



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO
CAMPUS VII – SENHOR DO BONFIM
COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ÉVELIN MASCARENHAS FERREIRA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO C825T DO GENE GNB3 ASSOCIADO À
HIPERTENSÃO E DIABETES E OCORRÊNCIA DE HIPERTENSOS E
DIABÉTICOS NO DISTRITO DE IGARA – SENHOR DO BONFIM-BA**

Senhor do Bonfim, BA.
2012

ÉVELIN MASCARENHAS FERREIRA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO C825T DO GENE GNB3 ASSOCIADO À
HIPERTENSÃO E DIABETES E OCORRÊNCIA DE HIPERTENSOS E
DIABÉTICOS NO DISTRITO DE IGARA – SENHOR DO BONFIM-BA**

Monografia apresentada ao Colegiado do Curso de Ciências Biológicas como requisito parcial para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado da Bahia, sob a orientação da Prof.^a Msc. Juliana Côrtes de Freitas (UNEB).

Senhor do Bonfim, BA.
2012

**IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO C825T DO GENE GNB3 ASSOCIADO À
HIPERTENSÃO E DIABETES E OCORRÊNCIA DE HIPERTENSOS E
DIABÉTICOS NO DISTRITO DE IGARA – SENHOR DO BONFIM-BA**

Por

ÉVELIN MASCARENHAS FERREIRA SANTOS

Monografia apresentada ao Colegiado do
Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas como requisito parcial para
conclusão do Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado da Bahia, e aprovada em:
__/__/__ pela seguinte banca
examinadora:

Prof.^a Msc. Juliana Côrtes de Freitas
(orientadora)

Prof.^o Msc. Rudval Souza da Silva

Prof.^o Msc. Rodrigo de Queiroz Oliveira

Senhor do Bonfim, BA
2012

*À mulher cujos valores regem a minha vida.
Minha mãe, Veraneuza Mascarenhas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus Pai, por todas as coisas que Ele me deu, conquistas e desafios, através dos quais me transformei na pessoa que sou hoje. Agradeço pela força e coragem que contribuíram para que pudesse completar mais essa etapa em minha vida.

Agradeço a minha mãe, Veraneuza Mascarenhas, por inculcar na minha vida o amor aos estudos e a realização profissional, por sua paciência, confiança, fé, apoio, por ouvir meus lamentos e me dar forças quando mais precisei. Por nunca ter deixado que o desânimo me acompanhasse. Ao meu pai, Elton (*in memoriam*), por seu amor e por ter me ensinado o significado da palavra felicidade. Às minhas irmãs Jade, Ellen, e ao meu irmão Marcelo, pelos sorrisos e pelas lágrimas, por confiarem em mim e por me apoiarem até aqui. Sei que essa vitória também pertence a vocês.

A minha família, pela sua tolerância, compreensão e carinho, dos quais jamais faltaram esforços e dedicação para que eu pudesse alcançar meus objetivos, em especial as minhas lindas avós: vovó Ideuza e vovó Edna pelas inúmeras orações.

Agradeço a minha orientadora Juliana Côrtes, com a qual me identifiquei desde o início do curso, por toda a sua dedicação na construção desse trabalho, por toda atenção e disponibilidade de caminhar ao meu lado durante essa árdua jornada, a sua vasta perspicácia, conhecimento e sugestões transmitidas durante a elaboração desse trabalho. Pelo seu sentido às especificidades da área e à sua ajuda para além das suas obrigações profissionais.

Aos alunos da turma da turma 2008.1, em especial Rafaela Teixeira, Jamilly Cunha, Nicássio Rocha, Lucas Garboggini, Tatiana Sampaio e Patric Eric, porque durante esses quatro anos foram companheiros desde os momentos tristes aos mais alegres.

As minhas companheiras de República: Izana Queiroz, Rayssa Lima, Laíse Matos, Bruna Coutinho e Iuly Lima por toda paciência, pelas lágrimas e sorrisos; pelo

silêncio nas horas exatas e pelas alegrias e euforias a qualquer hora; eu aprendi a amar vocês.

Ao professor Gervásio Paulo pelo primeiro estágio no laboratório de microbiologia, e a Edemir e Brito pelo apoio durante o estágio. Ao professor Rodrigo Queiroz pela oportunidade e confiança de estagiar em seu projeto de Extensão no qual tive experiências qualificantes.

Aos professores Perimar, Valdira, Hilder, Marta, Marileide, Cris, dentre outros que me auxiliaram na construção do conhecimento. A UNEB campus VII e seus funcionários, em especial a Tati e a D. Maria por todas as experiências que esse universo me proporcionou.

Ao meu namorado, Iuri D'Césare, pelos momentos de compreensão e apoio. Espero poder retribuir todo o seu companheirismo. À D. Kátia, tia Vânia, Pastor Nelson e Papito, por serem suportes para minha formação e pela constante presença do meu lado.

Aos meus amigos Dr. Iuri, Dr. Belitardo, Lucas, Aldo, Gidélcio, Rafael, Daniel, Jefte, Mateus Henrique e Pacheco, e às minhas amigas Rebeka, Ísis, Jamille, Moíra e Rayane, pois os laços que nos unem me deram forças pra chegar até aqui.

Este trabalho não representa apenas o resultado de horas de estudo, reflexão e trabalho durante as diversas etapas que o constituem. Mas é a realização de um objetivo acadêmico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número importante de pessoas. Estou ainda em dívida para com muitas pessoas pela sua ajuda, apoio e paciência. E é por isso que quero dedicar este trabalho a todos aqueles que, sem reservas, compartilharam comigo os seus conhecimentos.

Como disse Rob Thomas, no fim o que realmente importa é o coração, e o meu está aqui.

“Antes pensávamos que nosso futuro estava nas estrelas, agora sabemos que está em nossos genes.”

James Watson

RESUMO

No Brasil, o diabetes *mellitus* e hipertensão arterial são responsáveis pela primeira causa de mortalidade e conseqüentemente de hospitalizações, essas doenças já se espalharam como uma epidemia invisível pelo mundo, independente do nível de desenvolvimento do país. Um dos grandes desafios da genética é compreender as causas das doenças de origem multifatorial, como é o caso da hipertensão e diabetes *mellitus*, principalmente no que diz respeito à identificação de genes que predispõem às doenças, porque, além dos fatores genéticos, o estilo de vida e fatores ambientais são também considerados fatores deflagradores dos principais sintomas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de genotipagem, a partir da técnica de PCR para obtenção do diagnóstico do polimorfismo C825T, presente no gene GNB3, que estaria associado ao fenótipo da hipertensão, bem como ao da diabetes, por meio de um teste piloto. Participaram da pesquisa 5 indivíduos com histórico de hipertensão e diabetes familiar, que foram submetidos a genotipagem através da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram também observados prontuários dos pacientes do PSF do distrito de Igara para observar a ocorrência dos casos de hipertensão e diabetes *mellitus* confirmando a importância desse trabalho. Em seguida foi realizada a análise de dados demonstrou que a técnica de PCR é um importante instrumento para identificação precoce de genótipos ligados a suscetibilidade às doenças de origem multifatorial, pois pode produzir diagnósticos preventivos com mais precisão, proporcionando uma orientação mais individualizada quanto ao tipo de ação terapêutica.

Palavras-chave: Doenças multifatoriais. Polimorfismo C825T. Investigação molecular.

ABSTRACT

In Brazil, diabetes and hypertension are responsible for the first cause of mortality and hospitalizations, these diseases have spread as an invisible epidemic around the world, independent of the level of development of the country. One of the great challenges of genetics is to understand the causes of diseases of multifactorial origin, as is the case of hypertension and diabetes, especially in respect of the identification of genes that predispose to disease, because in addition to genetic factors, lifestyle and environmental factors are also considered factors triggers major symptoms. Thus, the objective of this work was to establish a genotyping protocol, from the PCR technique for diagnosis of this gene polymorphism in C825T, GNB3, that would be associated with the phenotype of hypertension, as well as that of diabetes, by means of a test pilot. Participated in the survey 5 individuals with a history of hypertension and diabetes, which were submitted to genotyping through the technique of polymerase chain reaction (PCR). Medical records have also been observed of the PSF of the Igara people to observe the occurrence of cases of hypertension and diabetes confirming the importance of this work. Data analysis showed that the PCR technique is an important tool for the early identification of genotypes associated with susceptibility to diseases of multifactorial origin, because it can produce more accurate diagnoses, providing a more individualized guidance as to the type of therapeutic action.

Keywords: Multifactorial Diseases. C825T polymorphism. Molecular research.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa do Município de Senhor do Bonfim (modificado IBGE, 2010).23
- Gráfico 1** - Número de habitantes portadores de hipertensão, diabetes *mellitus* e hipertensão/diabetes no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.27
- Gráfico 2** - Distribuição dos pacientes portadores de diabetes tipo I, diabetes tipo II, hipertensão e diabetes/hipertensão, por sexo, no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.28
- Gráfico 3** - Percentual de portadores de diabetes, hipertensão e diabetes/hipertensão, em relação à quantidade de habitantes no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.....29
- Figura 2** - Genotipagem obtida através de DNA genômico com uso de *primers* para amplificação da região 825 da subunidade β do gene GNB3. 1. Marcador de peso molecular; 2-5. Produtos de PCR, digeridos com *BseDI*, indicando genótipo CC 116 pb e 152 pb; 6. Produto de PCR indicando genótipo TT 268 pb; 7. Controle primers; 8. Controle água.32

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 Revisão da literatura	14
3.1 Proteína G	14
3.2 Polimorfismo.....	15
3.2.1 GNB3 e o polimorfismo C825T.....	15
3.3 Doenças Multifatoriais: hipertensão e diabetes <i>mellitus</i>	17
3.3.1 Hipertensão Arterial.....	17
3.3.2 Diabetes <i>mellitus</i>	19
3.4 Genotipagem através da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction).....	21
4 Metodologia.....	23
4.1 Área de estudo e tipo de pesquisa	23
4.2 Sujeitos da pesquisa	23
4.3 Coleta de dados	24
4.4 Diagnóstico molecular	25
4.4.1 Extração de DNA de sangue total	25
4.4.2 Reação de PCR	25
4.4.3 Digestão enzimática	26
4.4.4 Eletroforese de DNA.....	26
4.5 Análise de dados.....	26
5 Resultados e discussão.....	27
5.1 Ocorrências de Casos de Hipertensão e Diabetes no Distrito de Igara	27
5.2 Genotipagem do polimorfismo C825T	31
6 Considerações finais	35
Referências	36
Apêndices.....	43

1 INTRODUÇÃO

As doenças multifatoriais são o resultado de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais, assim são também denominadas de doenças complexas (BOSSONI, OLIVEIRA; 2009). Estudos demonstraram que os transtornos multifatoriais como a hipertensão, doenças cardiovasculares e a diabetes *mellitus* se desenvolvam por causa da interação de múltiplos genes com fatores ambientais e/ou comportamentais (SIFFERT, 2005). No, entanto a identificação de genes e o estabelecimento de protocolos para a investigação de doenças multifatoriais ainda é um processo em desenvolvimento.

Além dos fatores externos, alguns polimorfismos genéticos podem estar associados a algumas doenças. É certo que não existe uma rota única para a identificação e divulgação da genética, mas o passo fundamental é chegar a um gene candidato plausível que possa ser testado. Quanto mais estudos e divulgações forem feitos, maiores são as chances de se encontrar um gene comprovadamente ligado à predisposição a hipertensão e a diabetes *mellitus* e que possibilite a implementação de medidas preventivas que possam ser realizadas por indivíduos de toda população.

Nos dias de hoje a epigenética, um ramo da biologia responsável por estudar as interações causais entre genes e seus produtos que são responsáveis pela criação do fenótipo, vem avançando, com a pretensão de esclarecer como os fatores externos podem interferir no funcionamento dos genes, tais como: hábitos alimentares, temperatura, stress, medicamentos, entre outros. Ao contrário de alguns fatores externos já bem conhecidos, pouco se sabe sobre quais genes, ou combinações de genes, contribuem efetivamente para a origem das doenças multifatoriais.

O gene GNB3 que codifica a subunidade $\beta 3$ da proteína G tem sido estudado com o intuito de explicar a relação entre polimorfismos associados a este gene e a ocorrência de doenças multifatoriais, supra citadas.

A proteína G é constituída por três subunidades: α , β , e γ , que compõem uma família de proteínas envolvidas em inúmeras vias de controle metabólico das células. Tais proteínas ativam vários receptores transmembrânicos e sinalizam

sistemas intracelulares que regulam a pressão sanguínea, o controle de glicose e a captação de colesterol pela célula (YAMAGISHI, et al. 2006). As subunidades α , β e γ da proteína G formam um complexo que age na ativação de várias enzimas que implicam na ação de diversos efeitos biológicos. Dessa maneira, polimorfismos presentes nos genes que codificam essas subunidades poderiam alterar o efeito biológico mediado pelas proteínas Gs.

A proteína trimérica de ligação, a GTP (proteína G), está ligada a face da membrana plasmática e acopla funcionalmente o receptor a enzimas ou a canais iônicos na membrana (GUYTON, HALL, 2002). Quando ocorre alguma mudança alélica nessas proteínas, elas podem agir de forma diferenciada. O alelo 825T está associado a uma maior atividade destas proteínas, principalmente em pacientes obesos, diabéticos e hipertensos (SIFFERT, et al. 1998).

Diferentes estudos de controle do caso têm relacionado o alelo 825T à hipertensão e a diabetes, mas essa é uma discussão recente, e alguns autores não confirmam estes resultados. Porém, a hipertensão arterial e a diabetes tem atingido grande parte da população e essa resposta genética pode ser de grande significância. O polimorfismo do C825T da proteína G pode ou não influenciar na sensibilidade ao sódio e a condução de insulina para dentro das células e conseqüentemente na hipertensão e diabetes. Respostas a essa questão poderiam contribuir significativamente no tratamento dessas doenças.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a forma mais sensível de amplificar o gene, ou a sequência de interesse em um tubo de ensaio. A grande vantagem da PCR é que são necessários menos procedimentos se comparados, por exemplo, a clonagem (Clonagem é a produção de indivíduos geneticamente iguais. Através de um processo de reprodução assexuada que resulta na obtenção de cópias geneticamente idênticas de um mesmo ser vivo), porque na técnica de PCR consegue-se determinar a especificidade do fragmento desejado.

Tendo em vista a dificuldade encontrada para a investigação genética de doenças multifatoriais este estudo objetivou estabelecer um protocolo para a genotipagem molecular de genes específicos, descrevendo essa técnica para que possíveis portadores dessas doenças sejam instruídos precocemente, a mudar seus hábitos para que no futuro possam minimizar os efeitos dessas doenças, ou até mesmo inibir seu aparecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diagnósticar o polimorfismo C825T, presente no gene GNB3, associado ao fenótipo da hipertensão, bem como ao quadro clínico da obesidade e da diabetes *mellitus*, através de um teste piloto a partir da técnica PCR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a ocorrência de hipertensos e diabéticos no distrito de Igara;
- Estabelecer um protocolo de genotipagem que permita uma identificação precoce do fator de risco genético em indivíduos, possíveis portadores de hipertensão e diabetes.
- Reconhecer a genotipagem de doenças multifatoriais como ferramenta útil na medicina preventiva.
- Contribuir para a popularização do diagnóstico molecular entre os órgãos de saúde da região a partir da divulgação dos dados obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Proteína G

Em 1971, M. Rodbell propôs a existência de um intermediário entre o receptor transmembrana e a enzima amplificadora intracelular. Esse composto ficou desconhecido até os anos 1980, quando Alfred G. Gilman conseguiu purificar uma proteína que após ser inserida ao meio intracelular, devolvia a função para as células que apresentavam receptores e enzimas amplificadoras sadias. Essa descoberta contemplou a Gilman e Rodbell o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina em 1994. Esse composto proteico foi denominado proteína G e foi extensivamente descrito por Gilman nos anos seguintes, sendo alvo até hoje de pesquisas farmacológicas. Suas disfunções são relacionadas com a etiologia de muitas doenças, devido à sua ampla distribuição no organismo (KRESGE, SIMONI, HILL. 2005).

As proteínas G fazem parte de uma superfamília de proteínas que hoje compreende mais de 50 membros descritos. São proteínas que, no estado inativo, encontram-se acopladas a receptores no meio intracelular e, graças a propriedades funcionais e estruturais, quando ativadas por estímulos adequados podem migrar pelo citosol e ativar enzimas amplificadoras ou canais iônicos, consumando a transdução de sinais, que é o processo de ativação dos eventos intracelulares por estímulos externos (GUILLARD, et al. 2003).

Segundo Alberts, et al., (2010) “as proteínas G são formadas por três subunidades α , β e γ . Os alvos dessas subunidades são enzimas ou canais iônicos na membrana plasmática”. De acordo com Randazzo e Augusto (2011), as proteínas G são compostos de alto peso molecular e ditos heterotriméricos, por serem formadas por três polipeptídeos distintos, formando o complexo transdutor de sinais melhor conservado entre os mamíferos. Levam este nome por interagir com grupos guanílicos guanosina difosfato (GDP) e guanosinatrifosfato (GTP). A proteína G desempenha papel chave na mediação de diversos sinais e participa da manutenção de reflexos cardiovasculares. Conforme Siffert (1998) essa proteína

ativa vários receptores transmembrânicos, como sistemas de sinalização intracelular e regula a pressão arterial.

A subunidade α da proteína G é a melhor conservada entre os mamíferos, bem como é a fração do trímero com maior peso molecular (45 kDa), nela encontrando-se cinco regiões: G1 a G5 (que estão relacionadas com a ligação ao GTP) Existem no mínimo cinco tipos de subunidades β , que podem ser codificadas por seis genes conhecidos: $\beta 1$ a $\beta 4$ (que apresentam homologia estrutural) e $\beta 5$, que é um pouco menor, o que sugere ter diferentes papéis ainda não esclarecidos. Já a subunidade γ apresenta 12 tipos diferentes, sendo conhecidos 12 genes que a codificam. Essas duas subunidades estão associadas fortemente por ligações não covalentes, e quando se encontram ligadas à subunidade α , configuram o estado inativo da proteína G (HSIN et al., 1998).

As proteínas G e seus receptores constituem papel crucial na sobrevivência celular, haja vista os achados evolutivos que comprovam sua presença em organismos primitivos e perduram até os organismos mais complexos. Dessa forma, a transdução de estímulos externos em sinais intracelulares é comprovadamente um dos fatores de grande importância para a perpetuação das características viáveis na escada evolutiva (RANDAZZO, AUGUSTO, 2011). Tendo em vista seu papel abrangente, disfunções nessa estrutura são responsáveis por estados patológicos diversos, que em muitos casos se mostram tão importantes quanto sua própria função fisiológica. Estudos que correlacionem à anormalidade dos complexos transdutores com processos patológicos podem ser a base para descobertas farmacológicas empregadas na terapêutica de muitas doenças.

3.2 Polimorfismo

3.2.1 GNB3 e o polimorfismo C825T

Poucas áreas têm evoluído tão significativamente como a que estuda a identificação de genes de doenças humanas. Antes de 1980, poucos genes humanos haviam sido identificados como lócus de doenças (STRACHAN, 2002).

O polimorfismo genético é descrito como situações especiais em que se torna possível observar diferentes formas alélicas de um mesmo locus gênico. De acordo com o Instituto Hermes Pardini, o gene GNB3, que codifica a subunidade $\beta 3$ da proteína G apresenta um polimorfismo denominado 825T, que está relacionado à ocorrência de um *splicing (encaixe)* alternativo. Estudos independentes mostraram que o genótipo 825TT do GNB3 contribui para um alto risco de hipertensão, diabetes e obesidade em brancos e negros.

Siffert et al. (1998), foram os primeiros estudiosos a mostrar que o polimorfismo C825T presente no gene GNB3 estava associado com a hipertensão. O polimorfismo envolve uma substituição entre os nucleotídeos C (citosina) por T (timina), na posição 825 no éxon 10 do gene, da subunidade $\beta 3$ (GNB3) da proteína G (DONG, et al. 2009).

O alelo 825T associa-se ao aumento da massa corporal e retenção de peso na população geral e, principalmente em mulheres primíparas, sendo este efeito minimizado com atividades físicas regulares. A hipertensão tem um risco aumentado de 2 a 6 vezes pela obesidade, o que reflete uma maior importância deste polimorfismo (INSTITUTO HERMES PARDINI, 2009). Segundo González e colaboradores (2001). Ocorre uma disparidade muito grande de resultados quando se refere à análise genética da hipertensão e da diabetes por estas doenças serem tão heterogêneas, e de tão difícil tratamento.

Em 2001 a Universidade de Barcelona juntamente com o Hospital Clínico de Nefrologia de Barcelona realizaram um estudo em 46 pacientes sensíveis e resistentes ao Cloreto de sódio, mantendo dietas de baixo e alto consumo de sal e utilizaram técnicas de PCR (Reação em cadeia da polimerase) para determinar as variantes alélicas de GNB3. O estudo demonstrou que não havia uma associação relevante entre o alelo 825T do gene GNB3 e a resposta ao sal de indivíduos com hipertensão (SIFFERT, et al 2004)

Porém, outro estudo realizado em 2006 na Universidade de Ciência Médica e no Departamento de Medicina Interna do Hospital Municipal de Kanazawa – Japão sugere que o polimorfismo C825T influencia o metabolismo lipídico, porém não está associado com hipertensão e obesidade. Entretanto, outra pesquisa realizada no Japão: Polimorfismo do C825T da subunidade B3 da proteína G, Sódio e Pressão arterial, um estudo de base comunitária de homens e mulheres, realizado em 2006, demonstrou que o polimorfismo C825T está associado com maior hipertensão

arterial sistólica (máxima) em uma grande população de japoneses. Esse resultado vem afirmar o que já era esperado e contribui para explicar relatos genéticos da associação entre diferentes grupos étnicos.

De acordo com Hayakawa e colaboradores (2006), os papéis do alelo 825T em hipertensão, diabetes e obesidade têm sido controversos em brancos, negros e orientais. Assim, é preciso que ocorram mais investigações para que um resultado mais preciso seja alcançado.

O gene GNB3 é investigado por sua associação com à hipertensão, obesidade, resistência à insulina, diabetes, e complicações diabéticas. Um maior estudo desse polimorfismo pode vir a responder muitas questões, sabe-se que não existe só um gene que controle a doença, porém estudos de maior relevância podem demonstrar que esse polimorfismo é de fundamental importância para o desenvolvimento da doença e por sua vez de novos fármacos que possam agir diretamente sobre o princípio da doença.

3.3 Doenças Multifatoriais: hipertensão e diabetes *mellitus*

3.3.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão pode ser definida como o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica. A taxa de incidência da hipertensão é de 30% na população brasileira, chegando a mais de 50% quando se trata da população na terceira idade e atingindo cerca de 5% dos 70 milhões de crianças e adolescentes no Brasil. As doenças cardiovasculares foram responsáveis pela morte de 274 mil brasileiros em 2003. Entre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão explica 40% das mortes por AVC (Acidente Vascular Cerebral) e 25% por doença coronária. (PARDINI, 2010).

A hipertensão arterial é uma síndrome complexa e determinada por diversos fatores, tantos genéticos como ambientais. A sensibilidade ao sódio é um dos grandes fatores que contribuem para o aumento da pressão arterial. Essa sensibilidade é documentada tanto em indivíduos hipertensos como em sujeitos jovens e com saúde (GONZÁLES, et al., 2001). Os rins são os grandes

responsáveis por regular, a curto e longo prazo a pressão arterial, pois tudo vai depender das quantidades excretadas de sal e água. Alterações gênicas podem ser responsáveis por mudanças na pressão arterial.

Quando uma pessoa tem hipertensão (ou “pressão alta”), significa dizer que sua pressão arterial está acima do padrão. Para a Organização Mundial de saúde (OMS) os valores considerados “normais” são: 120x80mmHg. A hipertensão arterial (HA) é caracterizada pela elevação da pressão em valores acima de: 140x90mmHg. A elevação da pressão arterial resulta numa menor expectativa de vida. Segundo o III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial de 1998, no Brasil, a Hipertensão Arterial (HA) é um dos problemas de Saúde Pública de maior prevalência na população, e representa o maior e mais perigoso fator de risco para a progressão ou desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

A hipertensão é uma doença complexa, e geralmente determinada pela interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, sendo difícil definir quais são os determinantes principais dessa doença em cada paciente (NABER, 2004). Mesmo evidenciando que a hipertensão arterial constitui um dos principais problemas de saúde mundiais, o número de hipertensos tratados é mínimo, De acordo com Simonetti e colaboradores. (2002) estes dados derivam de vários fatores dentre eles os principais são: as características assintomáticas da doença, tratamento prolongado, alto custo dos medicamentos e os seus efeitos colaterais, e a relação médico/paciente que é insatisfatória.

Os rins possuem papel dominante no controle da pressão arterial a curto e longo prazo, por excretarem quantidades variáveis de sódio e água, e através da secreção de fatores ou substâncias vasoativas, como a renina. (PURVES, et al., 2002). O aumento da ingestão de sal causa o aumento do volume extracelular e causa a elevação da pressão nas artérias.

Cerca de 90 a 95% de todas as pessoas que apresentam hipertensão são portadoras da denominada: “hipertensão essencial”. A hipertensão essencial não possui uma origem conhecida, porém, verifica-se forte tendência hereditária (GUYTON; HALL, 2002). A pressão arterial é controlada por diversos sistemas inter-relacionados e normalmente é controlada por fármacos que aumentam o fluxo sanguíneo renal ou que diminuem a absorção de sal. No entanto esses remédios não curam, são apenas paliativos.

Segundo Smith e colaboradores., (1990 *apud* LOPES et al., 2003) identifica-se que, da população hipertensa, apenas 50% tem o diagnóstico. Destes, 50% são tratados; e dos tratados, 50% tem sua pressão adequadamente controlada. Isso sugere que apenas um em oito pacientes é efetivamente tratado. Existem diversas evidências sobre o benefício do tratamento precoce da hipertensão arterial, principalmente quando existem mudanças no estilo de vida do paciente.

Um dos genes importantes na regulação dos níveis da pressão arterial é o GNB3. Mudanças na expressão deste gene provocam alterações metabólicas que comprometem o controle da hipertensão (SANDRIM, SANTOS, 2006).

Estudos epidemiológicos concluíram que indivíduos portadores do variante 825T presente no GNB3 poderiam apresentar respostas maiores a mediadores da pressão arterial, quando comparados com portadores do variante C825. Ou seja, ficou demonstrado que uma associação entre o alelo 825T e a hipertensão arterial, sugere que essa variante poderia contribuir na susceptibilidade a essa doença em indivíduos portadores do genótipo TT e CT, caracterizando o alelo T como dominante para o risco a hipertensão e/ou doenças relacionadas (SANDRIM, SANTOS, TANUS. 2006; SIFFERT. 2005).

Vale ressaltar que apesar dos esforços na identificação dos genes candidatos a hipertensão arterial, o estudo destes polimorfismos segundo Sadrim, Tanus e Santos, (2006) não é conclusivo. Diante disso um padrão de estudo para polimorfismos genéticos que podem estar associados a algumas doenças e é de extrema importância para que possam ser utilizados como uma ferramenta útil na medicina preventiva, possibilitando futuramente a identificação de indivíduos com risco de obesidade, hipertensão e diabetes.

3.3.2 Diabetes mellitus

O diabetes é parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, como por exemplo, destruição das células beta do

pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (GUYTON e HALL, 2002).

O diabetes configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de portadores da doença em todo o mundo era de 177 milhões em 2000, com expectativa de alcançar 350 milhões de pessoas em 2025. No Brasil, ainda segundo a OMS em 2000 são cerca de sete milhões de portadores, a números de hoje, e deve alcançar 12 milhões de pessoas em 2016. Um indicador macroeconômico a ser considerado é que o diabetes cresce mais rapidamente em países pobres e em desenvolvimento, impactando de forma muito negativa no próprio crescimento do país, deixando marcas na previdência social.

O caderno de Atenção Básica do Ministério da Saúde diz que as consequências sociais e econômicas são devastadoras: são 4 milhões de mortes por ano relacionadas ao diabetes e suas complicações (com muitas ocorrências prematuras), o que representa 9% da mortalidade mundial total. O grande impacto econômico ocorre notadamente nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento da doença e, sobretudo das complicações, como a doença cardiovasculares, a diálise por insuficiência renal crônica e as cirurgias para amputações de membros inferiores.

Amanto e colaboradores. (2008), faz uma ressalva diante dos altos índices de portadores de diabetes, estudos moleculares que procuram avaliar suscetibilidade genética poderiam contribuir para compreender melhor como os fatores de risco genético interagem com os fatores ambientais para o desenvolvimento da doença. Zecchin e colaboradores. (2004) diz que diante de tantos fatores o mapeamento genômico permitiu investigar centenas de genes candidatos funcionais para determinar seu papel na suscetibilidade a diabetes, no entanto até o momento poucos genes foram associados a doença.

O polimorfismo C825T está associado com um aumento da transdução de sinal intracelular o que provavelmente aumenta a quantidade de açúcar que entra na célula, isso faz com esse polimorfismo seja associado à diabetes. O alelo 825T foi relatado por estar ligado a predisposição para a fase final da doença renal na diabetes *mellitus* (SIFERT et al, 1998). A maior frequência deste alelo foi descrita em pacientes poloneses com diabetes tipo 2. Curiosamente, a intensa normalização

da glicose do sangue parece melhorar a sensibilidade à insulina em indivíduos portadores do alelo 825T (DZIDA et al., 2008).

A diabetes *mellitus* é uma doença de herança multifatorial e poligênica, ou seja, associada à hereditariedade, mas é agravada por fatores ambientais como dieta inadequada e sedentarismo (DINIZ E NOTTOLI, 2008). Doenças como a diabetes tipo II são controladas por um grande número de genes, tendo cada um deles uma variante que confere um pequeno aumento no risco. Estas variantes interagem entre si e com o ambiente de forma complexa. Isto torna extremamente difícil determinar a contribuição de cada gene alterado para a doença.

3.4 Genotipagem através da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction)

O processo de PCR foi descrito por Kary Mullis no final da década de 1980, e posteriormente, em 1993, lhe foi atribuído o Prémio Nobel da Química pelo seu trabalho. Em 1989, a Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation, patenteou este processo. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, que é a identificação de "impressões digitais" genéticas, a construção de árvores filogenéticas (árvores de relação entre espécies), a clonagem de genes (ver adiante), testes de paternidade, exames para detecção de agentes patogênicos entre outros (SAIKI, et al 1985).

PCR é o acrónimo em inglês de Polymerase Chain Reaction (em português - reação em cadeia da polimerase). É um método de amplificação (criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo, por exemplo, *Escherichia coli* (bactéria) ou leveduras. Sales, (2006) confirma que a PCR é uma técnica utilizada em todo o mundo para que possa amplificar um DNA-alvo.

A utilização de técnicas moleculares, principalmente a PCR, tem permitido grande evolução nas análises de rotina de laboratórios clínicos e industriais. Em poucos anos, o diagnóstico molecular evoluiu de uma mera curiosidade tecnológica

para um campo vasto e complexo, com o potencial para revolucionar a ciência e a prática da medicina e áreas correlatas.

Para Saiki et al. (1988) a PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. (Em tese, é possível amplificar qualquer DNA).

Uma das principais aplicações da PCR é na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime são amplificadas para serem analisadas pelo método de *fingerprinting*. A PCR também é rotineiramente utilizada em procedimentos científicos de Biologia Molecular como amplificação para gerar mutagênese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem (inserção em plasmídeo, por exemplo). Também pode ser utilizado para identificação de patógenos que estão presentes em amostras como: *Candida sp*, *Chlamydia trachomatis*, HPV (Vírus do papiloma humano) e seus genótipos, HBV (Vírus da Hepatite B), entre outros.

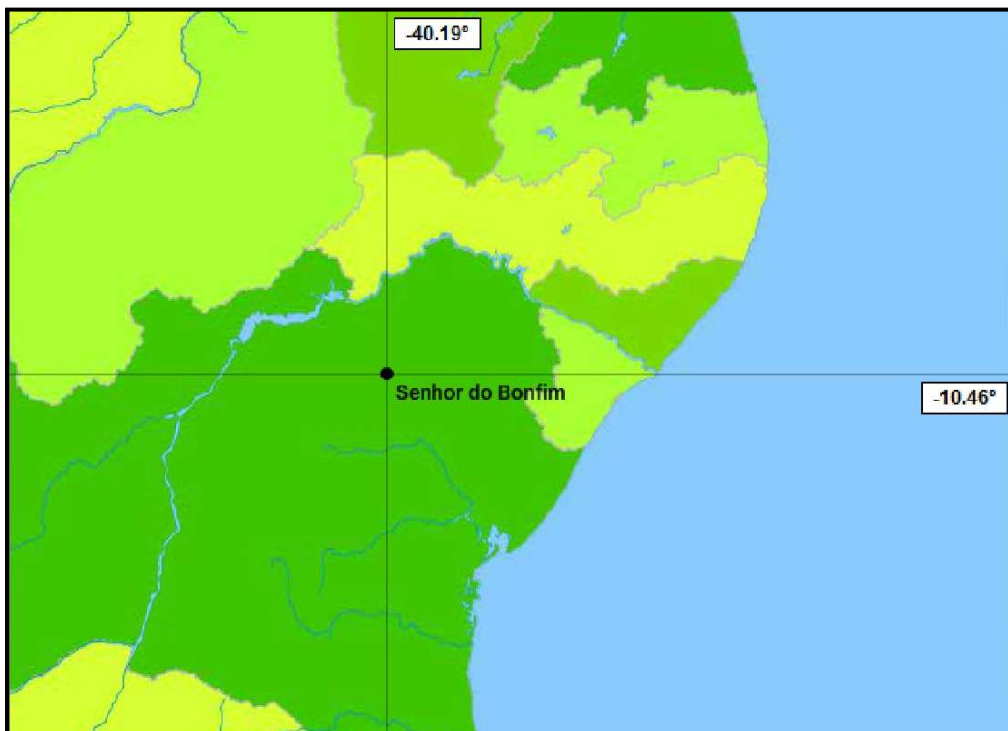
Diversos estudos demonstram a capacidade da PCR em amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, liquor, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar e até urina. Existem também outras aplicações alternativas, derivadas da PCR tradicional. A PCR em tempo real, por exemplo, é uma metodologia rápida, sensível e quantitativa de detecção de fragmentos de DNA específicos e a PCR quantitativa que também pode prover dados adicionais que auxiliam na escolha de tratamento específico e é particularmente útil em laboratórios de genética para investigação genômica (FUENTES, 1996).

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo e tipo de pesquisa

O presente estudo foi desenvolvido na cidade de Senhor do Bonfim, Bahia (Figura 1). As coletas de dados foram realizadas no distrito de Igara. A cidade de Senhor do Bonfim está localizada no Piemonte da Chapada Diamantina, a 376 km de Salvador, localidade de clima semiárido. Possui aproximadamente 827km², e de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) sua população é de 74,419 habitantes. O distrito de Igara localiza-se a 4km do centro de Senhor do Bonfim. Este estudo buscou analisar a aplicabilidade da técnica de PCR para demonstrar a associação do polimorfismo C825T, presente no gene GNB3, ao fenótipo da hipertensão, identificando também, a relação deste, com o quadro clínico da obesidade e da diabetes, através de um teste piloto. Pesquisa de abordagem qualitativa, que segundo Martins (2006), é caracterizada pela descrição, compreensão e interpretação de fatos e fenômenos, através do contato direto entre o pesquisador e a situação investigada.

Figura 1 - Mapa do Município de Senhor do Bonfim (modificado IBGE, 2010).



4.2 Sujeitos da pesquisa

Foram selecionados para participar do teste piloto cinco indivíduos voluntários, não pertencentes a comunidade estudada, com histórico de hipertensão, obesidade e/ou diabetes na família. Os sujeitos conheceram os objetivos do estudo e autorizaram sua participação através do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, tratando de garantir o respeito à dignidade dos sujeitos, sua autonomia e defesa em sua vulnerabilidade.

4.3 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada em três etapas: Análise de prontuários médicos, aplicação de questionário e análise do material biológico. Foi aplicado um pequeno questionário (Apêndice A) aos participantes da pesquisa com intuito de identificar aqueles que tinham histórico de Hipertensão e/ou Diabetes na família. Dos cinco indivíduos selecionados foram coletados 5mL de sangue venoso por meio de seringa descartável, em seguida acondicionados em tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras de material biológico foram coletadas no Laboratório de Enfermagem do Departamento de Educação; Campus VII (UNEB), acondicionadas em caixas térmicas e levadas para o Laboratório de Genética para realização das etapas pertinentes ao diagnóstico molecular.

Os prontuários médicos dos PSF (Programa de Saúde da Família) da Igara foram analisados, sendo coletadas as seguintes informações: número de diabéticos, número de hipertensos e número de diabéticos com hipertensão. Estes dados foram organizados de acordo o sexo dos indivíduos.

4.4 Diagnóstico molecular

Para realização do diagnóstico molecular por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram seguidas as etapas abaixo.

4.4.1 Extração de DNA de sangue total

Para lise das células e extração do material genético foram utilizados 0,8 mL de DNAzol em 0,4 mL de sangue total. A mistura foi agitada em vortex e incubada 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período o DNA foi precipitado a partir da adição de 0,32mL de isopropanol, seguida da centrifugação a 6.000g por 6 minutos. Após este processo todo o sobrenadante foi removido e centrifugado, no qual foram adicionados 0,3mL de DNAzol. O material foi agitado em vortex até a completa dissolução do centrifugado, em seguida a mistura foi centrifugada a 2000g por 4 minutos, o sobrenadante removido e as etapas finais de adição de 0,3 mL de DNAzol, agitação em vortex e centrifugação a 2000g por 4 minutos foram repetidas. Ao final deste processo o sobrenadante final foi removido e centrifugado para ser adicionado 1mL de etanol a 95%, em seguida o material foi centrifugado a 2.000g por 4 minutos. Após centrifugação o etanol foi retirado por decantação ou pipetagem. Para solubilização do centrifugado, foram adicionados 200ul de NaOH 8mM. O material permaneceu incubado a temperatura ambiente por 3 a 5 minutos. Ao final deste período a amostra foi agitada em vortex e para neutralizar a mistura foram adicionados 23 ul de HEPES 0,1M.

4.4.2 Reação de PCR

Para reação em cadeia de polimerase foram utilizados 2ul do DNA extraído a partir do sangue total, 5ul de 10x PCR buffer, 4ul de mix de DNTP, 1ul de primer sense 10 mM, 1µl de primer antisense 10 mM, 1 µl de Taq DNA polimerase, 2 µl de cloreto de magnésio 50mM e água mili-q. (q.s.p 20 ul).

As condições dos ciclos de PCR foram: desnaturação a 94 °C por 5 minutos 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento 60°C por 0.5 min, extensão 72°C por 1 min e para extensão final 72°C por 7 min.

4.4.3 Digestão enzimática

Para digestão enzimática do material amplificado a partir do PCR foram utilizados 2ul de tampão, 1ul do DNA da amostra amplificada, 1 ul da enzima BseDI para a genotipagem do polimorfismo C825T, água mili-q (q.s.p 20ul). Para ação da enzima a amostra foi incubada a 37°C por 1 hora.

4.4.4 Eletroforese de DNA

As moléculas de DNA digeridas por enzima de restrição foram submetidas à eletroforese unidirecional em gel de agarose (concentração de 2,5%) em tampão TBE 1x (Tris-borato 50 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) com adição de solução de brometo de etídio (0,05g/ml). Foram utilizados como referência os fragmentos do bacteriófago λ digerido com HindIII cujo tamanho varia de 23 kb a 0,5 kb. As amostras de DNA foram aplicadas no gel após adição de tampão de amostra (TBE 1x; xileno-cianol 0,83 mg; azul de bromofenol 0,83 mg; glicerol 6%) para diluição final de 1x. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante a 100 V. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta com máquina digital.

4.5 Análise de dados

Os dados obtidos sobre a ocorrência de hipertensão e diabetes no PSF do distrito de Igara foram tabulados em gráficos e analisados quantitativamente.

A partir dos dados obtidos no teste piloto, que foi realizado em laboratório, foi feito uma análise descritiva a partir de dados já estabelecidos em outras pesquisas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrências de Casos de Hipertensão e Diabetes no Distrito de Igara

Através da análise de 123 prontuários do PSF do Distrito da Igara foram identificados 94 indivíduos com hipertensão arterial, 64 indivíduos com diabetes (Tipo I e II) e 41 indivíduos que possuem tanto diabetes quanto hipertensão (Gráfico 1). Dentre os portadores de hipertensão arterial 33 são homens e 61 são mulheres. Dos indivíduos portadores de diabetes 22 desenvolveram diabetes tipo I e 42 diabetes tipo II (que é a mais relevante durante esse estudos). Entre os pacientes portadores de diabetes tipo I, 9 são homens e 13 mulheres e entre os pacientes portadores de diabetes tipo II, 14 são homens e 28 são mulheres. Dentre os 41 indivíduos portadores de hipertensão e diabetes ao mesmo tempo, 19 são homens e 22 são mulheres. (Gráfico 2). O número total de pacientes atendidos pelo PSF não foi divulgado, por falta de atualizações nos dados.

Gráfico 1 - Número de habitantes portadores de hipertensão, diabetes e hipertensão/diabetes no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.

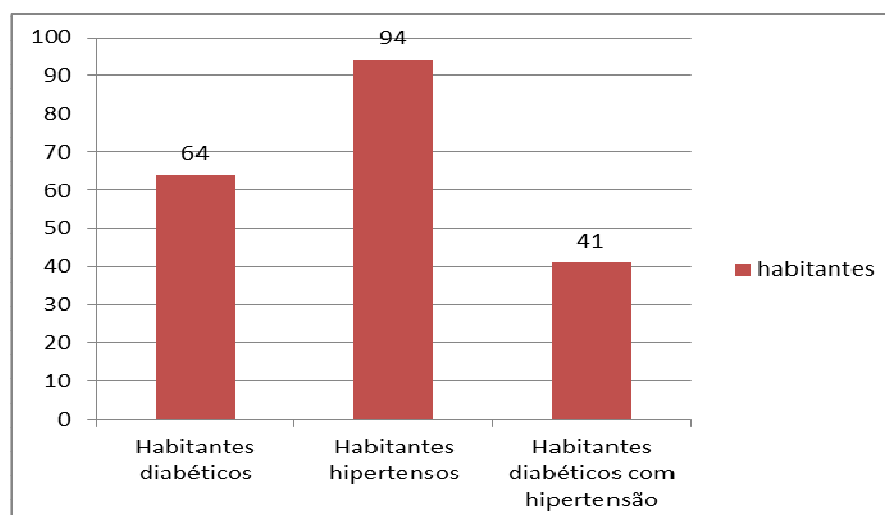
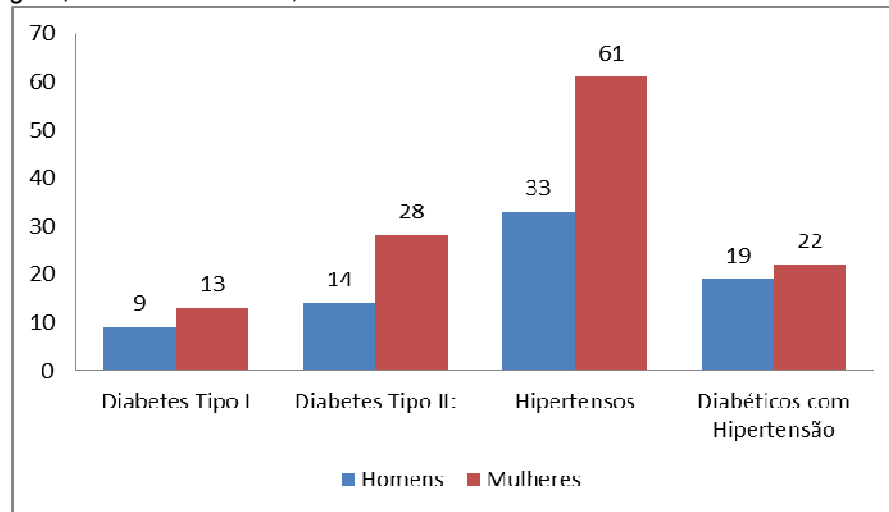
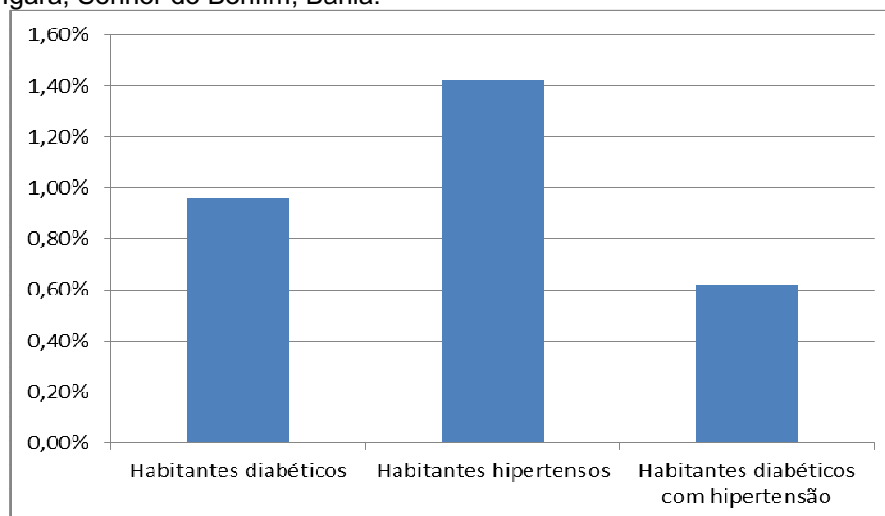


Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes portadores de diabetes tipo I, diabetes tipo II, hipertensão e diabetes/hipertensão, por sexo, no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.



Os maiores índices da doença entre as mulheres, parte do pressuposto que as mulheres procuram mais o serviço médico do que os homens. É preciso levar em consideração que esses valores são dos pacientes atendidos exclusivamente no PSF do Distrito de Igara, já que muitos dos moradores do local se consultam no município de Senhor do Bonfim. Segundo a Prefeitura Municipal de Senhor do Bonfim a população da Igara é de 6.634 habitantes, com isso a porcentagem de hipertensos diagnosticados chega a ultrapassar 1,4% da população e de diabéticos alcança 1,0 % da população (Gráfico 3). Entretanto, os profissionais de saúde reconhecem que os portadores retardam a procura pelo atendimento médico, por isso não fazem parte das estatísticas.

Gráfico 3 - Percentual de portadores de diabetes, hipertensão e diabetes/hipertensão, em relação à quantidade de habitantes no Distrito de Igara, Senhor do Bonfim, Bahia.



Estima-se que no Brasil a prevalência de hipertensão arterial varie entre 22% a 44% da população adulta, dependendo da localidade. Além da alta prevalência, outro fator agravante da hipertensão arterial é que, apesar da gama de medicamentos anti-hipertensivos disponíveis, somente uma parcela dos pacientes (30%) responde bem à terapia anti-hipertensiva. Esses números preocupantes derivam, ao menos em parte, do fato de que a hipertensão arterial é uma doença complexa, geralmente determinada pela interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais, sendo difícil definir quais são os determinantes principais dessa doença em cada paciente (NABER, 2004).

Dentre os pacientes que sofrem dessas patologias 23% sofrem as consequências mais graves da hipertensão arterial como, por exemplo: enfarte agudo do miocárdio, AVC (Acidente Vascular cerebral), Insuficiência cardíaca, falhas na visão, arteriosclerose dentre outras. Dentre os pacientes portadores de diabetes 22% sofrem as consequências mais graves dessa doença como, por exemplo: visão borrada, dificuldade de refração, retinopatia diabética, hiperkeratoses, perda da sensibilidade nas extremidades. Considerando-se tal quadro, torna-se urgente implementar ações básicas de diagnóstico e controle destas condições, através dos seus clássicos fatores de risco.

De acordo com STURMER, et al (2006) a hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus são agravos independentes e frequentemente simultâneos cuja combinação redundante em grave comprometimento à saúde. Ambos necessitam de

acompanhamento em longo prazo, exigem mudança de hábitos e, por vezes, o uso de medicação por toda a vida. O Ministério da Saúde, ao propor o *Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial Sistêmica e ao Diabetes Mellitus*, reconhece a importância da Atenção Básica, na abordagem desses agravos, feita por meio do modelo de atenção programática denominada HIPERDIA (Sistema de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos) que possibilita o desenvolvimento de ações contínuas, e que sugerem que o cuidado ofertado deva ir além de saber a quantidade de pessoas que a hipertensão e a diabetes vem matando e avançar na investigação de causas e consequências a partir do monitoramento extremo dos pacientes (BRASIL, 2004)

Na implementação da atenção básica no Brasil, o Programa Saúde da Família (PSF) se destacou como uma via de extensão de cobertura e de vigilância em saúde dirigida a grupos situação de vulnerabilidade (BRASIL,2002). Nos últimos anos, o programa foi redimensionado na forma de um conjunto de ações estratégicas capazes de reordenar o modelo assistencial e viabilizar a integração entre as diversas formas de cuidados e níveis de atenção (AYRES, 2005). Diante desses fatores uma pesquisa avaliativa como essa em nível de PSF, gera subsídios para o entendimento dessas patologias e demonstra a importância da divulgação dessas doenças, quando se parte do pressuposto que conhecimento gera consciência.

Com frequência, essas doenças levam à invalidez parcial ou total do paciente, com graves consequências e repercussões para o paciente, para a sua família para todos os níveis da sociedade, desse modo a focalização dos aspectos biológicos da hipertensão arterial e do diabetes não é uma exclusividade da unidade básica de saúde, é um dever da sociedade.

5.2 Genotipagem do polimorfismo C825T

Para obtenção dos resultados da genotipagem as amostras dos indivíduos participantes foram processadas para extração do DNA total e amplificadas através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos correspondentes a sequência gênica do polimorfismo C825T. Os produtos de PCR obtidos foram digeridos com a enzima BseDI e após separação dos fragmento em gel de agarose estes foram visualizados através do transiluminador. Das 5 amostras processadas 4 geraram fragmentos de 116 Pb e 152 Pb, após digestão enzimática indicando o genótipo CC em uma das amostras foi observado o fragmento não digerido de 268 Pb indicando o genótipo TT. Houve amplificação bem sucedida do fragmento esperado, o que demonstra que os métodos de extração testados aqui foram eficientes na amplificação de fragmento de 115 pb a 270 pb (Figura 7).

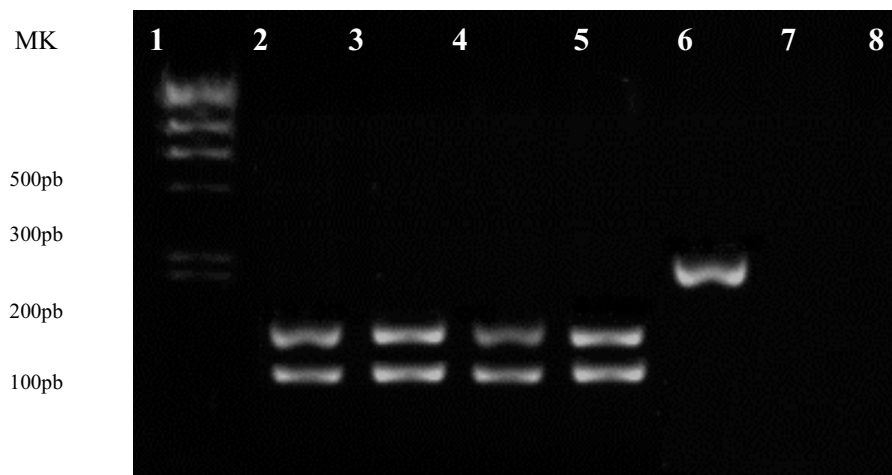
Os quatro indivíduos de genótipo CC são considerados normais pela literatura e não possuem o alelo ligado à hipertensão e diabetes, já o indivíduo TT possui o polimorfismo que está diretamente ligado à hipertensão e a diabetes. O indivíduo portador do polimorfismo possui a substituição de uma Citosina por uma Timina o que provoca um splincg alternativo, onde ocorre a deleção de 41 aminoácidos no exón 9 na posição 825 do gene, nucleotídeos 498 a 620. De acordo com Siffert, 2005 o resultado do polimorfismo é o aumento do sinal de transdução intracelular, ou seja, o indivíduo TT possui aumento da atividade da proteína G.

De acordo com Filippatos, 2005. O genótipo 825TT indica predisposição genética à hipertensão e a diabetes, e teste-pilotos como o realizado nesse trabalho vem sendo indicado para indivíduos com história familiar destas patologias. Estudos como esse, vem demonstrando a importância de testes experimentais nessa área tão pequena que é a identificação de doenças multifatoriais através da investigação genética.

De acordo com testes-piloto realizados em 1996, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, a amplificação de DNA através de PCR caracteriza uma boa fonte de diagnóstico molecular. Os resultados da amplificação do DNA quanto à metodologia utilizada na eletroforese em gel de agarose são adequadas para o diagnóstico de polimorfismos presentes no DNA dos organismos.

A metodologia utilizada neste trabalho para a realização do teste piloto foi a Técnica de PCR. Um dos aspectos mais fundamentais da técnica de PCR é a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (exemplo é o brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma. A construção de oligonucleotídeos para amplificação via PCR depende essencialmente do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse

Figura 2 - Genotipagem obtida através de DNA genômico com uso de primers para amplificação da região 825 da subunidade β do gene GNB3. 1. Marcador de peso molecular; 2-5. Produtos de PCR, digeridos com *BseDI*, indicando genótipo CC 116 pb e 152 pb; 6. Produto de PCR indicando genótipo TT 268 pb; 7. Controle primers; 8. Controle água.



Fonte: CÔRTEZ, 2012.

Com relação ao uso da técnica de PCR para amplificação do fragmento identificador do polimorfismo C825T os resultados obtidos em alguns estudos merecem destaque. Siffert e colaboradores (1999) foram os primeiros a sugerir que possivelmente a presença do alelo 825T tornaria o indivíduo mais suscetível à obesidade e, conseqüentemente, este indivíduo possuiria maior propensão em desenvolver a hipertensão e diabetes. Dong et al. (2001) indicaram que o mecanismo no qual o alelo 825T estaria associado à gênese da hipertensão está relacionado aos canais de íons, sódio e hidrogênio. O aumento da atividade destes

canais poderia representar o acréscimo da absorção de íons pelos túbulos renais, o que levaria ao incremento de volume sanguíneo devido à captação de água por osmose, acarretando na elevação da pressão arterial. A presença de apenas um alelo 825T é suficiente para a expressão da variante mutada da proteína G β 3 (SARTORI, et al. 2003). Nesse estudo, verificou-se a presença do polimorfismo em um dos participantes que possui histórico de Hipertensão e diabetes na família. De acordo com Siffert, (2005):

“A genotipagem do GNB3 é uma ferramenta útil na medicina preventiva, possibilitando a identificação precoce de indivíduos com risco de obesidade e hipertensão e, conseqüentemente, das inúmeras patologias associadas, como doenças cardiovasculares, lipidemias e diabetes tipo II; bem como na adequação individualizada dos respectivos tratamentos.” (SIFFERT, 2005, p.9)

O polimorfismo C825T é conhecido como um marcador significativo das diferenças individuais em resposta a pressão arterial por meio de estudos entre raças, associação com a obesidade, baixos níveis de renina plasmática, e elevação de aldosterona em à relação de renina, que está relacionada à expansão do volume extracelular e sensibilidade ao sódio (TURNER, 2010).

Os resultados encontrados nesse trabalho são semelhantes aos encontrados em outros trabalhos que também utilizaram a técnica de PCR na investigação do polimorfismo C825T (Yanbin., 1999; Sartori., 2003; Siffert et al., 1999; Siffert et al., 2001; Siffert et al., 2005; Beige., 2009; Beckerath., 2002; Lelonek., 2007.) Mas, diferem dos resultados encontrados por Yamagishi et al., 2006; Nakagawa., 2006; que não encontraram o polimorfismo em estudos feitos em populações japonesas, que segundo diversos estudos as populações orientais diferem das ocidentais a nível genético.

O polimorfismo C825T é conhecido como um marcador significativo das diferenças individuais em resposta a pressão arterial por meio de estudos entre raças, associação com a obesidade, baixos níveis de renina plasmática, e elevação de aldosterona em à relação de renina, que está relacionada a expansão do volume extracelular e sensibilidade ao sódio (TURNER, 2010). Em suma, o estudo sugere que a variabilidade observada no gene que codifica a subunidade β 3 da proteína G são indicativos de diferenças interindividuais na resposta da pressão arterial para

uma diurético tiazídico e que os efeitos gerados pelo polimorfismo C825T são similares aos dos outros indicadores, incluindo idade, raça, e as medidas dos sistema renina-angiotensina-aldosterona (TURNER, 2010).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto, sabemos que normas e protocolos são as diretrizes de funcionamento de operação em qualquer ambiente, nos dias de hoje a capacidade de interagir de forma rápida e eficiente é considerada uma pedra angular de qualquer pesquisa. Somente através de diagnósticos moleculares é possível afirmar a relação existente entre os genes e as doenças multifatoriais.

A genotipagem através da técnica de PCR é uma fonte confiável de diagnóstico que pode ser utilizado na medicina preventiva, viabilizando a identificação de indivíduos suscetíveis a doenças que apresentam componentes genéticos para seu estabelecimento, bem como na adequação individualizada dos respectivos tratamentos. A genotipagem de polimorfismos relacionados ao gene GNB3 permite identificar indivíduos que melhor respondam a fármacos que melhorem seu quadro clínico. Por isso estudos como este se constituem de grande valor para a medicina tanto na prevenção quanto no controle da doença.

O estudo do polimorfismo C825T também viabiliza uma abordagem terapêutica personalizada da medicina, colaborando na seleção de dosagens terapêuticas adequadas e levando maior segurança e efetividade do fármaco para cada paciente que faz uso desses medicamentos.

Pode-se constatar diante dos dados obtidos que a número amostral dessa pesquisa foi insuficiente, sendo necessários mais esforços e mais estudos na área para que o diagnóstico precoce possa ser uma realidade para toda a população, no intuito de observar o grau de influência que os caracteres hereditários possuem na evolução das doenças multifatoriais. Ademais a realização desse trabalho mostra-se como uma grande contribuição para o conhecimento do diagnóstico precoce de doenças multifatoriais e para o perfil genético da doença no Distrito de Igará. É de fundamental importância discutir os achados que comprovam a identificação de genes ligados a doenças, já que diagnóstico molecular é na atualidade, uma ferramenta promissora para identificação precoce de patologias.

REFERENCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 5 edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AMANTO, A.; BARRA, B.G.; NEVES, R.A.F. **Genética do diabetes mellitus do tipo II: novidades e perspectivas**. Revista Brasileira Médica. Brasília, v. 45, n. 3: 167-182, 2008.
- AYRES J.R.C.M. **Hermenêutica e humanização das práticas de saúde**. Ciências Saúde Coletiva 2005; 10:549-60.
- BARRETO-FILHO, J. A. S.; KRIEGER, J. **Genética e hipertensão arterial: conhecimento aplicado à prática clínica?** Ver. Soc. Cardiol. 1:46-55. 2003.
- BARROSO, I.; GURNELL, M.; CROWLEY, V.E.; AGOSTINI, M.; SCHWABE, J.W.; SOOS, M.A. et al. **Dominant negative mutations in human PPAR gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension**. Nature 1999; 402:880-3.
- BECKERATH, N. von et al. **G protein beta 3 subunit 825T allele carriage and risk of coronary artery disease**. Atherosclerosis, 2002.
- BEIGE, J.; HOHENBLEICHER, H.; DISTLER, A.; SHARMA, A. M. **G-Protein $\beta 3$ Subunit C825T Variant and Ambulatory Blood Pressure in Essential Hypertension**. Hypertension, 33; 1049-1051. 2009.
- BEIGE, J. et al. **G-Protein $\beta 3$ Subunit C825T Variant and Ambulatory Blood Pressure in Essential Hypertension**. Journal of the American Heart Association, 1999.
- BORTOLOTTO, L. A.; SAFAR, M. E. **Perfil da pressão arterial ao longo da árvore arterial e genética da hipertensão**. Arq. Bras. Cardio.vol.86, n.3, pp. 191-197. 2006.
- BOSSONI, M. G. R.; OLIVEIRA, A. V. **Contribuição dos Fatores Genéticos no Desencadeamento das Doenças Multifatoriais**. CESUMAR - Centro Universitário de Maringá - VI EPCC, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2004. **Hipertensão: vida saudável o melhor remédio**. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/html/dicas/hipertensao.html>
Acesso: abr. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1101/GM, de 12 de junho de 2002. **Estabelece os parâmetros de cobertura assistencial no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS**. Brasília, DF, 2002. Disponível em:
<<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/Gm/GM-1101.htm>>. Acesso em: jan. 2010.

BRASIL, Caderno de Atenção Básica do Ministério da Saúde – **Diabetes Mellitus**; Cadernos de Atenção Básica - nº16. Brasília, 2006.

CASIGLIA, E. et al. **Effects of the C825T polymorphism of the GNB3 gene on body adiposity and blood pressure in fertile and menopausal women: a population-based study**. Journal of Hypertension, 2008.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Basic concepts in metabolism**. In: Champe PC, Harvey RA, eds – Biochemistry. 2 ed. Philadelphia: Lippincott; Raven: 75. 1994.

COLLINS, F.S.; MCKUSICK, V.A. **Implications of the Human Genome Project for medical science**. Jama. v. 285, p. 540–544. 2001.

CORVOL, P.; PERSU, A.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.P.; JEUNEMAITRE, X. **Seven lessons from two candidate genes in human essential hypertension: angiotensinogen and epithelial sodium channel**. Hypertension, v. 33, p. 1324–1331. 1999.

Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Arq. Bras. Cardiol., vol.89, n.3, pp. e24-e79. 2007

DISHY, V.; GUPTA, S.; LANDAU, R.; XIE, H. G.; KIM, R. B.; SMILEY, R. M.; BYRNE, D. W.; WOOD, A. J. J.; STEIN, C. M.: **G-protein beta-3 subunit 825 C/T polymorphism is associated with weight gain during pregnancy**. Pharmacogenetics 13: 241-242, 2003.

DONG, Y.; ZHU, H.; SAGNELLA, G. A.; CARTER, N. D.; COOK, D. G.; CAPPUCCIO, F. P. **Association Between the C825T Polymorphism of the G Protein β 3-Subunit Gene and Hypertension in Blacks**. Hypertension.34, 1193-1196. 2009.

DZIDA, G.; GOLON-SIEKIERSKA, P.; PUŻNIAK, A.; SOBSTYL, J.; BIŁAN, A.; MOSIEWICZ, J.; HANZLIK, J. **G-protein beta3 subunit gene C825T polymorphism is associated with arterial hypertension in Polish patients with type 2 diabetes mellitus**, Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 8(8), 597-602. 2008.

EMALA C. W.; SCHWINDINGER, W. F.; WAND, G. S.; LEVINE, M. A. **Signal-transducing G proteins: basic and clinical implications**. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 47: 81-111. 1994.

EVORA, P. R. B.; NOBRE, F. **O Papel das G-Proteínas na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares**. Arq. Bras. Cardiol. volume 72, n.2. 1999.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V. **Impaired endothelium-dependent relaxation to sodium fluoride following coronary reperfusion injury: Evidence for G-protein dysfunction**. Ann Thorac Surg, 57:1550-6. 1994.

FIRMO, J.; BARRETO, S. M.; LIMA-COSTA, M. F. **The Bambui Health and Aging Study (BHAS): factors associated with the treatment of hypertension in older adults in the community.** Cadernos de Saúde Pública.19:817-27. 2003.

FUENTES, I. et al. **Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR.** J Clin Microbiol, v. 34, n. 10, p. 2368-71, 1996.

GONZÁLEZ, N. et al. **Ausencia de asociación entre el polimorfismo C825T de la subunidad $\beta 3$ de la proteína G y la sensibilidad a la sal en la hipertensión arterial esencial.** Rev. Nefrología, Vol. XXI. Número 4. 2001

GUILLARD, C. S. et al. **Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway.** Biol Chem. 278:11050-6; 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica.** 10. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HAYAKAWA T.; TAKAMURA T.; ABE T.; KANEKO S. **Association of the C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese.** Metabolism. 56, 44–48. 2007.

HAYAKAWA, T. et al. **Association of the C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese.** Science direct, 2006.

HSIN, C. L.; DUNCAN, J. A, et al. **Sequestration of the G-protein beta gamma subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis.** Proc Natl Acad Sci. USA. 1998; 95: 5057-60.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **A qualidade da informação sobre a mortalidade no Brasil recente e avaliação do impacto das causas violentas no número de anos de vida perdidos.** Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil. 2009. Disponível em:< www.ibge.gov.br/home/estatistica/...socioSaude/2009/indicSaude.pdf> Acesso em: mar 2010.

III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Rev. Bras. Clín. Terap., v. 24, n. 5, novembro, 1998.

III CONSENSO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/publicacoes/consenso3/apresentacao.asp>. Acesso em Dezembro de 2010.

INSTITUTO HERMES PARDINI. **Determinação Do Polimorfismo 825TT Da Proteína G.** Departamento De Genética Humana Do IHP. www.hermespardini.com.br. Acesso em: dezembro de 2010.

INSTITUTO HERMES PARDINI. **Estudo Molecular Para Predisposição à Hipertensão.** Disponível em: www.hermespardini.com.br. Acesso em: dezembro de 2010.

KIMURA, L. **Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo.** 2010. Tese (Doutorado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-11032011-135658/>. Acesso em: 15 de ago de 2011.

KNUIMAN, M. W.; DIVITINI M. L.; WELBORN, T. A.; BARTHOLOMEW, H. C. **Familial correlations, cohabitation effects, and heritability for cardiovascular risk factors.** Ann. Epidemiol., 6:188-94. 1996.

LEWINGTON S, CLARKE R, QIZILBASH N, PETO R, COLLINS R, **For the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies.** Lancet, 360:1903–13. 2002.

LOPES, H. F.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; RICCIO, G. M. G. **Tratamento não medicamentoso da Hipertensão Arterial.** Rev. Socie. Cardi. do Est. de SP. São Paulo, v. 13, n. 1, p. 148-55, 2003.

MICHALSEN, A. et al. **Effects of lifestyle modification on the progression of coronary atherosclerosis, autonomic function, and angina—The role of GNB3 C825T polymorphism.** American Heart Journal, 2005.

MUNROE, P. B.; CAULFIELD, M. J. **Genetics of hypertension.** Curr. Opin. Genet. Dev., v. 10, p. 325–329, 2000.

NABER C.; HÜSING J.; WOLFHARD U.; ERBEL R.; SIFFERT W. **Interaction of the ACE D allele and the GNB3 825T allele in myocardial infarction.** Hypertension. 2000; 36: 986-989.

NABER, C. K.; SIFFERT, W. **Genetics of human arterial hypertension.** Minerva Med.,v. 95, p. 347–356, 2004.

NAKAGAWA, H. et al **G-Protein β 3 Subunit Variant C825T is a Risk Factor for Hypertension in Japanese Females -A Prospective Cohort Study Over 5 Years.** Annals of Human Genetics, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **World Health Organization**, disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 21 de Julho de 2012.

PARDINI, H. **Determinação do polimorfismo 825TT da proteína G**. Disponível em: <http://www.hermespardini.com.br/atualmanual/pdfgenetica/>. Acesso em 10 mar. 2010.

PRESTON, R., MATERSON B., REDA D., WILLIAMS D., HAMBURGER R., CUSHMAN W, ANDERSON R. **Age-race subgroup compared with renin profile as predictors of blood pressure response to antihypertensive therapy**. JAMA., 280: 1168–1172.1998.

PURVES, W. K. et al. **Vida: A ciência da biologia**; volume único. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2002.

RANDAZZO, P. M.; AUGUSTO, P. V. F. **Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G**. Scientia Medica (Porto Alegre); volume 21, número 1, p. 31-36. 2011.

ROSSKOPF, D.; BUSCH, S.; MANTHEY, I.; SIFFERT, W. **G protein β 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms**. Hypertension., 36, 33–41. 2000.

SAIKI, R. K. et al. **Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**. Science, v. 230, p. 1350-4, 1985.

SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND, S.; STOFFEL, S. J.; SCHARF, R.; HIGUCHI, G. T.; HORN, K. B.; MULLIS, H. A.; ERLICH. **Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase**. Science 239 (1988): 487-491.
SALES, P. H. D. **Reação em Cadeia de Polimerase e suas aplicações**. Monografia. Belo Horizonte - MG: 2006.

SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. **Farmacogenômica em hipertensão Aspectos fisiológicos**. Revista Brasileira de Hipertensão, São Paulo volume 9, número 1: 4–8; 2006.

SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. **Farmacogenômica em hipertensão Aspectos fisiológicos**. Hipertensão.v. 9(1): 4–8,2006.

SARTORI, M. et al. **G-Protein Subunit Gene 825T Allele and Hypertension - A Longitudinal Study in Young Grade I Hypertensives**. Hypertension; 42; 909-914. 2003.

SCHIFFRIN, E. L. **Intracellular signal transduction for vasoactive peptides in hypertension**. Can J Physiol Pharmacol,72:954 –962,1994.
SHIELDS, S.; DELL, H. **A 'thrifty' gene linked to obesity**. TRENDS in Genetics., Vol.17 No.1. 2001.

SECRETARIA DE POLÍTICAS PÚBLICAS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus**. Revista de Saúde Pública 2001; 35:585-8.

SIFFERT W. **G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes.** *Annu. Rev. Med.*, 56, 17–28. 2005.

SIFFERT, W.; ROSSKOPF, D.; SIFFERT, G.; BUSCH, S.; MORITZ, A.; ERBEL, R.; SHARMA, A. M.; RITZ, E.; WICHMANN, H. E.; JAKOBS, K. H.; HORSTHEMKE, B. **Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension.** *Nature Genetics.*, 18:45– 48. 1998.

SIFFERT, W. et al. **G Protein β 3 Subunit Gene 825T Allele Is Associated With Increased Left Ventricular Mass in Young Subjects With Mild Hypertension.** *American Journal of Hypertension*, 2001.

SIFFERT, W. et al. **Association of a human G-protein β 3 subunit variant with hypertension, *Nature Genetics.*** *American Journal of Hypertension.* 1998.

SIFFERT, W. et al. **G-Protein β 3-Subunit Gene 825T Allele and Hypertension: A Longitudinal Study in Young Grade I Hypertensive.** *Journal of the American Heart Association*, 2003.

SIMONETTI, J.P.; BATISTA L.; CARVALHO, L.R.; **Hábitos de saúde e fatores de risco em pacientes hipertensos.** *Revista Latino – americana de Enfermagem maio/jun.*, v. 10 n. 3, p. 415-222, 2002.

STRACHAN, T. et al. **Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle.** *Human Molecular Genetics*, 2002.

STURMER G. et al. **O manejo não medicamentoso da hipertensão arterial sistêmica no Sul do Brasil.** *Caderno Saúde Pública* 2006; 22:1727-37.

SUWAZONO, Y et al. **G-Protein β 3 Subunit Variant C825T is a Risk Factor for Hypertension in Japanese Females-A Prospective Cohort Study over 5 Years.** *Annals of Human Genetics*, 2006.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA*, 289 v.19 p.2560-72, 2003

TURNER, S T; BOERWINKLE, E. **Genetics of hypertension, target-organ complications, and response to therapy.** *Circulation.*, 102:IV40- IV45, 2000.

TURNER, S. T.; SCHWARTZ, G. L.; CHAPMAN, A. B.; HALL, W. D.; BOERWINKLE, E. **Antihypertensive pharmacogenetics: getting the right drug into the right patient.** *J. Hypertens.* v. 19, p. 1–11, 2001.

VANHALA, M. J.; PITKAJARVI, T. K.; KUMPUSALO, E. A.; TAKALA, J. K. **Obesity type and clustering of insulin resistance-associated cardiovascular risk factors in middle-aged men and women.** *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 22:369-74, 1998.

VILLARES, S. M. et al. **Associação entre polimorfismo Gln27Glu do receptor b₂-adrenérgico e hipertensão arterial sistêmica em obesos mórbidos.** Arq Bras Endocrinol Metab., vol.44, n.1, pp. 72-80, 2000.

VOET, D.; VOET, J.G. **Molecular physiology:** Biochemical communications. Hormones and neurotransmission. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

WATSON, J.D. **DNA o segredo da vida.** São Paulo: Companhia das Letras, 2005.

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, 44, S57- S64, 1994.

WILSON, P.W.; KANNEL, W.B.; SILBERSHATZ, H.; D'AGOSTINO, R.B. **Clustering of metabolic factors and coronary heart disease.** Arch Intern Med 1999, 159:1104-9.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Arterial Hypertension,** Geneva, 1978. Report. Geneva, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2011.

YAMAGISHI, K.; TANIGAWA T.; CUI R.; TABATA M.; IKEDA A.; YAO M.; SHIMAMOTO T.; ISO, H. **G-Protein β -3 Subunit C825T Polymorphism, Sodium and Arterial Blood Pressure:** A Community-Based Study of Japanese Men and Women. Annals of Human Genetics, 70, 759–766, 2006.

ZECCHIN, G. H.; CARVALHEIRA, C. B. J.; SAAD, A. J. M.; **Bases genéticas da Resistência a Insulina, da síndrome metabólica e do diabetes mellitus tipo 2.** Revista Sociedade da Cardiologia. São Paulo; v.3; n. 2p. 508-20, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A: FORMULÁRIO DE PESQUISA DESTINADO AOS PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA (UNEB)
Departamento de Educação – Campus VII – Senhor do Bonfim, BA
Colegiado de Ciências Biológicas

Formulário da Pesquisa

Nome:		No.
Endereço:		Tel.
E-mail:		Estado Civil:
Data de Nascimento:		Sexo: ()F ()M
Classificação Fenotípica: ()Br ()Ng ()Ind ()Am ()Misto		
Se misto		
() Traços de Caucasoíde		
() Traços de Negróide		
() Traços de Indígena		
() Traços de Asiático		
() Outros _____		
Pais são portadores de alguma doença multifatorial?		
Hipertensão arterial() Diabetes() Obesidade() Câncer() Outra() _____		
Nenhuma()		
Pratica de atividade física?		
()Sim ()Não Se sim, qual? _____		
É fumante?		
()Sim ()Não Há quantos anos? _____		
Genotipagem C825T: CC () CT() TT()		
Outras Informações relevantes:		

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO - CAMPUS VII/SENHOR DO BONFIM
Colegiado de Ciências Biológicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro por meio deste termo, que concordo em ser entrevistado (a) e doar meu 5ml de meu material biológico na pesquisa referente ao gene C825T e sua ligação com hipertensão, obesidade e diabetes.

Assinando esse termo concordo que devo responderei as perguntas feitas em questionário. Não será feito nenhum procedimento que traga qualquer desconforto ou risco á minha vida. Sei que poderei ter todas as informações que quiser e poderei desistir do estudo a qualquer momento, sem prejuízo algum para a minha pessoa.

Afirmo que aceitei participar desse estudo por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informado (a) dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo, tenho a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de minha responsabilidade. E que meu nome não aparecerá em qualquer momento.

Fui também esclarecido (a) de que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidas ás normas éticas destinada á pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde e do Ministério da Saúde.

O acesso aos dados coletados será exclusivo da pesquisadora e de sua orientadora. Fui informado que a orientadora da pesquisa é Prof^o Msc Juliana Côrtes de Freitas a quem poderei consultar a qualquer momento através do telefone (74)9140-9114. Sei que posso contatar a Universidade do Estado da Bahia a qualquer momento pra obter informações sobre a veracidade dessa pesquisa através do telefone (74)3541-4013. Sei também que posso contatar a pesquisadora caso queira me retirar da pesquisa através do telefone (74)9141-5444.

A pesquisadora me ofertou uma cópia assinada desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreende para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo.

Assinatura: _____

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador