC, percentual de gordura corporal, percentual de massa magra, percentual de água e peso ideal.

De acordo com a OMS, os indivíduos podem ser classificados baseados em seu IMC, calculado como o peso (em kilogramas) dividido pela altura (em metros) elevada ao quadrado, nas seguintes classes: peso normal (18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>), obesidade grau 1 (30-34,9 kg/m<sup>2</sup>), obesidade grau 2 (35-39,9 kg/m<sup>2</sup>), e obesidade mórbida ou grau 3 ( $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) (WHO, 1997). A Relação Cintura-Quadril (RCQ) foi realizada por fita métrica, medindo-se a circunferência da cintura e do quadril, e então dividindo-se a medida da circunferência da cintura pela medida da circunferência do quadril (em centímetros); o resultado desta divisão foi analisado segundo tabela em anexo (*Apêndice 1*) (ACSM, 2006).

A aferição da PA em repouso foi realizada em um aparelho de coluna de mercúrio da marca Protec<sup>®</sup> e um estetoscópio da marca Rappaport Premium<sup>®</sup>.

### **3.6 Programa de Treinamento Aeróbico (PTA)**

O programa foi aplicado apenas no Grupo E, por meio da realização de caminhadas na pista de atletismo do Campus da Universidade Estadual do Centro Oeste, no município de Irati-PR, durante 60 dias, com frequência de 3 vezes na semana (segunda, quarta e sexta) no período da manhã.

As caminhadas eram monitoradas durante quarenta e cinco minutos, na pista de atletismo, com manutenção da percepção subjetiva do esforço entre 11 e 13 na escala de categoria de Borg (Borg e Noble, 1982) descrita na tabela em anexo (*Apêndice 2*), e FC de reserva de 50%. Tais limites correspondem a um esforço de intensidade leve, assegurando-se assim a não realização de exercícios de alta intensidade, visto que estes indivíduos eram hipertensos. A aferição da PA e da FC eram realizadas 5 minutos antes de iniciar a sessão de treinamento aeróbico e após 10 minutos de repouso na posição sentada. Precedente às caminhadas, eram realizados aquecimentos com duração total de 15 min, sendo compostos de exercícios de alongamento.

### **3.7 Análises Estatísticas**

Para o Grupo E foram realizadas análise estatísticas utilizando-se o software GraphPad Prism, version 5.0 (Motulsky, 2007), empregando-se para resultados de PA e triglicérides a análise de variância (ANOVA) e para resultados de glicemia e colesterol total o teste t-Student ( $p < 0,05$ ).

Para o Grupo M foram obtidas as frequências alélicas, genotípicas e o padrão de diferenciação genética entre grupos, utilizando estatística F e distâncias de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983) e o teste de Equilíbrio de

Hardy-Weinberg (EHW) pelo programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses*), (Miller, 1997). As frequências genóticas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de qui-quadrado de Pearson, utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2001).

#### **4. Resultados**

---

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I: **RESPOSTA AO PROGRAMA DE TREINAMENTO AERÓBICO DE CURTO PRAZO NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL EM PACIENTES PORTADORES DO GENÓTIPO I/D DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)**

Capítulo II: **INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO I/D DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) NO CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS**

**Capítulo I – RESPOSTA AO PROGRAMA DE TREINAMENTO AERÓBICO DE  
CURTO PRAZO NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL EM  
PACIENTES PORTADORES DO GENÓTIPO I/D DA ENZIMA CONVERSORA  
DE ANGIOTENSINA (ECA)**

---

**Abstract**

Actually, the arterial hypertension is a disease with major world prevalence. It is well elucidated that the regular physical exercise is very important for hypertension status prevention. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether aerobic exercise-induced modifications in anthropometric and biochemical parameters have a relationship with ACE polymorphism (intron 16 of this gene) in hypertensive subjects. The study included 16 hypertensive subjects, sedentary and non-smokers in the city of Irati-PR, but the study included only individuals diagnosed with heterozygous genotype for the ACE gene (n=10) and some of them with diabetes mellitus type 2 (DM2). The subjects executed two months of physical exercise with consequent enhanced in blood pressure (BP) in basal and in recovery period pos exercise (Systolic blood pressure – SBP:  $p=0.0001$ ; Diastolic blood pressure – DBP:  $p=0.0039$ ), in addition, showed reduction in fasting glucose levels.

**Keywords:** Systemic Arterial Hypertension, ECA Gene; Acute Physical Exercise; Hyposensitive effect

**Resumo**

Atualmente a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das doenças de maior prevalência mundial. Sabe-se que a inclusão de exercícios físicos regulares é considerada uma forte aliada para o controle e prevenção da hipertensão. Assim, o objetivo do presente estudo foi relacionar a resposta à prática regular do exercício aeróbico a curto prazo com o polimorfismo genético presente no íntron 16 do gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (ECA). Participaram do estudo 16 indivíduos hipertensos, sedentários e não fumantes do município de Irati-PR, porém foram incluídos no estudo somente os indivíduos diagnosticados com o genótipo heterozigoto para o gene da ECA (n=10) e alguns deles portadores de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Os mesmos foram submetidos a um programa de exercício físico durante 2 meses, período em que foram realizados os testes biométricos e bioquímicos. A prática do exercício físico aeróbico regular a curto prazo revelou melhora nos níveis de Pressão Arterial (PA) basal e na recuperação após esforço nos indivíduos analisados, portadores ou não de DM2 (Pressão Arterial Sistólica – PAS:  $p=0,0001$ ; Pressão Arterial Diastólica – PAD:  $p=0,0039$ ), além de apresentarem diminuição em seus níveis de glicemia em jejum.

**Palavras-chave:** Hipertensão Arterial Sistêmica; Gene ECA; Exercícios Físicos a curto prazo; efeito hipotensor

## **Introdução**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada como um distúrbio multifatorial, influenciada por fatores genéticos e fatores ambientais, sendo que os fatores ambientais são os maiores responsáveis pelo crescimento drástico desta doença. Embora a HAS não apareça como causa isolada entre os óbitos cardiovasculares, está associada a 60% dos infartos do miocárdio e a 85% dos acidentes vasculares encefálicos (Boing e Boing, 2007). Acredita-se que 15% das populações dos países desenvolvidos sejam portadoras de HAS (Boing e Boing, 2007). No Brasil, a população de hipertensos atinge cerca de 30 milhões de pessoas e é responsável por 300.000 mortes ao ano (Ministério da Saúde, 2011). Como medidas de prevenção ou tratamento desta doença, hábitos de vida saudáveis compostos de dietas balanceadas e com menor teor de sal contribuem para a reversão do quadro de hipertensão. A prática de exercícios físicos, principalmente aeróbicos a longo prazo, são considerados aliados para o tratamento desta doença, devido a sua ação hipotensora (diminuição da pressão arterial) pós-exercício (Nunes *et al.*, 2009). Além disso, a administração de medicamentos que agem em alguns sistemas responsáveis pelo controle da pressão arterial (PA), também podem ser utilizados.

Com o objetivo de elucidar o comprometimento da genética para a hipertensão, atualmente alguns estudos relacionados à biologia molecular e a farmacogenética estão em desenvolvimento. Alguns destes estudos envolvem a investigação de polimorfismos de genes que podem estar relacionados diretamente ao controle da PA, como aqueles pertencentes ao Sistema Renina Angiotensina (SRA). A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) é



responsável por converter Angiotensina I (Ang I) em Angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstritor. O gene que codifica a ECA é um dos principais alvos de estudo e algumas variantes genéticas apontam sua relação com a hipertensão. Este gene está localizado no braço longo do cromossomo 17 e é composto por 26 éxons, sendo que especificamente no Íntron 16, são observados alguns polimorfismos de inserção (I) ou deleção (D) de uma sequência *Alu* de aproximadamente 287 pares de bases (Rigat *et al.*, 1990). Em algumas populações já estudadas, a diminuição ou aumento da PA estão relacionados à inserção ou deleção do fragmento, respectivamente (Rigat *et al.*, 1990; Danser *et al.*, 1995; O'Donnell *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 1999; Agachan *et al.*, 2003; Rondinelli e Moura-Neto, 2003; Matos, 2006; Moleda *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2007). Segundo Moleda *et al.* (2006), níveis aumentados de ECA circulantes, observados na presença do alelo D, resultam em elevação da PA quando comparado a indivíduos que apresentam o alelo I.

A associação entre o polimorfismo da ECA e a resposta ao exercício físico aeróbico de intensidade leve a moderada e de curto a longo prazo foi investigada e estudos mostram que diminuições nos níveis de Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e PA média, foram observadas apenas nos indivíduos portadores do genótipo ID e II (Hagberg *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002).

Desta forma, pretende-se avaliar neste estudo a influência do exercício físico aeróbico de curto prazo (2 meses de programa de exercícios) em uma parcela da população de hipertensos do município de Irati-PR, portadores do genótipo ID (heterozigotos). Dados biométricos e bioquímicos, tais como taxas

de colesterol, triglicerídeos e glicemia foram tomados antes e após o programa.

### **Material e Métodos**

O presente projeto teve autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - COEP (parecer nº 116/2011, protocolo 13664/11) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para realização deste trabalho participaram do projeto 16 indivíduos hipertensos, porém foram incluídos no estudo somente os indivíduos diagnosticados com genótipo heterozigoto para o gene da ECA, sendo 10 indivíduos (2 homens e 8 mulheres) com  $58,9 \pm 9,5$  anos, sedentários e não-fumantes da cidade de Irati-PR. Todos apresentavam sobrepeso ou obesidade de grau I, sendo 5 deles diabéticos tipo 2 (1 homem e 4 mulheres).

Em tubos contendo EDTA, foram coletados 5 mL de sangue de cada indivíduo. Cerca de 250  $\mu$ L de sangue total foram utilizados para extração DNA genômico utilizando-se kits comerciais, segundo instruções do fabricante (Kit de Extração Mini Spin, BioPur®). O restante do sangue foi centrifugado e o plasma sanguíneo foi submetido à exames clínicos (glicemia, colesterol total e triglicerídeos), antes e após 2 meses do programa de treinamento aeróbico (PTA). Foi realizada uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção do genótipo do indivíduo em relação ao polimorfismo I/D presente no íntron 16 do gene da ECA. Foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueassem a região, segundo Lindpaintner *et al.* (1995): ACE 1F: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATG-3' e ACE 1R: 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'. As amplificações foram realizadas

utilizando-se os seguintes componentes: 1,5µL de tampão de reação (10X), contendo 200 mM de Tris, pH 8,4 e 500 mM de KC); 0,25µL de enzima *Taq* DNA Polymerase (2U) (Invitrogen®); 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1µL de dNTP (2 µM) (Ludwig Biotec®); 0.8µL de *primer forward* e *reverse* (10 µM) (Ludwig Biotec®), além de 40 ng/µL do DNA molde obtido dos participantes do estudo. As reações de polimerização foram realizadas em um termociclador (Biocycler®) programado da seguinte maneira: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C; 5 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C e 45 segundos a 72 °C; seguidos por 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 45 segundos a 72°C; finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72 °C. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coradas com GelRed (Biotium®).

Foram também realizadas algumas avaliações biométricas: impedância bioelétrica utilizando aparelho tetrapolar (marca Maltron® modelo BF-906); Índice de Massa Corporal (IMC), calculado como o peso (em kg) dividido pela altura (em metros) elevada ao quadrado; Relação Cintura-Quadril (RCQ), medindo-se a circunferência da cintura e do quadril (em centímetros), e então dividindo-se a medida da circunferência da cintura pela medida da circunferência do quadril e aferição da PA em repouso na posição sentada. O PTA foi aplicado realizando caminhadas de quarenta e cinco minutos em pista de atletismo, durante 60 dias, com frequência de 3 vezes na semana, no período da manhã. As caminhadas eram monitoradas com manutenção da percepção subjetiva do esforço entre 11 e 13 na escala de categoria de Borg (Borg e Noble, 1982) e frequência cardíaca (FC) de reserva de 50%. Tais

limites correspondem a um esforço de intensidade leve, assegurando-se assim a não realização de exercícios de alta intensidade, visto que estes indivíduos eram hipertensos. A aferição da PA e a FC eram realizadas 5 minutos antes de iniciar a sessão de treinamento aeróbico e após 10 minutos de repouso na posição sentada. Precedente às caminhadas, foram realizados aquecimentos com duração total de 15 min, sendo compostos de exercícios de alongamento.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism, version 5.0 (Motulsky, 2007), empregando-se para resultados de PA e triglicerídeos ANOVA e para resultados de glicemia e colesterol total o teste t-Student ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

As amplificações para a determinação dos genótipos dos indivíduos, em relação ao polimorfismo I/D presente no íntron 16 do gene da ECA, mostraram que todos eram heterozigotos para a região, sendo que foram observados fragmentos diferentes para o alelo de Inserção. Os indivíduos 1, 6, 7, 9 e 10 apresentaram o fragmento de inserção no tamanho de 600 pb, enquanto que nos indivíduos 2, 3, 4, 5 e 8 o alelo I foi de 350 pb (figura 1).

No geral, os dados mostram mudanças entre PA de repouso aferida antes de iniciar o PTA e a PA de repouso verificada após 2 meses do PTA. Houve uma diminuição da PA de repouso de alguns indivíduos aferida antes e após os 2 meses do PTA, o que foi considerado clinicamente relevante. Em um deles, por exemplo, pode-se observar uma diminuição da PA inicial de repouso de 140/85 mmHg para 125/83 mmHg já após 1 mês do PTA. Após 2 meses do

programa, foi possível observar uma diminuição considerável dos níveis pressóricos de 2 indivíduos: de 152/73 mmHg para 128/71 mmHg e de 150/90 mmHg para 129/84 mmHg.

Ainda, quando comparada uma média da PA inicial aferida 5 minutos antes de iniciar a sessão de exercícios aeróbicos, com PA final (média dos 2 meses após PTA) aferida após 10 minutos da execução da sessão de exercícios aeróbicos, observou-se que 9 indivíduos tiveram uma diminuição significativa na PAS (ANOVA,  $p=0,0001$ ) (figura 2A), enquanto que na PAD 7 indivíduos apresentaram diminuição (ANOVA,  $p=0,0039$ ) (figura 2B). Além disso, os 10 indivíduos apresentaram uma recuperação rápida na FC, após 10 minutos da execução da sessão de exercícios.

Quanto aos resultados dos exames sanguíneos, observou-se que todos os indivíduos apresentaram a glicemia em jejum diminuída após PTA (figura 3, A). Embora esta diminuição não tenha sido estatisticamente significativa ela é extremamente importante sob o ponto de vista clínico, principalmente tratando-se dos portadores de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Os resultados de colesterol total (Figura 3, B) apresentaram um aumento estatisticamente significativo em todos os indivíduos ( $p=0,0195$ ) após o PTA, possivelmente devido ao aumento dos níveis plasmáticos de HDL (*High Density Lipoprotein*) e aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos ou VLDL (*Very Low-Density Lipoprotein*). Após o PTA, os níveis de triglicerídeos (Figura 3, C) apresentaram decréscimo em 4 indivíduos, outros 5 indivíduos apresentaram acréscimo, porém os resultados são considerados estatisticamente significativos quando são analisados individualmente (ANOVA,  $p=0,0020$ ).

Nas avaliações biométricas, não ocorreram diferenças significativas quando comparada as classificações de IMC e RCQ. Os resultados de percentual de gordura corporal e percentual de massa magra realizados por impedância bioelétrica também não mostraram diferenças antes e após o PTA, possivelmente devido ao curto período do programa de exercícios físicos. Em relação ao percentual de água, foi constatado pelo teste de impedância bioelétrica que o mesmo sempre esteve abaixo do limite mínimo ideal em todos os indivíduos, antes e após o PTA, provavelmente devido à administração de medicamentos para tratamento de hipertensão.

### **Discussão**

Diversos trabalhos relatam o envolvimento do polimorfismo genético I/D, presente no íntron 16 do gene da ECA, como um dos mecanismos relacionados ao controle da PA, no qual indivíduos apresentando o genótipo DD seriam os mais propensos a desenvolverem HAS, comparados aos portadores do genótipo II, ficando os heterozigotos com níveis intermediários de PA (Rigat *et al.*, 1990; O'Donnell *et al.*, 1998; Agachan *et al.*, 2003; Rondinelli e Moura-Neto, 2003; Freitas *et al.*, 2007). Os participantes do estudo são heterozigotos (ID) em relação à região polimórfica, o que favoreceu a compreensão de como os hipertensos se comportaram exclusivamente em relação ao PTA, minimizando possíveis variáveis que genótipos diferentes (DD e II) poderiam ocasionar em relação ao fenótipo (melhora da PA). A sequência *Alu* presente em portadores do alelo I possui aproximadamente 287 pb, porém estudos já relataram inserções superiores a 287 pb (Niu *et al.*, 2002 e Pedroso,

2006), assim como demonstrado por alguns participantes deste estudo.

Embora muitos estudos tenham relacionado o polimorfismo I/D com desordens cardiovasculares, visto que o genótipo do indivíduo foi confrontado com os níveis plasmáticos da ECA, sua localização em uma região não codificadora é intrigante no que se diz respeito a sua funcionalidade. De acordo com Pedroso (2006), a inserção *Alu* pode estar em desequilíbrio de ligação com outra mutação que seria a verdadeira responsável pela alteração da atividade da ECA, assim, o polimorfismo I/D pode ser considerado apenas como um marcador da característica genética. As variações encontradas entre as diferentes populações humanas dependeriam da extensão do desequilíbrio de ligação entre as duas mutações polimórficas. Ainda, considera-se que a inserção *Alu* pode ter alterado o mecanismo de *splicing* afetando, pelo menos em parte, a maquinaria de transcrição da ECA, ou ainda, pode apresentar um papel regulador da expressão do gene ECA ou algum outro gene a ele relacionado, evidenciando que a manutenção dos segmentos intrônicos seria um forte indicativo de sua importância evolutiva (Pedroso, 2006).

O papel da prática habitual de exercícios físicos utilizados como medida preventiva ou mesmo cura de algumas doenças, tais como obesidade e diabetes, já é bem conhecido. No caso da hipertensão arterial, programas de exercícios físicos aeróbicos e de intensidade leve a moderada, com duração entre 20 a 50 minutos, levam a melhora dos níveis pressóricos, devido a sua ação hipotensora (Negrão *et al.*, 2001; Rondon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Wallace, 2003; Pescatello, 2005; Laterza *et al.*, 2007 e Monteiro *et al.*, 2007). A hipotensão pós-exercício ocorre devido à liberação de fatores relaxantes do

endotélio, como o óxido nítrico, além de alguns fatores neurais e humorais relacionados às alterações hemodinâmicas, responsáveis pela diminuição da PA no período de recuperação (pós-exercício) (Nunes *et al.*, 2009). Este efeito hipotensor foi verificado na maioria dos indivíduos participantes deste trabalho, os quais obtiveram uma diminuição significativa nos seus níveis pressóricos após o PTA de 2 meses, evidenciando assim a importância do exercício físico regular mesmo a curto prazo. A hipotensão pós-exercício pode durar de 12 a 22 horas em hipertensos e está associada a uma diminuição no volume de ejeção do ventrículo esquerdo e volume diastólico final (Rondon *et al.*, 2002), podendo ocorrer um decréscimo de até 20 mmHg na PA (Halliwill, 2001).

Outro efeito benéfico que é adquirido com a prática regular de exercícios físicos, principalmente aeróbicos, é o aumento nas concentrações plasmáticas de HDL. Neste estudo, foram analisados apenas os níveis de colesterol total (sem especificação de HDL, LDL e VLDL), os quais apresentaram um aumento no decorrer do PTA. Infere-se, portanto, que este aumento de colesterol total decorreu de um aumento dos níveis plasmáticos de VLDL, além de um aumento dos níveis plasmáticos de HDL, tendo a prática regular dos exercícios aeróbicos um forte impacto sobre este quadro. De acordo com Maughan *et al.* (2000), o exercício físico é o principal responsável pelo acréscimo de HDL, cuja função é atuar no transporte de colesterol das paredes das artérias para a conversão em bile no fígado. De acordo com Kodama (2007), uma sessão mínima semanal de 120 minutos já seria suficiente para o aumento dos valores de colesterol HDL. Estudos demonstraram modificações benéficas nos níveis e composição química das frações e subfrações de HDL, após um programa de



exercícios aeróbios com diferentes intensidades, durações e frequências, realizado por indivíduos de variadas faixas etárias e níveis diferentes de aptidão cardiorrespiratória (Prado e Dantas, 2002; Monteiro *et al.*, 2007). Monteiro *et al.* (2007) comprovaram o aumento de até 6 mg/dL de HDL após 4 meses de um programa de exercícios físicos aeróbicos. Porém, em alguns estudos podem ser observados um aumento do HDL logo após uma única sessão de exercícios físicos aeróbicos (Frey *et al.*, 1993; Visich *et al.*, 1996 e Grandjean *et al.*, 2000).

Pode-se observar que embora o programa de exercícios físicos tenha trazido aos indivíduos hipertensos deste estudo alguns benefícios como, por exemplo, a diminuição da PA e aumento de HDL, não foram observadas alterações nas avaliações biométricas, como o percentual de gordura corporal e classificações de IMC e RCQ. De acordo com Ciolac e Guimarães (2004), as recomendações tradicionais de exercícios físicos para portadores de doenças cardiovasculares e de doenças crônicas, como o diabetes mellitus, são de exercícios físicos de intensidade leve a moderada, não priorizando a redução do peso. Monteiro *et al.* (2007) mostrou em seu estudo resultados positivos quanto a hipotensão após exercício físico aeróbico e aumento de HDL, mas os resultados de IMC e de percentual gordura não apresentaram modificações. Desta forma, exercícios podem ser eficazes sem obter diminuição no peso corporal ou gordura corporal em indivíduos hipertensos (Wallace, 2003). Segundo Ferreira *et al.* (2005), os principais efeitos decorrentes da prática regular de exercícios físicos são a redução dos níveis de PA, elevação dos níveis de HDL-colesterol e aumento da sensibilidade à insulina. Vale salientar

também que 2 meses de exercício físico talvez não sejam suficientes para uma perda de peso satisfatória e diminuição da RCQ.

O transporte de glicose na célula muscular aumenta durante o exercício físico, como também a sensibilidade da célula à ação da insulina. Durante o exercício físico, os níveis plasmáticos de insulina são menores e as reservas locais intramusculares de ácidos graxos são utilizadas em maior extensão (Maughan *et al.*, 2000). Neste estudo, foi observada uma diminuição nos níveis glicêmicos de todos os indivíduos, comprovando que o exercício físico mesmo a curto prazo apresenta efeitos benéficos, principalmente ao indivíduo diabético. Neste sentido, de acordo com Silva e Lima (2002), um programa de exercícios físicos regulares de intensidade moderada para indivíduos com DM2, tratado ou não com insulina, auxilia no controle glicêmico destes indivíduos diabéticos, sendo que este efeito já pode ser observado em apenas uma única sessão de exercício com duração de 60 minutos.

Caso a glicose não seja imediatamente catabolizada como forma de obtenção de energia, ela pode ter outras duas ações: gerar glicogênio nos músculos e triglicerídeos no tecido adiposo (Canali e Kruehl, 2001). Foi observado um aumento dos níveis de triglicerídeos após o PTA na maioria dos indivíduos deste estudo. Esta elevação dos triglicerídeos após 2 meses de exercício pode ser explicada pelo aumento do fluxo de ácidos graxos do plasma para as células musculares. O exercício prolongado requer aporte de energia e uma das formas de disponibilizar este recurso é atribuída a um nível plasmático de ácidos graxos a serem disponibilizados para células musculares por permeabilidade endotelial, ocorre em um período longo, devido à

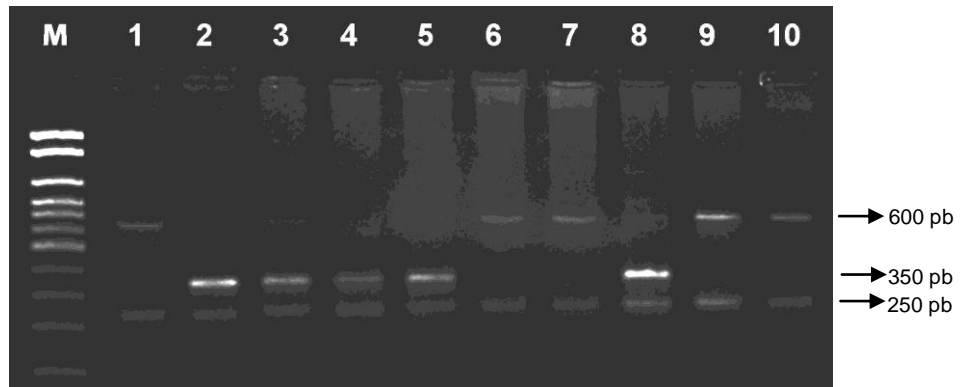
dissociação do complexo de albumina (Lima *et al.*, 2009). Os dados apontam que mesmo diante da prática de exercício físico leve durante um curto período de tempo (sessões de 45 minutos), apontam aumento dos níveis de triglicerídeos de alguns indivíduos. É sugestivo que a continuidade do programa de exercício físico proposto, esses níveis de triglicerídeos devam baixar pela continuidade da demanda de energia para o trabalho das células musculares.

O exercício físico é um importante tratamento não farmacológico. Dentre vários benefícios decorrentes da prática regular de exercícios físicos, a atividade hipotensora após exercício é uma das principais contribuições no controle da PA de hipertensos. Porém, alguns indivíduos hipertensos apresentaram poucas modificações na PA de repouso e PA final após exercício, não se beneficiando tanto desta atividade de redução pressórica quanto demais indivíduos. Apenas 25% dos indivíduos hipertensos não são responsivos ao treinamento físico (Rondon e Brum, 2003), pois diferenças genéticas e fisiopatológicas podem influenciar na heterogeneidade da resposta depressora da PA com o treinamento físico (Wallace, 2003; Laterza *et al.*, 2007).

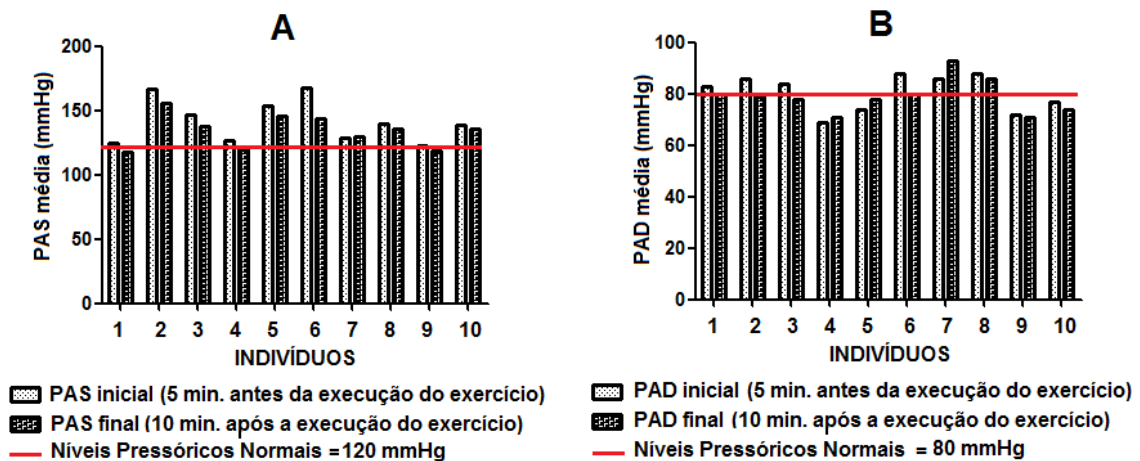
Em conclusão, este trabalho reforça os dados da literatura quanto aos efeitos benéficos da prática do exercício físico para hipertensos. Embora, o grupo amostral tenha sido pequeno, revelou-se uma melhora nos níveis de PA basal e na recuperação após esforço físico em indivíduos heterozigotos para o gene da ECA, portadores ou não de DM2, além da diminuição da glicemia em jejum, um efeito importante principalmente para os indivíduos diabéticos.

**Referências**

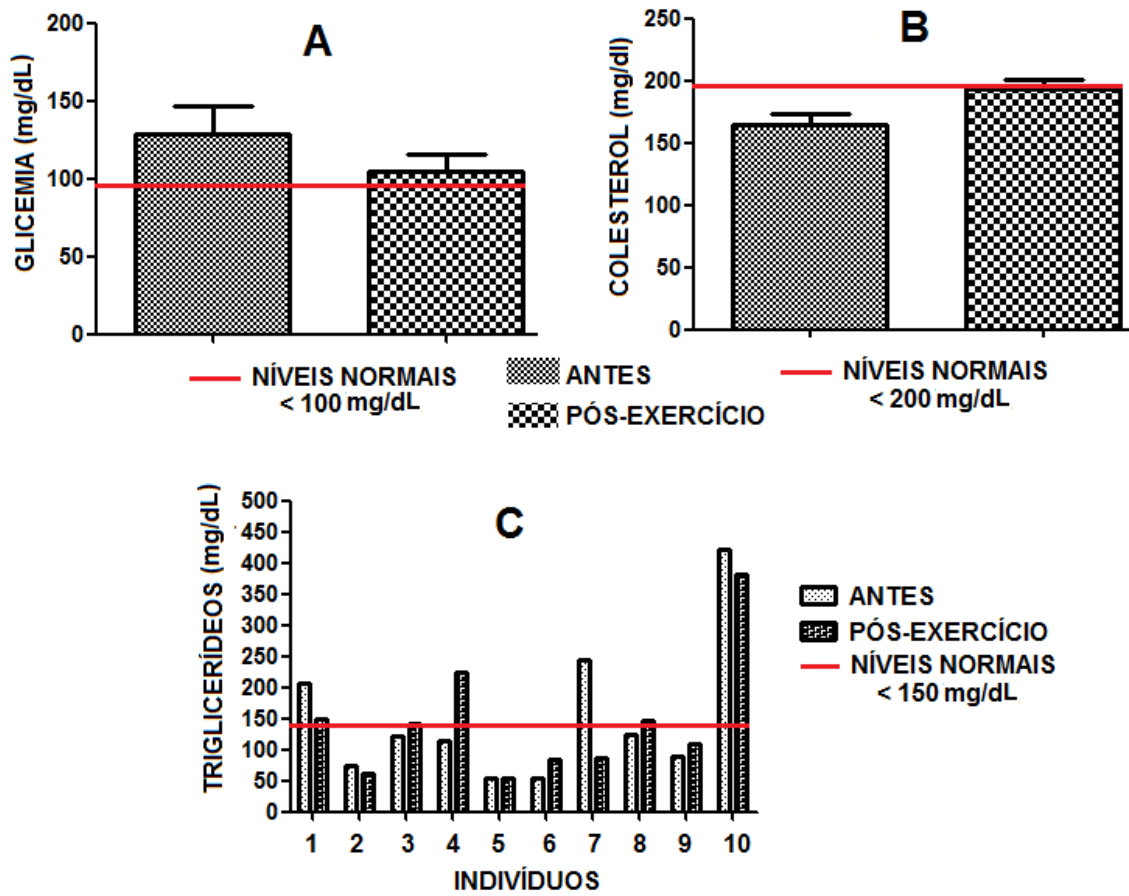
As referências citadas neste capítulo estão apresentadas ao final da dissertação no item Referências Bibliográficas.



**Figura 1.** Gel de Agarose 1.5% evidenciando o padrão de bandas resultantes das amplificações da região polimórfica I/D do gene da ECA. M: marcador de peso molecular; 1-10: produto da PCR dos indivíduos.



**Figura 2.** Gráficos demonstrando a média dos valores de PAS e PAD (em mmHg) de cada indivíduo verificadas 5 minutos antes de iniciar a sessão de exercícios físicos e após 10 minutos da execução das atividades: **A)** Valores de PAS; **B)** Valores de PAD.



**Figura 3.** Gráficos demonstrando valores dos exames clínicos verificados antes e 2 meses após execução do PTA. **A)** Valores de Glicemia em jejum; **B)** Valores de Colesterol Total; **C)** Valores de Triglicerídeos.

Capítulo II – **INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO I/D DA ENZIMA  
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) NO CONTROLE DA PRESSÃO  
ARTERIAL EM INDIVÍDUOS HIPERTENSOS**

---

**Abstract**

The arterial hypertension (HBP) is a physiopathology phenomenon resulting of relationship between genetic and environmental factors. The renin-angiotensin system is an important mechanism in the control of blood pressure (BP). In addition, the polymorphism of insertion/deletion (I/D) of *Alu* sequences, that occur in the intron 16 of ACE gene, has been controversial when relationship with genetic variations, BP and SAH. The present study aim investigated possible associations I/D in hypertensive patients during different stages of BP control. The subjects of present study were 78 patients sob clinic and pharmacological treatment: easy control (FaC), moderate control (MC), and difficult control (DC): The DNA of patients were extracting of peripheral blood and amplified by Polymerase Chain Reaction, with specific primers for I/D. The Allelic (I = 0,3782, D = 0,6218) and genotypic (II = 0,0257, ID = 0,7051, DD = 0,2692) frequencies and genetic differentiation between groups were availed and were not found differences in the genetic structuring ( $F_{st} < 0,05$ ) or significant distances between them (Reynolds  $< 0,03$ ). The population sample is not found in Equilibrium of *Hardy-Weinberg* ( $p < 0,05$ ), with D allele less frequency and with two new alleles were descript (I<, 350 pb; I>, 600 pb). The genotypic frequencies between groups showed no that exist a significant difference between them (Chi-square=5,657326;  $p=0,22625$ ). Evolutionary

tendencies suggest that others mechanisms should interact with the I/D in the modulation of the action of the ACE.

**Keywords:** Systemic Arterial Hypertension; Pharmacological Treatment; ACE gene; *Alu* sequences.

### **Resumo**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um fenômeno fisiopatológico decorrente da associação entre fatores genéticos e ambientais. O sistema renina-angiotensina está envolvido no controle da pressão arterial (PA). Neste, o polimorfismo de inserção/deleção (I/D) de sequências *Alu*, que ocorre no íntron 16 do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), tem se apresentado controverso na associação das variantes genéticas com o controle da PA e estabelecimento da HAS. Foi objetivo deste estudo investigar possíveis associações I/D em pacientes hipertensos em distintos estágios de controle da PA. Participaram do estudo 78 indivíduos em tratamento clínico e medicamentoso, assim arranjados: fácil controle (FaC), moderado controle (MC) e difícil controle (DC). O DNA dos pacientes foi extraído a partir do sangue periférico e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase, com *primers* específicos para I/D. As frequências alélicas (I = 0,3782, D = 0,6218), genotípicas (II = 0,0257, ID = 0,7051, DD = 0,2692) e determinação da diferenciação genética entre grupos foram obtidas e não mostraram estruturação genética ( $F_{st} < 0,05$ ), ou distâncias significativas entre elas (Reynolds  $< 0,03$ ). A amostra populacional não se encontra em Equilíbrio de



Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), com o alelo D menos frequente e dois alelos novos foram descritos ( $I < 350$  pb;  $I > 600$  pb). As frequências genótípicas entre os grupos mostraram que não existe uma diferença significativa entre elas (qui-quadrado=5,657326;  $p = 0,22625$ ). Tendências evolutivas sugerem que outros mecanismos devem interagir com o I/D na modulação da ação da ECA.

**Palavras-chave:** Hipertensão Arterial Sistêmica; Tratamento medicamentoso; Gene ECA; Sequências *Alu*.

## **Introdução**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um fenômeno fisiopatológico complexo, importante no agravamento às doenças cardiovasculares (DCV), decorrente da associação entre fatores genéticos e ambientais (Harrap *et al.*, 1988; Willians *et al.*, 1994). A contribuição hereditária na fisiopatogênese da HAS representa pelo menos um terço das principais causas (Willians *et al.*, 1994).

É bem conhecido o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona no controle da pressão arterial (PA) (Crisan *et al.*, 2000). Com isto, genes que codificam peptídeos relacionados a esta via reguladora, se apresentam como candidatos a estudos de associação entre variantes genéticas e a HAS. Entre os genes mais estudados, na tentativa de elucidar o envolvimento gênico na patogênese da HAS, está o polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA), que apresenta efeito vasoconstritor pela ação do produto oriundo da quebra da angiotensina I em angiotensina II

(Zhou *et al.*, 2010). Contudo, ainda são muito controversos os resultados dos estudos de associação do polimorfismo da ECA com a HAS.

No início da década de 90, Jeunemaitre e colaboradores sugeriram não ocorrer ligação entre o locus da ECA com a HAS (Jeunemaitre *et al.*, 1992). Resultados recentes de meta-análise demonstram que o alelo *ACE2350* está associado com reduzido risco de HAS entre mulçumanos do Golfo da Arábia e do Paquistão, mas um elevado risco entre chineses (Niu *et al.*, 2010). Embora o genótipo DD, do polimorfismo de inserção no íntron 16 do gene da ECA, demonstre associação positiva com eventos de infarto do miocárdio (Danser *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 2000), não existe consenso a cerca de uma possível associação dos alelos do polimorfismo I/D com a HAS. Embora seja sugestivo de que o alelo I possa desempenhar um papel de inibição-indução da ECA (revisado em Niu *et al.*, 2002).

O polimorfismo I/D para o gene da ECA é atribuído à inserção de um DNA repetitivo da família *Alu*. Estes elementos *Alu* constituem grande parte do genoma humano e emergiu há cerca de 55 m.a. como um retrotransposon (Quentin, 1992). Existem evidências que demonstram que elementos *Alu* podem modular a expressão gênica pós-transcricional por processamento alternativo do RNA, edição de RNA e/ou regulação da tradução (Häsler e Strub, 2006). Vários genes que predispõem a DCV têm mostrado processamento alternativo de RNA, especialmente relacionados à aterosclerose (von Kodolitsch, 1999), o que ainda não está elucidado em relação ao polimorfismo I/D do gene da ECA.

Assim, foi escopo deste artigo verificar se existe associação das

variantes genéticas para o polimorfismo I/D da ECA (íntron 16) em pacientes hipertensos em distintos estágios de controle da PA.

### **Material e Métodos**

Amostras de sangue total foram obtidas de 78 indivíduos ( $59,8 \pm 10,61$  anos) hipertensos usuários de medicação para o controle da PA (Tabela 1), arranjados em três grupos segundo tratamento clínico e medicamentoso: fácil controle (FaC), moderado controle (MC) e difícil controle (DC) (Tabela 2). O grupo FaC é composto por indivíduos que estabilizam a PA com o uso de até dois medicamentos, o grupo MC é composto por usuários de três classes de medicamentos para o controle da PA, enquanto o grupo DC reúne indivíduos usuários de mais de 4 classes de medicamentos e que apresentam difícil controle clínico da PA (Tabela 1). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado (autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - COEP parecer nº 116/2011, protocolo 13664/11).

**Tabela 1.** Agrupamentos dos pacientes segundo o uso de medicamentos para o controle da PA.

MEDICAMENTO	FaC	MC	DC
Bloqueadores de canais de cálcio	S	S	S
Antiagregadores de plaquetas	S	S	S
Betabloqueadores	S	S	S
Bloqueadores centrais	N	S	S
Antagonistas dos receptores da angiotensina	S	S	S
Diuréticos	S	S	S
Espiro lactona	N	S	S
Estatina	S	S	S
Ezetimiba	S	S	N
Fibratos	S	S	S
Inibidores da ECA	S	S	S
Inibidores da Renina	N	S	S

Grupos (FaC) fácil controle; (MC) médio controle; (DC) difícil controle. (S) uso do medicamento; (N) medicamento não indicado.

As amostras de DNA foram extraídas de linfócitos do sangue periférico (250 µL) usando kit comercial (Kit de Extração Mini Spin, BioPur<sup>®</sup>), segundo instruções do fabricante. A genotipagem de cada indivíduo para o polimorfismo I/D, presente no íntron 16 do gene da ECA, foi realizada por reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguida de eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados os primers descritos por Lindpaintner *et al.* (1995): ACE 1F: 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATG-3' e ACE 1R: 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'. As amplificações foram realizadas utilizando-se: 1,5µL de tampão de reação (10X), contendo 200 mM de Tris, pH 8,4 e 500 mM de KC); 0,25µL de enzima *Taq* DNA Polymerase (2U) (Invitrogen<sup>®</sup>); 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1µL de dNTP (2 µM) (Ludwig Biotec<sup>®</sup>); 0,8µL de *primer forward* e *reverse* (10 µM) (Ludwig Biotec<sup>®</sup>), além de 40 ng/µL do DNA molde obtido dos participantes do estudo. As reações de polimerização foram realizadas em um termociclador (Biocycler<sup>®</sup>) programado da seguinte

maneira: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C; 5 ciclos: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C e 45 segundos a 72 °C; seguidos por 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 45 segundos a 72 °C; finalizando com uma extensão de 7 minutos a 72 °C. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% e coradas com GelRed (Biotium®).

As frequências alélicas, genotípicas e o padrão de diferenciação genética entre grupos, utilizando estatística F e distâncias de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983) e o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) pelo programa TFGA (*Tools for Population Genetic Analyses*), (Miller, 1997). As frequências genotípicas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de qui-quadrado de Pearson, utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2001).

## **Resultados**

As amplificações para a determinação dos genótipos dos 78 indivíduos, em relação ao polimorfismo I/D (Figura 1) presente no íntron 16 do gene da ECA, estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Agrupamento dos pacientes segundo o uso de medicamentos para controle da PA, classificação genotípica e gênero.

GRUPO FaC		GRUPO MC		GRUPO DC	
Genótipo	Sexo	Genótipo	Sexo	Genótipo	Sexo
ID<	M	ID<	F	ID<	F
ID<	M	ID<	F	ID<	F
ID<	M	ID<	F	ID<	F
ID<	M	ID<	F	ID<	F
ID<	M	ID<	F	ID<	F
ID<	M	ID>	F	ID<	F
ID<	M	ID>	F	ID<	F
ID<	M	ID>	F	ID<	F
ID<	M	ID>	F	ID<	F
ID<	M	II<	F	ID<	M
ID<	M	II<	F	ID<	M
ID<	M	II<	F	ID<	M
ID<	F	II<	F	ID<	M
ID<	F	II<	F	ID>	F
ID<	F	II<	M	ID>	F
ID<	F	II<	M	ID>	F
ID<	F	-	-	ID>	F
ID<	F	-	-	ID>	M
ID<	F	-	-	ID>	M
ID>	M	-	-	ID>	M
ID>	M	-	-	II<	F
ID>	F	-	-	II<	F
ID>	F	-	-	II<	M
ID>	F	-	-	II<	M
II<	M	-	-	II<	M
II<	M	-	-	II<	M
II<	M	-	-	II<	M
II<	M	-	-	II>	F
II>	M	-	-	DD	F
DD	M	-	-	-	-
n = 31 (20M; 11F)		n = 17 (2M; 15F)		n = 30 (13M; 17F)	
II = 5	II> = 1; II< = 4	II = 8	II> = 0; II< = 8	II = 8	II> = 1; II< = 7
ID = 25	ID> = 5; ID< = 20	ID = 9	ID> = 4; ID< = 5	ID = 21	ID> = 7; ID< = 14
DD = 1	-	DD = 0	-	DD = 1	-

(F) feminino, (M) masculino; (II, II<, II>) inserção, variante 350pb, variante 600pb em homozigose, (DD) deleção 250pb em homozigose e (ID, ID<, ID>) heterozigoto e variantes 350/250pb e 600pb/250pb encontradas para o polimorfismo I/D no gene da ECA.

As frequências do polimorfismo I/D do gene da ECA obtidas considerando os 78 pacientes em conjunto para os genótipos II, ID e DD são apresentadas na Tabela 3, sendo que todas as frequências genotípicas se apresentaram fora do EHW ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Frequências gênicas (D; I) e genotípicas (DD; ID; II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA em todos os pacientes analisados em conjunto. Os números em negrito indicam frequências fora do EHW.

<b>Alelo/Genótipo</b>	<b>Frequência</b>
Freq D	0,3782
Freq I	0,6218
Freq DD	<b>0,0257</b>
Freq ID	<b>0,7051</b>
Freq II	<b>0,2692</b>

As frequências gênicas e genotípicas também foram obtidas considerando os pacientes agrupados segundo o uso medicamentoso como indicados na tabela 1, e os resultados são sumarizados na tabela 4. As classes genotípicas se apresentaram fora do EHW ( $p < 0,05$ ) para os grupos FaC e DC, enquanto para o grupo MC se apresentaram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 4.** Frequências gênicas (D; I) e genóticas (DD; ID; II) para o polimorfismo I/D do gene da ECA em todos os pacientes analisados em grupos definidos segundo uso de medicamentos em: (FaC) Fácil Controle, (MC) Médio Controle e (DC) Difícil Controle. Os números em negrito indicam frequências fora do EHW.

Alelo/Genótipo	FaC	MC	DC
Freq D	0,4344	0,2647	0,3833
Freq I	0,5645	0,7353	0,6167
Freq DD	<b>0,0323</b>	0,0000	<b>0,0333</b>
Freq ID	<b>0,8064</b>	0,5294	<b>0,7000</b>
Freq II	<b>0,1613</b>	0,4706	<b>0,2667</b>

A comparação das frequências genóticas entre os grupos (qui-quadrado de Pearson) mostrou que não existe uma diferença significativa entre eles (qui-quadrado = 5,657326;  $p = 0,22625$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequências gênicas (D; I) e genóticas (DD; ID<, ID>; II<; II>) para o polimorfismo I/D do gene da ECA em todos os pacientes analisados em grupos definidos segundo uso de medicamentos em: (FaC) Fácil Controle, (MC) Médio Controle e (DC) Difícil Controle. Os números em negrito indicam frequências fora do EHW ( $p < 0,05$ ).

Alelo/Genótipo	Frequência
Freq D	0,3782
Freq I<	0,4936
Freq I>	0,1282
Freq DD	<b>0,0257</b>
Freq ID<	<b>0,5000</b>
Freq ID>	<b>0,2051</b>
Freq II<	<b>0,2435</b>
Freq II>	<b>0,0257</b>

Analisando-se os genótipos individualizados, a comparação das frequências genóticas entre os grupos (qui-quadrado de Pearson) mostrou que não existe uma diferença significativa entre eles (qui-quadrado=9,691828;



$p=0,28734$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Frequências gênicas (D; I) e genótípicas (DD; ID<, ID>; II<; II>) para o polimorfismo I/D do gene da ECA em todos os pacientes analisados em grupos definidos segundo uso de medicamentos em: (FaC) Fácil Controle, (MC) Médio Controle e (DC) Difícil Controle. Os números em negrito indicam frequências fora do EHW ( $p<0,05$ )

Alelo/Genótipo	FaC	MC	DC
Freq D	0,4355	0,2647	0,3833
Freq I<	0,4516	0,6176	0,4667
Freq I>	0,1129	0,1176	0,1500
Freq DD	<b>0,0323</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0334</b>
Freq ID<	<b>0,6451</b>	<b>0,2941</b>	<b>0,4666</b>
Freq ID>	<b>0,1613</b>	<b>0,2353</b>	<b>0,2333</b>
Freq II<	<b>0,1290</b>	<b>0,4706</b>	<b>0,2333</b>
Freq I<I>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
Freq II>	<b>0,0323</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0334</b>

Tanto para os dados agrupados pelas classes genótípicas clássicas (II, ID, DD), quanto separando os dois alelos variantes (I> e I<), a análise de diferenciação genética mostrou que esta é baixa ( $F_{st} < 0,05$ , e distâncias de Reynolds  $< 0,03$ ).

## Discussão

O gene da ECA é responsável pela síntese da Enzima Conversora de Angiotensina, está localizado no locus 17q23 e atua na homeostase de funções do sistema vascular (Crisan et al., 2000). Alguns estudos apontam uma relação do alelo D com doenças coronarianas (Niu et al., 2002), disfunção circulatória e vasoconstrição (O'Donnell et al., 1998; Bengtsson et al., 1999), enquanto outros relatam não terem encontrado associações significantes (Fujimura et al., 1997; Poch et al., 2002).

A literatura ainda é muito controversa em relação a implicações de variantes polimórficas deste gene e o estabelecimento da HAS, embora a atividade enzimática da ECA possa ser modulada pelo polimorfismo I/D do íntron 16 do gene da ECA (Rigat *et al.*, 1992; Weekers *et al.*, 2005).

Estudar pacientes exclusivamente hipertensos, com diferentes níveis de controle da PA, pode ser um caminho interessante, especialmente considerando indivíduos com uso de múltiplos medicamentos e de difícil controle da PA. Contudo, os resultados com pacientes hipertensos, obtidos com a genotipagem para o polimorfismo I/D da ECA, não apontam estruturação genética ( $F_{st}$ ) na amostra total e também considerando grupos de pacientes com diferentes níveis de controle da HAS (FaC, MC, DC). Isto implica em que, na amostra, não é corroborada a hipótese de associação de classes genotípicas para o polimorfismo I/D com diferentes níveis de HAS.

Os dados obtidos para as frequências gênicas e genotípicas, da população de hipertensos aqui estudada, demonstram ainda que, os genótipos encontram-se fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, fatores como: mutação, recombinação gênica, seleção natural, deriva genética, fluxo gênico ou endogamia podem estar ocasionando este desequilíbrio. Resultado semelhante ocorre quando os dados são analisados para os grupos em separado, exceto para o grupo de controle moderado (MC). Este pode ser um efeito atribuído a deriva genética devido ao tamanho da amostra, ou mesmo que a própria frequência extremamente mais baixa do alelo D, nesta amostra, reflita um efeito de seleção em favor do alelo I. A primeira hipótese pode ser requerida para explicar a manutenção de alelos com maior carga genética na população

humana, o que poderá tomar caminho inverso a medida em que a HAS afete o valor adaptativo da população, atingindo faixas etárias menores. Por outro lado, com perspectiva não menos alarmante, efeitos de seleção poderão ser sentidos por portadores do alelo D se predominar este quadro em outras populações. No entanto, esta é ainda uma questão em aberto, mas que implica em investigar tendências evolutivas da HAS sobre a população humana.

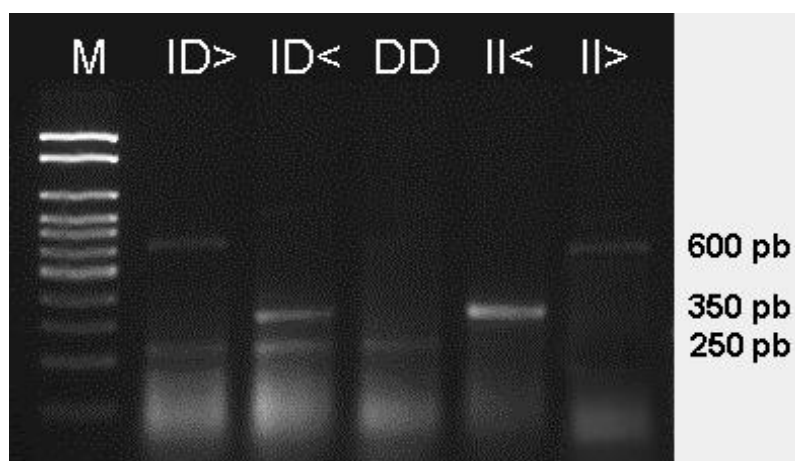
Ainda sob a óptica da biologia evolutiva, merece destaque considerar que as sequências *Alu* se inseriram no genoma humano há cerca de 55 m.a. (Quentin, 1992) e não ocorre em outros primatas (Watkins *et al.*, 2001). O polimorfismo I/D é caracterizado pela inserção ou deleção de um fragmento *Alu* de 287 pb no íntron 16 do gene da ECA (Rigat *et al.*, 1992; Weekers *et al.*, 2005). Embora I/D represente um polimorfismo intrônico, alguns estudos já demonstraram uma correlação da variabilidade de atividade da enzima ECA com diferentes haplótipos (Villard *et al.*, 1996; Keavney *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001), sugestivo de que eventos pós-transcricionais possam estar implicados na regulação deste gene (Häsler e Strub 2006).

O perfil eletroforético evidenciado em nosso estudo (Figura 1) demonstrou dois alelos variantes (I< com 350 pb e I> com 600 pb) para inserção de sequências *Alu*, diferente do que é relatado na literatura com o fragmento de inserção apresentando 287 pb (Rigat *et al.*, 1992; Weekers *et al.*, 2005). Acreditamos que isto seja devido a eventos de duplicação e o sequenciamento destes fragmentos deve elucidar esta questão. Por outro lado, mesmo estes novos alelos não mostraram associação com a HAS na população investigada. De posse destes dados não é possível suportar a

hipótese original de influência de eventos pós-transcricionais no gene da ECA em associação a HAS. Outros mecanismos devem estar envolvidos no equilíbrio da PA no sistema renina-angiotensina. Recentemente Zhou e colaboradores propuseram que a biodisponibilidade do angiotensinogênio para a ECA é fator preponderante na clivagem molecular e depende do estado de oxidação do angiotensinogênio (Zhou *et al.*, 2010), o que em nossa opinião deve refletir um quadro mais complexo na integração destes novos dados com o polimorfismo I/D.

## **Referências**

As referências citadas neste capítulo estão apresentadas ao final da dissertação no item Referências Bibliográficas.



**Figura 1.** Gel de agarose 1,5% evidenciando os perfis encontrados para a amplificação da região polimórfica I/D da ECA nos pacientes hipertensos estudados. **(M)** Marcador de peso molecular; **(ID>)** inserção/deleção variante 600pb/250pb; **(ID<)** inserção/deleção variante 350pb/250pb; **(DD)** deleção 250pb em homozigose; **(II<)** inserção em homozigose variante 350pb; **(II>)** inserção em homozigose variante 600pb.

## **5. Conclusões**

---

Considerando que o exercício físico regular é uma forma de prevenção e de tratamento não-farmacológico para indivíduos portadores de SM, foi possível demonstrar, neste estudo, que exercícios aeróbicos mesmo a curto prazo, contribuíram para a reversão do quadro de HAS e/ou DM2, devido a ocorrência de algumas ações importantes como atividade hipotensora pós-exercício, níveis plasmáticos de HDL aumentados e glicemia em jejum diminuídos.

A caracterização genotípica dos pacientes hipertensos submetidos a este estudo, em relação ao polimorfismo I/D para o gene da ECA, indicou não haver agrupamentos preferenciais ou associação de diferentes estados de controle medicamentoso da HAS com as classes genotípicas. Contudo, indicou que esta amostra populacional se apresenta fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com menor representatividade do alelo D.

Foi demonstrado, pela primeira vez que variantes para o alelo I podem ocorrer e, mesmo estas não apresentaram associação com a HAS, na população amostrada.

## 6. Referências Bibliográficas

---

ACSM (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE). **Manual do ACSM para Avaliação da Aptidão Física relacionada à Saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

AGACHAN, B.; ISBIR, T.; YILMAZ, H.; AKOGLU, E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphisms in Turkish hypertensive patients. **Exp Molec Med**, v. 35, n. 6, p. 545-549, 2003.

APPEL, L. J.; MOORE, T. J.; OBARZANEK, E.; VOLLMER, W. M.; SVETKEY, L. P.; SACKS, F. M.; BRAY, G. A.; VOGT, T. M.; CUTLER, J. A.; WINDHAUSER, M. M.; LIN, P. H.; KARANJA, N.; SIMONS-MORTON, D.; MCCULLOUGH, M.; SWAIN, J.; STEELE, P.; EVANS, M. A. MILLER, E. R.; HARSHA, D. W. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. **N Engl J Med**, v. 336, n. 16, p. 1117-1124, 1997.

ARNETT, D. K.; DAVIS, B. R.; FORD, C. E.; BOERWINKLE, E.; LEIENDECKER-FOSTER, C.; MILLER, M. B.; BLACK, H.; ECKFELDT, J. H. Pharmacogenetic Association of the Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism on Blood Pressure and Cardiovascular Risk in Relation to Antihypertensive Treatment. The Genetics of Hypertension-Associated Treatment (GenHAT) Study. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3374-3383, 2005.

ARSA, G.; LIMA, L.; ALMEIDA, S. S.; MOREIRA, S. R.; CAMPBELL, C. S. G.; SIMÕES, H. G. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Rev Bras Ci Desemp Hum**, v. 11, n. 1, p. 103-111, 2009.

BARRETO-FILHO, J. A. S.; KRIEGER, J. E. Genética Hipertensão Arterial: conhecimento aplicado à prática clínica? **Rev Soc Cardiol**, v. 13, n. 1, p. 46-55, 2003.

BATZER, M. A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D. H.; SHAIKL, T. H.; NOVICK, G. E.; LOANNOU, P. A.; SCHEER, W. D.; HERRERA, R. J. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **PNAS**, v. 91, n. 25, p. 12288-12292, 1994.

BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nature Genet**, v. 3, p. 370-379, 2002.

BENGTSSON, K.; ORHO-MELANDER, M.; LINDBLAD, U.; MELANDER, O.; BOG-HANSEN, E.; RANSTAM, J.; RASTAM, L.; GROOP, L. Polymorphism in

the angiotensin converting enzyme but not in the angiotensinogen gene is associated with hypertension and type 2 diabetes: the Skaraborg Hypertension and diabetes project. **J Hypertens**, v. 17, n. 11, p. 1569-1575, 1999.

BENJAFIELD, A. V.; JEYASINGAM, C. L.; NYHOLT, D. R.; GRIFFITHS, L. R.; MORRIS, B. J. G-Protein  $\beta$ 3 Subunit Gene (GNB3) Variant in Causation of Essential Hypertension. **Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 1094-1097, 1998.

BIOLO, A.; ROHDE, L. E. O impacto dos polimorfismos genéticos e da farmacogenética na avaliação e manejo da insuficiência cardíaca. **Rev Soc Cardiol do RS**, a. XIII, n. 3, p. 1-5, 2004.

BOING, A. C.; BOING, A. F. Hipertensão arterial sistêmica: o que nos dizem os sistemas brasileiros de cadastramentos e informações em saúde. **Rev Bras Hipertens**, v. 14, n. 2, p. 84-88, 2007.

BORG, G; NOBLE, B. J. Psychophysical bases of perceived exertion. **Med Sci Sports e Exerc**, v. 14, n. 5, p. 377-381, 1982.

BRETT SE, RITTER JM, CHOWIENCZYK PJ. Diastolic blood pressure changes during exercise positively correlate with serum cholesterol and insulin resistance. **Circulation**, v. 101, n. 6, p. 611-615, 2000.

BROSIUS, J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. **Gene**, v. 238, n. 1, p. 115-134, 1999.

BRYAN, A.; HUTCHISON, K. E.; SEALS, D. R.; ALLEN, D. L. A Transdisciplinary Model Integrating Genetic, Physiological, and Psychological Correlates of Voluntary Exercise. **Health Psychol**, v. 26, n. 1, p. 30-39, 2007.

CAMBIEN, F.; ALHENC-GELAS, F.; HERBETH, B.; ANDRE, J. L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F.; ALLEGRINI, J.; BLOCH, C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. **Am J Hum Genet**, v. 43, n. 5, p. 774-780, 1988.

CARNEVALI JUNIOR, L. C.; LIMA, W. P. Lipídios, Expressão Genica e Exercício. In: Lima W. P. (Org.). **Lipídios e Exercício**: aspectos fisiológicos e do treinamento. São Paulo: Phorte, 2009.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology. **Circulation**, v. 101, p. 329-335, 2000a.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential Hypertension: Part II: Treatment. **Circulation**, v. 101, p. 446-453, 2000b.

CARSON, P.; ZIESCHE, S.; JOHNSON, G.; COHN, J. N. 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.

CHARBONNEAU, D. E.; HANSON, E. D.; LUDLOW, A. T.; DELMONICO, M. J.; HURLEY, B. F.; ROTH, S. M. ACE Genotype and the Muscle Hypertrophic and Strength Responses to Strength Training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 4, p. 677-683, 2008.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L. Jr.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. JR.; ROCCELLA, E. J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-1252, 2003.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev Bras Med Esp**, v. 10, n. 4, p. 319-324, 2004.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **Intern J Biochem & Cell Biol**, v. 35, p. 769-773, 2003.

COHN, J. N.; JOHNSON, G.; ZIESCHE, S.; COBB, F.; FRANCIS, G.; TRISTANI, F.; SMITH, R.; DUNKMAN, W. B.; LOEB, H.; WONG, M.; BHAT, G.; GOLDMAN, S.; FLETCHER, R. D.; DOHERTY, J.; et al. A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. **N Engl J Med**, v. 325, n. 5, p. 303-310, 1991.

CORDAUX, R.; BATZER, M. The impact of retroposons on human genome evolution. **Nature Rev Genet**, v. 10, n. 10, p. 691-703, 2009.

CORVOL, P., WILLIAMS, T. A.; SOUBRIER, F. **Peptidyl dipeptidase a-angiotensin-I converting-enzyme**. In *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases*, 1995.

COSTA, A. M.; SILVA, A. J.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, R. J.; GRANADEIRO, L. B. Efeitos do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do polimorfismo i/d do gene da eca no desempenho esportivo. **Rev Bras Ci do Esp**, v. 31, n. 1, p. 9-24, 2009.

CRISAN, D.; CARR, J. Angiotensin I-Converting Enzyme Genotype and Disease Associations. **J Mol Diag**, v. 2, n. 3, p. 105-115, 2000.

DANILOV, S.; JASPARD, E.; CHURAKOVA, T.; TOWBIN, H.; SAVOIE, F.; WEI, L.; ALHENCHELAS, F. Structure-function analysis of angiotensin I converting enzyme using monoclonal-antibodiesselective- inhibition of the amino-terminal active-site. **J Biol Chem**, v. 269, n. 43, p. 26806-26814, 1994.

DANSER, A.; SCHALEKAMP, M.; BAX, W.; VAN-DEN-BRINK, A.; SAXENA, P.; RIEGGER, G. Angiotensin-converting enzyme in the human heart: effect of the

deletion/insertion polymorphism. **Circulation**, v. 92, p. 1387-1388, 1995.

DATASUS. **Taxa de Prevalência de Hipertensão Arterial**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0207>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

DAVIS, G. K.; MILLNER, R. W.; ROBERTS, D. H. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene expression in the human left ventricle: effect of ACE gene insertion/deletion polymorphism and left ventricular function. **Eur. J. Heart Fail**, v. 2, n. 3, p. 253-256, 2000.

DEININGER, P. L.; BATZER M. A. Alu repeats and human disease. **Mol Genet Metabol**, v. 67, n. 3, p. 183-193, 1999.

DELL'ITALIA, L. J.; ROCIC, P.; LUCCHESI, P. A. Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with diabetes and coronary artery disease. **Cur Prob Cardiol**, v. 27, n. 1, p. 6-36, 2002.

DIAS, R. G.; PEREIRA, A. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, J. E. Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite. **Rev Bras Med Esp**, v. 13, n. 3, p. 209-216, 2007.

DUFOUR, C.; CASANE, D.; DENTON, D.; WICKINGS, J.; CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X. Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the renin angiotensin system. **Genomics**, v. 69, n. 1, p. 14-26, 2000.

EL-DORRY, H. A.; PICKETT, C. B.; MACGREGOR, J. S.; SOFFE, R. R. L. Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes. **PNAS**, v. 79, n. 14, p. 4295-4297, 1982.

FEINLEIB, M.; GARRISON, R. J.; FABSITZ, R.; CHRISTIAN, J. C.; HRUBEC, Z.; BORHANI, N. O.; KANNEL, W. B.; ROSENMAN, R.; SCHWARTZ, J. T.; WAGNER, J. O. The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. **Am J Epidemiol**, v. 106, n. 4, p. 284-285, 1977.

FEITOSA, G. S.; CARVALHO, E. N. Sistema renina-angiotensina e insuficiência cardíaca: o uso dos antagonistas do receptor da angiotensina II. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 3, p. 250-254, 2000.

FERREIRA, S. R. G.; VIVOLO, M. A.; KHAWALI, C. Atividade Física e Síndrome Metabólica. In: Godoy-Mattos, A. F. (Ed.). **Síndrome Metabólica**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FOLLAND, J.; LEACH, B.; LITTLE, T.; HAWKER, K.; MYERSON, S.; MONTGOMERY, H.; JONES, D. Angiotensin converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload. **Exper Physiol**, v. 85, n. 5, p. 575-579, 2000.

FORD, E. B. **Polymorphism and taxonomy**. In Huxley J. The new systematics. Oxford. 1940.

FREITAS, S. R. S.; CABELLO, P. H.; MOURA-NETO, R. S.; DOLINSKY, L. C.; BÓIA M. N. Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em um município da Região Amazônica. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 4, p. 447-51, 2007.

FREY, I.; BAUMSTARK, M. W.; BERG, A. Acute and delayed effects of prolonged exercise on serum lipoproteins. I. Composition and distribution of high density lipoprotein subfractions. **J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 66, p. 521-525, 1993.

FUJIMURA, T.; YOKOTA, M.; KATO, S.; HIRAYAMA, H.; TSUNEKAWA, A.; INAGAKI, H.; TAKATSU, F.; NAKASHIMA, N.; YAMADA, Y. Lack of association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism or serum enzyme activity with coronary artery disease in Japanese subjects. **Am J Hypertens**, v. 10, p. 1384-1390, 1997.

GINER, V.; POCH, E.; BRAGULAT, E.; ORIOLA, J.; GONZALEZ, D.; COCA, A.; DE LA SIERRA, A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. **Hypertension**, v. 35, p. 512-517, 2000.

GONÇALVES, L. M. Marcadores Genéticos da Hipertensão Arterial: Que Futuro? **Rev Port Cardiol**, v. 21, n. 1, p. 39-43, 2002.

GRANDJEAN, P. W.; CROUSE, S. F.; ROHACK, J. J. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 472-480, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Tradução da 12ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAGBERG, J. M.; FERRELL, R. E.; MCCOLE, S. D.; WILUND K. R.; MOORE, G. E.  $VO_{2max}$  is associated with ACE genotype in postmenopausal women. **J Appl Physiol**, v. 85, p. 1842-1846, 1998.

HAGBERG, J. M.; FERRELL, R. E.; DENGEL, D. R.; WILUND, K. R. Exercise training-induced blood pressure and plasma lipid improvements in hypertensives may be genotype dependent. **Hypertension**, v. 34, p. 18-23, 1999.

HALLIWILL, J. R. Mechanisms and clinical implications of postexercise

hypotension in humans. **J Exerc Sport Sci**, v. 29, n. 2, p. 65-70, 2001.

HARRAP, S. B.; CLARK, S. A.; FRASER, R.; TOWRIE, A.; BROWN, A. J.; LEVER, A. F. Effects of sodium intake and aldosterone on the renal pressure natriuresis. **Am J Physiol**, v. 254, 697-703, 1988.

HÄSLER, J.; STRUB, K. Alu elements as regulaytors of gene expression. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 19, p. 5491-5497, 2006.

HOWARD, T. E.; SHAI, S.; LANGFORD, K. G.; MARTIN, B. M.; BERNSTEIN, K. E. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. **Mol Cell Biol**, v. 10, p. 4294-4302, 1990.

HUBERT, C.; HOUOT, A. M.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **J Biol Chem**, v. 266, p. 15377-15383, 1991.

HWANG, D.M.; DEMPSEY, A.A.; WANG, R.; REZVANI, M.; BARRANS, J. D.; DAI, K.; WANG, H. Y.; MA, H.; CUKERMAN, E.; LIU, Y.; GU, J.; ZHANG, J.; TSUI, S. K. W.; WAYE, M. M. Y.; FUNG, K.; LEE, C.; LIEW, C. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium cardiovascular genes. **Circulation**, v. 96, p. 4146-4203, 1997.

IZAWA, H.; YAMANA, Y.; OKADA, T.; TANAKA, M.; HYRAYAMA, H.; YOKOTA, M. Prediction of genetic risk for hypertension. **Hypertension**, v. 41, p. 1035-1040, 2003.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **J Biol Chem**, v. 268, p. 9496-9503, 1993.

JEUNEMAITRE, X.; LIFTON, R. P.; HUNT, S. C.; WILLIAMS, R. R.; LALOUEL, J. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. **Nature Genet**, v. 1, p. 72-75, 1992a.

JEUNEMAITRE, X.; SOUBRIER, F.; KOTELEVTSSEV, Y. V.; LIFTON, R. P.; WILLIAMS, C. S.; CHARRU, A.; HUNT, S.; HOPKINS, P. N.; WILLIAMS, R. R.; LALOUEL, J. M. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**, v. 71, p. 169-180, 1992b.

KARIO, K.; HOSHIDE, S.; UMEDA, Y.; SATO, Y.; IKEDA, U.; NISHIUMA, S.; MATSUO, M.; SHIMADA, K. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. **Hypertens Rev**, v. 22, p. 95-103, 1999.

KEAVNEY, B.; MCKENZIE, C. A.; CONNELL, J. M. C.; JULIER C.; RATCLIFFE, P. J.; SOBEL, E.; LATHROP, M.; FARRALL, M. Measured Haplotype Analysis of the Angiotensin-I Converting Enzyme Gene. **Human Mol Genet**, v. 7, n. 11, p. 1745-1751, 1998.

KODAMA, S. Effect of Aerobic Exercise Training on Serum Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. **Arch Inter Med**, v. 167, n. 10, 2007.

KREGE, J. H.; JOHN, S. W.; LANGENBACH, L. L.; HODGIN, J. B.; HAGAMAN, J. R.; BACHMAN, E. S.; JENNETTE, J. C.; O'BRIEN, D. A.; SMITHIES, O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature**, v. 375, p. 146-148, 1995.

KUNZ, R.; KREUTZ, R.; BEIGE, J.; DISTLER, A.; ; SHARMA A. M. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systemic review and methodological appraisal. **Hypertension**, v. 30, p. 1331-1337, 1997.

LATERZA, M. C.; RONDON, M. U. P.B.; NEGRÃO, C. E. Efeito anti-hipertensivo do exercício. **Rev Bras Hipertens**, v. 14, n. 2, p. 104-111, 2007.

LEE, M. A.; BOHM, M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. **Circulation**, v. 87, Supl IV, p. 7-13, 1993.

LEE, Y. J.; TSAI, J. C. R. ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 world health organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 25, n. 6, p. 1002-1008, 2002.

LEI, H.; DAY, I. N.; VORECHOVSKY, I. Exonization of AluYa5 in the human ACE gene requires mutations in both 3' and 5' splice sites and is facilitated by a conserved splicing enhancer. **Nucleic Acid Res**, v. 33, p. 3897-3906, 2005.

LEITÃO, C. B.; RODRIGUES, T. C.; COSTA, L. A.; CANANI, L. H.; GROSS, J. L. Tratamento da Hipertensão na Síndrome Metabólica. In: Godoy-Mattos, A. F. (Ed.). **Síndrome Metabólica**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LIFTON, R. P. Molecular genetics of human blood pressure variation. **Science**, v. 272, p. 676-680, 1996.

LIMA, W. P.; JUNIOR, P. C.; BELMONTE, M. A. Metabolismo Lipídico Muscular em Repouso e Exercício. In: Lima, W. P. **Lipídios e Exercícios: aspectos fisiológicos e do treinamento**. São Paulo: Phorte, 2009.

LINDPAINTENER, K.; PFEFFER, M. A.; KREUTZ, R.; STAMPFER, M. J.; GRODSTEIN, F.; LAMOTTE F.; BURING, J.; HENNEKENS, C. H. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene

polymorphism and the risk of ischemic heart disease. **N Engl J Med**, v. 332, n. 11, p. 706-711, 1995.

LONGINI, I. M.; HIGGINS, M. W.; HINTON, P. C.; MOLL, P. C.; KELLER, J. B. Environmental and genetic sources of familial aggregation of blood pressure in Tecumseh, Michigan. **Am J Epidemiol**, v. 120, p. 131-144, 1984.

MAEDA, Y.; IKEDA, U.; EBATA, H.; HOJO, Y.; SEINO, Y.; HAYASHI, Y.; KUROKI, S.; SHIMADA, K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in hypertensive individuals with parental history of stroke. **Stroke**, v. 27, p. 1521-1523, 1996.

MALIK, F.S.; LAVIE, C.J.; MEHRA, M.R.; MILANI, R.V.; RE, R. N. Renin-angiotensin system: genes to bedside. **Am Heart J**, v. 134, p. 514-527, 1997.

MARTE, A. P.; SANTOS, R. D. Bases fisiopatológicas das dislipidemia e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 14, n. 4, p. 252-257, 2007.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P. L. **Bioquímica do Exercício e do Treinamento**. São Paulo: Manole, 2000.

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

MCNAMARA, D. M.; HOLUBKOV, R.; JANOSKO, K.; PALMER, A.; WANG, J. J.; MACGOWAN, G. A.; MURALI, S.; ROSENBLUM, W. D.; LONDON, B.; FELDMAN, A. M. Pharmacogenetic Interactions Between  $\beta$ -Blocker Therapy and the Angiotensin-Converting Enzyme Deletion Polymorphism in Patients With Congestive Heart Failure. **Circulation**, v.103, p.1644-1648, 2001.

MCNAMARA, D. M.; HOLUBKOV, R.; POSTAVA, L.; JANOSKO, K.; MACGOWAN, G. A.; MATHIER, M.; MURALI, S.; FELDMAN, A. M.; LONDON, B. Pharmacogenetic Interactions Between Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy and the Angiotensin-Converting Enzyme Deletion Polymorphism in Patients With Congestive Heart Failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, n. 10, p. 2019-2026, 2004.

MEISSNER, I.; WHISNANT, J.; SHEPS, S.; Schwartz G. L; O'Fallon, W. M.; Covalt, J. L.; Sicks, J. D.; Bailey, K. R.; Wiebers, D. O. Detection and control of high blood pressure in the community: do we need a wake-up call? **Hypertension**, v. 34, p. 466-471, 1999.

MENEZES JÚNIOR, A. S.; MOREIRA, H. G.; DAHER, M. T. Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca em Pacientes Hipertensos, Antes e Depois do Tratamento com Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina II. **Arq Bras de Cardiol**, v. 83, n. 2, p. 165-168, 2004.

MILLER, M.P. **TFPGA – Tools For Population Genetic Analyses**, 1997, Version 1.3, <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estáticas da Hipertensão**. Disponível em: <<http://www.criasaude.com.br/N4766/doencas/hipertensao/estatisticas-hipertensao.html>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

MOLEDA, P.; MAJKOWSKA, L.; KALISZCZAK, R.; SAFRANOW, K.; ADLER, G.; GORACY, I. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Kardiol Pol J**, v. 64, p. 959-65, 2006.

MONTEIRO, H. L.; ROLIM, L. M. C.; SQUINCA, D. A.; SILVA, F. C.; TICIANELI, C. C. C.; AMARAL, S. L.. Efetividade de um programa de exercícios no condicionamento físico, perfil metabólico e pressão arterial de pacientes hipertensos. **Rev Bras Med Esp**, v. 13, n. 2, p. 107-112, 2007.

MONTGOMERY, H. E.; CLARKSON, P.; DOLLERY, C. M.; PRASAD, K.; LOSI, M. A.; HEMINGWAY, H.; STATTERS, D.; JUBB, M.; GIRVAIN, M.; VARNAVA, A.; WORLD, M.; DEANFIELD, J.; TALMUD, P.; MCEWAN, J. R.; MCKENNA, W. J.; HUMPHRIES, S. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. **Circulation**, v. 96, p. 741-747, 1997.

MONTGOMERY, H.; CLARKSON, P.; BARNARD, M.; BELL, J.; BRYNES, A.; DOLLERY, C.; HAJNAL, J.; HEMINGWAY, H.; MERCER, D.; JARMAN, P.; MARSHALL, R.; PRASAD, K.; RAYSON, M.; SAEED, N.; TALMUD, P.; THOMAS, L.; JUBB, M.; WORLD, M.; HUMPHRIES, S. Angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. **Lancet**, v. 353, n. 9152, p. 541-545, 1999.

MOTULSKY, H. J. **Prism 5 Statistics Guide**, 2007, GraphPad Software Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

MYERSON S, HEMINGWAY H, BUDGET R, MARTIN J, HUMPHRIES S, MONTGOMERY H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 1313-1316, 1999.

NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. P. B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 89-95, 2001.

NEKRUTENKO, A.; LI, W. H. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. **Trends Genet**, v. 17, p. 619-621, 2001.

NIU, T.; CHEN, X.; XU, X. Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism and Cardiovascular Disease: Therapeutic Implications. **Drugs**, v. 62, n. 7, p. 977-993, 2002.

NIU, W.; QI, Y.; GAO, P.; ZHU, D. Review: Association between angiotensin converting enzyme G2350A polymorphism and hypertension risk: a meta-analysis. **JRA Syst**, v. 12, n. 1, p. 8-14, 2010.

NUNES, N.; CAMPOREZ, J. P. G.; ZANUTO, R. Lipídios, patologias associadas e exercício: hipertensão arterial. In: Lima W. P. (Org.). **Lipídios e Exercício**: aspectos fisiológicos e do treinamento. São Paulo: Phorte, 2009.

O'DONNELL, C. J.; LINDPAINTNER, K.; LARSON, M. G.; RAO, V. S.; ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J.; MYERS R. H.; LEVY, D. Evidence for Association and Genetic Linkage of the Angiotensin-Converting Enzyme Locus With Hypertension and Blood Pressure in Men but Not Women in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 97, p. 1766-1772, 1998.

OHMACHI, N.; IWAI, N.; UCHIDA, Y.; SHICHIRI, G.; NAKAMURA, Y.; KINOSHITA, M. Relationship between the response to the angiotensin converting enzyme inhibitor imidapril and the angiotensin converting enzyme genotype. **Am J Hypertens**, v. 10, n.8, p. 951-955, 1997.

OLIVEIRA, E. M.; ALVES, G. B. A.; BARAUNA, V. G. Sistema renina-angiotensina: interação gene-exercício. **Rev Bras Hipertens**, v. 10, p. 125-129, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Diminuindo diferenças: a prática das políticas sobre determinantes sociais da saúde: documento de discussão**. WHO, Genebra, 2011.

PEDROSO, J. A. R. **Evolução temporal da função renal entre pacientes criticamente doentes: papel dos polimorfismos I/D e -262A>T do gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)**. 2006 48f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PESCATELLO, L. S. Exercise and Hypertension: Recent Advances in Exercise Prescription. **Current Hypertension Rep**, v. 7, p. 281-286, 2005.

PRADO, E. S.; DANTAS, E. H. M. Efeitos dos Exercícios Físicos Aeróbio e de Força nas Lipoproteínas HDL, LDL e Lipoproteína (a). **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, SP, v. 79, n. 4, 2002.

POCH, E.; DE LA SIERRA, A.; GONZÁLES-NUÑEZ, D.; ORIOLA, J.; REDÓN, J.; CHAVES, F. J.; MARÍN, P.; GINER, V.; PAMIES, E.; VILLAR, J.; RAMÍREZ, R.; STIEFEL, P.; RODRÍGUEZ PÉREZ, J. C.; RODRÍGUEZ ESPARRAGÓN, F.; MARTÍNEZ, E.; CARRIÓN, L.; SANCHÍS, C.; DIVISÓN, J. A. Genetic Polymorphisms of the renin-angiotensin system and essential hypertension. **Med Clin (Barc)**, v. 118, n. 15, p. 575-579, 2002.



QUENTIN, Y. Fusion of a free left Alu monomer and free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 20, p. 487-493, 1992.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: bases for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105, p. 767-779, 1983.

RIEDER, M.; TAYLOR, S.; CLARK, A.; NICKERSON, D. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. **Nature Genet**, v. 22, p. 59-62, 1999.

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. **J Clin Invest**, v. 86, p. 1343-1346, 1990.

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 Res**, v. 20, p. 1433, 1992.

ROLA, M. G.; FERREIRA, L. B. Polimorfismos genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica. **Univ Ci Saúde**, v. 6, n. 1, p. 57-68, 2008.

RONDINELLI, E.; MOURA-NETO, R. S. de. Perspectivas futuras: o papel da genética na abordagem do indivíduo hipertenso. **Rev SOCERJ**, v. 16, n. 1 p. 81-87, 2003.

RONDON, M. U. P. B.; ALVES, M. J. N. N.; BRAGA, A. M. F. W.; TEIXEIRA, O. T. U. N.; BARRETO, A. C. P.; KREIGER, E. M.; NEGRÃO, C. E. Postexercise blood pressure reduction in elderly hypertensive patients. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 4, p. 676-682, 2002.

RONDON, M. U. P.; BRUM, P. C. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 10, p. 134-139, 2003.

ROSSKOPF, D.; MANTHEY, I.; HABICH, C.; KIELBIK, M.; EISENHARDT, A.; NIKULA, C.; URBAN, M.; KOHNEN, S.; GRAF, E.; RAVENS, U.; SIFFERT, W. Identification and characterization of G $\beta$ s2, a novel splice variant of the G-protein  $\beta$ 3 subunit. **Biochem J**, v. 371, p. 223-232, 2003.

SANDRIM, V. C.; SANTOS, J. E. Farmacogenômica em hipertensão Aspectos fisiológicos. **Hipertensão**, v. 9, n. 1, p. 4-8, 2006.

SANTOS, S. H. S. **Avaliação dos distúrbios metabólicos produzidos pela deleção genética do receptor de angiotensina-(1-7), Mas, em**

- Camundongos FVB/N.** 2007 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SAYED-TABATABAEI, F. A.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.; VAN DUIJN C. M.; WITTEMAN, J. C. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. **Stroke**, v. 34, p. 1634-1639, 2003.
- SAYED-TABATABAEI, F. A.; OOSTRA, B. A.; ISAACS, A.; VAN DUIJN, C. M.; WIETTEMAN, J. C. M. ACE polymorphisms. **Circulation Res**, v. 98, p. 1123-1133, 2006.
- SHARMA, P. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. **J Neurol Neurosurg Psych** v.64, p. 227–230, 1998.
- SHERWOOD, L. **Fisiologia Humana das Células aos Sistemas.** São Paulo: Cengage Learning, 2011.
- SIFFERT, W.; ROSSKOPF, D.; SIFFERT, G.; BUSH, S.; MORITZ, A.; ERBEL, R.; SHARMA, A.M.; RITZ, E.; WICHMANN, H.; JAKOBS, K.H.; HORSTHEMKE, B. Association of a human G-protein  $\beta 3$  subunit variant with hypertension. **Nature Genet**, v.18, p. 45-48, 1998.
- SILVA, C. A.; LIMA, L. C. Exercício Físico e Controle Metabólico do DM2. **Arq Bras Endoc Metab**, v. 46, n. 5, p. 550-556, 2002.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, Supl I, 2005.
- STAESSEN, J. A.; WANG, J. G.; GINOCCHIO, G.; PETROV, V.; SAAVEDRA A. P.; SOUBRIER, F.; VLIETINCK, R.; FAGARD, R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. **J Hypertens**, v. 15, p. 1579-1592, 1997.
- STANTON, J. L.; BRAITMAN, L. E.; RILEY, A. M. JR.; KHOO, C. S.; SMITH, J. L. Demographic, dietary, life style, and anthropometric correlates of blood pressure. **Hypertension**, v. 4, n. 3, p. 135-142, 1982.
- STATSOFT. **Statistic**, 2001, Data analysis software system Inc., version 6, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- STRAZZULLO, P.; IACONE, R.; IACOVIELLO, L.; RUSSO, O.; BARBA, G.; RUSSO, P.; DO'RAZIO, A.; BARBATO, A.; CAPPUCCIO, F.; FARINARO, E.; SIANI, A. Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. **Ann Intern Med**, v. 138, p. 17-23, 2003.
- SUTHERLAND, D. J.; RUSE, J. L.; LAIDLAW, J. C. Hypertension, increased

aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. **Can Med Assoc J.** v. 95, p. 1109-1119, 1966.

TANIRA, M.; BALUSHI, K. Genetic variations related to hypertension: a review. **J Hum Hyperten**, v. 19, p. 7-19, 2005.

TOMILIN, N. V. Control of genes by mammalian retroposons. **Int Rev Cystol**, v. 186, p. 1-48, 1999.

TURNER, S. T.; BOERWINKLE, E. Genetics of Hypertension, Target-Organ complications, and response to therapy. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 39-45, 2000.

TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. **Trends Pharm Sci**, v. 23, 4, p. 177-183, 2002.

UEDA, S.; ELLIOTT, H. L.; MORTON, J. J.; CONNELL, J. M. Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**, v. 25, p. 1266-1269, 1995.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

VILLARD, E.; TIRET, L.; VISVIKIS, S.; RAKOTOVAO, R.; CAMBIEN, F.; SOUBRIER, F. Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two QTL segregation-linkage. **Am J Hum Genet**, v. 58, n. 6, p. 1268-1278, 1996.

VISICH P. S.; GOSS, F. L.; GORDON, P. M.; ROBERTSON, R. J.; WARTY, V.; DENYS, B. G.; METZ, K. F. Effects of exercise with varying energy expenditure on high-density lipoprotein-cholesterol. **J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 72, p. 242-248, 1996.

VON KODOLITSCH, Y.; PYERITZ, R. E.; ROGAN, P. K. Splice-site mutations in atherosclerosis candidate genes: relating individual information to phenotype. **Circulation**, v. 100, p. 693-699, 1999.

WALLACE, J. P. Exercise in Hypertension A Clinical Review. **J Sports Med**, v. 33, n. 8, 2003.

WANG, Y.; O'CONNELL, J. R.; MCARDLE, P. F.; WADE, J. B.; DORFF, S. E.; SHAH, S. J.; SHI, X.; PAN, L.; RAMPERSAUD, E.; SHEN, H.; KIM, J. D.; SUBRAMANYA, A. R.; STEINLE, N. I.; PARSA, A.; OBER, C. C.; WELLING, P. A.; CHAKRAVARTI, A.; WEDER, A. B.; COOPER, R. S.; MITCHELL, B. D.; SHULDINER, A. R.; CHANG, Y. C. Whole-genome association study identifies

STK39 as a hypertension susceptibility gene. **PNAS**, v. 106, n.1, p. 226-231, 2009.

WATKINS, W. S.; RICKER, C. E.; BAMSHAD, M. J.; CARROLL, M. L.; NGUY, S. V.; BATZER, M. A.; HARPENDING, H. C.; ROGERS, A. R.; JORDE, L. B. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of Alu-Insertion and restriction-site polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet**, v. 68, p. 738-752, 2001.

WEEKERS, L.; BOUHANICK, B.; HADJADJ, S.; GALLOIS, Y.; ROUSSEL, R.; PEAN, F.; ANKOTCHE, A.; CHATELLIER, G.; ALHENC-GELAS, F.; LEFEBVRE, P. J.; MARRE, M. Modulation of the renal response to ACE inhibition by ACE insertion/deletion polymorphism during hyperglycemia in normotensive, normoalbuminuric type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2961-7, 2005.

WILLIAMS, A. G.; RAYSON, M. P.; JUBB, M.; WORLD, M.; WOODS, D. R.; HAYWARD, M.; MARTIN, J.; HUMPHRIES, S. E.; MONTGOMERY, H. E. The ACE gene and muscle performance. **Nature**, v. 403, n. 10, p. 614-615, 2000.

WILLIAMS, R. R.; HUNT, S.C.; HOPKINS, P. N.; HASSTEDT, S. J.; WU, L. L.; LALOUEL, J. M. Tabulations and expectations regarding the genetics of human hypertension. **Kidney Int**, v. 44, p. 57-64, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Preventing and managing the global epidemic of obesity. Report of the World Health Organization Consultation of Obesity**. WHO, Geneva, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation**. WHO, Geneva, 2000.

WUYTS, B.; DELANGHE, J.; DE BUYZERE, M. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: clinical implications. **Acta Clin Belg**, v. 52, n. 6, p. 338-349, 1997.

YANCY, C. W.; FOWLER, M. B.; COLUCCI, W. S.; GILBERT, E. M.; BRISTOW, M. R.; COHN, J. N.; LUKAS, M. A.; YOUNG, S. T.; PACKER, M. Race and the response to adrenergic blockade with carvedilol in patients with chronic heart failure. **N Engl J Med**, v. 344, p. 1358-1365, 2001.

ZANELLA, M. T. Hipertensão e Síndrome Metabólica. In: Godoy-Mattos, A. F. (Ed.). **Síndrome Metabólica**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZHANG, B.; SAKAI, T.; MIURA, S.; KIYONAGA, A.; TANAKA, H.; SHINDO, M.; SAKU, K. Association of angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism with the depressor response to mild exercise therapy in patients with mild to moderate essential hypertension. **Clinical Genet**, v. 62, p. 328-333, 2002.

ZHANG, B.; TANAKA, H.; SHONO, N.; MIURA, S.; KIYONAGA, A.; SHINDO, M.; SAKU, K. The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. **Clinical Genet**, v. 63, p. 139-144, 2003.




ZHOU, A.; CARRELL, R. W.; MURPHY, M. P.; WEI, Z.; YAN, Y.; STANLEY, P. L. D.; STEIN, P. E.; PIPKIN, F. B.; READ, R. J. A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release. **Nature**, v. 468, p. 108-111, 2010.

ZHU, X.; BOUZEKI, N.; SOUTHAM, L.; COOPER, R. S.; ADEYEMO, A.; MCKENZIE, C. A.; LUKE, A.; CHEN, G.; ELSTON, R. C.; WARD, R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting Enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. **Am J Hum Genet**, 68, n. 5, p. 1139-1148, 2001.

ZISMAN, L. S. Inhibiting tissue angiotensin-converting enzyme. A Pound of flesh without the blood? **Circulation**, v. 98, p. 2788-2790, 1998.

## 7. Anexos

### Anexo 1: Parecer COEP

**PARECER Nº 116/2011**  
**Protocolo: 13664/11**

No dia 27 de Outubro de 2011, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Estudos de Polimorfismos genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose"** de responsabilidade da pesquisadora Viviane Nogaroto Vicari.


Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Parcial: 01 de Novembro de 2012.

Data para entrega do relatório Final: 01 de Novembro de 2013.

Ponta Grossa, 31 de Outubro de 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

  
Prof. Dr. Ulisses Coelho  
Coordenador

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL  
Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas  
Fone (42) 3220-3108 - Fax: (42) 3220-3102  
e-mail: [secocoe@uepg.br](mailto:secocoe@uepg.br) Home page: [www.uepg.br](http://www.uepg.br)

**Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)  
PESQUISA COM SERES HUMANOS**

Eu, \_\_\_\_\_, original da cidade de \_\_\_\_\_, Estado \_\_\_\_\_, nascido (a) em \_\_\_\_\_ (dia/mês/ano), portador (a) do documento de identidade RG \_\_\_\_\_, C.P.F. \_\_\_\_\_, residente à Rua \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, complemento \_\_\_\_\_, Bairro \_\_\_\_\_, localizado no município de \_\_\_\_\_, Estado \_\_\_\_\_, concordo com a minha participação no projeto de pesquisa intitulado "Estudos de Polimorfismos Genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e arterosclerose" à realizar-se na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Laboratório de Citogenética e Evolução, sob supervisão, da Dra. Viviane Nogaroto Vicari e do Dr. Mario Augusto Cray da Costa. Esta pesquisa está sob a responsabilidade do Prof. Dr. Roberto Ferreira, à encontrar-se pelos telefones (42) 3220-3739 / celular (42) 9918-0913, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84030-900, Bloco M, sala 40, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, e-mail: rfartoni@pq.cnpq.br. O médico Dr. Mario Augusto Cray da Costa, responsável pelo tratamento clínico do paciente, encontra-se no telefone (42) 3028-9494 (Clínica Cardiorespiratória Cray da Costa).

Estou ciente de que o objetivo deste trabalho consiste em coletar 5 ml de sangue, a partir do qual será extraído o DNA total e este será utilizado como molde em reações de amplificação do gene da Enzima Conversora de Angiotensina, relacionada a pressão arterial. A partir das sequências fornecidas pelo sequenciamento nucleotídico dos fragmentos amplificados, será realizada uma busca por mutações e polimorfismos que possam estar presentes nestes genes citados acima. Caso haja a identificação de alguma mutação/polimorfismo, o médico responsável e o paciente serão informados podendo, desta maneira, serem tomadas as devidas providências acerca de um tratamento mais adequado, o qual só trará benefícios ao paciente.

Os resultados destes trabalhos poderão ser apresentados à comunidade científica em geral, respeitando toda a informação adquirida que será tratada como confidencial pelos pesquisadores. Apenas pacientes voluntários serão incluídos como participantes deste estudo, no qual qualquer tipo de identificação pessoal será mantida sob sigilo e não constará em nenhum relatório ou publicação científicos ou estará disponível a terceiros (seguradoras ou empregadores, por exemplo). Os procedimentos e tratamentos específicos, quando identificadas as mutações, não trarão ônus nenhum aos pacientes participantes deste estudo. Estou ciente ainda de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja penalização alguma ou prejuízo ao meu tratamento. Da mesma forma, não haverá qualquer dano e, que em caso de reclamação, ou recurso poderei entrar em contato com a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa, pelo telefone (42) 3220-3108, Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84030-900, Bloco M, Sala 12, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, e-mail: seccoep@uepg.br.

Li, portanto, este termo, fui orientado (a) quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nenhum valor econômico por minha participação.

\_\_\_\_\_  
Voluntário (a)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni  
Supervisor responsável da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Dra. Viviane Nogaroto Vicari  
Pesquisadora - Prodoc/Capes

\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Augusto Cray da Costa  
Cardiologista

Ponta Grossa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

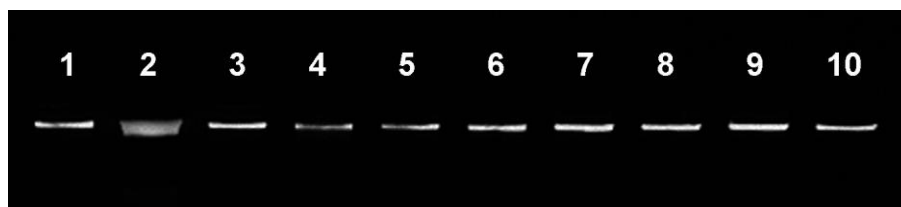
**Anexo 3: Protocolo de Extração de DNA de sangue****PROTOCOLO: EXTRAÇÃO DE DNA – KIT BIOPUR**

Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar em banho a 56°C.

1. Transferir 200µL de sangue total para um tubo de reação de 1,5mL.
2. Adicionar 200µL de Tampão A de Lise e 20µL de Proteínase K. Vortexar por 5 segundos.
3. Incubar por 15 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua.
4. Adicionar 400µL de Tampão B6 de Ligação e vortexar.
5. Transferir a mistura do passo 4 para a coluna que estará em um tubo de 2mL e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 2 minutos a 13000rpm. Descartar o filtrado e o tubo.
7. Utilize um novo tubo de 2mL. Adicionar 500µL de Tampão I de Lavagem na coluna e centrifugar por 1 minuto a 13000rpm, descartar o filtrado.
8. Adicionar 800µL de Tampão II de Lavagem, centrifugar por 1 minuto a 13000rpm, descartar o filtrado.
9. Uma nova centrifuga o por 4 minutos a rota o máxima deverá ser realizada para eliminar toda a soluço que ficou na coluna.
10. Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5mL. Adicionar 100-200µL de Tampão de Elui o aquecido a 56°C. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto e descartar a coluna. Armazenar a amostra a -20°C.



**Anexo 4:** Gel de Agarose 1.5% na verificação da integridade das amostras de DNA



**Anexo 5:** Tabelas de Quantificação das Amostras de DNA

Indivíduos	Grupo E	Quantificação (ng/uL)
1		127.5
2		682.5
3		122
4		102.5
5		76
6		75.5
7		72
8		80.5
9		99
10		64

Indivíduos	Grupo M	Quantificação (ng/uL)
1		24
2		109.5
3		325.5
4		93
5		14.1
6		46
7		28.5
8		127.5
9		32
10		25
11		114
12		99.5
13		22.5
14		160
15		25
16		166

---

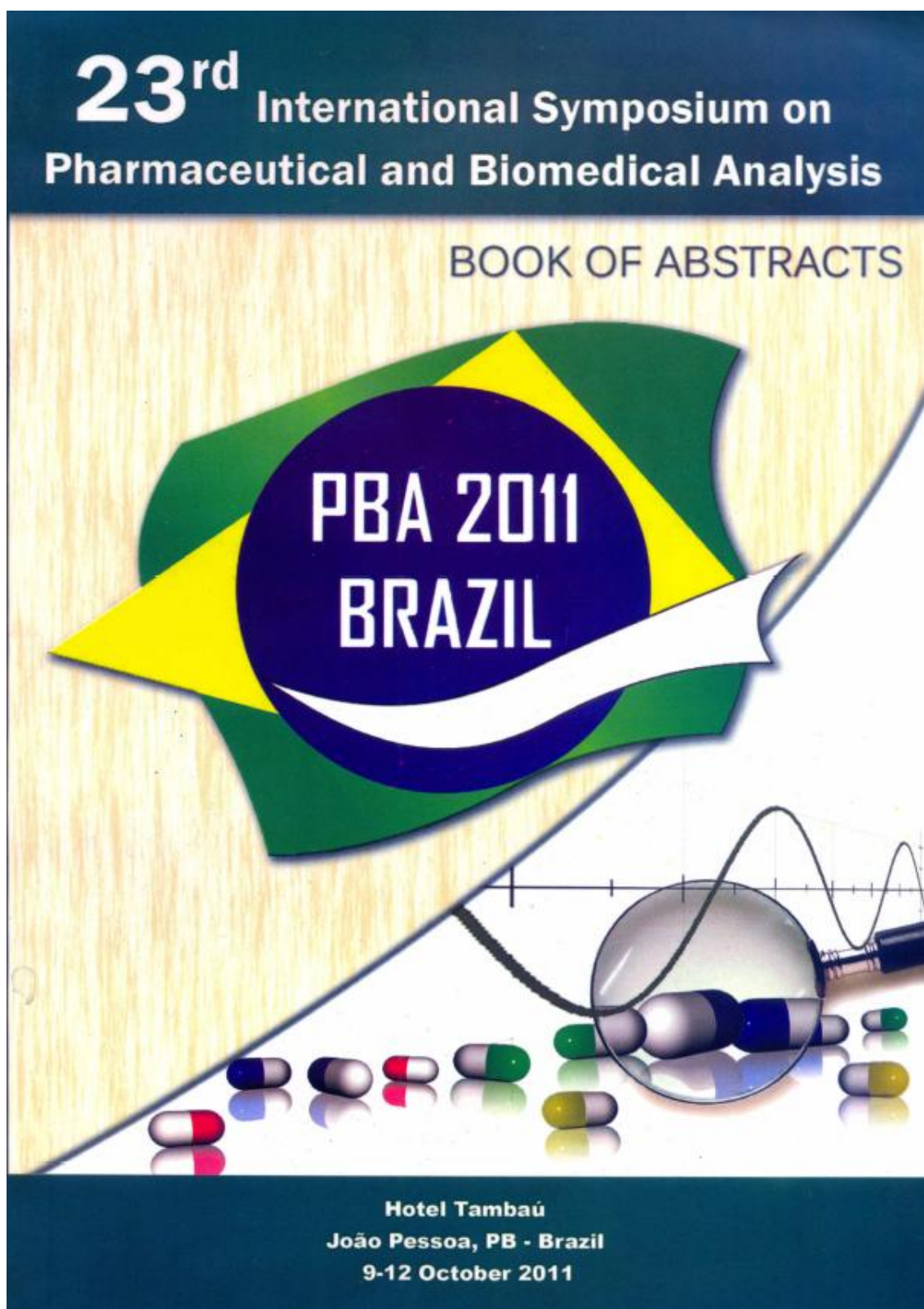
17	43.5
18	14.2
19	103
20	45
21	28.5
22	29
23	26
24	428.5
25	176
26	267.5
27	49.5
28	72.5
29	28.5
30	16
31	25
32	47
33	682.5
34	134
35	30
36	55.5
37	26
38	46.5
39	70
40	17.5
41	34
42	25.5
43	119.5
44	129
45	10.5
46	20.5
47	26
48	21
49	19.5
50	20.5
51	22
52	122
53	102.5
54	76
55	75.5
56	72
57	375.5
58	27
59	21
60	43.5
61	19.5
62	36.5
63	12.1
64	14.3
65	17.5
66	26.5
67	33
68	95.5

---

---

69	24
70	32.5
71	17.5
72	22
73	16
74	96.5
75	24
76	80.5
77	99
78	64

---

**Anexo 6:** Resumo Expandido



## L-Arginine-induced blood pressure reduction during and post exercise is associated with angiotensin converting enzyme polymorphism

João Luiz Lang Pavlak<sup>1</sup>, Kátia Cristina Alonso<sup>2</sup>, Luiz Augusto da Silva<sup>1</sup>, Viviane Nogaroto<sup>2</sup>,

Roberto Ferreira Artoni<sup>2</sup>, Carlos Ricardo Maneck Malfatti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Centro-Oeste, <sup>2</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa

Keywords: Polymorphism, Angiotensin, Hypertension, Exercise

### INTRODUCTION

The presence of an ACE gene polymorphism in humans (Cambien et al., 1994) is characterized by the presence (insertion, I) or absence (deletion, D) of a fragment of 287 bp, which has been identified in the intron 16 of this gene (Soubrier et al., 1988). The presence of the D allele is associated with higher ACE levels and vice versa (Tiret et al., 1992).

The nitric oxide (NO) synthesis, as a product of the metabolism of L-arginine, could be expected to cause vasodilation (Ast et al., 2010).

Therefore, this study was conducted to determine whether the reduction of arterial pressure (BP) at rest, during and in the recovery period of an aerobic exercise induced by the supplementation of different doses of oral L-Arginine is related with ACE polymorphism in hypertensive subjects.

### MATERIALS AND METHODS

The eight hypertensive patients (Table 1) received L-arginine (2 or 4 g/day) or placebo for 4 days prior to the test. The aerobic exercise was performed using a treadmill ergometer. The BP and heart (HR) rate were measured every 2 minutes during the exercise protocol.

Table 1. Clinical characteristics of patients (n=8)

Age (years)	Fat (%)	VO <sub>2</sub> max (ml. Kg <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> )	Glucose (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	SBP/DBP (mmHg)	HR (beats min <sup>-1</sup> )
51 ± 9	41 ± 5	24 ± 8	104 ± 24	160 ± 79	202 ± 44	145 ± 4/ 85 ± 8	78 ± 12

### RESULTS AND DISCUSSION

The L-arginine promoted a significant systolic BP reduction regardless of the genotype before, during and in the recovery period of the exercise protocol (P<0.05; Figure 1). The vasodilatation effect promoted by oral L-arginine supplementation is confirming what had been shown by a previous study (Ast et al., 2010). In present study, was showed that the magnitude of BP reduction suggests an association with the ACE genotype, where the major reduction effect was related to the II genotype versus the DD genotype (19%) with a smaller reduction in the relation ID vs DD genotype (12%). Although in the present study the L-arginine supplementation was efficient in attenuating the BP in different phases of exercise prescription, suggesting that

L-arginine promotes a better tolerance during exercise execution. The present study suggests that vasodilator actions that occur by secretion of nitric oxide, inducing reduction in BP during and after the exercise may depend on the genotype of the ACE gene.

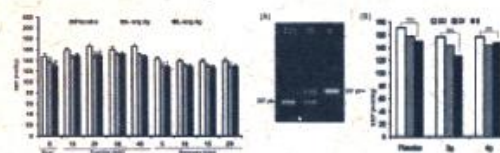


Figure 1. L-arginine supplementation effect in the systolic blood pressure (Left graphic, ANOVA; \*p<0.05) is associated with ACE Polymorphism in patients sampled (Right graphic). DD: homozygote deletion; DI: heterozygote patient; II: homozygote insertion.

### CONCLUSIONS

The present study suggests that the L-arginine vasodilator action that occurs by secretion of nitric oxide may depend on the genotype of the ACE gene.

### REFERENCES

- CAMBIEN, F.; COSTEROUSSÉ, O.; TIRET, L.; POIRIER, O.; LECERÉ, L.; GONZALES, M. F.; EVANS, A.; ARVEILER, D.; CAMBOU, J. P.; LUC, G. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation*, 1994 Aug;90(2):669-76.
- SOUBRIER, F.; ALHENC-GELAS, F.; HUBERT, C.; ALLEGRINI, J.; JOHN, M.; TREGAR, G.; CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85, 9386-9390.
- 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. *American Journal of Human Genetics*, 1992, 51, 197-205.
- AST J, JABLECKA A, BOGDANSKI P, SMOLAREK I, KRAUSS H, CHMARA E. Evaluation of the antihypertensive effect of L-arginine supplementation in patients with mild hypertension assessed with ambulatory blood pressure monitoring. *Medical Science Monitor*, 2010, 16(5):CR266-71.

## Anexo 7: Certificado





## 8. Apêndices

### Apêndice 1: Tabela de RCQ

Sexo	Idade	Categoria de Risco			
		Baixo	Moderado	Alto	Muito Alto
HOMEM	20 – 29	< 0,83	0,83 – 0,88	0,89 – 0,94	> 0,94
	30 – 39	< 0,84	0,84 – 0,91	0,92 – 0,96	> 0,96
	40 – 49	< 0,88	0,88 – 0,95	0,96 – 1,00	> 1,00
	50 – 59	< 0,90	0,90 – 0,96	0,97 – 1,02	> 1,02
	60 – 69	< 0,91	0,91 – 0,98	0,99 – 1,03	> 1,03
	70 – 79	< 0,92	0,92 – 0,99	1,00 – 1,04	> 1,04
MULHER	20 – 29	< 0,71	0,71 – 0,77	0,78 – 0,82	> 0,82
	30 – 39	< 0,72	0,72 – 0,78	0,79 – 0,84	> 0,84
	40 – 49	< 0,73	0,73 – 0,79	0,80 – 0,87	> 0,87
	50 – 59	< 0,74	0,74 – 0,81	0,82 – 0,88	> 0,88
	60 – 69	< 0,76	0,76 – 0,83	0,84 – 0,90	> 0,90
	70 – 79	< 0,77	0,77 – 0,84	0,85 – 0,91	> 0,91

Fonte: Modificado de ACSM (2006).

### Apêndice 2: Tabela Escala de Borg

Escala de categoria de Borg (Original)	
6	
7	Extremamente leve
8	
9	Muito leve
10	
11	Leve
12	
13	Um pouco intenso
14	
15	Intenso
16	
17	Muito intenso
18	
19	Extremamente intenso
20	

Os números de 6-20 são baseados na Frequência Cardíaca de 60-200 batimentos por minuto. O número 11 equivale a 50% da  $F_{c_{máx}}$ .

