Lilian Kimura

# Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo

São Paulo

2010

Lilian Kimura

# Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética

Orientador(a): Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2010

# Dados catalográficos

Kimura, Lilian

Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – São Paulo

166 páginas

Tese Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1.Genética da hipertensão 2.Estudos de associação 3.Remanescentes de quilombos 4.Afro-descendentes

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientador(a)

*Ao meu querido Israel Rubio, por tornar a minha vida mais completa.*

"O Amor...

É difícil para os indecisos.
É assustador para os medrosos.
Avassalador para os apaixonados!
Mas, os vencedores no amor são os
fortes.
Os que sabem o que querem e querem o que têm!
Sonhar um sonho a dois,
e nunca desistir da busca de ser feliz,
é para poucos!!"

*Cecília Meireles*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Regina Célia Mingroni Netto, não somente pela orientação deste trabalho, mas também pelos cuidados de mãe que muitas vezes deixou transparecer nessa convivência de sete anos.

Ao Dr. Tiago V. Pereira, pela extrema paciência, por todos os esclarecimentos conceituais, por todo o suporte na realização e interpretação das análises estatísticas.

Ao amigo Gustavo Ribeiro por me socorrer com seus conhecimentos estatísticos, por ser tão prestativo e por ter tido extrema paciência ao me auxiliar na interpretação dos resultados na conclusão da tese.

Aos meus amigos "quilombolas" Daniel Rincon e Claudia B. Angeli, por todo o empenho no projeto dos quilombos, auxílio extra e pelas risadas nas longas viagens ao Vale do Ribeira, tornando cada expedição um acontecimento.

Aos demais "quilombolas" Nelson H. Cotrim e Lúcia Inês M. de Souza, pelo empenha nas viagens e na construção das genealogias.

Agradeço à minha amiga Maria Teresa B. de M. Auricchio, pelos conselhos, pelo apoio técnico e por todos os momentos de descontração tanto nas viagens como no laboratório.

Meus agradecimentos à minha amiga Eliete Pardono, tanto pela dedicação e carinho remetidos ao trabalho nos quilombos, como por ser uma pessoa especial.

Agradeço também aos "quilombolas eventuais" Karina L. Mandelbaum, Deborah A. Nogueira, Fernando J. Velloso, Rafaella M. P. Nascimento e Renata T. S. de Aguiar, pela participação voluntária (mas com grande dedicação) nas viagens.

Aos médicos da nossa equipe, Dr. João Pedro Vicente e Roberto Maluf pelo exame clínico dos indivíduos quilombolas, e especialmente ao amigo Franklin Albert S. Kono (em memória), pela amizade, dedicação e por ter tornado nossas viagens uma troca de experiências.

Aos Drs. José Eduardo Krieger e Alexandre Pereira, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, pelo incentivo na elaboração do projeto, e especialmente ao Dr. Alexandre pelas valiosas sugestões de análises.

Ao Dr. Sidney E. Batista dos Santos e à doutoranda Elzemar M. Ribeiro Rodrigues, do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA, por terem me recebido de forma acolhedora para realizar as genotipagens dos INDEL por duas vezes. Agradeço também aos demais membros do LGHM pelo interesse em me familiarizar com o ambiente.

Meus agradecimentos sinceros ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto pelos valiosos ensinamentos durante a minha trajetória acadêmica.

Às Profas. Dras. Angela M. Vianna Morgante e Luciana A. Haddad, pelo interesse constante nesse trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Depto. de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela infra-estrutura que permitiu a realização desse projeto.

Aos motoristas do IBUSP, pela competência e alegria durante as viagens.

Aos funcionários e funcionárias das mais diversas seções do Instituto de Biociências, por serem sempre prestativos.

À Profa. Dra Mayana Zatz, coordenadora do CEPID (Centro de Estudos do Genoma Humano), cujo desenvolvimento e financiamento foram fundamentais à execução desse projeto.

Às técnicas do Centro de Estudos do Genoma Humano Kátia Rocha, Camila Juncansen e Martha Lima Cozzo, pelo auxílio técnico com as genotipagens automáticas.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço à amiga Maraisa de C. Sebastião, que sempre foi muito prestativa e me deu todo o suporte necessário ao cuidar das "burocracias" do projeto.

Aos funcionários Paulo Rogério de Camargo, Maria Raimunda L. S. Pinheiro e Laurinda de Fátima P. C. Baptista por todo a atenção e suporte técnico.

À antiga geração do Lab 349, Ronaldo S. Abreu Silva, Karina Lezirovitz Mandelbaum, Ana Carla Batissoco e Jihane Romanos, pela amizade e por terem cuidado de mim logo que eu integrei essa equipe, especialmente à Ana Carla por ter sido minha paciente companheira em momentos de alegria e de estresse durante a minha trajetória no laboratório.

À nova geração do Lab 349, Renata Thiele, Renata Nonose, Daniela Tiaki, Dayane Cruz e Vitor Dantas. Meus agradecimentos especiais à Thiele e Tiaki por terem me ouvido pacientemente nos momentos de estresse, e à Dayane e à Rezinha, que além da mesma paciência, estiveram sempre comigo nos momentos de crise.

À minha segunda "mãe" Ligia Vieira, por ter me amparado tantas vezes, e por ter feito companhia nos momentos mais difíceis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Humana e "adjacências", dos quais sentirei saudades: Jacaré, Silvinha, Larissa, Ana Carolina, Adriano, José, Renan, Ana Maria, Joana, Érica, Raquel, Felippe, Marilena, Christiane, Andressa e Max, especialmente ao Jacaré por tantas vezes dividir as tarefas com as genotipagens, e à Marilena e ao Felippe pelo convite à viagem para Avanhandava, pois a companhia de vocês foi essencial para que eu mantivesse o foco.

À minha grande amiga Dayse Alencar (e sua família), por terem me acolhido em sua casa em Belém, pelos passeios "turísticos" de ônibus e pela companhia nos almoços na Edilena.

À minha sempre professora e amiga Vera Rita, por mostrar o "mundo fantástico" da Biologia.

Agradeço a minha sempre amiga Renata Gomes Nascimento, por doze anos de amizade e histórias.

Aos meus pais Edison e Eunice, por serem meus exemplos de vida, por sempre terem acreditado e investido no meu potencial, pelo incentivo e pelo amor incondicional. Agradeço também ao meu irmão Marcio, pelas conversas na madrugada, pelas risadas, pelo carinho que sempre teve comigo.

Agradeço à minha família, Tia Fátima, Tio Zinho, Amanda, Aline, Tia Junko, Tio Itiro (em memória), Lu, Mau, Pri, Bob, Bá e Ditian, por fazerem parte da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos ao Israel, meu marido e grande amor da minha vida, por tudo o que já passamos juntos, pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho e cuidados, por me incentivar a nunca parar de lutar e por nunca me deixar desistir de um sonho.

Agradeço a DEUS, que tudo permitiu nessa jornada pela busca de conhecimento.

À família STM e "agregados" (Meire, Tião, Aninha, Martins e Will), pela torcida e pelos cuidados, e por toda a alegria que dividimos.

À minha família quilombola Cida, Martelo, Dani, Alana, Flávio e Gabriel, por todos os bons momentos vividos, por terem nos recebido com tanta generosidade em sua casa e por todas as histórias de pescaria na beira do rio.

Às prefeituras dos municípios de Eldorado, Iporanga e Barra do Turvo pelo apoio. Às irmãs Angela Biagioni e Maria Sueli Berlanga, da Casa Paroquial de Eldorado e a Antônio Carlos Nicomedes, do MOAB, pela ajuda no contato com as comunidades.

Aos indivíduos das comunidades quilombolas, especialmente aos líderes e agentes de saúde, pela colaboração, sem a qual não teríamos concretizado mais esse trabalho.

**SUMÁRIO**


**Resumo** 1

***Abstract*** 3

**Capítulo 1**

**1. Revisão bibliográfica** 5

1.1. Epidemiologia da Hipertensão 5

1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial 9

1.3. Genética da Hipertensão 11

1.3.1. Hipertensão monogênica 12

1.3.2. Hipertensão essencial 13

1.4. Estratégias para o estudo genético da hipertensão 13

1.4.1. Estudos de ligação 13

1.4.2. Estudos de associação 15

1.5. Genes candidatos selecionados para esse estudo 18

1.5.1. O gene *ACE* 19

1.5.2. O gene *AGT* 21

1.5.3. O gene *GNB3* 23

1.5.4. O gene *NOS3* 25

1.5.5. O gene *ADD2* 27

1.5.6. O gene *GRK4* 28

1.6. Os remanescentes de quilombos como modelo para estudo das bases genéticas da hipertensão essencial 30

**Capítulo 2**

**2. Objetivos** 35

2.1. Objetivo geral 35

2.2. Objetivos específicos 35

**Capítulo 3**

**3. Amostras e métodos** 36

3.1. Amostras e localização das doze populações estudadas 36

3.2. Aspectos éticos 38

3.3. Histórico clínico 38

3.4. Medidas de pressão arterial 39

3.5. Medidas antropométricas 40

3.6. Extração de DNA genômico 40
3.7. Estudos moleculares 40
3.7.1. Estudo dos marcadores de ancestralidade do tipo INDEL 40
3.7.2. Estudo dos sete polimorfismos selecionados 45
a)Estudo do polimorfismo *ACE* I/D 46
b)Estudo dos polimorfismos *NOS3* Glu298Asp, *GNB3* C825T, *AGT* M235T, *ADD2* A/C e *GRK4* A486V 47
c)Estudo do polimorfismo *GNB3* A-350G 50

**Capítulo 4**

**4. Estudo de ancestralidade nas populações remanescentes de quilombos** 51
4.1. Introdução 51
4.2. Objetivo 55
4.3. Amostras e Métodos 56
4.4. Resultados 56
4.5. Discussão 60
4.6. Conclusões 63

**Capítulo 5**

**5. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos: estudo transversal** 64
5.1. Introdução 64
5.2. Objetivos 66
5.3. Amostras e Métodos 66
5.3.1. Amostras e determinação dos genótipos 66
5.3.2. Caracterização clínica e antropométrica 67
5.3.3. Influência das variáveis clínicas e antropométricas sobre a pressão arterial e a Hipertensão 67
5.3.4. Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* 68
5.3.5. Análise da presença de estratificação populacional 68
5.3.6. Estudos de associação 68
5.3.6.1. Definição dos grupos hipertensos e normotensos 68
5.3.6.2. Desenho 69
i) Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos no risco de hipertensão essencial 69
ii) Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos na variação da pressão arterial 70

iii) Avaliação de efeitos haplotípicos no risco de hipertensão essencial e na variação da pressão arterial 70
iv) Avaliação dos efeitos multilocos 71
5.4. Resultados 72
5.5. Discussão 90
5.6. Conclusões 94

**Capítulo 6**

**6. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos: estudo baseado em famílias** 95
6.1. Introdução 95
6.2. Objetivos 97
6.3. Amostras e métodos 97
6.3.1. Amostras e determinação dos genótipos 97
6.3.2. Construção das genealogias 97
6.3.3. Desenho do estudo 98
6.3.3.1. Definição dos indivíduos hipertensos e normotensos 98
6.3.3.2. Estudo de associação baseado em famílias 98
6.3.3.3. Herdabilidade da pressão arterial 99
6.4. Resultados 100
6.5. Discussão 106
6.6. Conclusões 108

**Referências** 109

Anexo I 130
Anexo II 153
Anexo III 154
Anexo IV 155
Anexo V 156
Anexo VI 160

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1**: Prevalências do diabetes tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão de acordo com a ancestralidade em populações norte-americanas. 8

**Figura 2.1**: Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e suas diferentes causas no Brasil. 8

**Figura 3.1**: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. 10

**Figura 4.1**: Mapas dos estados de São Paulo e Paraná. Em verde, localização geográfica do Vale do Ribeira. O quadrado azul corresponde à área onde se concentram as comunidades remanescentes de quilombos por nós estudadas. 32

**Figura 5.1**: Vista panorâmica do Vale do Ribeira na comunidade de Abobral. 33

**Figura 6.1**: Travessia por meio de balsa que dá acesso às comunidades de Pilões e Maria Rosa. 33

**Figura 7.1**: Detalhe da balsa que dá acesso à comunidade de Pedro Cubas e detalhe do caminho de acesso à comunidade de São Pedro, sem qualquer pavimentação. 34

**Figura 8.1**: Casas características das comunidades remanescentes de quilombos – comunidade de Reginaldo. 34

**Figura 1.3**: Localização das doze comunidades de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira estudadas. 37

**Figura 2.3**: Exemplo de resultado gerado pelo *software* de análise do Genetic Analyser 3130. 45

**Figura 3.3**: Resultados da eletroforese dos produtos de PCR do gene *ACE*. 47

**Figura 4.3**: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP M235T no gene *AGT*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. 48

**Figura 5.3**: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP Glu298Asp no gene *NOS3*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. 48

**Figura 6.3**: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP C825T no gene *GNB3*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. 48

**Figura 7.3**: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A/C no gene *ADD2*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. 49

**Figura 8.3**: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A486V no gene *GRK4*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. 49

**Figura 9.3**: Exemplo de resultado da genotipagem do SNP G-350A no gene *GNB3*. 50

**Figura 1.4**: Representação ternária da distribuição dos indivíduos em relação à porcentagem estimada de contribuição genética de cada ancestralidade (africana, européia e ameríndia). 57

**Figura 2.4**: Representação gráfica das estimativas de ancestralidade individual das três subpopulações parentais e dos indivíduos dos remanescentes de quilombo. 57

**Figura 3.4**: Distâncias genéticas em duas dimensões entre as 10 populações estudadas, baseadas nos valores de Fst, obtidas por escalonamento multidimensional. 59

**Figura 1.5**: Distribuição do grau de atividade física (GAF) em homens e mulheres. 73

**Figura 2.5**: Frequência da hipertensão essencial em homens e mulheres dos remanescentes de quilombos, considerando os dois fenótipos da hipertensão. 74

**Figura 3.5**: Frequência da hipertensão em cada população, considerando todos os indivíduos. 75

**Figura 4.5**: Frequência da hipertensão em homens e mulheres em cada faixa etária, no total das doze populações remanescentes de quilombos. 76

**Figura 5.5**: Gráficos mostrando o intervalo interquartil referente às estimativas de ancestralidade africana, européia e ameríndia, entre os normotensos e hipertensos genotipados em relação ao painel de INDEL. 81

**Figura 1.6**: Exemplo de genealogia informatizada por meio do programa GenoPro2007 ®, versão 2.0. 100

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela I.1**: Classificação da pressão arterial segundo as medidas obtidas em consultório. 5

**Tabela II.1**: Relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento em que a hipertensão é o principal sinal clínico. 12

**Tabela III.1**: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ACE*. 20

**Tabela IV.1**: Estudos de associação com polimorfismos do gene *AGT*. 22

**Tabela V.1**: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GNB3*. 24

**Tabela VI.1**: Estudos de associação com polimorfismos no gene *NOS3*. 26

**Tabela VII.1**: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ADD2*. 28

**Tabela VIII.1**: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GRK4*. 29

**Tabela I.3**: Número estimado do total de habitantes de cada comunidade, número estimado de habitantes com idade igual ou superior a 17 anos, número de indivíduos estudados e porcentagem de cobertura do estudo. 38

**Tabela II.3**: Valor de GAF atribuído ao indivíduo de acordo com as atividades físicas exercidas diariamente. 39

**Tabela III.3**: Sequências dos *primers* utilizados na genotipagem do painel de 48 indels, tamanho dos fragmentos amplificados, tamanho dos alelos, concentração utilizada no protocolo de amplificação, fluorocromo dos *primers* marcados, localização e posição cromossômica. 42

**Tabela IV.3**: Polimorfismos estudados, localização no gene, região cromossômica no qual o gene está localizado, alelos de cada polimorfismo e sequências de *primers*. 46

**Tabela I.4**: Porcentagens da contribuição genética média das três subpopulações (africana, européia e ameríndia) na composição dos remanescentes de quilombos. 58

**Tabela II.4**: Matriz triangular inferior de distâncias genéticas (Fst) entre todos os pares possíveis das populações, em relação ao painel de 48 marcadores INDEL. 59

**Tabela I.5**: Genes candidatos selecionados e vias de atuação na regulação da pressão arterial. 67

**Tabela II.5**: Dados demográficos e antropométricos na amostra de 759 indivíduos do Vale do Ribeira de acordo com o gênero. 73

**Tabela III.5**: Modelos de regressão linear múltipla considerando a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica. 77

**Tabela IV.5**: Valores de p na análise de regressão logística, considerando o *status* da pressão arterial (0 = normotenso; 1 = hipertenso), *odds ratio* e intervalo de confiança (IC), em três modelos de regressão distintos. 78

**Tabela V.5**: Frequências alélicas e genotípicas e resultados dos testes de $\chi 2$ (1 grau de liberdade) [teste exato foi utilizado] para verificar se as populações se encontram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. 79

**Tabela VI.5**: Resultados do teste de *Mann-Whitney* comparando normotensos (169 indivíduos) e hipertensos (119 indivíduos) dos remanescentes de quilombo em relação a suas estimativas de ancestralidade. 82

**Tabela VII.5**: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério OMS). 83

**Tabela VIII.5**: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério JNC). 84

**Tabela IX.5**: Resultados da análise estatística MAX para a pressão arterial como fenótipo contínuo. 85

**Tabela X.5**: Resultados das análises haplotípicas, comparando o fenótipo de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *Joint National Commitee* (JNC). 87

**Tabela XI.5**: Resultados das análises haplotípicas, nas quais a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo. 88

**Tabela XII.5**: Melhores modelos preditivos de interação gene-gene obtidos pelas análises GMDR. 89

**Tabela I.6**: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério OMS). 101

**Tabela II.6**: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério JNC). 102

**Tabela III.6**: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica, analisadas separadamente. 103

**Tabela IV.6**: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica, analisadas conjuntamente. 104

**Tabela V.6**: Resultados do FBAT em relação aos haplótipos no gene *GNB3*. 105

**Tabela VI.6**: Herdabilidade da pressão arterial sistólica e diastólica. 106

## RESUMO

A hipertensão essencial, um problema de saúde pública mundial, é uma doença multifatorial, cujo componente genético varia entre 25 a 60%. A despeito da alta prevalência e incidência da hipertensão essencial em populações de ancestralidade africana, os estudos sobre o componente genético da hipertensão essencial têm sido primariamente realizados em populações de ancestralidade européia ou asiática.

Dessa maneira, o objetivo geral deste trabalho foi investigar e quantificar potenciais fatores de risco genéticos associados à hipertensão essencial em populações dos remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – SP, indivíduos afro-descendentes, oriundos de populações parcialmente isoladas, previamente bem caracterizadas do ponto de vista clínico, genealógico e genético-populacional.

A amostra foi constituída de 759 indivíduos adultos com estudo clínico e antropométrico oriundos das seguintes populações quilombolas: Abobral, Galvão, São Pedro, Pedro Cubas, André Lopes, Nhunguara, Sapatu, Pilões, Ivaporunduva, Maria Rosa, Poça e Reginaldo, localizadas no Vale do Ribeira, no estado de São Paulo.

Estimativas de ancestralidade (baseadas em 48 marcadores *INDEL* autossômicos) sugerem que a contribuição africana, européia e ameríndia na amostra estudada é de aproximadamente 39,7%, 39,0% e 21,3%, respectivamente ($N$=307), sendo igualmente distribuídas em normotensos e hipertensos (37,6%, 39,0% e 19,9% e 41,1%, 37,8% e 20,4%, $P$ = 0,845).

O estudo dos fatores de risco genéticos associados à hipertensão foi realizado por duas abordagens: (*i*) um estudo transversal com indivíduos não aparentados ($N$ = 383) e (*ii*) um estudo de associação baseado em famílias ($N$ total = 759, 79 famílias). Foram selecionados para estes estudos sete polimorfismos (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) em seis genes candidatos com forte base funcional: *ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* e *GRK4*.

As análises do estudo transversal revelaram uma associação significativa entre o polimorfismo C825T do *GNB3* e a hipertensão essencial ($P$=0,036), quando consideramos o fenótipo mais extremo (PAS ≥ 160mmHg e/ou PAD ≥ 95mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos). Análises haplotípicas do *GNB3* (variantes G-350A e C825T) revelaram que cada cópia do haplótipo C825/G-350 aumenta em 1,73 a chance de hipertensão em relação ao haplótipo basal T825/G-350 (OR = 1,73; IC 95% = 1,05 – 2,84, $P$ = 0,029). O haplótipo C825/G-350 estaria relacionado com um aumento na média

esperada da PAS e da PAD ($\Delta$ = 6,07 mmHg; IC de 95%: 1,64 – 10,50 mmHg; $P$ = 0,007 e $\Delta$ = 3.75 mmHg; IC de 95%: 1,16 – 6,35 mmHg; $P$ = 0,005, respectivamente). Estudos de interação gene-gene também foram conduzidos pela técnica de redução de dimensionalidade de múltiplos fatores generalizada (GMDR). Os modelos de predição por GMDR revelaram interações de alta ordem entre as variantes avaliadas e o risco de hipertensão essencial. Os melhores modelos de interação foram: *NOS3/GRK4*, *ACE/GNB3/AGT* e *ACE/GNB3/AGT/ADD2/GRK4*, com uma acurácia média balanceada de teste de 60% ($P$=0,006), 59% ($P$ =0,019), e 59% ($P$ = 0,025), respectivamente.

As análises de segregação em famílias indicaram uma associação significativa entre o polimorfismo G-350A do gene *GNB3* e a hipertensão essencial, quando consideramos o fenótipo classificado de acordo com o critério da OMS (PAS ≥ 140mmHg e/ou PAD ≥ 90mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos, $P$ = 0,018), e também quando consideramos o fenótipo mais extremo (PAS ≥ 160mmHg e/ou PAD ≥ 95mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos, $P$ = 0,001).

Finalmente, as estimativas da herdabilidade corroboram a noção de que o componente genético da pressão arterial é elevado nessas populações: herdabilidades (ajustadas para idade, gênero e IMC) de 36,1 e 42.9% para PAS e PAD, respectivamente.

Apresentamos nesse trabalho uma investigação extensiva e original sobre o componente genético da hipertensão essencial em uma população brasileira de afro-descendentes (com características históricas, genéticas e ambientais peculiares), reforçando a hipótese de um mecanismo poligênico de regulação da pressão arterial nas populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - SP.

**ABSTRACT**

Essential hypertension is a worldwide public health problem. Although this pathology has a multi-factorial etiology, the heritability of blood pressure is high, ranging from 25 to 60%. Despite the high prevalence and incidence of essential hypertension among subjects of African ancestry, most genetic association studies has been carried out either in subjects with European descent or in Asian-derived individuals.

Thus, the aim of this study was to investigate genetic risk factors putatively associated with essential hypertension in the *quilombo* populations, which are partially isolated African-derived populations, well characterized in terms of clinical, genealogical and population data, living in the Ribeira River Valley – São Paulo, Brazil.

A total of 759 adults with clinical and anthropometric data sampled from the 12 populations (Abobral, Galvão, São Pedro, Pedro Cubas, André Lopes, Nhunguara, Sapatu, Pilões, Ivaporunduva, Maria Rosa, Poça and Reginaldo) were studied.

Ancestry estimates (based on 48 ancestry informative INDEL markers) suggested that the African, European and Amerindian contributions were 39.7%, 39.0% and 21.3% respectively ($N$ = 307) to the studied sample. These proportions did not differ significantly between hypertensive and normotensive subjects(41.1%, 37.8% , 20.4% and 37.6%, 39.0% e 19.9%, respectively; $P$ = 0.845).

Two approaches were employed to investigate potential genetic risk factors for essential hypertension: (*i*) a cross-sectional study with unrelated individuals ($N$ = 383) and (*ii)* a family-based association study ($N$ = 759, 79 families). Seven polymorphisms (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) in six candidate genes with strong functional basis (*ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* and *GRK4*) were selected.

The cross-sectional study revealed a significant association between the C825T *GNB3* polymorphism and essential hypertension ($P$ = 0.036) defined as a SBP ≥ 160 mmHg and/or DBP≥95 mmHg, or use antihypertensive drugs). Haplotypic analyses of both G-350A and C825T *GNB3* variants indicated that each copy of the haplotype C825/G-350 increases in 1.73 the odds of hypertension compared to the reference T825/G-350 haplotype (OR = 1.73, CI 95% = 1.05 - 2.84, P = 0.029). The haplotype C825/G-350 was also associated with augmented levels of both SBP and DBP (expected mean difference, Δ = 6.7, 95% CI: 1.64 – 10.50, $P$ = 0.007 and Δ = 3.75, CI 95%: 1.16 – 6.35, $P$ = 0.005, respectively) compared to the reference haplotype. Gene-gene interactions were also investigated by the use of the generalized multifactor dimensionality reduction (GMDR). GMDR prediction models revealed high-order interactions for hypertension

between and among the studied variants. The best interaction models were *NOS3/GRK4*, *ACE/GNB3/AGT*, and *ACE/GNB3/AGT/ADD2/GRK4*, with an average testing balanced accuracy of 60% ($P = 0.006$) 59% ($P = 0.019$), and 59% ($P = 0.025$), respectively.

The family-based association study showed a significant association of the *GNB3* G-350 allele with essential hypertension ($P = 0.018$) when the diagnosis of essential hypertension was based on the WHO criteria (SBP ≥ 140mmHg and / or DBP ≥ 90 mmHg, or use of antihypertensive drugs, P = 0.018). Qualitatively analogous results were observed when a more extreme phenotype was considered (i.e. hypertension defined as a SBP ≥ 160mmHg and / or DBP ≥ 95 mmHg, or use of antihypertensive drugs, $P = 0.001$)

Finally, heritability estimates corroborated the notion that the genetic component of blood pressure is high in these populations. Heritability (adjusted for age, gender and BMI) estimates of 36.1 and 42.9% for SBP and DBP, respectively, were obtained.

We presented in this work an extensive and original investigation about the genetic component of essential hypertension in an African-Brazilian population (with peculiar historical, genetical and environmental characteristics). This study strengthens the hypothesis of a polygenic mechanism of regulation of blood pressure in the *quilombos* from Ribeira River Valley – São Paulo.

# CAPÍTULO 1

# 1. Revisão bibliográfica

## 1.1. Epidemiologia da hipertensão

Hipertensão é o termo utilizado para designar a pressão arterial elevada crônica, de caráter patológico. Essa condição associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, e também a alterações metabólicas, com consequente aumento no risco do surgimento de doenças cardiovasculares (DCVs). Quanto à sua etiologia, classifica-se a hipertensão como primária ou essencial aquela cuja manifestação não pode ser atribuída à existência de outra doença precedente, e como secundária, a hipertensão que se manifesta associada a outros distúrbios (Thibonnier & Schork, 1995).

A classificação da pressão arterial é baseada na média de duas ou mais medidas apropriadas, obtidas de duas ou mais leituras em pelo menos duas visitas ao consultório (Tabela I.1), para indivíduos com 18 anos ou mais. Quando as pressões arteriais sistólica e diastólica apresentam valores que se encontram em categorias diferentes, utiliza-se o maior valor para classificar a pressão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

Tabela I.1: Classificação da pressão arterial segundo as medidas obtidas em consultório.

| Classificação | PAS | PAD |
|---|---|---|
| Ótima | < 120 | < 80 |
| Normal | < 130 | < 85 |
| Limítrofe | 130 – 139 | 85 – 89 |
| Hipertensão estágio 1 | 140 – 159 | 90 – 99 |
| Hipertensão estágio 2 | 160 – 179 | 100 – 109 |
| Hipertensão estágio 3 | ≥ 180 | ≥ 110 |
| Hipertensão sistólica isolada | ≥ 140 | < 90 |

Mudanças na pressão arterial ocorrem com o avanço da idade. O aumento da pressão sistólica se dá ao longo de toda a vida, ao contrário da pressão diastólica, que se eleva até mais ou menos os 50 anos, tendendo a se estabilizar ou até mesmo a sofrer declínio após essa idade. A hipertensão diastólica é predominante antes dos 50 anos de idade, ocorrendo isoladamente ou combinada com a elevação da pressão sistólica. A prevalência da hipertensão sistólica aumenta com a idade, e por volta dos 50 anos, torna-se a forma mais comum de hipertensão. A pressão diastólica elevada é um fator de risco para doenças cardiovasculares mais importante do que a pressão sistólica até os 50 anos de

idade; depois dessa faixa etária, a pressão sistólica passa a ser o fator de risco mais importante (Chobanian e col., 2003).

A cada ano morrem 7,6 milhões de pessoas no mundo devido à hipertensão, segundo dados do Boletim Global de Doenças Relacionadas à Hipertensão (Lawes e col., 2008). A hipertensão arterial é responsável, segundo o documento, por 54% de todos os casos de acidente vascular cerebral (AVC) e 47% dos casos de infarto, fatais e não fatais, em todo o mundo. Na última década, a hipertensão fez mais de 70 milhões de vítimas fatais. A maioria das mortes ocorre em países em desenvolvimento econômico e mais da metade ocorre em indivíduos entre 45 e 69 anos.

Nos países mais desenvolvidos (*high-income countries*), somente 7% das mortes ocorridas antes dos 60 anos podem ser atribuídas à hipertensão, enquanto na África essa porcentagem sobe para 25% (*Global Health Risks*, OMS, 2009).

As doenças cardiovasculares emergiram como um significativo problema de saúde em vários países da África subsaariana. Estes, assim como diversos países de outras regiões do planeta, estão sob processo de transição epidemiológica, no qual as doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertensão, vêm ganhando expressividade em detrimento das doenças transmissíveis. A transição epidemiológica é intimamente relacionada com as mudanças demográficas, sociais e econômicas dessas populações (Oladapo e col., 2010). Em 1992, Ekpo e col. encontraram a frequência de 8,1% de hipertensos numa população urbana da Nigéria. Estudos recentes mostram um quadro epidemiológico completamente distinto, com prevalência da hipertensão de cerca de 20% ou até mais em populações urbanas ou rurais da África subsaariana (Thorogood e col., 2007; Kengne e col., 2007; Oladapo e col., 2010).

A África é considerada o local de origem e dispersão do homem moderno. Num dos maiores eventos migratórios na história recente da humanidade, milhões de africanos foram trazidos como escravos para a América durante mais de três séculos. Esses indivíduos, que são oriundos de diversas populações da África (predominantemente do Oeste), miscigenaram-se uns com os outros e também com europeus, resultando em populações geneticamente heterogêneas.

Estudos com populações afro-descendentes em países desenvolvidos revelaram que a hipertensão é um problema de saúde muito frequente. Na população norte-americana geral, cerca de 25% dos adultos são hipertensos; entre os afro-descendentes a frequência da hipertensão pode chegar a 35% (Cooper e col., 1999). Cui e col. (2003) estimaram em 24% a frequência de adultos norte-americanos com hipertensão. Estudos feitos a partir de 1970 mostraram que a hipertensão responde por cerca de 20% da mortalidade em afro-descendentes e por apenas 10% da mortalidade em populações caucasianas norte-

americanas (Cooper & Rotimi, 1997). Considerando como hipertensas as pessoas que apresentam pressão arterial com valores acima de 140/90 mmHg, Cooper e Rotimi (1997) concluíram que a hipertensão é cerca de 50% mais freqüente em negros do que em brancos ou hispânicos nos Estados Unidos. Nesse trabalho considerou-se a hipótese que o quadro da ocorrência da hipertensão devia-se basicamente às condições sócio-econômicas inferiores compartilhadas por hispânicos e negros norte-americanos. Como a incidência de hipertensão entre os hispânicos se assemelhava à ocorrência do distúrbio em brancos e não às frequências encontradas em negros, reforçou-se o indício de que fatores genéticos devem ser importantes no fenótipo da hipertensão entre afro-descendentes. Um estudo realizado por Umscheid e col. (2010) em populações norte-americanas demonstrou que os pacientes negros mantêm a pressão arterial menos controlada do que os pacientes brancos.

Cooper e col. (2005) questionaram se de fato há maior prevalência de hipertensão em populações negras. Comparando negros africanos, caribenhos e norte-americanos com brancos norte-americanos, canadenses e europeus (85.000 participantes no total), encontraram freqüências de 14-44% de hipertensos entre os negros e 27-55% entre os brancos. Analisando o modo de vida, situações de estresse e as condições sócio-econômicas dessas populações, os autores sugeriram que os fatores ambientais podem representar um impacto muito significativo no fenótipo da hipertensão. Esses resultados, no entanto, podem ter sido influenciados pelo delineamento experimental escolhido, no qual os países selecionados para o estudo não apresentavam de fato uma alta prevalência de hipertensão em negros. Também poderiam resultar de um viés sócio–econômico, segundo o qual as populações brancas teriam mais acesso aos tratamentos e por isso o número de brancos diagnosticados como hipertensos e em tratamento parece ser maior do que o de negros.

Crawford e col. (2010), investigando os efeitos do índice de massa corporal e da da obesidade na prevalência de diabetes do tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão em populações norte-americanas, encontraram as maiores proporções de diabéticos (12,1%) e hipertensos (28,9%) entre os afro-descendentes (Figura 1.1).

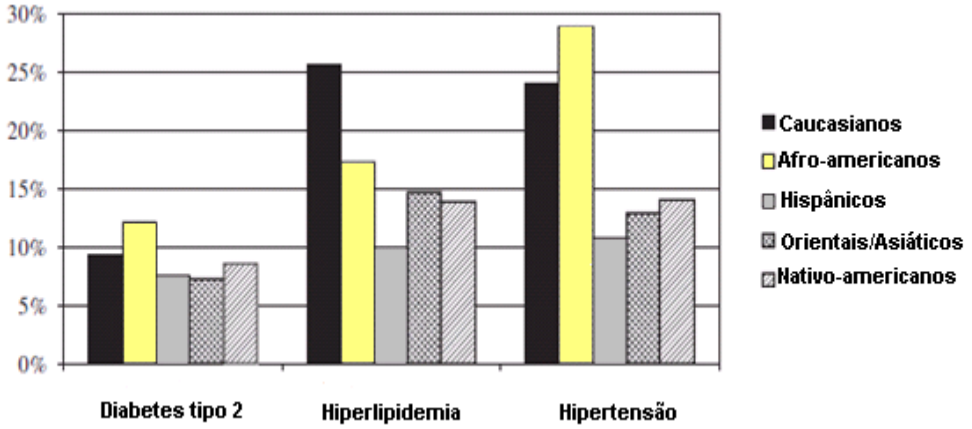



Figura 1.1: Prevalências do diabetes tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão de acordo com a ancestralidade em populações norte-americanas (adaptado de Crawford e col., 2010).

No Brasil, 29,4 % das causas de morte são atribuídas às doenças cardiovasculares, sendo 12,8% destas causadas por hipertensão arterial sistêmica (Figura 2.1). Estudos da década de 1980 até o ano de 2001, realizados em diversos estados brasileiros, observaram prevalências de hipertensão entre 10% e 42%, dependendo da região, subgrupo e critério diagnóstico utilizado (Lessa, 2001). Na realidade, a hipertensão arterial, doença mais frequente no Brasil, não tem sua prevalência conhecida no país como um todo (Rosário e col., 2009).

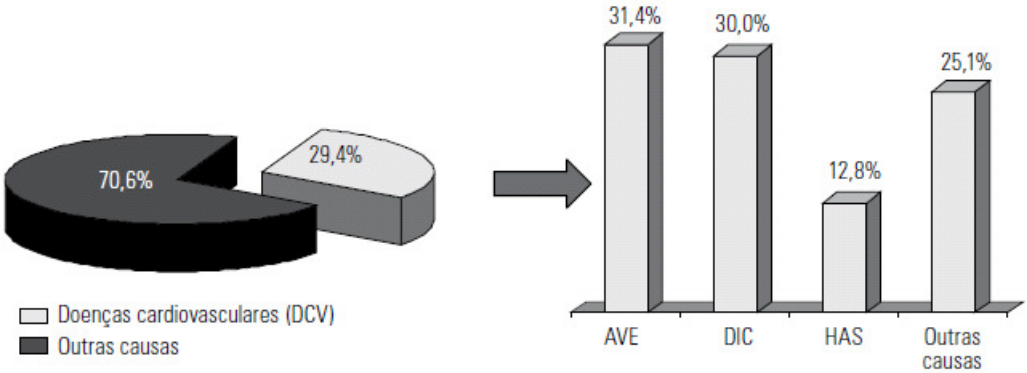



Figura 2.1: Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e suas diferentes causas no Brasil. AVE = acidente vascular encefálico; DIC = doença isquêmica do coração; HAS = hipertensão arterial sistêmica. (Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Jardim e col. (1992) realizaram um estudo epidemiológico e encontraram uma baixa frequência de hipertensão arterial (6,28%) em uma população quilombola Kalunga (em Goiás), isolada. Sichieri e col. (2001) relataram diferenças quanto à ocorrência da hipertensão: as mulheres negras de uma população miscigenada do Rio de Janeiro apresentavam maior probabilidade de desenvolverem hipertensão em relação às brancas e mulatas. Devido ao fato de haver estudos pouco conclusivos relatando a ocorrência da hipertensão em afro-brasileiros, são necessárias novas investigações para que se esclareça se há ou não uma alta prevalência de hipertensos, como tem sido relatado em diversos

trabalhos com afro-descendentes de outros países, analisando-se qual é a real contribuição dos fatores ambientais (dieta, hábitos e modo de vida) e dos fatores genéticos no desenvolvimento e na ocorrência da hipertensão.

### 1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial

Diversos sistemas fisiológicos estão relacionados à homeostase da pressão arterial: o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o sistema dopaminérgico, o equilíbrio de sódio e eletrólitos, o sistema endotelial e a transdução de sinais intracelulares.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um dos mais importantes mecanismos fisiológicos de controle da pressão arterial (Figura 3.1). A renina é sintetizada pelas células justaglomerulares dos rins. Quando há queda da pressão arterial, a renina é liberada no sangue. A renina tem função enzimática e cataliza a hidrólise do angiotensinogênio, que é produzido no fígado e liberado na circulação. Quando o angiotensinogênio é clivado, ocorre liberação de angiotensina I; outra enzima, a enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nos pulmões e tecidos vasculares, converte a angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor. A angiotensina II age por meio de dois receptores: AT1 e AT2, expressos em diversos tecidos, inclusive em tecidos cardiovasculares. Tanto o AT1 como o AT2 pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G. A angiotensina II, mediada pelo receptor AT1, age no controle da pressão arterial provocando vasoconstricção, liberação de aldosterona pela glândula adrenal e estimulando a retenção de sal nos túbulos renais (revisões em Connell & Davies, 2005; Bader & Ganten, 2008; Siragy & Carey, 2010). A aldosterona, sintetizada na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal, é o principal hormônio mineralocorticóide. A ação da aldosterona regula o volume de fluido corporal e mantém a homeostase de íons, pois atua nos rins, via receptores de mineralocorticóides, induzindo a reabsorção de íons sódio e de água e aumentando a excreção de íons potássio. A aldosterona também modula o tônus vascular, possivelmente aumentando a resposta vasopressora à catecolamina e diminuindo a resposta vasodilatadora à acetilcolina, ou pela estimulação dos receptores de angiotensina II (revisões em Connell & Davies, 2005; Funder, 2010; Carey, 2010). A aldosterona aumenta a reabsorção de íons sódio atuando sobre a regulação dos canais de sódio epiteliais ou canais amilorida-sensíveis (ENaC), que estão presentes no duto coletor do rim (revisão em Snyder, 2005). O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona, basicamente, é regular o fluido extracelular e o equlíbrio de íons, regulando, consequentemente, a pressão arterial.

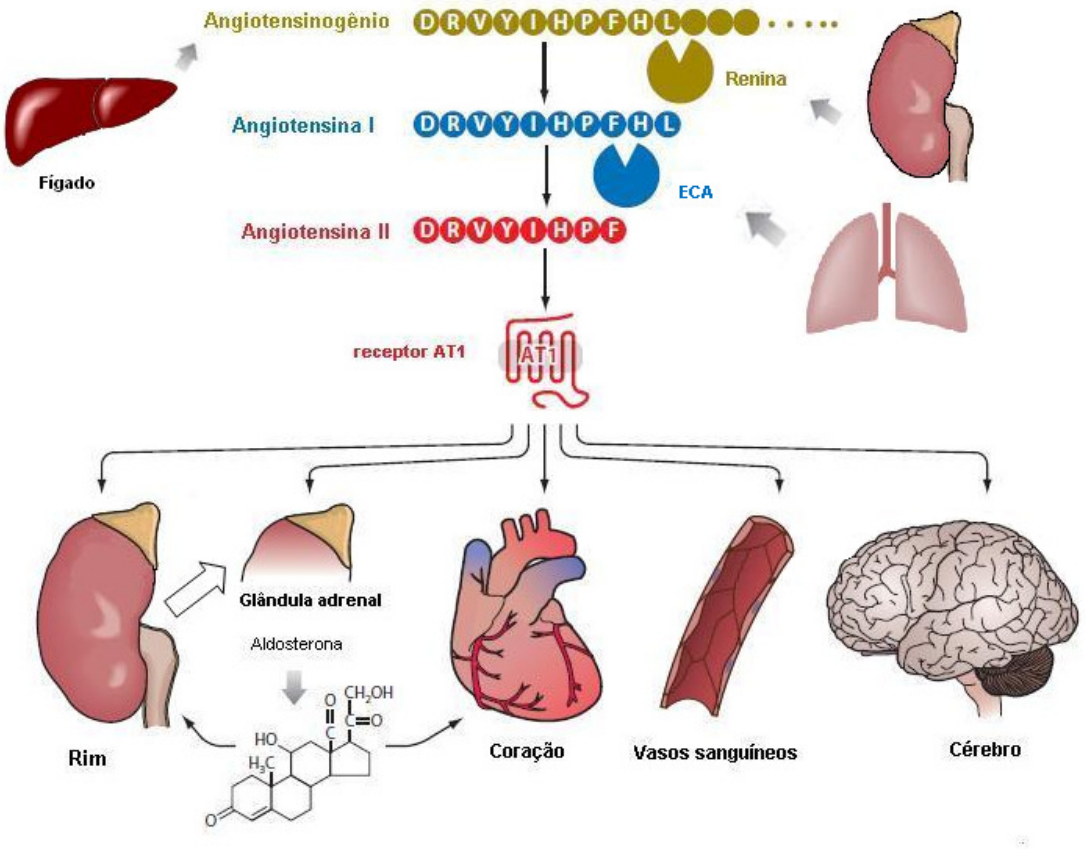



Figura 3.1: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. A renina sintetizada nos rins metaboliza seu substrato angiotensinogênio (produzido no fígado) no plasma, liberando a angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida na superfície do tecido pulmonar e nas células endoteliais renais, cataliza a conversão de angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II interage com receptores, principalmente os AT1, em diversos órgãos-alvo, levando a efeitos como a retenção de sódio, vasoconstricção e secreção de aldosterona (Adaptado de Bader, 2010).

Outro mecanismo importante na regulação da pressão arterial é o sistema dopaminérgico. A dopamina, sintetizada nos túbulos renais proximais, reduz a reabsorção de sódio pelos túbulos renais proximais inibindo o transporte de íons sódio. O sistema dopaminérgico exerce sua função por meio da ativação de receptores de superfície celular acoplados a proteínas G. A estimulação destes receptores é capaz de regular a excreção de água e eletrólitos atuando indiretamente sobre a hemodinâmica renal e a liberação de hormônios e peptídeos vasoativos. As proteínas G acopladas a receptores do tipo quinase (GRKs) desempenham papel importante na fosforilação, dessensibilização e internalização dos receptores de dopamina (revisões em Zeng e col., 2004; Staessen e col., 2008; Jose e col., 2010).

Um dos produtos mais importantes das células endoteliais é o óxido nítrico. O óxido nítrico endotelial (ON) é produzido constitutivamente nas células endoteliais a partir da conversão do aminoácido L-arginina por uma enzima do tipo sintase (eNOS). O ON participa de três mecanismos regulatórios que são fundamentais para a regulação do fluxo sanguíneo e, consequentemente, da pressão arterial: 1 – controle do tônus vascular, 2 –

adaptação do fluxo sanguíneo conforme a demanda de determinado tecido e 3 – adaptação do calibre dos vasos conforme o volume do influxo sanguíneo (Pereira e col., 2006).

As proteínas G desempenham um papel fundamental nos processos de sinalização intracelular. O aumento da atividade de canais de íons sódio e hidrogênio poderia representar potencialmente o aumento da reabsorção de íons sódio pelos túbulos renais, o que levaria ao incremento do volume sanguíneo devido à captação de água por osmose, acarretando na elevação da pressão arterial. A atividade dos canais de íons sódio e hidrogênio (entre outros) é controlada por sinais intracelulares. O grupo de pesquisa de Siffert (2005) caracterizou as vias de estímulo e resposta em culturas de linfócitos de pacientes hipertensos, verificando um aumento da sinalização por íons cálcio e a formação de mensageiros intracelulares secundários. Esta alteração poderia representar uma resposta a um incremento da ativação de proteínas G nas células em cultura oriundas dos pacientes hipertensos.

### 1.3. Genética da hipertensão

A compreensão da genética da pressão arterial nunca foi simples. Com o advento de novas tecnologias que facilitaram a detecção de variantes genéticas, a pressão arterial passou a ser alvo de estudos genéticos por volta da década de 1980, com os estudos de genes candidatos classicamente relacionados à regulação da pressão arterial (Harrap, 2009). Quaisquer pequenas variações na pressão sanguínea podem representar um impacto substancialmente considerável no aumento do risco de doenças cardiovasculares. A pressão arterial é uma característica hereditária e estimativas de herdabilidade sugerem que 15-60% da variação da pressão sistólica e diastólica podem ser atribuídas a fatores genéticos (Norton e col., 2010). Porém, a "arquitetura genética" precisa da regulação da pressão arterial – definida pelo número de variantes genéticas, suas frequências e seus efeitos nos fenótipos – que permeia essa elevada herdabilidade permanece desconhecida (Arora & Newton-Cheh, 2010).

### 1.3.1. Hipertensão hereditária monogênica

As formas de herança mendeliana de hipertensão são raras, correspondendo a menos de 1% de todos os casos de hipertensão (Rafiq e col., 2010).

Estudos diversos revelaram que os sistemas de reabsorção de íons pelos rins e de controle do volume sanguíneo são os principais responsáveis pela origem da hipertensão monogênica. As mutações genéticas afetam principalmente a síntese de mineralocorticóides, as funções dos receptores de mineralocorticóides, canais de sódio epiteliais e regulação destes canais (Rosskopf e col., 2007; revisão em Citterio e col., 2010).

A Tabela II.1 apresenta uma relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento, cujo principal sinal clínico é a hipertensão.

Tabela II.1: Relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento em que a hipertensão é o principal sinal clínico (*genes candidatos sugeridos no trabalho de Lafferty e col., 2000; adaptado de Rosskopf e col., 2007, Tobin e col., 2008 e Vehaskari 2009).

| Síndrome | Padrão de herança | Localização Cromossômica | Genes candidatos |
|---|---|---|---|
| Síndrome de Liddle | AD | 16p13 | *SCNN1B* / *SCNN1G* |
| Síndrome de Gordon | AD | 12p13 e 17q21 | *WNK1* e *WNK4* |
| Excesso aparente de mineralocorticóide (AME) | AR | 16q22 | *HSD11B2* |
| Pseudohipoaldosteronismo tipo I autossômico dominante (PHA I) e doença hipertensiva da | AD | 4q31.1 | *NR3C2* |
| Pseudohipoaldosteronismo tipo I autossômico recessivo (PHA I) | AR | 12p13 e 16p13 | *SCNN1A e SCNN1B* / *SCNN1G* |
| Aldosteronismo tratável com glicocorticóide (GRA) | AD | 8q21 | *CYP11B1* / *CYP11B2* |
| Hiperaldosteronismo familiar II (FH II) | AD | 7p22 | *GPR30/ PMS2/ PRKAR1B/ADAP1** |
| Hiperplasia congênita da suprarenal com deficiência de 11 ou 17-hidroxilase (CAH) | AR | 8q21 | *CYP11B1* |
| Resistência familiar a glicocorticóide (FGR) | AR/AD | 5q31.3 | *NR3C1* |
| Hipertensão com braquidactilia de herança autossômica dominante | AD | 12p12.2-p11.2 | *PDEA3* / *KCNJ8* / *ABCC9* |

AD = autossômico dominante. AR = autossômico recessivo.

### 1.3.2. Hipertensão essencial

A hipertensão essencial é um distúrbio de mecanismo multifatorial, pois resulta da interação entre diversos fatores genéticos (ou seja, tem herança poligênica) e ambientais. São conhecidos diversos fatores ambientais que contribuem para elevar a pressão arterial (consumo excessivo de sal, consumo de álcool, tabagismo, excesso de peso, estresse, sedentarismo), e os fatores genéticos responsáveis pela predisposição à hipertensão têm sido exaustivamente investigados.

Enquanto as formas monogênicas de hipertensão são raras, a hipertensão essencial como doença multifatorial afeta mais de 20% da população adulta em países industrializados (Rosskopf e col., 2007; Rafiq e col., 2010).

No caso da hipertensão essencial, muitos genes candidatos têm sido analisados, incluindo os que codificam componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aducinas, β-adrenoceptores, subunidades de proteínas G, proteínas regulatórias de sinalização das proteínas G, quinases Rho e receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G (Rosskopf e col., 2007).

Mesmo após 20 anos de pesquisa sobre genes candidatos, não se tem ainda um consenso sobre o papel exato de cada um na gênese da hipertensão essencial.

## 1.4. Estratégias de estudo genético da hipertensão

O mapeamento de genes de doenças multifatoriais ou complexas tem sido impulsionado pelo avanço tecnológico na identificação e genotipagem de marcadores polimórficos de DNA de diversos tipos. Atualmente, os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), o tipo mais frequente de polimorfismo genético, dado que existem mais de 3 milhões de SNPs espalhados pelo genoma humano (International HapMap Consortium, 2007), são os marcadores mais utilizados.

O estudo genético de doenças complexas (multifatoriais) pode ser feito basicamente por meio de duas estratégias, os estudos de associação e de ligação.

### 1.4.1. Estudos de ligação

Os estudos de ligação baseiam-se no conceito de ligação genética, que se descreve com a tendência de alelos em dois locos distintos, mas localizados muito próximos numa mesma região cromossômica, não sofrerem recombinação entre si e, portanto, serem transmitidos em conjunto na meiose. Esses locos podem ser tanto os genes responsáveis por determinadas características fenotípicas quanto marcadores genéticos polimórficos sem efeito no fenótipo. Em geral, são utilizados para se estudar a transmissão de um segmento cromossômico de uma geração para a outra em uma genealogia e compará-la com o padrão

de transmissão de uma doença. Desse modo, pode-se definir uma região cromossômica candidata a conter o gene responsável pela doença. Um marcador genético ideal deve se apresentar em alta frequência de heterozigose na população. Os microssatélites são um dos tipos de marcadores mais utilizados nos estudos de ligação devido à sua natureza multialélica e, em geral, apresentarem-se na população em alta taxa de heterozigose. Essa abordagem é feita sem pré-conhecimento sobre a função dos genes e facilita a identificação, nas regiões cromossômicas ligadas à condição estudada, de genes de predisposição, tanto os já descritos como aqueles ainda não conhecidos.

A análise estatística utilizada para definir se os resultados de um estudo de ligação são significativos, excluindo ou comprovando ligação entre o marcador e a entidade clínica em estudo é o cálculo do *lod score* ou logaritmo das chances.

Os estudos de ligação em doenças complexas utilizam métodos diferenciados daqueles utilizados para fenótipos mendelianos. A análise pelo *lod score* dito paramétrico, utilizado em estudos de doenças mendelianas, não pode ser utilizado por requerer premissas que na maioria das vezes não são possíveis de se estabelecer em estudos de doenças complexas: modo de herança e informações de penetrância. Uma abordagem possível para se realizar um estudo de ligação em doenças complexas é utilizar famílias nas quais a segregação da doença se dá de maneira quase mendeliana. A análise de segregação, uma ferramenta estatística que avalia a herdabilidade de uma determinada característica, define os parâmetros para um modelo genético nessas famílias, que desta forma poderão ser utilizados nas análises do *lod score* paramétrico (Stracham & Read, 2010).

Métodos não paramétricos de análises não requerem um modelo genético estabelecido, portanto, são apropriados para os estudos de ligação com doenças complexas. Porém, os estudos de ligação para doenças complexas não têm sido muito bem sucedidos em se mapear locos de susceptibilidade. O baixo sucesso em se mapear regiões cromossômicas que conferem susceptibilidade a doenças complexas sugerem que a maioria dos fatores genéticos tem efeito modesto no fenótipo e são extremamente heterogêneos, havendo necessidade de grande poder estatístico para serem detectados. Uma forma de se obter o poder estatístico almejado é trabalhar com um número amostral muito grande. No entanto, Risch & Merikangas (1996) demonstraram que o poder estatístico para se detectar efeitos modestos de variantes comuns pode ser alcançado mais facilmente através de estudos de associação ao invés de estudos de ligação.

Os estudos de ligação com formas mendelianas de hipertensão e hipotensão têm identificado com sucesso variantes raras que têm grande efeito nos fenótipos em questão. Apesar dessas variantes raras apresentarem um papel crucial na variação da pressão arterial

dentro das famílias estudadas, o papel que as mesmas exercem na variação da pressão arterial na população geral permanece desconhecido (Arora & Newton-Cheh, 2010).

Recentemente, a estratégia que vem sendo muito utilizada na busca por genes de regulação da pressão arterial e da susceptibilidade à hipertensão essencial são os estudos de ligação genômica em larga escala – os *genomewide linkage studies*. Alguns estudos encontraram ligação ou sugestão de ligação entre a hipertensão essencial (ou a pressão arterial) e locos de susceptibilidade em cromossomos diversos. Mas nenhum resultado de ligação significativa das QTLs (*Quantitative Trait Loci*) identificadas foi replicado em mais de uma população (revisão em Binder, 2007).

### 1.4.2. Estudos de associação

Associação é um termo estatístico que descreve a co-ocorrência entre alelos e fenótipos. Em contraste com os estudos de ligação, que são apropriados para se detectar grandes efeitos de variantes raras, os estudos de associação são adequados para se detectarem efeitos genéticos moderados ou pequenos das variantes frequentes (Arora & Newton-Cheh, 2010; Ehret, 2010).

Nos estudos de associação são comparadas as frequências alélicas de um marcador polimórfico, ou conjunto de marcadores, entre indivíduos não aparentados com o fenótipo (afetados) e sem o fenótipo (não afetados). Os marcadores mais utilizados são os SNPs, por serem muito numerosos. O polimorfismo em estudo pode ter ação biológica direta no fenótipo da doença ou então o marcador polimórfico pode estar em desequilíbrio de ligação com os genes candidatos que determinam susceptibilidade a essa doença.

A história dos estudos de associação iniciou-se com a investigação de polimorfismos em genes candidatos, analisados individualmente e de maneira independente.

Os avanços tecnológicos na área da genética e da genômica permitiram análises simultâneas de centenas de milhares de marcadores por um custo razoavelmente baixo, promovendo a expansão dos estudos de associação genômica em larga escala (*Genomewide Associations Studies* - GWAS). Nesse tipo de estudo buscam-se novos locos contendo genes de susceptibilidade a diversas doenças complexas, por meio de varreduras do genoma, utilizando-se plataformas que analisam milhares de SNPs simultaneamente (Johnson & O'Donnell, 2009). Estudos de associação genômica em larga escala, conduzidos em populações européias, não revelaram nenhuma variante genética significativamente associada à hipertensão. No entanto, em um estudo conduzido em uma população de afro-americanos, foram evidenciadas associações entre diversos genes e a pressão arterial

sistólica; dentre esses genes, dois potencialmente desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial (Adeyemo e col., 2009).

Dado que muitas vezes os efeitos dos polimorfismos genéticos são muito pequenos sobre o fenótipo e sua detecção nem sempre é fácil do ponto de vista estatístico, uma abordagem complementar para testar a associação entre marcadores genéticos e um fenótipo é a avaliação das interações gene-gene ou epistasia, uma vez que é cada vez mais evidente que este mecanismo desempenha papel fundamental na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças complexas (Moore, 2003). Uma metodologia que pode ser empregada para avaliar possíveis efeitos da interação gene-gene no risco de desenvolver o fenótipo estudado é a Redução de Dimensionalidade de Múltiplos Fatores (MDR, do inglês *multifactor dimensionality reduction)* [Namkung e col., 2009].

Haplótipos compostos por SNPs adjacentes podem contribuir com maior informação do que SNPs avaliados individualmente, possibilitando maior poder de exploração da associação entre genes candidatos e doenças complexas. Informações contidas nas regiões flanqueadoras do marcador são ignoradas quando analisamos um marcador individualmente. Akey e col. (2001) demonstraram através de uma fórmula analítica explícita que a análise de haplótipos aumenta o poder de detecção de associação, aumentando a robustez dos testes. Zolner e Von Haeseler (2000) utilizaram uma abordagem para estudar desequilíbrio de ligação entre SNPs e sugeriram que haplótipos construídos com dois SNPs são muito eficientes em se detectar associação.

Um problema frequentemente encontrado em estudos de associação, e talvez a maior razão para a inconsistência de seus resultados, é a estratificação populacional. Verifica-se estratificação populacional quando os casos e controles apresentam frequências de alelos e genótipos distintas atribuídas à diversidade do *background* das amostras, independente do *status* da condição que está sendo analisada (Cardon & Palmer, 2003). Uma solução para se tentar contornar a estratificação é a utilização de casos e controles provenientes de uma amostra com o mesmo *background* genético. Pritchard & Rosenberg (1999) preconizam a utilização de marcadores genéticos não ligados espalhados pelo genoma para averiguar a diversidade do *background* genético nos estudos de associação, principalmente devido à ancestralidade. Dessa maneira, as diferenças de *background* genéticos das amostras podem ser testadas e quantificadas e, na ausência de diferença significativa, o estudo pode ser validado.

Já os estudos de associação que empregam metodologias baseadas na transmissão dos polimorfismos nas famílias têm a vantagem de que, se a transmissão é avaliada dentro de uma mesma família, os indivíduos em geral têm a mesma ancestralidade e efeitos de estratificação seriam evitados. Os métodos com abordagens baseadas em famílias procuram

avaliar se determinados alelos são transmitidos aos afetados em frequências diferentes às esperadas pela segregação mendeliana, o que poderia sugerir associação real entre alelos ou genótipos com a susceptibilidade ao distúrbio.

O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT - *Transmission Disequilibrium Test*), proposto por Spielman e col. em 1993, avalia com que frequência um alelo associado a uma determinada doença é transmitido de pais heterozigotos em relação a esse alelo para o filho afetado. Comparado aos estudos convencionais de ligação, o TDT não requer famílias em que existam muitos afetados, nem necessita de informações dos irmãos normais do afetado. No entanto, o TDT só considera informações de trios (pai-mãe-filho) e só pode detectar ligação entre o marcador estudado e o loco que contem genes de susceptibilidade à doença se a associação estiver presente. Martin e col. (1997) e Lazzeroni & Lange (1998) estenderam o TDT, permitindo o estudo de famílias que apresentavam mais de um afetado, ao contrário do TDT proposto inicialmente por Spielman e col. (1993).

Laird e col. (2000) e Rabinowitz & Laird (2000) propuseram uma abordagem unificada de teste de associação baseado em famílias (FBAT - *Family-Based Association Test*), baseada no TDT proposto por Spielman e col. (1993). O FBAT contempla diferentes modelos genéticos, diferentes amostragens, diferentes fenótipos da doença, além de permitir a ausência de informações parentais. Semelhantemente ao TDT, o FBAT compara as frequências genotípicas observadas e esperadas (pela segregação mendeliana) nos afetados, sob as hipóteses nulas de "não ligação e não associação" ou "não associação na presença de ligação". Laird & Lange (2006) estenderam o FBAT, permitindo a incorporação de dados longitudinais e o estudo de fenótipos binários ou quantitativos.

A literatura sobre estudos de associação de genes candidatos e fenótipos complexos, como é o caso da hipertensão, é extremamente vasta. Associações significativas são encontradas entre polimorfismos variados em diversas populações, mas seus resultados são controvertidos. A falta de reprodutibilidade dos resultados de associação pode ser gerada por diversos fatores de "confusão" que podem permear os diferentes estudos, como a presença de estratificação populacional, a interação entre efeitos ambientais com os fatores genéticos, o efeito diferenciado de um determinado polimorfismo nas diversas populações, efeito modesto das variantes gênicas no fenótipo, presença de interações gênicas (epistasia), entre outros. Mesmo quando se busca alcançar um poder estatístico adequado para se detectar associações entre genes e hipertensão, os fatores de confusão dificultam a interpretação dos estudos de associação (Citterio e col., 2010).

### 1.5. Genes candidatos selecionados para esse estudo

Foram selecionados para esse estudo alguns polimorfismos presentes em genes candidatos que participam de vias regulatórias da pressão arterial.

Devido ao papel principal do sistema renina-angiotensina-aldosterona na regulação em longo prazo da pressão arterial, é óbvio considerar em primeiro lugar os genes que codificam os componentes desse sistema como candidatos a explicar a gênese da hipertensão, e os mais estudados são o ***ACE*** e o ***AGT***. Genes cujos produtos estão envolvidos direta ou indiretamente na homeostase do volume sanguíneo e/ou com o equilíbrio de $Na^+$ são candidatos promissores para os estudos de associação, como os genes que codificam as subunidades da aducina (***ADD2***, por exemplo). As proteínas G mediam efeitos intracelulares que estimulam a atividade dos vasos sanguíneos, portanto, estudos do gene ***GNB3***, que codifica uma das subunidades da proteína G, justificam-se. O sistema endotelial, que consiste de uma série de peptídeos e receptores, é potencialmente importante para o controle da pressão arterial; diversos estudos com polimorfismos no gene ***NOS3*** têm sido descritos. O sistema dopaminérgico renal está relacionado com o equilíbrio de íons, pois é importante por promover a excreção de sódio. Os receptores dopaminérgicos, especialmente os $D_1$, tem sua função relacionada à atividade dos receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G do tipo 4, codificados pelo gene ***GRK4***. Nas seções seguintes apresentamos uma breve revisão bibliográfica descrevendo alguns estudos de associação entre os genes candidatos selecionados e fenótipos da hipertensão essencial.

### 1.5.1. O gene *ACE*

A enzima conversora de angiotensina em angiotensina II (ACE) é um componente-chave no sistema renina-angiotensina e tem sido considerada como um fator relacionado à gênese da hipertensão e de doenças cardiovasculares. O gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (*ACE*) está localizado no cromossomo 17 (em 17q23). O polimorfismo *ACE* I/D (rs1799752) foi identificado em 1990 por Rigat e col., e foi o mais estudado. Este polimorfismo é caracterizado pela presença (I) ou ausência (D) de um elemento *Alu* de 287pb no intron 16 do gene *ACE*.

Foram encontradas diferenças significativas nos níveis de enzima conversora de angiotensina (ECA) sérica de indivíduos saudáveis, relacionados aos três possíveis genótipos (I/I, I/D, D/D). Como as variantes desse polimorfismo se refletem nos diferentes níveis de ECA sérica, sugeriu-se que o gene *ACE* desempenha um papel significativo na patogênese da hipertensão essencial. A Tabela III.1 resume alguns estudos com achados positivos de associação entre polimorfismos do gene *ACE* e a ocorrência de hipertensão ou ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. No entanto, os estudos sobre a associação do polimorfismo I/D do gene *ACE* têm apresentado resultados conflitantes, e nem sempre foi confirmada essa associação (Zhu e col., 2001; Pereira e col., 2003; Mondry e col., 2005).

A meta-análise realizada por Staessen e col. (1997), incluindo estudos de populações caucasianas, negras e asiáticas de diversos países, revelou uma associação significativa do polimorfismo I/D no gene *ACE* apenas com os asiáticos. Possíveis explicações para esses resultados controvertidos seriam: tamanho amostral inadequado de muitos estudos, o que resulta em um poder estatístico reduzido; diferenças nos critérios de seleção dos casos e controles de cada trabalho; diferenças ambientais; estratificação populacional; diferenças das faixas etárias estudadas por cada grupo; e possivelmente um viés de publicações apenas de achados positivos (Pereira e col., 2003). Em uma meta-análise mais recente de estudos de associação realizada com a população chinesa Han, o genótipo DD está significativamente associado ao risco da hipertensão essencial (Ji e col., 2010).

Tabela III.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ACE*.

| País (população) | N | Desenho do estudo | Polimorfismo | Particularidades da associação encontrada | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| Diversos países (diversos grupos populacionais). | 49.959 | Meta-análise | I/D | Associação somente em populações asiáticas | Staessen e col., 1997 |
| EUA (participantes do *Framingham Heart Study*, maioria caucasianos) | 3.095 | Estudo de coorte | I/D | Associação com a hipertensão e aumento da pressão diastólica em homens | O'Donnell e col., 1998 |
| EUA (membros de 583 famílias do *Rochester Family Heart Study)* | 3.653 | Estudo de coorte | $(AAAG)_n(AG)_m$ | Associação com a variação da pressão diastólica e média da pressão arterial, principalmente em homens | Fornage e col., 1998 |
| Nigéria (332 famílias do *International Collaborative Study on Hypertension in Blacks*) | 1.343 | Estudo de coorte | A-262T A11860G | Explicam a variação da concentração da enzima e associação com o aumento da pressão arterial | Zhu e col., 2001 |
| Bangladesh (população urbana) | 103 | Caso-controle | I/D | Associação com a hipertensão em homens | Morshed e col., 2002 |
| Brasil (afro-brasileiros da zona rural do Mato Grosso do Sul) | 184 | Caso-controle | I/D | Associação com a hipertensão em homens | Sakuma e col., 2004 |
| Paquistão | 108 | Caso-controle | I/D | Associação com a hipertensão em homens e mulheres jovens | Ismail e col., 2004 |
| Itália (caucasianos) | 684 | Estudo de coorte | I/D | Associação com a hipertensão em indivíduos mais velhos | Di Pasquale e col., 2004 |
| Coréia | 13.914 | Estudo de coorte | I/D | Associação com a hipertensão em homens | Yoo, 2005 |
| Coréia (adolescentes) | 60 | Caso-controle | I/D | Alelo D associado com o aumento dos níveis de ACE sérico | Park e col., 2009 |
| Índia | 910 | Caso-controle | I/D | Interação gênica entre alelo D e alelos de risco dos genes *NOS3* e *AGT* | Kumar e col., 2009 |
| China (população Han) | 19.764 | Meta-análise | I/D | Genótipo DD associado com a hipertensão essencial | Ji e col., 2010 |

### 1.5.2. O gene *AGT*

Em estudos clínicos e experimentais, a administração de inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem se mostrado efetiva em baixar os níveis de pressão arterial. Assim, genes codificadores de componentes do SRAA são potenciais candidatos a desempenhar um papel na regulação da pressão arterial. Aumento dos níveis de angiotensinogênio plasmático pode levar a um incremento da formação de angiotensina II, resultando em hipertensão (Kumar e col., 2005).

Jeunemaitre e col. (1992) foram os primeiros a relatar evidências de ligação e associação de variantes no gene *AGT* (localizado no cromossomo 1, em 1q42-q43 e que codifica o angiotensinogênio) com a hipertensão, especialmente um polimorfismo denominado M235T (rs669). Desde então a associação deste polimorfismo com a hipertensão essencial tem sido replicada com sucesso em muitos estudos, em diversas populações independentes. Pereira e col. (2003) encontraram associação dose-dependente entre o alelo T do polimorfismo M235T e a variação da pressão arterial em uma população urbana miscigenada de Vitória – ES.

Outro polimorfismo, localizado na região promotora do gene *AGT* (A/G), foi associado com o fenótipo da hipertensão: o alelo –217A do polimorfismo A/G estaria relacionado com o aumento da atividade transcricional do *AGT* humano (Jain e col., 2002).

Associação entre a hipertensão e haplótipos do gene do angiotensinogênio também já foi relatada (Tsai e col., 2003). Apesar dos resultados negativos (Brand e col., 1998; Niu e col., 1999; Rodriguez-Perez e col., 2000; Matsubara e col., 2003), estudos de meta-análise demonstraram que resultados positivos de associação têm sido replicados em diferentes populações (Staessen e col., 1999; Ji e col., 2010).

A Tabela IV.1 mostra o resumo de diversos estudos de associação, com resultado significativo, com o gene *AGT*.

Tabela IV.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *AGT*.

| País (população) | N | Desenho do estudo | Polimorfismo | Particularidades da associação encontrada | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| França (caucasianos)<br>Japão | 841<br>214 | Caso-controle | M235T | Associação com a hipertensão em franceses e japoneses | Jeunemaitre e col., 1997 |
| Diversos países (diversos grupos populacionais) | 27.906 | Meta-análise | M235T | Genótipo TT associado com aumento do risco de hipertensão em caucasianos | Staessen e col., 1999 |
| Japão | 1.232 | Meta-análise | M235T | Alelo T associado a um incremento de 60% no risco de hipertensão | Kato e col., 1999 |
| EUA<br>(afro-americanos)<br>(caucasianos) | <br>342<br>262 | Caso-controle | A-217G | Associação com o aumento da atividade transcricional do gene *AGT* | Jain e col., 2002 |
| Romênia | 59 | Caso-controle | M235T | Alelo T aumenta a predisposição a desenvolver hipertensão | Procopciuc e col., 2002 |
| EUA | 1.041 | Caso-controle | M235T | Associação com um menor risco de infarto com o uso de inibidores de ECA para aqueles com o genótipo ThrThr | Bis e col., 2003 |
| Brasil (população miscigenada do Espírito Santo) | 1.421 | Caso-controle | M235T | Associação com o risco de hipertensão em homens e mulheres quando em homozigose | Pereira e col., 2003 |
| EUA<br>(afro-americanos)<br>(caucasianos) | <br>342<br>263 | Caso-controle | A-217G | Associação em afro-americanos | Kumar e col., 2005 |
| Alemanha | 1.358 | Meta-análise | M235T | Associação com um risco menor de hipertensão em mulheres | Mondry e col., 2005 |
| Nigéria (da zona rural) e EUA (afro-americanos da zona metropolitana de Chicago) | 595<br>901 | Estudo baseado em famílias | C-532T<br>M235T<br>A-6G | Altos níveis de AGT plasmático em nigerianos e baixos níveis de AGT plasmático em afro-americanos | Fejerman e col., 2006 |
| China (população Han) | 19.764 | Meta-análise | M235T | Genótipo TT associado com a hipertensão essencial | Ji e col., 2010 |

### 1.5.3. O gene *GNB3*

Outro gene relacionado à hipertensão é o *GNB3*, localizado no cromossomo 12 (em 12p13) e que codifica a subunidade β3 das proteínas G heterotriméricas. Siffert e col. (1998) descreveram o polimorfismo C825T (rs5443) no exon 10 do gene; o alelo 825T estaria associado ao *splicing* alternativo deste gene, originando uma proteína Gβ3 funcional com 41 aminoácidos a menos do que a proteína normal; essa proteína mutada pode estar relacionada com um aumento da atividade das proteínas G. Siffert e col. (1999a,b) sugeriram que possivelmente a presença do alelo 825T tornaria o indivíduo mais susceptível à obesidade e, consequentemente, este indivíduo possuiria maior propensão em desenvolver a hipertensão. Dong e col. (1999) sugeriram 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 aumento da reabsorção de íons sódio pelos túbulos renais, o que levaria ao incremento do 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 Gβ3 (Sartori e col., 2003). Nesse estudo, verificou-se que ocorreu vasoconstricção em indivíduos saudáveis portadores do alelo 825T quando estes recebiam substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II.

O calibre dos vasos sanguíneos da retina é uma característica determinada geneticamente e parece estar relacionada à susceptibilidade de um indivíduo desenvolver a hipertensão. Sun e col. (2009) estudaram 1.842 indivíduos brancos e afro-descendentes americanos em relação a SNPs em três genes candidatos a estarem associados à hipertensão, entre eles o *GNB3*, para verificar se havia associação entre esses genes e o calibre dos vasos sanguíneos da retina. Não observaram nenhuma associação significativa entre os polimorfismos e o fenótipo estudado. Outros estudos também não verificaram associação de polimorfismos no gene *GNB3* e a hipertensão (Brand e col., 1999; Huang e col., 2003; Wang e col., 2004a).

A Tabela V.1 resume alguns estudos de associação entre o gene *GNB3* e a ocorrência da hipertensão e fenótipos relacionados.

Tabela V.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GNB3*.

| País (população) | N | Desenho do estudo | Polimorfismo | Particularidades da associação encontrada | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| Alemanha | 853 | Caso-controle | C825T | Associação do alelo T | Siffert e col., 1998 |
| Alemanha (participantes do WHO-MONICA) | 608 | Caso-controle | C825T | Associação do alelo T e variação da PAD e dos níveis de renina plasmática | Schunkert e col., 1998 |
| Inglaterra (afro-descendentes) | 495 | Caso-controle | C825T | Associação com a hipertensão em homens e mulheres | Dong e col., 1999 |
| Espanha | 86 | Caso-controle | C825T | Associação do alelo T e a hipertrofia do ventrículo esquerdo | Poch e col., 2000 |
| Alemanha | 2.052 | Caso-controle | C825T | Alelo T associado com a hipertensão em homens | Hengstenberg e col., 2001 |
| Itália (caucasianos) | 461 | Estudo de coorte | C825T | Alelo T associado com o aumento precoce da pressão arterial | Sartori e col., 2003 |
| Japão | 806 | Caso-controle | C825T | Associação com a pressão de pulso e PAS | Yamamoto e col., 2004 |
| China | 1.004 | Caso-controle | G-350A C825T C1429T | Alelo A do polimorfismo G-350A e haplótipo A-C-C associados à hipertensão | Li e col., 2005 |
| Espanha (caucasianos) | 144 | Caso-controle | C825T | Associação do polimorfismo e a concentração plasmática de sódio e potássio | Martín e col., 2005 |
| Polônia (homens) | 44 | Caso-controle | C825T | Alelo T e aumento da atividade do trocador sódio/hidrogênio aumentam o risco de hipertensão | Kedzierska e col., 2006 |
| Coréia | 1.612 | Caso-controle | C825T | Interação entre alelo D do gene *ACE* e alelo 825T do *GNB3* | Bae e col., 2007 |
| EUA (afro-descendentes e brancos) | 14.716 | Caso-controle | C825T | Interação entre polimorfismo, obesidade e atividade física como preditivos de hipertensão | Grove e col., 2007 |
| Diversos países (populações asiáticas e caucasianas) | 31.854 | Meta-análise | C825T | Baixa frequência do alelo T em populações caucasianas que habitam em baixas latitudes | Bagos e col., 2007 |

### 1.5.4. O gene *NOS3*

Um gene muito investigado na hipertensão essencial é o *NOS3*, localizado no cromossomo 7 (em 7q36). Este gene se expressa constitutivamente nas células endoteliais vasculares e codifica uma enzima, a NO sintase endotelial (eNOS), que sintetiza o óxido nítrico. Miyamoto e col. (1998) identificaram um polimorfismo no exon 7, que consiste de uma substituição de um nucleotídeo G por um T na posição 824 no cDNA do gene, e que resulta em uma troca de um aminoácido glutamato por um aspartato na posição 298 da proteína (Glu298Asp - rs1799983). Alguns estudos sugeriram que o polimorfismo Glu298Asp está associado a doenças coronarianas e com a hipertensão essencial (Miyamoto e col., 1998; Shoji e col., 2000; Kajiyama e col., 2000). Li e col. (2004) constataram que um alelo raro no intron 4 deste gene, o qual é frequentemente encontrado em afro-descendentes, associado ao alelo G do polimorfismo encontrado no exon 7, poderia constituir um marcador das variações de pressão arterial em afro-americanos. Outros estudos, no entanto, não encontraram associação significativa do polimorfismo Glu298Asp com a ocorrência de hipertensão (Kato e col., 1999; Kishimoto e col., 2004, Zhao e col., 2006; Khawaja e col., 2007).

Zintzara e col., (2006) realizando uma meta-análise com diversos trabalhos publicados em relação ao gene *NOS3*, encontraram associação significativa entre um polimorfismo no intron 4 (a/b) em caucasianos, mas não em populações asiáticas e negras. Pereira e col. (2007), também em meta-análise, encontraram associação positiva entre o polimorfismo Glu298Asp e a hipertensão apenas em asiáticos, mas resultados negativos foram encontrados em relação ao polimorfismo no intron 4 (a/b), sugerindo-se que os resultados controvertidos entre os diversos estudos de associação entre polimorfismos no gene *NOS3* se devem ao fato de não serem considerados efeitos ambientais. Ambos os estudos sugerem que analisar haplótipos no gene *NOS3* podem trazer resultados mais elucidativos a respeito da genética da hipertensão do que avaliar cada polimorfismo individualmente.

A Tabela VI.1 resume alguns estudos de associação significativa entre o gene *NOS3* e a hipertensão em diversas populações.

Tabela VI.1: Estudos de associação com polimorfismos no gene *NOS3*.

| País (população) | N | Desenho do estudo | Polimorfismo | Particularidades da associação encontrada | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| Japão | 458 | Caso-controle | Glu298Asp<br>G10T<br>intron4b/a<br>A27C | Alelo Asp associado ao risco aumentado de hipertensão | Miyamoto e col., 1998 |
| EUA (euro-descendentes) | 439 | Estudo transversal | Glu298Asp<br>G23T | Alelo Glu associado ao risco aumentado de hipertensão | Lacolley e col., 1998 |
| Japão | 376 | Caso-controle | Glu298Asp | associação com a hipertensão em homens e mulheres | Shoji e col., 2000 |
| República Checa (caucasianos) | 204 | Caso-controle | Glu298Asp | Maior frequência do alelo T (Asp) no grupo de hipertensos resistentes à terapia anti-hipertensiva | Jáchymová e col., 2001 |
| EUA | 1148 | Estudo de coorte | A-922G<br>T-786C<br>Glu298Asp<br>G10T | Alelo Asp e 10T e haplótipo Glu/10T associados à pressão arterial em mulheres negras e brancas | Chen e col., 2004 |
| Brasil<br>(brancos)<br>(negros) | <br>225<br>178 | Caso-controle | T-786C<br>Glu298Asp<br>intron4b/a | associação com hipertensão em brancos e negros | Sandrim e col., 2006 |
| Brasil (população urbana miscigenada) | 1577 | Estudo transversal | Glu298Asp | Genótipo AspAsp aumenta o risco de hipertensão em indivíduos com colesterol elevado | Pereira e col., 2006 |
| Diversos países e populações | 31.539 | Meta-análise | T-786C<br>Glu298Asp<br>intron4b/a<br>G23T | Alelo 4b associado à diminuição dos risco de hipertensão em caucasianos | Zintzaras e col., 2006 |
| Índia | 910 | Caso-controle | T-786C<br>Glu298Asp<br>intron4b/a | Haplótipos -786T/298Glu/4a e -786C/298Glu/4a considerados de risco | Kumar e col., 2009 |

### 1.5.5. O gene *ADD2*

Aducinas são proteínas heterodiméricas e atuam no citoesqueleto. Consistem de uma subunidade α e outra β ou γ. As três subunidades são codificadas por genes diferentes (*ADD1*, *ADD2* e *ADD3*, ou *Add1*, *Add2* e *Add3*, em humanos e ratos, respectivamente) mapeados em cromossomos distintos (Bianchi e col., 2005). As aducinas α e β estão abundantemente expressas nos eritrócitos, enquanto nos outros tecidos há maior expressão do heterodímero de aducinas α e γ (Richart e col., 2007).

Uma série de estudos conduzidos em ratos hipertensos (*Milan hypertensive strain*) e humanos indicou que a função alterada da aducina pode causar hipertensão por meio do aumento da reabsorção constitutiva de sódio pelos túbulos renais (Bianchi e col., 1994; Zagato e col., 2000; Tripodi e col., 2004). Num estudo *in vitro* em células de ratos normotensos e com a linhagem de ratos hipertensos *Milan*, Tripodi e col. (1996) descreveram a função das isoformas α e β da aducina na polimerização da actina do citoesqueleto e no transporte de íons pela membrana celular. Mutações no gene na subunidade β (*Add2*), isoladamente, não são capazes de gerar o fenótipo de hipertensão nos animais. Quando mutações da subunidade β são combinadas com mutações no gene da subunidade α (*Add1*), os níveis de pressão arterial são mais elevados do que aqueles observados em portadores de mutações somente na α - aducina. Nas células epiteliais renais transfectadas com a aducina mutada houve um aumento da atividade da bomba de $Na^+/K^+$, dando apoio à hipótese de relação entre mutações nas aducinas, aumento da reabsorção de sódio nas células renais e a consequente hipertensão. Camundongos *knockout* deficientes de β – aducina apresentam maiores níveis de pressão arterial e de pulso (Marro e col.; 2000).

Diversos achados bioquímicos, fisiológicos e moleculares apontam o gene *ADD2* (localizado no cromossomo 2, em 2p13 e que codifica β - aducina) como um candidato promissor para a susceptibilidade à hipertensão.

Nos estudos de associação em humanos, o polimorfismo C1797T (rs4984) no gene *ADD2* é o mais comumente investigado (Wang e col., 2002; Tikhonoff e col., 2003 a,b; Marcun Varda e col., 2006; Seidlerová e col., 2009).

Kato e col. (2008) realizaram um estudo de associação com alta densidade de marcadores do tipo SNP, em uma população japonesa, e encontraram associação altamente significativa entre outro polimorfismo no gene *ADD2* (A/C - rs3755351) e a hipertensão.

Poucos são os estudos de associação já publicados entre o gene *ADD2* e a hipertensão em humanos. A Tabela VII.1 resume alguns desses estudos.

Tabela VII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ADD2*.

| País (população) | N | Desenho do estudo | Polimorfismo | Particularidades da associação encontrada | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| Bélgica | 1.848 | Estudo transversal | C1797T | Alelo 1797T associado com risco aumentado de hipertensão em mulheres na pós-menopausa e usuárias de contraceptivos orais | Wang e col., 2002 |
| Polônia<br>Rússia<br>Itália | 844 | Estudo transversal e baseado em famílias | C1797T | Alelo 1797T associado apenas com a PAS | Tikhnoff e col., 2003 |
| Polônia<br>Rússia<br>Itália | 844 | Estudo transversal e baseado em famílias | C1797T | Frequência do alelo T difere entre as três populações | Tikhnoff e col., 2003b |
| EUA | 1583 | Estudo transversal | 15 SNPs | Polimorfismos influenciam a resposta a certos medicamentos | Kardia e col., 2007 |
| Japão | 1.692 | Caso-controle | A/C | Estudo caso-controle em larga escala, utilizando 80.795 SNPs distribuídos ao longo dos 22 autossomos | Kato e col., 2008 |

### 1.5.6. O gene *GRK4*

Os receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G (GRKs) são da família de quinases serina/treonina, que têm papel na dessensibilização de outros receptores, como os receptores de dopamina do tipo I (D1). As GRKs estão envolvidas no desenvolvimento da hipertensão devido ao seu papel na ativação dos receptores D1, cuja ação reduz a reabsorção de sódio pelos túbulos renais.

O gene *GRK4*(da família dos GRKs), é expresso, entre outros tecidos, nos túbulos renais proximais. Polimorfismos no gene *GRK4*, localizado no cromossomo 4 (em 4p16), levam a alterações da função do GRK4, aumentando sua atividade e causando o desacoplamento dos receptores D1 do complexo enzimático ligado à proteína G que ativa esses receptores, não permitindo mais a excreção adequada de sódio pelos rins (Felder e col., 2002).

Bathnagar e col. (2009) estudaram a relação entre genótipos e haplótipos do gene *GRK4* e a relação com a variação da pressão arterial em afro-americanos que estavam sob tratamento medicamentoso com um bloqueador de β-adrenoreceptores. O polimorfismo A142V (rs1024323) estava associado à resposta da pressão arterial ao medicamento e os homens com o alelo A142 eram menos responsivos ao tratamento.

A expressão tecido- específica (Premont e col., 1996; Sallese e col., 1997) e o fato de estar ligado a um loco de susceptibilidade à hipertensão (Casari e col., 1995), torna o gene *GRK4* um atraente candidato a estar envolvido no mecanismo de patogênese da hipertensão essencial.

A Tabela VIII.1 resume alguns estudos de associação entre o gene *GRK4* e a hipertensão.

Tabela VIII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GRK4*.

| **País (população)** | **N** | **Desenho do estudo** | **Polimorfismo** | **Particularidades da associação encontrada** | **Referências** |
|---|---|---|---|---|---|
| Itália | 120 | Caso-controle | R65L<br>A142V<br>A486V | Associação com a hipertensão sensível a sal | Bengra e col., 2002 |
| Gana | 177 | Caso-controle | R65L<br>A142V<br>A486V | Análise por MDR sugerem interação entre polimorfismos R65L do *GRK4* e I/D do *ACE* na predisposição à hipertensão | Williams e col., 2004 |
| Austrália (caucasianos) | 480 | Caso-controle | R65L<br>A142V<br>A486V | Alelo V associado à hipertensão e elevação da PAS. Alelos L65 e V142 com elevação da PAD em homens. | Speirs e col., 2004 |
| EUA (gêmeos brancos e negros) | 934 | Análise de pares de irmãos | R65L<br>A142V<br>A486V | Alelo L65 e idade com interação significativa na variação da PAS, com efeito dose dependente | Zhu e col., 2006 |
| China | 993 | Caso-controle | R65L<br>A142V<br>A486V | Polimorfismo A486V e haplótipos L-V-A e R-A-A associados à hipertensão | Wang e col., 2006 |
| Japão | 184 | Caso-controle | R65L<br>A142V<br>A486V | Análise por MDR sugerem que polimorfismos do *GRK4* são preditivos de hipertensão sensível a sal | Sanada e col., 2006 |
| EUA (afro-descendentes) | 839 | Estudo de coorte | R65L<br>A142V<br>A486V | Alelo V142 associado com resposta mais rápida ao metoprolol | Bathnagar e col., 2009 |

## 1.6. Os remanescentes de quilombos como modelo para estudo das bases genéticas da hipertensão essencial

A grande prevalência de hipertensão em populações afro-descendentes tem gerado especulações a respeito da possibilidade de existirem diferenças genéticas significativas que determinam susceptibilidade à hipertensão.

A alta diversidade genética das populações africanas e sua história demográfica as tornam particularmente informativas para se fazer mapeamentos genéticos de genes de doenças complexas como a hipertensão (Tishkoff & Williams, 2002).

Sabendo que houve uma grande contribuição africana na formação das populações brasileiras, consideramos de grande importância o estudo das bases genéticas relacionadas à hipertensão essencial nessas populações, especialmente nas populações remanescentes de quilombos.

Os remanescentes de quilombos são um modelo muito interessante para o estudo das doenças de herança multifatorial quando comparados aos estudos que são realizados com populações de hospitais dos grandes centros, heterogêneas do ponto de vista genético e sócio-ambiental. Os remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira são populações miscigenadas. Porém, os dados que obtivemos sobre diversos conjuntos de marcadores indicam que os componentes genéticos dessa mistura e suas proporções não diferem entre essas populações geograficamente muito próximas. Estudos de marcadores de cromossomo Y (Macedo-Souza, 2003; Kimura e col., 2010 – Anexo I), DNA mitocondrial (Rincon, 2009) e locos variáveis em diversos autossomos (alguns locos de PSA, *population specific alleles*) [Cotrim e col., 2004] foram alvos de pesquisas conduzidas pelo grupo. De acordo com o estudo de Tang e col. (2005), de um modo geral, populações geneticamente miscigenadas podem ser objeto de estudos caso-controle, sem artefatos significativos, desde que os indivíduos tenham a mesma origem geográfica, o que é o caso dos quilombos.

Os remanescentes de quilombos caracterizam-se como populações de ancestralidade majoritariamente africana e que vivem atualmente em áreas outrora ocupadas por escravos negros fugidos e/ou alforriados. Historicamente, quilombos eram "comunidades formada pelos negros escravos, que fugiram do trabalho forçado e resistiram à recaptura por parte das forças escravocratas" (Carvalho e col., 1995). O conceito de remanescente de quilombo mais aceito atualmente refere-se a "toda comunidade negra rural que agrupe descendentes de escravos vivendo da cultura de subsistência e onde as manifestações culturais têm forte vínculo com o passado" (Oliveira Jr e col., 2000), incluindo não somente negros fugidos, mas também os libertos ou abandonados por seus senhores.

**Remanescentes de quilombos no Vale do Ribeira**

A ocupação do Vale do Ribeira remonta ao período pré-colombiano. A presença de inúmeros sítios arqueológicos comprova que a ocupação humana no Vale do Ribeira é anterior à chegada dos portugueses. O Vale era utilizado como rota de passagem dos ameríndios vindos do planalto para o litoral. No século XVI, as bandeiras de mineração iniciaram suas expedições partindo do litoral sul de São Paulo para o interior do Vale do Ribeira, estabelecendo os primeiros povoados na região. A mineração do ouro representou o primeiro ciclo econômico do Vale. Durante o século XVII, muitos africanos foram trazidos para a região como mão de obra ligada à mineração. Com o fim do ciclo da mineração, os escravos negros eram abandonados pelos senhores, e juntamente com aqueles que fugiam, formaram os quilombos (Oliveira Jr e col., 2000).

Em 1576 foi fundada uma das primeiras cidades, Iporanga. No século XVII, em função do ouro encontrado às margens do rio Ribeira do Iguape, teve origem a cidade de Xiririca, hoje Eldorado (Agenda socioambiental – ISA, 2008).

O Vale do Ribeira está localizado em dois dos estados mais desenvolvidos do país, abrangendo o sudeste de São Paulo e leste do Paraná (Figura 4.1). A área da Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira do Iguape e Complexo Estuarino Lagunar de Iguape-Cananéia-Paranguá, genericamente chamada de Vale do Ribeira, abrange 31 municípios – 9 no Paraná e 22 em São Paulo. Mais dez municípios paranaenses e 14 paulistas estão ainda parcialmente inseridos. O Vale do Ribeira caracteriza-se por ter sido uma das primeiras regiões brasileiras mais intensamente exploradas. Mesmo assim, ainda abriga o maior remanescente de Mata Atlântica do país. Dos 7% que restaram desse bioma no Brasil, 21% estão no Vale do Ribeira (Agenda Socioambiental - ISA, 2008). O relevo é predominantemente montanhoso, o clima é quente e úmido. O Vale do Ribeira ocupa 10% do território do Estado de São Paulo. Cerca de 60% de sua área é protegida por leis ambientais que estabelecem restrições ao uso e 20% do território do Vale abriga parques, estações ecológicas e outras áreas de proteção ambiental (Oliveira Jr e col., 2000).

Em 1999 foi considerado pela Unesco (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e a Cultura) como Patrimônio Natural da Humanidade.

O Vale do Ribeira é a região do estado de São Paulo onde se encontra a maior parte dos remanescentes de quilombos do estado (Figura 4.1). De acordo com dados oficiais do ITESP (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo), juntamente com os dados do EAACONE (Equipe de Articulações e Assessoria às Comunidades Negras do Vale do Ribeira), existem 59 comunidades quilombolas na porção paulista do Vale do Ribeira.

Foram reconhecidas pelo ITESP, até o momento, 26 comunidades nessa região: **Ivaporunduva**, **Maria Rosa**, **Pedro Cubas**, **Pilões**, **São Pedro**, Cafundó, Caçandoca, Jaó,

**Sapatu**, **Nhunguara**, **André Lopes**, **Galvão**, Mandira, Praia Grande, Porto Velho, Pedro Cubas de Cima, Capivari, Brotas, Cangume, Camburi, Morro Seco, **Poça**, Cedro, Ribeirão Grande/Terra Seca, **Reginaldo** e Pedra Preta/Paraíso. Apenas seis têm as terras tituladas: Ivaporunduva, Maria Rosa, Pedro Cubas, Pilões, São Pedro e Galvão. Cinco estão em fase de reconhecimento: Biguazinho, Bombas, Fazenda da Caixa, Fazendinha Pilar e Cazanga. Outras quinze comunidades foram apontadas pelo ITESP para reconhecimento: Os Camargo, Fazendinha dos Pretos, Carmo, **Abobral**, Castelhanos, Bananal Pequeno, Chácara dos Pretos, Jaú, Tamandaré, Bairro Peropava, Poço Grande, Anta Magra, Tocos, Piraporinha/Jucurupava/Itinga e Piririca.

As Figuras 5.1 a 8.1 ilustram alguns cenários típicos do Vale do Ribeira e algumas comunidades que foram estudadas no presente trabalho.

Atualmente, essas populações sobrevivem às margens dos últimos remanescentes de Mata Atlântica da Região Sudeste do Brasil. Seu modo de vida, tradicionalmente rural, encontra-se em transformação, pois as leis ambientais dificultam sua agricultura de subsistência, a caça e a manutenção de certos animais. Podemos afirmar que os remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira são populações que vivem a transição epidemiológica, sendo afetados simultaneamente por doenças resultantes da sua falta de acesso a serviços básicos de saneamento e saúde (como por exemplo, as doenças parasitárias) e por doenças frequentes do mundo ocidental e moderno, como a hipertensão e a obesidade.

**Figura 4.1:** Mapas dos estados de São Paulo e Paraná. Em verde, localização geográfica do Vale do Ribeira. O quadrado azul corresponde à área onde se concentram as comunidades remanescentes de quilombos por nós estudadas. Fonte: ISA – Instituto Socioambiental.

**Figura 5.1**: Vista panorâmica do Vale do Ribeira na comunidade de Abobral. Fonte: arquivo do Laboratório de Genética Humana.

**Figura 6.1**: Travessia por meio de balsa que dá acesso às comunidades de Pilões e Maria Rosa. Fonte: arquivo do Laboratório de Genética Humana.

**Figura 7.1**: Detalhe da balsa que dá acesso à comunidade de Pedro Cubas – cabo de aço que traciona a balsa, que se movimenta apenas pela força da correnteza do rio Ribeira. À direita, detalhe do caminho de acesso à comunidade de São Pedro, sem qualquer pavimentação. Fonte: arquivo pessoal de Israel Rubio.

**Figura 8.1**: Casas características das comunidades remanescentes de quilombos – comunidade de Reginaldo. Fonte: arquivo pessoal.

# CAPÍTULO 2

# 2. Objetivos

## 2.1. Objetivo geral

Nossa pesquisa teve como objetivo geral estudar fatores de risco genético associados à hipertensão essencial em populações afro-descendentes, de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – SP.

## 2.2. Objetivos específicos

Para atender o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

1. Determinação dos genótipos em polimorfismos em genes candidatos a explicar o fenótipo da hipertensão: *ACE*, *AGT*, *GNB3*, *NOS3*, *ADD2* e *GRK4*;
2. Determinação dos genótipos em polimorfismos do tipo INDEL (inserção/deleção), selecionados por serem eficazes na realização de estimativas de ancestralidade genômica;
3. Análise de aspectos do processo de miscigenação que ocorreu nessas populações;
4. Estudos de controle de ancestralidade nos grupos hipertensos e normotensos, com o objetivo de verificar a ocorrência de estratificação populacional em nossas amostras;
5. Análises de associação dos genótipos determinados em genes candidatos com o fenótipo da hipertensão, por meio de estudo transversal;
6. Estudos de transmissão dos genótipos nos genes candidatos nas famílias, utilizando estratégias que analisam genealogias com estrutura heterogênea.

# CAPÍTULO 3

## 3.1. Amostras e localização das doze populações estudadas

Esse estudo iniciou-se como parte de um projeto intitulado "Variabilidade molecular em populações brasileiras: um estudo do gene da síndrome do cromossomo X Frágil", conduzido entre 2000 e 2003 (processo FAPESP 1999/11698-0), com o objetivo de estudar sob diversos aspectos genéticos os remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - SP. Coletaram-se durante as viagens amostras de sangue periférico de indivíduos adultos que consentiram participar do estudo. A partir do ano de 2003, iniciou-se a segunda etapa do projeto voltada para o estudo da obesidade e da hipertensão sob o financiamento do CEPID (Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão) – Centro de Estudos do Genoma Humano (processo FAPESP 1998/14254-2). Nessa etapa foram realizadas novas viagens ao Vale do Ribeira com a finalidade de reexaminar os indivíduos adultos dos quais já possuíamos amostras de DNA, para coletar medidas de pressão arterial e medidas antropométricas complementares, relevantes também para os estudos de obesidade conduzidos pela Dra. Claudia Blanes Angeli (projeto de doutorado, processo FAPESP 2003/14087-9, concluído em abril de 2008). Entre os anos de 2003 e 2009 (correspondentes à segunda etapa do projeto), foram realizadas 21 viagens com duração de três a quatro dias cada uma, com o objetivo de avaliar a pressão arterial e coletar medidas antropométricas em condições padronizadas, dos indivíduos maiores de 17 anos. Também foram coletadas amostras de sangue periférico de novos indivíduos que aderiram à pesquisa.

A pesquisa sobre genética da obesidade e da hipertensão foi conduzida em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – InCor, coordenado pelo Prof. Dr. José Eduardo Krieger, contando principalmente com o apoio do Dr. Alexandre da Costa Pereira.

As populações estudadas foram: Abobral, Galvão, São Pedro, Pedro Cubas, Pilões, André Lopes, Nhunguara, Sapatu, Ivaporunduva, Maria Rosa, Poça e Reginaldo (Figura 1.3).

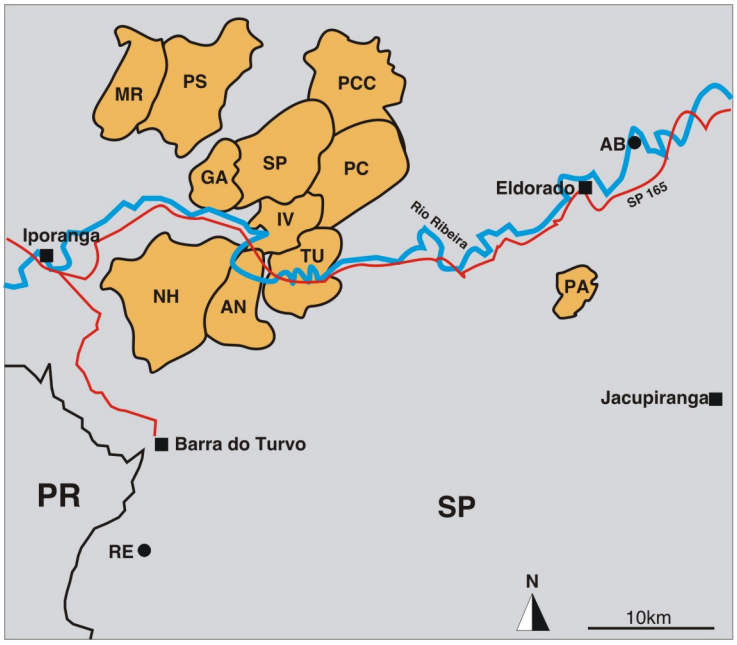



Figura 1.3: Localização das doze comunidades de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira estudadas, localizadas nos municípios de Eldorado (AB, parte da PA, PC, SP, parte de GGA, IV, AN, TU e parte de NH), Jacupiranga (parte da PA), Iporanga (parte de NH, parte de GA, MR e PS) e Barra do Turvo (RE). Adaptado da Agenda Socioambiental de Comunidades Quilombolas do Vale do Ribeira - Instituto Socioambiental, 2008; por Deborah Azzi Nogueira. AB: Abobral; PA: Poça; PC: Pedro Cubas; PCC: Pedro Cubas de Cima; SP: São Pedro; IV: Ivaporunduva; TU: Sapatu; GA: Galvão; PS: Pilões; MR: Maria Rosa; AN: André Lopes; NH: Nhunguara; RE: Reginaldo.

O número estimado de habitantes e o número dos indivíduos examinados estão apresentados na Tabela I.3. A porcentagem de cobertura refere-se aos indivíduos com 17 anos ou mais. Os dados sobre o número total de habitantes, bem como do número de habitantes com mais de 17 anos das populações de Abobral, Galvão, São Pedro, Pilões, Maria Rosa, Pedro Cubas, André Lopes, Nhunguara, Sapatu e Ivaporunduva foram obtidos pelo grupo do Prof. Dr. Rui Murrieta do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP, que conduziu um projeto de pesquisa no Vale do Ribeira intitulado: "Antropologia ecológica da agricultura de corte-e-queima de populações quilombolas do Vale do Ribeira" (Processo FAPESP nº 05/0117-9) [Pedroso Jr. e col., 2008]. Os dados sobre Poça e Reginaldo foram obtidos nos relatórios técnico-científicos do ITESP (www.itesp.sp.gov.br) e por comunicação pessoal.

Tabela I.3: Número estimado do total de habitantes de cada comunidade, número estimado de habitantes com idade igual ou superior a 17 anos, número de indivíduos estudados e porcentagem de cobertura do estudo.

| População | Nº estimado de habitantes | Nº de habitantes com 17 anos ou mais | Nº de indivíduos incluídos nesse estudo | Porcentagem de cobertura |
|---|---|---|---|---|
| Abobral | ~400 | 240 | 96 | 39,5% |
| Galvão | ~110 | 62 | 44 | 80,6% |
| São Pedro | ~130 | 69 | 55 | 94,2% |
| Pilões | ~130 | 65 | 39 | 72,3% |
| Maria Rosa | ~55 | 28 | 16 | 64,3% |
| Pedro Cubas | ~260 | 135 | 82 | 68,9% |
| André Lopes | ~290 | 158 | 89 | 68,4% |
| Nhunguara | ~440 | 222 | 91 | 49,1% |
| Sapatu | ~290 | 183 | 73 | 43,7% |
| Ivaporunduva | ~290 | 178 | 77 | 71,9% |
| Poça | ~220 | 170 | 50 | 30,0% |
| Reginaldo | ~250 | ~160 | 47 | 45,6% |
| **Total** | **~2.865** | **~1.670** | **759** | **-** |

Incluímos nas análises estatísticas somente aqueles indivíduos com avaliação clínica e antropométrica completa e que nasceram nos remanescentes de quilombos, ou cujos pais ou avós nasceram nessas comunidades; incluímos também aqueles que se casaram com um indivíduo quilombola e deixaram descendentes que vivem nos quilombos. Excluímos dessas análises os indivíduos diabéticos e as grávidas.

### 3.2. Aspectos éticos

Esse estudo foi realizado sob a aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (Parecer 111/CEP; Anexo II) e do Comitê de Ética do Instituto de Biociências (CEP – IBUSP – 034/2005; Anexo III), ambos da Universidade de São Paulo. O termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética foi assinado por todos os participantes dessa pesquisa (Anexo IV) ou por seus responsáveis.

### 3.3. Histórico clínico

Um questionário sobre o histórico de doenças e hábitos de saúde foi aplicado a todos os indivíduos participantes da pesquisa. Esse questionário foi elaborado em colaboração com o médico Dr. Alexandre da Costa Pereira, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – InCor, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo V).

Cada indivíduo respondeu a um questionário, que precisou ser adaptado ao modo de vida nos quilombos, no qual era atribuído um valor que nomeamos de GAF (Grau de Atividade Física). O GAF é um valor que varia de 1 a 4 (Tabela II.3) e foi obtido a partir dos relatos dos entrevistados. Para minimizar problemas de subjetividade de avaliação, tentamos manter sempre o mesmo entrevistador.

Tabela II.3: Valor de GAF atribuído ao indivíduo de acordo com as atividades físicas exercidas diariamente.

| | **Atividade física diária do indivíduo** |
|---|---|
| GAF 1 | Indivíduos que permanecem em casa sentados durante o dia, sem muitas atividades devido à alguma limitação física ou pela idade avançada |
| GAF 2 | Indivíduos que não trabalham na lavoura mas fazem serviços domésticos o dia todo, ficando a maior parte do tempo em pé |
| GAF 3 | Indivíduos que trabalham apenas meio período na lavoura, mas que realizam serviços domésticos o resto do dia |
| GAF 4 | Indivíduos que relatam trabalhar na lavoura em período integral e carregando peso |

### 3.4. Medidas de pressão arterial

A pressão arterial foi medida em todos os indivíduos pelos médicos Dr. João Pedro Vicente, Roberto Maluf ou Franklin Albert Kono, de maneira padronizada, com o aparelho portátil da marca *Omron*, ou com o uso de esfigmomanômetro.

A primeira medida das pressões sistólica e diastólica era obtida assim que o indivíduo chegava à sala do atendimento, após ter ficado em repouso por pelo menos 15min. Cerca de 5min após a primeira, nova medida das pressões era obtida.

Os valores de pressão arterial adotados para o estudo foram a média aritmética das duas medidas da pressão sistólica e a média aritmética das duas medidas da pressão diastólica.

### 3.5. Medidas antropométricas

Foram coletadas medidas padronizadas de peso e altura. Os indivíduos foram medidos e pesados sem sapatos e com roupas leves. Realizamos também medidas antropométricas para avaliar o padrão de distribuição de gordura corporal: perímetro braquial, pregas cutâneas tricipital e subescapular, e circunferências da cintura e do quadril. Essas medidas foram coletadas seguindo as instruções contidas em Frisancho (1990). Foram tomadas três medidas da prega cutânea tricipital, da prega cutânea subescapular, da circunferência da cintura e da circunferência do quadril. Adotamos a média aritmética dos três valores tomados de cada uma das medidas para as análises estatísticas.

Os parâmetros idade, peso, altura e pressão arterial foram obtidos tanto na primeira como na segunda visita a cada população do Vale do Ribeira. No caso dos indivíduos examinados nas duas etapas, optamos por utilizar as medidas obtidas na etapa mais recente.

### 3.6. Extração de DNA genômico

As amostras de sangue (aproximadamente 5 mL) foram processadas e o DNA foi extraído, inicialmente, segundo o protocolo de rotina do Laboratório de Genética Humana, com fenol e clorofórmio. Das amostras mais recentemente coletadas, o DNA foi extraído utilizando-se o aparelho *Autopure LS* da Gentra Systems.

Cada amostra de DNA foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, da Thermo Scientific) e uma alíquota foi diluída em água *milli-Q* autoclavada com a finalidade de obterem-se amostras de DNA com concentração entre 100 e 200 ng/ μL.

### 3.7. Estudos moleculares

#### 3.7.1. Estudo dos marcadores de ancestralidade do tipo INDEL

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Genética Humana e Médica, da UFPA, sob a supervisão do Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos.

Foram genotipados 307 indivíduos, não aparentados em primeiro grau, de dez populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira (ver capítulo 4, item 4.3).

Cada amostra foi genotipada em relação a 48 marcadores do tipo INDEL (inserção/deleção) que foram selecionados para estudo no laboratório do Dr. Sidney por serem bons indicadores de ancestralidade africana, indígena ou européia. Os marcadores foram selecionados seguindo três critérios principais: (1) grandes diferenças de frequências alélicas entre Africanos, Europeus e/ou Nativos Americanos ($\delta \geq 40\%$); (2) estarem em diferentes cromossomos ou em regiões físicas distantes quando no mesmo cromossomo;

(3) terem tamanhos que variassem entre 3pb a 40pb, permitindo a genotipagem simultânea de múltiplos marcadores (Santos e col., 2010).

Os *primers* (Tabela III.3) foram desenhados utilizando-se o *software Primer3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3) e foram testados no *software AutoDimer* (Vallone e Butler, 2004) para averiguar possíveis estruturas secundárias como a formação de dímeros ou *hairpin* entre os *primers*.

**Condições de amplificação**

Foram realizadas amplificações por PCR dos fragmentos contendo os alelos inserção/deleção em três sistemas *multiplex*, cada um contendo um *mix* de 16 pares de *primers* marcados com fluorescência. Cada sistema *multiplex* foi feito sob as seguintes condições: volume final de 12,5 µL, 10 a 20 ng de DNA, *primers* (de acordo com a Tabela III.3), tampão de PCR (1X) contendo 3mM de $MgCl_2$, 125 mM de cada dNTP, 2U de *AmpliTaq Platinum DNA Polymerase* (*Invitrogen*). Para a amplificação foi utilizada uma sequência de ciclos na qual foi feita uma desnaturação inicial a 95ºC por 11min, seguida por 10 ciclos de desnaturação a 94ºC por 1min, hibridação a 60ºC por 1min, e extensão a 70ºC por 2min. Depois se seguiram mais 17 ciclos de desnaturação a 90ºC por 1min, hibridação a 60ºC por 1min e extensão a 70ºC por 2min, e uma extensão final a 60ºC por 60min.

Após a reação de PCR, 1µL do produto amplificado foi misturado a 8,5µL de uma solução de formamida deionizada Hi-Di™ e 0,5µL de *GeneScan 500 Liz™ Size Standard* (ambos da *Applied Biosystems*) e essa mistura foi desnaturada a 95ºC por 3min. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados no analisador automático de DNA *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e analisados com o *GeneMapper ID v3.2 software* (*Applied Biosystems*). Um exemplo de resultado está apresentado na Figura 2.3.

Tabela III.3: Sequências dos *primers* utilizados na genotipagem do painel de 48 indels, tamanho dos fragmentos amplificados, tamanho dos alelos, concentração utilizada no protocolo de amplificação, fluorocromo dos *primer* marcados (*DYE*), localização e posição cromossômica. Este conjunto de marcadores é adequado para distinguir ancestralidade européia.

| Marcadores | Sequência do *primer* | Tamanho da inserção (pb) | Alelos INDEL*1/ INDEL*2 | PRIMER [ ] (µM) | *DYE* | Cromossomo | Posição cromossômica (Mbp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MID 473F | 5´ GCA ACA ACC AAG ACA AGG ATT 3´ | 8 | 83-91 | 3.0 | 6FAM | 6 | 95.3 |
| MID 473R | 5´ AAA ATG TTA AGC CTC CCC TGT 3´ | | | 3.0 | | | |
| MID 1923F | 5´ CAC TAC TGA GAT GCT TTC ACC AA 3´ | 4 | 134-138 | 5.0 | 6FAM | 6 | 12.1 |
| MID 1923R | 5´ CCT TTC CTG TAC GTG CTT CTT T 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 1448F | 5´ GAT CTC CTC TGA TCC TGA TTT TG 3´ | 3 | 162-165 | 5.0 | 6FAM | 3 | 192.6 |
| MID 1448R | 5´ CAT GGA TAA CTC TGT GGA TGG A 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 619F | 5´ GAC TCT TTT CCT TGA CCC TTC A 3´ | 3 | 198-201 | 5.0 | 6FAM | 7 | 27.9 |
| MID 619R | 5´ GAG AGG TAG AGG GAG TTT GGG 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 856F | 5´ TTA ATT CTT GAG GGC AGA GGA G 3´ | 26 | 256-282 | 6.5 | 6FAM | 5 | 65.3 |
| MID 856R | 5´ TAT TGT GCT CAT TTT CTG GGT C 3´ | | | 6.5 | | | |
| MID 1780F | 5´ AGG AAA CGG CAC TTA TGA CTT C 3´ | 3 | 104-107 | 2.5 | NED | 11 | 35.1 |
| MID 1780R | 5´ CGC AGA TAT TAG CCT GAC CTT C 3´ | | | 2.5 | | | |
| MID 1470F | 5´ AGT CTG ACC CTT CAT AAG CAA GA 3´ | 6 | 133-139 | 3.5 | NED | 11 | 64.5 |
| MID 1470R | 5´ ATC CCA AAC AAC CAC ATA GGA G 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 132F | 5´ AAT GAG ATT GCC AGC TTT CCT A 3´ | 4 | 190-194 | 8.0 | NED | 15 | 22.9 |
| MID 132R | 5´ CCA CCC ACA AAA TTG GAC ATA 3´ | | | 8.0 | | | |
| MID 1098F | 5´ TCC TTT CAG GTA TCA GTC CCC 3´ | 9 | 340-349 | 1.0 | NED | 10 | 78.8 |
| MID 1098R | 5´ TGG AGA GAA GTG GGT AGA TTT GA 3´ | | | 1.0 | | | |
| MID 1558F | 5´ GTT GGT TTG GCT TTG AGT GTT 3´ | 4 | 145-149 | 3.5 | PET | 3 | 132.1 |
| MID 1558R | 5´ ATA TTC ACC TGT AGC TGC CTG AT 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 217F | 5´ AAA GGC AGA TTT AGG GAC CAC 3´ | 3 | 171-174 | 3.5 | PET | 7 | 145.5 |
| MID 217R | 5´ GGA TGA AGG GGA AAA AGT ATG A 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 568F | 5´ TTT AGT GTG CCT CCT TCA AAC A 3´ | 3 | 201-204 | 3.5 | PET | 13 | 92.7 |
| MID 568R | 5´ GGG TGA GTT GTT GAG TGT GAG T 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 99F | 5´ CAA GGT GCA GGT GAA GTT GAG 3´ | 6 | 132-138 | 2.0 | VIC | 22 | 24.1 |
| MID 99R | 5´ AAT GGC AAA GAT ACA GGT CTG G 3´ | | | 2.0 | | | |
| MID 93F | 5´ TGA CCC CAG TTA CTA ATG AAA ACC 3´ | 3 | 146-149 | 3.5 | VIC | 22 | 40.3 |
| MID 93R | 5´ CAC AGC TTT TTC TCC AGT GTT G 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 682F | ´ CTC CAT TCT TTC AGC CAA CTC T 3´ | 3 | 173-176 | 3.5 | VIC | 9 | 94.6 |
| MID 682R | 5´ CAA AGC ACT TCA TGG AAT TAA GG 3´ | | | 3.5 | | | |
| MID 1716F | 5´ TTT GTG TGT GTG TGT GTG TGT G 3´ | 4 | 182-186 | 3.0 | VIC | 6 | 83.9 |
| MID 1716R | 5' ACCTCAGCATCACCAGAAGAGT 3' | | | 3.0 | | | |
| MID 1039F | 5´ GCG TTT CAT CTC TTT GGG TTA G 3´ | 40 | 211-251 | 6.5 | VIC | 5 | 34 |
| MID 1039R | 5´ CTG TTC TTA GCA GTG GGC TTT C 3´ | | | 6.5 | | | |

Tabela III.3: Continuação. Este conjunto de marcadores é adequado para distinguir ancestralidade Africana.

| Marcadores | Sequência do *primer* | Tamanho da inserção (pb) | Alelos INDEL*1/ INDEL*2 | PRIMER [ ] (µM) | *DYE* | Cromossomo | Posição cromossômica (Mbp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MID 1357F | 5´ TTA TAC CTG CAA AGT GGG CAT T 3´ | 4 | 95-99 | 1.25 | 6FAM | 14 | 79.2 |
| MID 1357R | 5'GTTCCAGCAAACAGAACACAAG 3' | | | 1.25 | | | |
| MID 273F | 5´ GGTGTGATCAATTCCAACTGC 3´ | 4 | 137-141 | 1.25 | 6FAM | 17 | 5.3 |
| MID 273R | 5´ AAA GGA AAT CAC GTC TAA GTG ACC 3´ | | | 1.25 | | | |
| MID 1684F | 5´GTGATGTTTTCACAAGCAGGAA 3´ | 6 | 157-163 | 2.5 | 6FAM | 14 | 37.9 |
| MID 1684R | 5'TCA TCC ATG TCT ATG TCT TCA GC 3' | | | 2.5 | | | |
| MID 818F | 5´ AGAGCCAGTTAGAGGGAGGATG 3´ | 23 | 222-245 | 3.0 | 6FAM | 16 | 2.1 |
| MID 818R | 5' GAA CGA GAG TGC GAA CCA AAT 3' | | | 3.0 | | | |
| MID 1172F | 5´ CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC 3´ | 5 | 113-118 | 3.5 | VIC | 16 | 2.13 |
| MID 1172R | 5' CAGCTTGTCTTGGTCAACTGC 3' | | | 3.5 | | | |
| MID 1176F | 5´ GCT TAC CTA GCA GGG TTG TTG T 3´ | 3 | 149-152 | 1.5 | VIC | 5 | 55.6 |
| MID 1176R | 5' AAACTCCCAGTCCAAGGTGATA 3' | | | 1.5 | | | |
| MID 1358F | 5´ AAA AAC ACC CTT TGC TGA AGT C 3´ | 17 | 235-252 | 4.0 | VIC | 5 | 35.6 |
| MID 1358R | 5' ACAGACGCCAGGAATTTTCTAT 3' | | | 4.0 | | | |
| MID 1785F | 5´ CGGGTGTGCATTCTACATTCT 3´ | 3 | 95-98 | 2.5 | NED | 3 | 12 |
| MID 1785R | 5' GGA GGA TGA ATA TGG TGG TCT C 3' | | | 2.5 | | | |
| MID 1271F | 5´ GTA TTA AGG TTT CCG GCC TCA C 3´ | 6 | 144-150 | 1.25 | NED | 5 | 109.8 |
| MID 1271R | 5' AAGATGAGAAAGCAGGTTTGGA 3' | | | 1.25 | | | |
| MID 789F | 5´ CAGAGTAGAAATTGGCTTCCTCA 3´ | 4 | 161-165 | 2.5 | NED | 14 | 78.5 |
| MID 789R | 5' GAT GCT ATC AGT CTT GCT AAT GGA 3' | | | 2.5 | | | |
| MID 494F | 5´ AGACACATGGAGGAAAGACCAT 3´ | 9 | 227-236 | 2.0 | NED | 6 | 6.6 |
| MID 494R | 5' TGT TAC GGA AAT CAC AAG AAC G 3' | | | 2.0 | | | |
| MID 625F | 5´ TAC GGC TAG GCT ACA AGA CCT C 3´ | 3 | 115-118 | 3.0 | PET | 2 | 31.3 |
| MID 625R | 5' CACAAGGAGACAGAACTTCATCA 3' | | | 3.0 | | | |
| MID 1379F | 5´ GAGGTGATTCAAGATGGCAGAT 3´ | 3 | 150-153 | 0.8 | PET | 19 | 54.4 |
| MID 1379R | 5' AAG AAG GTC AGA TGC AGA GAG G 3' | | | 0.8 | | | |
| MID 2011F | 5´ TGAGTAGGCCAATAAGAACATCC 3´ | 5 | 192-197 | 3.5 | PET | 2 | 108.8 |
| MID 2011R | 5' TTA CTT ACG CTT CGG GTT CAT T 3' | | | 3.5 | | | |
| MID 1726F | 5´ GTCCAAATGCACCACAATCTT 3´ | 13 | 243-256 | 5.0 | PET | 1 | 39.6 |
| MID 1726R | 5' TTT GTA CTA CGG CAC ATT AAG AGG 3' | | | 5.0 | | | |

Tabela III.3: Continuação. Este conjunto de marcadores é adequado para distinguir ancestralidade Ameríndia.

| Marcadores | Sequência do *primer* | Tamanho da inserção (pb) | Alelos INDEL*1/ INDEL*2 | PRIMER [ ] (µM) | *DYE* | Cromossomo | Posição cromossômica (Mbp) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MID 1952F | 5´ TTT GCT CCC ACA GCA TTA GTC 3´ | 4 | 96-100 | 2.0 | 6FAM | 15 | 60.95 |
| MID 1952R | 5´ AGT AAA CAA ACG GCT GCA AGA 3´ | | | 2.0 | | | |
| MID 476F | 5´ CAT TGA TGT CTA TTT GCC TTT GAG 3´ | 3 | 167-170 | 4.0 | 6FAM | 9 | 19.70 |
| MID 476R | 5´ TTC CTA GGG CTG GAG TTA CTG A 3´ | | | 4.0 | | | |
| MID 275F | 5´ TCT TTC TGC CAA TGA CTT CTA GC 3´ | 5 | 210-215 | 2.0 | 6FAM | 17 | 66.39 |
| MID 275R | 5´ ACA AAC TGA CTG ACT TCC ACG A 3´ | | | 2.0 | | | |
| MID 152F | 5´ CTCCCTGCTGATACCGTCTATAA 3´ | 8 | 255-263 | 6.0 | 6FAM | 20 | 2.07 |
| MID 152R | 5´ GGAGGCAGAAGTCCAGAGATAC 3´ | | | 6.0 | | | |
| MID 196F | 5´ AAC CAA GTT CTA GCC ATA TGG AAC 3´ | 3 | 112-115 | 4.0 | VIC | 6 | 99.90 |
| MID 196R | 5´ AAA GCT TCA GTG AAT TCC AAG G 3´ | | | 4.0 | | | |
| MID 778F | 5´ GTG ACA GGC TTT ATA GGC CAA C 3´ | 3 | 197-200 | 3.0 | VIC | 16 | 82.40 |
| MID 778R | 5´ TTT ACC TGC TGT GGA CTT GAT G 3´ | | | 3.0 | | | |
| MID 1603F | 5´ AAA AGA CTG GAG GTT CCT TTT GA 3´ | 4 | 234-238 | 8.0 | VIC | 5 | 70.86 |
| MID 1603R | 5´ GTG CAA ATA AAA CGC AAC AGA A 3´ | | | 8.0 | | | |
| MID 1386F | 5´ ACA AAG AGA ACA GCC TCC AGA C 3´ | 21 | 327-348 | 5.0 | VIC | 1 | 244.10 |
| MID 1386R | 5´ TAA TCA ATC CCC AGA CAA CTC C 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 660F | 5´ AAA GGC CAT GCC AAT AAT TTT C 3´ | 3 | 109-112 | 8.0 | NED | 10 | 17.40 |
| MID 660R | 5´ ATG GCA AGTCAT TCA ATC CTT C 3´ | | | 8.0 | | | |
| MID 575F | 5´ AAC TGG TCA AAA TCT GCT CCA T 3´ | 4 | 175-179 | 3.0 | NED | 1 | 36.06 |
| MID 575R | 5´ TAC GTG GAC CTA GCA TTC CTC T 3´ | | | 3.0 | | | |
| MID 216F | 5´ CTG TAT TTG GTC ATT CAA GCT GTT 3´ | 5 | 226-231 | 4.0 | NED | 2 | 191.38 |
| MID 216R | 5´ CTG TCC ACT TGG GTC TCA AAA T 3´ | | | 4.0 | | | |
| MID 481F | 5´ AGA TTT GAT AGA AAT GCA GGA ACC 3´ | 7 | 283-290 | 5.0 | NED | 2 | 63.80 |
| MID 481R | 5´ GTA GTT GGG GAA GAG TGC AGA C 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 913F | 5´ CTA GAA TGT CAA GAC CTG GGA TG 3´ | 13 | 331-344 | 5.0 | NED | 6 | 38.40 |
| MID 913R | 5´ TGG CCT TTG ATT GGA TAT GAG 3´ | | | 5.0 | | | |
| MID 350F | 5´ CTT GGA GAT GTA CCA GGA AAA TG 3’ | 3 | 102-105 | 2.0 | PET | 2 | 211.2 |
| MID 350R | 5´ AAG TGG GTG TTT CCA ATC ATT C 3’ | | | 2.0 | | | |
| MID 988F | 5´ CAC AAT AGC CAT GTT TGC ATC T 3’ | 4 | 149-153 | 5.0 | PET | 5 | 113.8 |
| MID 988R | 5´ CCT TTC TCC TGA TTC ACC AAA T 3’ | | | 5.0 | | | |
| MID 184F | 5´ CGG TTC AGT CTT GAT TGT GCT A 3’ | 10 | 243-253 | 7.0 | PET | 16 | 82.3 |
| MID 184R | 5’ TCC AAT TCT CTC CTG CAA AAC T 3’ | | | 7.0 | | | |

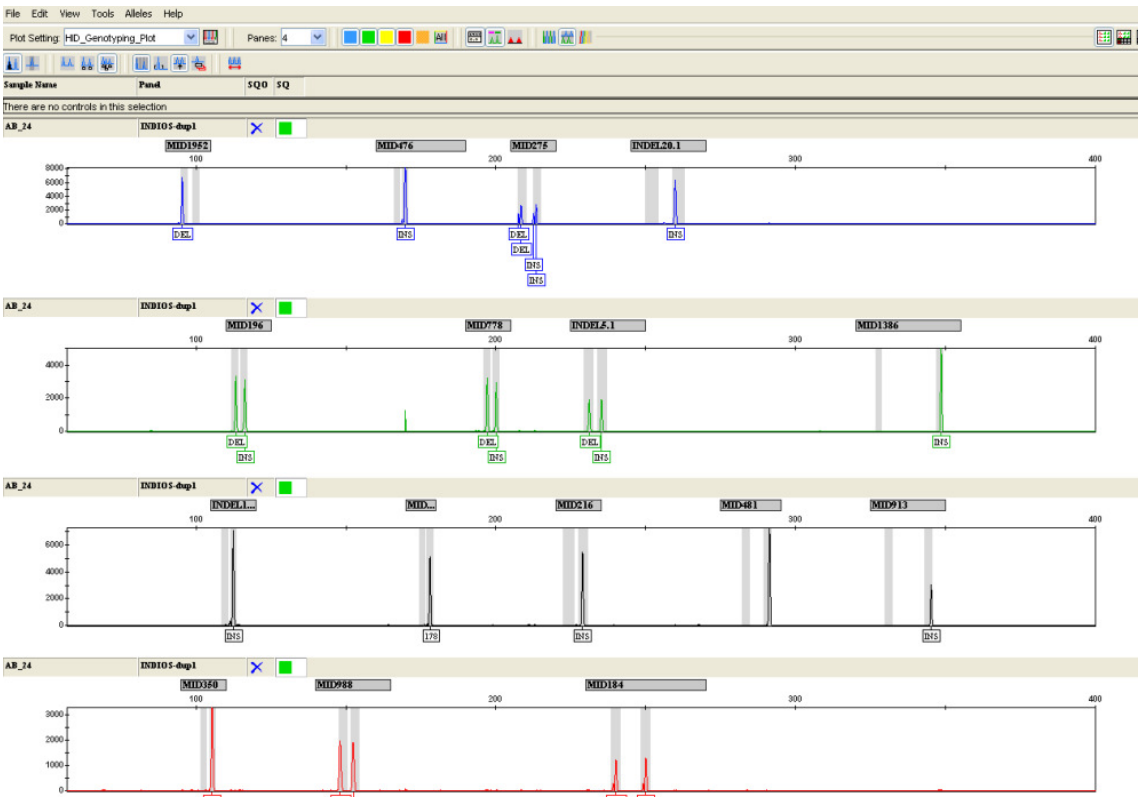



Figura 2.3: Exemplo de resultado gerado pelo *software* de análise do Genetic Analyser 3130. Cada cor (azul, verde, preto e vermelho) representa um fluorocromo. Os picos correspondem aos alelos de um indivíduo (inserção e deleção). Os 16 marcadores apresentados na figura correspondem ao painel de marcadores selecionados por serem bons indicadores de ancestralidade indígena.

### 3.7.2. Estudos dos sete polimorfismos selecionados

Os protocolos de amplificação são apresentados nesse capítulo. Os resultados e análises estatísticas pertinentes serão apresentados em capítulos posteriores.

Foram selecionados para esse estudo sete polimorfismos (I/D, Glu298Asp, C825T, A-350G, M235T, A/C, A486V) em seis genes candidatos: *ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* e *GRK4*. A Tabela IV.3 mostra detalhadamente os polimorfismos estudados.

Tabela IV.3: Polimorfismos estudados, localização no gene, região cromossômica no qual o gene está localizado, alelos de cada polimorfismo e sequências de *primers* (F – *foward* e R – *reverse*) para amplificação.

| Gene | SNP | Nº dbSNP | Localização no gene | Localização Cromossômica | Alelos | *Primers* | ***Primer Snupe*/Sítio de restrição** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *ACE* | I/D | rs1799752 | Intron | 17q23 | I/D | F - CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT<br>R - GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT | |
| *ADD2* | A/C | rs3755351 | Intron | 2p13 | A/C | F - AGAGCAAATGCCTTTGTACCAT*<br>R - CCATCATGCTATATGCCTTCCT* | GGCTCCCAAGTCACTAGTCC |
| *AGT* | M235T | rs669 | Exon | 1q42-q43 | C/T | F - ACCTGAAGCAGCCGTTTGT*<br>R - CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC | GAAGACTGGCTGCTCCCTGA |
| *GNB3* | C825T | rs5443 | Exon | 12p13 | C/T | F - CTTGCCCTGGAGCTGTCA*<br>R - CTTCCAGCTGAGGAAGCAG* | ATCATCTGCGGCATCACGTC |
| *GNB3* | G-350A | rs5441 | Região promotora | 12p13 | A/G | F - CTGGACAGATGGGGAACACT*<br>R - CTGACAAATCACAGGCTCCA* | TaqI |
| *NOS3* | Glu298Asp | rs1799983 | Exon | 7q36 | G/T | F - GAAGGCAGGAGACAGTGGAT*<br>R - CAGCAGCATGTTGGACACTG* | CTGCTGCAGGCCCCAGATGA |
| *GRK4* | A486V | rs1801058 | Exon | 4p16 | C/T | F - ACTAAAAGCTGGCGAACCAC*<br>R - TGGAAGGGCAGTACCTCATT* | GGATATCGAGCAGTTCTCGG |

* *Primers* desenhados com o auxílio do *software Primer 3* (Rozen & Skalestsky, 2000).
**O *primer Snupe* corresponde a uma seqüência de 20 pb localizada imediatamente a 5' do SNP, adjacente à substituição.
Informações sobre os SNPs (Gene, SNP, Nº dbSNP e Alelos) em http://www.hypertensiongenetics.org/

### a) Estudo do polimorfismo *ACE* I/D

Determinamos os genótipos do gene *ACE* em relação à presença (I-inserção) ou ausência (D-deleção) da inserção de *Alu*, por meio da técnica de PCR seguida de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Figura 3.3).

### Condições de amplificação

A reação de PCR (*polymerase chain reaction*) foi realizada sob as seguintes condições: volume final de 25 µL, cerca de 100 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP (*Invitrogen*), 10 % do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*), e as amostras foram amplificadas em 32 ciclos (desnaturação a 94 ºC por 1min, hibridação a 58 ºC por 2min e extensão a 72 ºC por 2 min).

É conhecido que existe amplificação preferencial do alelo de menor tamanho (desprovido da inserção) em polimorfismos de inserções de *Alu*. Portanto, para todos os indivíduos que apresentaram como resultado homozigose para a ausência da inserção (genótipo DD) foi realizada uma segunda amplificação para a confirmação do genótipo.

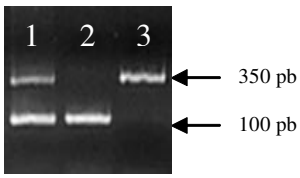



Figura 3.3: Resultados da eletroforese dos produtos de PCR do gene *ACE*. 1 = heterozigoto I/D; 2 = homozigoto D/D para a ausência da inserção de *Alu* e 3 = homozigoto I/I para a presença da inserção de *Alu*.

### b) Estudo dos polimorfismos *NOS3* Glu298Asp, *GNB3* C825T, *AGT* M235T, *ADD2* A/C e *GRK4* A486V

Estes polimorfismos foram estudados por meio da técnica de genotipagem automatizada de SNPs, com a utilização do *MegaBace SNuPe Genotyping Kit* e do analisador genético – *MegaBACE™1000* (*GE Healthcare*), disponível no Centro de Estudos do Genoma Humano, Depto de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP.

**Condições de amplificação**

A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: volume final de 25 µL, cerca de 100 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP (*Invitrogen*), 10 % do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*). Para a amplificação foi utilizada uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94º C por 4min, seguida por 14 ciclos de desnaturação a 94º C por 30s, hibridação por 40s que se inicia a 67º C no 1º ciclo e termina a 60º C no 14º ciclo, e extensão a 72º C por 1min. Depois se seguem mais 24 ciclos de desnaturação a 94º C por 30s, hibridação a 60º C por 40s e extensão a 72º C por 1min.

O produto da PCR (4 µL) foi purificado com 2,5U da enzima *Exonuclease I* e 0,5U da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase*, incubados a 37ºC por 1h e posteriormente submetidos a uma temperatura de 80ºC por 15 min para a inativação das enzimas. Para a reação de *SNuPe* (volume final de 10µL) foram utilizados 4µL de *SNuPe premix* (*GE Healthcare*), 0,2 µM do *primer SNuPe*, 4 µL do produto da PCR já purificado e 1 µL de água estéril. Após a reação de *SNuPe*, os produtos foram novamente purificados com *AutoSeq96 Dye Terminator Clean-up*, segundo instruções do fabricante. 5µL do produto da reação de *SNuPe* purificado foram misturados a 0,02µL de *Multi Injection Marker* e 4,98µL de *Loading Solution*, sendo então carregados no analisador genético *MegaBACE™1000* da *GE Healthcare*. Exemplos de resultados da genotipagem automática estão apresentados nas Figuras 4.3, 5.3, 6.3, 7.3 e 8.3.

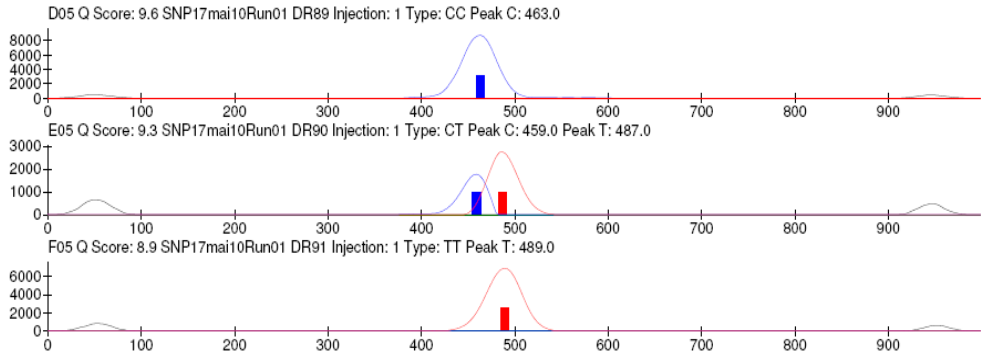



Figura 4.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP M235T no gene *AGT*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. A figura representa os genótipos de três indivíduos – um homozigoto CC, um heterozigoto CT e um homozigoto TT.

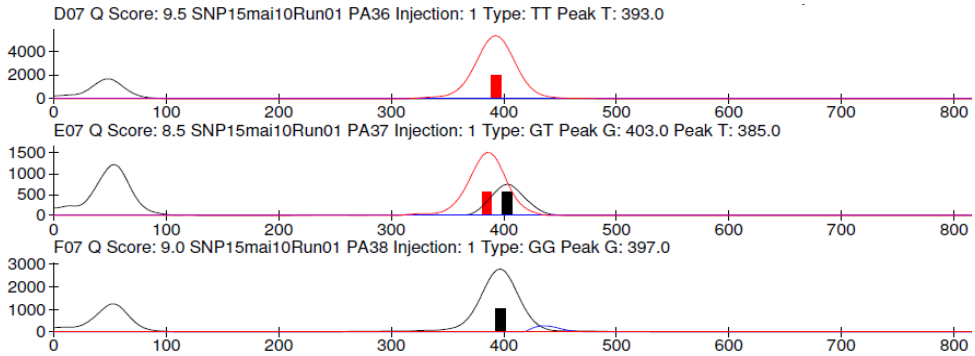



Figura 5.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP Glu298Asp no gene *NOS3*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. A figura representa os genótipos de três indivíduos – um homozigoto TT, um homozigoto GG e um heterozigoto GT.

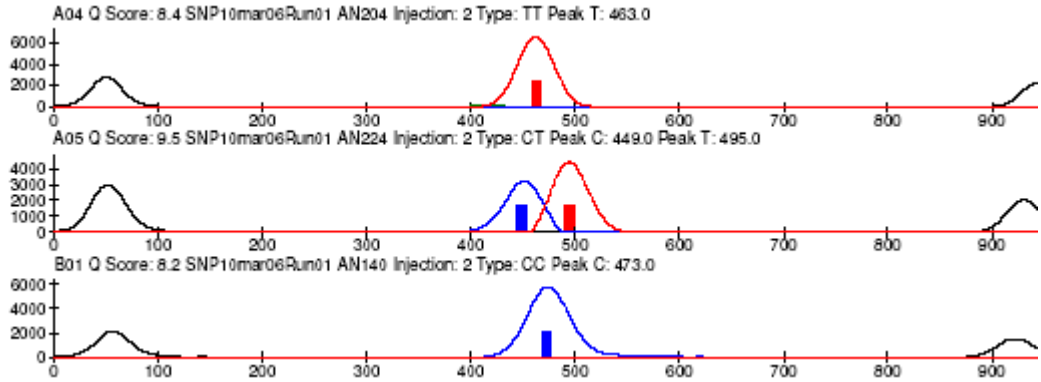



Figura 6.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP C825T no gene *GNB3*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. A figura representa os genótipos de três indivíduos – um homozigoto TT, um heterozigoto CT e um homozigoto CC.

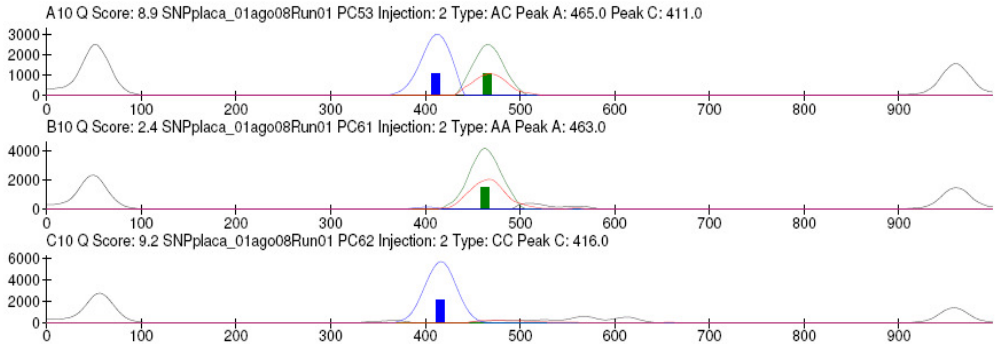



Figura 7.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A/C no gene *ADD2*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. A figura representa os genótipos de três indivíduos – um heterozigoto AC, um homozigoto AA e um homozigoto CC.

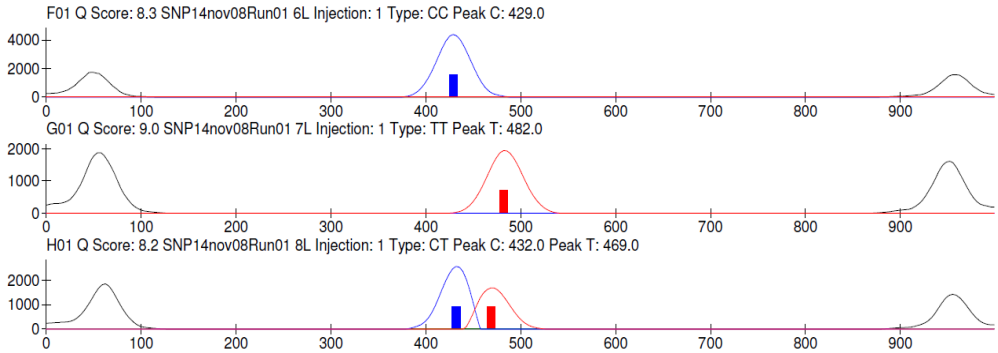



Figura 8.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A486V no gene *GRK4*, realizada com o *MegaBace SNuPe Genotyping Kit*. A figura representa os genótipos de três indivíduos – um homozigoto CC, um homozigoto TT e um heterozigoto CT.

### c) Estudo do polimorfismo *GNB3* G-350A

O polimorfismo G-350A no gene *GNB3* foi estudado por meio de PCR seguida de digestão com endonuclease de restrição.

**Condições de amplificação**

A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: volume final de 25 µL, cerca de 100ng de DNA, 0,2µM de cada *primer*, 200µM de cada dNTP (*Invitrogen*), 10% do volume final de tampão confeccionado no Laboratório de Genética Humana, 1U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*). Para a amplificação foi utilizada uma sequência de ciclos *touch down*, na qual é feita uma desnaturação inicial a 94º C por 4min, seguida por 14 ciclos de desnaturação a 94º C por 30s, hibridação por 40s que se inicia a 67º C no 1º ciclo e termina a 62º C no 14º ciclo, e extensão a 72º C por 1min. Depois se seguem mais 24 ciclos de desnaturação a 94º C por 30s, hibridação a 60º C por 40s e extensão a 72º C por 1min.

O produto da PCR (3µL) foi submetido à digestão com 10U da endonuclease TaqªI (*New England Biolabs*), 1,5µL de tampão da enzima, 1,5µL de BSA 10%, completando com água estéril para um volume final de reação de 15µL. Os produtos da digestão foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata (Figura 9.3).

Figura 9.3: Exemplo de resultado da genotipagem do SNP G-350A no gene *GNB3*. Estão indicados na figura o padrão de peso molecular 100pb e exemplos do padrão de migração de indivíduos homozigotos AA, heterozigotos AG e homozigotos GG em relação a este polimorfismo.

# CAPÍTULO 4

## 4. Estudo de ancestralidade nas populações remanescentes de quilombos

### 4.1. Introdução

A análise da composição genética das populações por meio de marcadores moleculares tem se mostrado importante no estudo da dispersão do homem moderno. Fundamentalmente duas estratégias têm sido utilizadas para reconstruir a história da evolução humana: (a) o estudo da composição genética de populações do passado por meio do DNA de múmias e restos esqueletais, estratégia essa também chamada de arqueologia molecular (Renfrew & Boyle, 2000); (b) o estudo da estrutura genética das populações atuais, buscando nessa estrutura registros de eventos passados.

Os polimorfismos protéicos, hoje chamados clássicos, por muito tempo predominaram no cenário dos estudos sobre a variabilidade genética humana. Os mais difundidos foram os estudos sobre polimorfismos de grupos sanguíneos, de imunoglobulinas e de outras proteínas plasmáticas ou eritrocitárias (Cavalli-Sforza e col., 1996; Cavalli-Sforza, 1998; Cavalli-Sforza & Feldman, 2003); atualmente, apenas os ligados às proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (sistema HLA) ainda são usados, devido ao grau extremo de variabilidade do sistema.

Os estudos com marcadores clássicos, predominantes entre as décadas de 1950 e 1980, mostraram apenas uma pequena parcela da variação genética existente, uma vez que representam apenas a variação resultante de modificações de produtos gênicos primários.

Atualmente, inferências mais precisas sobre a história evolutiva humana são obtidas com o estudo dos polimorfismos de DNA, os quais também são utilizados em estudos filogenéticos (por exemplo, quando se quer agrupar duas ou mais populações em função das suas frequências alélicas, ou seja, de acordo com o seu grau de similaridade genética). Qualquer loco que tenha dois ou mais alelos, que não sejam mantidos na população apenas por mutação, com frequência entre 1% e 99%, é considerado um loco polimórfico (Kendrew, 1994). É importante ressaltar que esse limiar de frequência é arbitrário, existindo outros valores de corte na literatura (por exemplo, alguns autores ainda adotam o nível crítico de 5%). Também é importante ressaltar que o termo alelo, nos dias de hoje, passou a ser comumente empregado para designar qualquer tipo de variação na sequência de bases do DNA.

A vasta maioria dos polimorfismos de DNA em humanos pode ser dividida em dois grupos: aqueles que constituem substituições de um nucleotídeo (os SNPs) e aqueles que constituem inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos (indels). Os indels, por sua vez, podem ser divididos em duas classes: os com múltiplos alelos e os que apresentam

somente dois alelos (Weber e col., 2002). Quase todos os indels multialélicos são repetições em tandem (STRs – *short tandem repeat*). Indels bialélicos variam muito quanto à diferença de tamanho entre seus alelos. Alguns destes são originados pela inserção de retrotransposons, como é o caso dos elementos *Alu* e L1 (Watkins e col., 2001). No entanto, a maior parte dos indels bialélicos possui diferenças de tamanho de apenas alguns poucos nucleotídeos.

A modernização das técnicas de análise de DNA promoveu o surgimento de grandes projetos em escala global, que têm como finalidade reunir a maior quantidade de informações possíveis, numa tentativa de unificar os esforços dos estudos sobre a variabilidade genética do homem, para responder questões sobre as origens do homem moderno, seus padrões de dispersão das populações, o seu grau de diversidade genética inter e intrapopulacional, com eventuais aplicações na área médica. Existem atualmente três projetos importantes que enfatizam o estudo da diversidade genética humana: (1) *The Human Genomic Diversity Project* (HGDP, ou Projeto da Diversidade do Genoma Humano); (2) *The International HapMap Consortium* e (3) *Genographic Project* (Projeto Genográfico), cada um por meio de ferramentas distintas, visando a obtenção de conjuntos de informações genético-populacionais de diversas partes do mundo.

O principal esforço do HGDP foi organizar uma coleção de linhagens celulares linfoblastóides provenientes de populações de diversas partes do mundo. Em 2002, Rosenberg e col. realizaram o primeiro estudo populacional com enfoque bioantropológico utilizando a coleção do HGDP. Analisando um painel de 377 locos de microssatélites autossômicos, encontraram resultados que indicam serem o isolamento geográfico e o efeito de deriva genética importantes fatores determinantes da diversidade genética humana (como já se suspeitava bem antes do início dos estudos moleculares). Por meio destes marcadores, foi possível agrupar as populações em cinco regiões geográficas: América, África Subsaariana, Leste Asiático, Oceania e um grupo composto por Europa, Oriente Médio e Ásia Central. Bastos-Rodrigues e col. (2006) analisaram as mesmas amostras do HGDP, utilizando um painel distinto de marcadores polimórficos, composto por 40 marcadores bialélicos do tipo Indel (inserção/deleção), corroborando em linhas gerais os resultados do estudo de Rosenberg e col. (2002).

O Projeto Internacional do *HapMap* tem como objetivo descrever os padrões da variação do genoma humano pelo método de genotipagem de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*).

O Projeto Genográfico, por sua vez, pretende analisar as amostras de DNA de centenas de milhares de pessoas, por meio de marcadores autossômicos, mitocondriais e do cromossomo Y, com a finalidade de se rastrear a história do povoamento da Terra.

Os estudos genético-populacionais tornaram-se especialmente informativos com o emprego de marcadores polimórficos de DNA, mais numerosos e, em geral, com maior número de variantes alélicas do que os marcadores clássicos. Os diversos marcadores polimórficos de DNA, distribuídos por todo o genoma, podem ser empregados em aplicações forenses (na identificação individual e em testes de paternidade) e no mapeamento de genes de interesse clínico.

Shriver e col. (1997) utilizaram pela primeira vez o termo PSAs (*population-specific alleles*) para descrever os marcadores genéticos com dois ou mais alelos e com grandes diferenças de frequência entre populações geograficamente definidas ($\delta > 50\%$). Os marcadores de DNA do tipo PSAs podem ser bialélicos (inserções de *Alu* e SNPs, por exemplo) ou multialélicos (microssatélites, por exemplo).

O termo PSA foi substituído, recentemente, pelo termo "marcadores informativos de ancestralidade" (*Ancestry Informative Markers* – AIMs), que são definidos como marcadores genéticos que apresentam frequências alélicas com diferenças entre as subpopulações chamadas parentais superiores a 30%, ao invés dos 50% previamente definidos (Bonilla e col., 2004). São considerados excelentes ferramentas para se obter estimativas confiáveis de miscigenação e subestruturação populacional (Luizon e col., 2008).

Cada vez mais os estudos genético-populacionais utilizam marcadores de ancestralidade (AIMs) [Shriver e col., 1997; Parra e col., 1998; Probst e col., 2000; Parra e col., 2001; Parra e col., 2003; Bamshad e col., 2003; Bastos-Rodrigues e col., 2006; Enoch e col., 2006; Luizon e col., 2008; Kosoy e col., 2009; Santos e col., 2010].

Mais recentemente, os marcadores informativos de ancestralidade do tipo INDEL passaram a ser foco de diversas investigações (Weber e col., 2002; Bastos-Rodrigues e col., 2006; Ribeiro-Rodrigues e col., 2009; Santos e col., 2010), uma vez que (a) estão distribuídos ao longo de todos os cromossomos; (b) são marcadores de evolução lenta, pois apresentam baixa taxa de mutação; (c) podem ser analisados por meio de fragmentos (*amplicons*) curtos, o que permite a amplificação de DNA degradada; (d) podem ser identificados por meio de técnicas de genotipagem relativamente simples e de baixo custo (Ribeiro-Rodrigues e col., 2009).

A população brasileira é uma das populações geneticamente mais heterogêneas do mundo, resultando de um intenso processo de miscigenação entre três grupos principais: ameríndios, que povoavam as Américas; europeus, principalmente portugueses, que chegaram ao Brasil a partir de 1500; e africanos, que foram trazidos maciçamente como escravos desde meados do século XVI até o século XIX (Salzano & Bortolini, 2002).

Acredita-se que aproximadamente 2,5 milhões de ameríndios viviam no Brasil na época do descobrimento. Atualmente, existem menos de 300.000, a maior parte habitando áreas protegidas designadas pelo governo. Os europeus, em grande parte portugueses, vieram ao Brasil em busca de riquezas e novas terras; aproximadamente 500.000 homens portugueses chegaram entre 1500 e 1808, a maioria sem suas famílias (Salzano & Freire-Maia, 1970; Ribeiro, 2000). Os africanos foram trazidos como escravos em grande número, a partir de 1550, a maioria vindo de regiões atualmente ocupadas pelo Congo e Angola, e uma pequena parcela de Benin, Nigéria, Senegal e Gâmbia. A partir de 1845 até meados do século XIX, foram trazidos escravos de Moçambique. É estimado que de 1550 até aproximadamente 1870 cerca de 4 milhões de africanos foram introduzidos no Brasil (Klein, 1999; Ribeiro, 2000). Mesmo antes da abolição da escravatura em 1888, muitas comunidades haviam sido fundadas em áreas isoladas por escravos foragidos ou abandonados. Essas comunidades são conhecidas atualmente como remanescentes de quilombos. De acordo com a Fundação Palmares (http://www.palmares.gov.br), 1.289 comunidades afro-brasileiras de quilombos haviam sido registradas até 2008. Pelo fato de permanecerem semi-isoladas, os remanescentes de quilombo podem ser considerados como relíquias da contribuição genética africana para a população brasileira.

Os estudos com marcadores clássicos, realizados predominantemente com populações do nordeste e sudeste do Brasil, já estimaram, com um nível de precisão invejável, o grau de miscigenação da população brasileira, cujo padrão varia de acordo com a região analisada, sendo mais intensa no norte e nordeste e menos acentuada no sudeste e sul, região maciçamente colonizada por famílias européias originárias do Mediterrâneo (Portugal e Espanha) e Europa Central (Itália, Alemanha, Polônia e Rússia) a partir das últimas décadas (Salzano, 1997; Callegari-Jacques & Salzano, 1999; Dornelles e col., 1999; Guerreiro e col., 1999; Salzano, 2002).

Parra e col. (2003) analisaram 10 marcadores PSA (inserções de *Alu* e SNPs) e características morfológicas (cor da pele, forma do nariz, lábios e tipo de cabelo) comumente usadas em definição de raças, em duas populações: uma afro-descendente rural e outra de brancos. O objetivo do trabalho foi verificar se existia correlação entre a cor da pele e alelos considerados específicos de africanos. Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada. Portanto, os dados deste trabalho sugerem que a cor da pele não é um bom preditivo de ancestralidade africana (estimada pelos marcadores moleculares) em populações brasileiras. Outro estudo na mesma linha indica que no Brasil, dado o seu alto grau de miscigenação, a cor da pele nem sempre mostra correlação direta com a ancestralidade (Pimenta e col., 2006).

Vários estudos têm sido conduzidos nos remanescentes de quilombos com a finalidade de avaliar a contribuição de populações parentais na formação dessas comunidades, utilizando-se polimorfismos clássicos (Bortolini e col., 1997; Arpini-Sampaio e col. 1999; Guerreiro e col., 1999), polimorfismos moleculares autossômicos – VNTRs, STRs e inserções de *Alu* (Bortolini e col., 1999; Da Silva e col., 1999; Cayres-Vallinoto e col., 2003, Cotrim e col., 2004; Scliar e col., 2009); DNA mitocondrial (Bortolini e col., 1999; Ribeiro-dos-Santos e col., 2002; Carvalho e col., 2008; Rincon, 2009) e polimorfismos do cromossomo Y (Bortolini e col., 1999; Abe-Sandes e col., 2004; Ribeiro e col., 2009). Esses estudos demonstraram que, dependendo do tipo de marcador genético utilizado, a contribuição genética africana varia de maneira significativa (de 43 a 92%).

No presente trabalho, um painel de 48 AIMs foi usado para estimar a mistura interétnica individual e populacional em indivíduos não aparentados de dez comunidades afro-descendentes do Vale do Ribeira - SP. Todos os marcadores utilizados constituem polimorfismos do tipo INDEL, que representam a inserção (IN) ou a deleção (DEL) de pequenos fragmentos de DNA (entre 3 bp e 40 pb), tendo sido genotipados de acordo com o painel de INDEL descrito por Santos e col. (2010). Os dados também foram utilizados para identificar afinidades genéticas entre as diferentes comunidades remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira, bem como para estimar a diferenciação genética entre eles (Fst), com o intuito de se verificar a história da formação destas comunidades.

### 4.2. Objetivo

Caracterizar as populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira quanto a estimativas de mistura gênica, por meio de um painel de 48 marcadores bialélicos do tipo INDEL, normalmente usados em estudos de ancestralidade.

### 4.3. Amostras e Métodos

Foram genotipados 307 indivíduos não aparentados em primeiro grau, selecionados de 10 populações remanescentes de quilombos: Abobral (42), André Lopes (27), Nhunguara (43), Sapatu (32), Ivaporunduva (52), São Pedro (24), Galvão (11), Pedro Cubas (40), Pilões (27) e Maria Rosa (11).

As sequências dos *primers* utilizados e os respectivos protocolos de amplificação foram detalhados no capítulo 3.

A localização das 10 populações investigadas neste estudo está descrita em De Mello Auricchio e col. (2007) e mostrada na Figura 1.3 do capítulo 3 (pag. 37).

As frequências alélicas e genotípicas em relação ao painel de 48 marcadores bialélicos INDEL foram obtidas por contagem direta. Análises para se verificar se os genótipos seguiam as proporções de *Hardy-Weinberg* e para se determinar o grau de diferenciação genética (Fst) foram realizadas com o programa *Arlequin 3.0 Software Package* (Excoffier e col., 2005). As distâncias genéticas Fst estimadas foram distribuídas em um espaço bi-dimensional utilizando-se o método de escalonamento multidimensional (MDS), por meio do pacote estatístico *SPSS v.13* (*Statistical Package for the Social Science* - Ins. Chicago, IL, USA). Para a estimativa de miscigenação individual e global das populações remanescentes de quilombos, utilizamos o programa *STRUCTURE v.3.2 Software* (http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html), cujo algoritmo básico foi descrito por Pritchard e col. (2000), modificado e ampliado por Falush e col. (2003 e 2007).

### 4.4. Resultados

A representação gráfica ternária da Figura 1.4 mostra a distribuição dos indivíduos em relação à porcentagem estimada de contribuição genética de cada ancestralidade (africana, européia e ameríndia), com cada vértice do triângulo representando uma subpopulação parental. Os indivíduos dos remanescentes de quilombo testados (pontos coloridos – Figura 1.4A e somente amarelos – Figura 1.4B) foram plotados no triângulo de acordo com a classificação bayesiana fornecida pelo algoritmo do programa *STRUCTURE*.

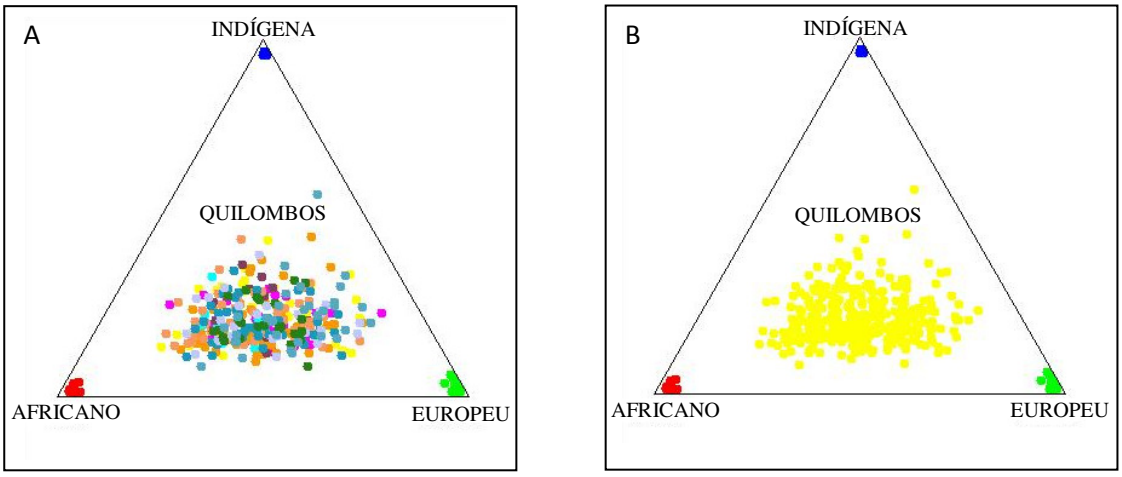



Figura 1.4: Azul = subpopulação parental indígena; vermelho = subpopulação parental africana; verde = subpopulação parental européia; pontos coloridos = cada cor representa uma das 10 populações remanescentes de quilombos individualizadas; amarelo = amostras das 10 populações remanescentes de quilombos analisadas como uma única população. Cada ponto representa um individuo que foi classificado e plotado de acordo com a estimativa de miscigenação individual baseada nos genótipos dos marcadores INDEL.

A Figura 2.4 mostra as estimativas de ancestralidade dos indivíduos das três subpopulações parentais (africana, indigena e européia) e dos indivíduos dos remanescentes de quilombos. A barra horizontal é composta por finas linhas verticais, cada linha representando um indivíduo. Cada indivíduo das três subpopulações parentais (africana - 1, européia - 2 ou ameríndia - 3) foi classificado e plotado no gráfico de acordo com a estimativa de ancestralidade individual, com base no genótipo apresentado em relação aos 48 marcadores do tipo INDEL, classificação essa que foi possível porque as frequências alélicas desses marcadores são distintas nas três subpopulações parentais. O último conjunto de linhas (4-13) representa os indivíduos dos remanescentes de quilombos, mostrando ancestralidade tri-híbrida, ou seja, apresentam componentes genéticos de ancestralidade das três subpopulações parentais, em proporções distintas.

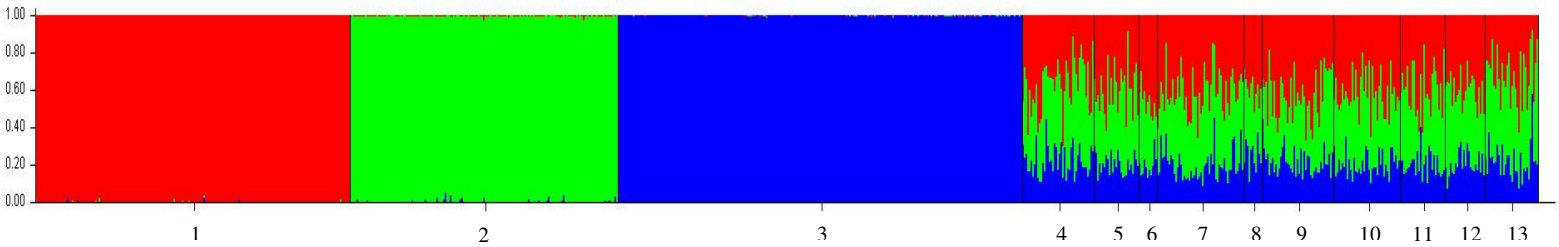



Figura 2.4: Representação gráfica das estimativas de ancestralidade individual das três subpopulações (1) indivíduos da subpopulação parental africana, (2) indíviduos da subpopulação parental européia, (3) indivíduos da subpopulação parental ameríndia e (4-13) os 307 indivíduos dos remanescentes de quilombo genotipados. 4: Abobral; 5: André Lopes; 6: Galvão; 7: Ivaporunduva; 8: Maria Rosa; 9: Nhunguara; 10: Pedro Cubas; 11: Pilões; 12: São Pedro; 13: Sapatu.

A Tabela I.4 mostra as porcentagens de ancestralidade estimadas em cada população e no conjunto das populações de quilombos.

Tabela I.4: Porcentagens da contribuição genética média das três subpopulações (africana, européia e ameríndia) na composição dos remanescentes de quilombos. N = número de indivíduos analisados em cada localidade.

| **Populações quilombolas** | % da contribuição genética | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Africana** | **Européia** | **Ameríndia** | **N** |
| Abobral | 0.369 | 0.408 | 0.224 | 43 |
| André Lopes | 0.395 | 0.400 | 0.204 | 27 |
| Galvão | 0.460 | 0.346 | 0.194 | 11 |
| Ivaporunduva | 0.408 | 0.394 | 0.198 | 52 |
| Maria Rosa | 0.394 | 0.354 | 0.252 | 11 |
| Nhunguara | 0.424 | 0.359 | 0.217 | 43 |
| Pedro Cubas | 0.415 | 0.381 | 0.204 | 40 |
| Pilões | 0.393 | 0.403 | 0.204 | 27 |
| São Pedro | 0.398 | 0.396 | 0.207 | 24 |
| Sapatu | 0.316 | 0.462 | 0.222 | 32 |
| **Total quilombos** | **0.397** | **0.390** | **0.213** | **309** |

Galvão, Ivaporunduva, Nhunguara e Pedro Cubas apresentaram contribuição de material genético de origem africana superior à ameríndia e européia. Abobral, André Lopes, Pilões e Sapatu apresentaram predominância de contribuição genética de origem européia em relação às duas outras ancestralidades. A maior contribuição genética ameríndia foi verificada em Maria Rosa. São Pedro apresenta contribuições praticamente idênticas de material genético de origem africana e européia, cada uma delas representando cerca do dobro da contribuição indígena.

A Tabela II.4 mostra a matriz de distâncias genéticas (Fst) entre todos os pares possíveis das 10 populações remanescentes de quilombos, matriz essa obtida a partir da análise das frequências alélicas dos 48 marcadores do tipo INDEL.

Tabela II.4: Matriz triangular inferior de distâncias genéticas (Fst) entre todos os pares possíveis das populações, em relação ao painel de 48 marcadores INDEL.

| | distancias (FST) entre as populações | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Populações | | | | | | | | | |
| | AN | GA | IV | NH | SP | TU | AB | MR | PC |
| GA | 0,03076 | - | | | | | | | |
| IV | 0,01362 | 0,02098 | - | | | | | | |
| NH | 0,00620 | 0,02438 | 0,01730 | - | | | | | |
| SP | 0,00763 | 0,00738 | 0,00757 | 0,00811 | - | | | | |
| TU | 0,01674 | 0,04461 | 0,02113 | 0,02116 | 0,02092 | - | | | |
| AB | 0,00829 | 0,02279 | 0,00276 | 0,01030 | 0,01313 | 0,01352 | - | | |
| MR | 0,03212 | 0,03409 | 0,02959 | 0,02923 | 0,02965 | 0,03557 | 0,01437 | - | |
| PC | 0,01506 | 0,02177 | 0,00916 | 0,01006 | 0,01546 | 0,01748 | 0,00226 | 0,02453 | - |
| PS | 0,01824 | 0,03779 | 0,02590 | 0,01596 | 0,01344 | 0,01886 | 0,01858 | 0,03051 | 0,0193 |

A Figura 3.4, obtida por escalonamento multidimensional, mostra em duas dimensões, as distâncias genéticas entre as populações estudadas, num gráfico construído a partir das distâncias Fst entre os pares possíveis de populações.

A análise do índice Fst indicou que as dez populações estudadas, geograficamente muito próximas, apresentam um baixo grau de diferenciação genética, pois nenhum dos valores de Fst encontrados mostrou-se superior a 5%.

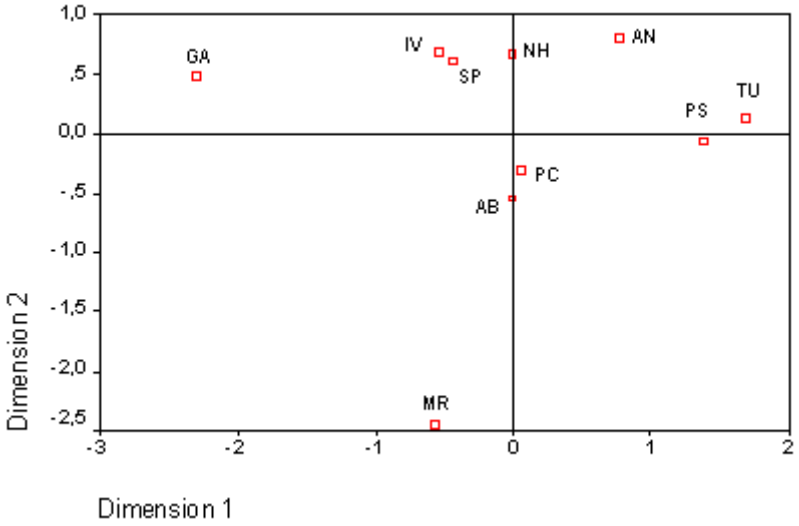



Figura 3.4: Distâncias genéticas em duas dimensões entre as 10 populações estudadas, baseadas nos valores de Fst, obtidas por escalonamento multidimensional. GA: Galvão. IV: Ivaporunduva. SP: São Pedro. NH: Nhunguara. AN: André Lopes. PS: Pilões. TU: Sapatu. AB: Abobral. PC: Pedro Cubas. MR: Maria Rosa.

### 4.5. Discussão

A Figura 1.4 indica que os indivíduos das dez populações remanescentes de quilombos apresentam uma composição genética tri-híbrida (Tabela I.4), com contribuições africana e européia superiores à ameríndia. A Figura 2.4 indica presença de uma grande heterogeneidade quanto a composição ancestral individual dos remanescentes de quilombos. As proporções de ancestralidade africana variaram entre os indivíduos de 7,3 % a 69,5%, a européia de 12,9% a 68,3% e a ameríndia, de 7,3% a 58,5%.

Nossos resultados revelaram uma contribuição genética média similar européia e africana (39,0% e 39,7%, respectivamente) na formação das populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira (Tabela I.4). A contribuição ameríndia média foi estimada em apenas 21,3%. A significativa proporção de material genético de origem européia evidenciada pelos marcadores INDEL demonstra a importância histórica da contribuição européia para a formação dessas comunidades. Resultados previamente obtidos por meio do estudo das inserções de *Alu* mostraram que as contribuições africana e européia foram mais expressivas (médias de aproximadamente 40% e 50%, respectivamente), e em todas as populações analisadas, a contribuição ameríndia foi pequena (cerca de 12% em média) [Cotrim e col., 2004]. Nesse estudo, a contribuição européia estimada foi maior do que a contribuição estimada pelos marcadores INDEL, e a contribuição ameríndia foi menor do que a estimada pelos INDEL. É provável que os marcadores INDEL investigados, em maior número, sejam mais eficientes que os marcadores anteriormente usados, para se detectar taxas confiáveis da contribuição de ancestralidade, principalmente a indígena.

Outros estudos conduzidos pelo nosso grupo foram realizados com a finalidade de se investigar a mistura étnica existente nas mesmas populações, utilizando-se marcadores distintos: do cromossomo Y, que possibilitam a análise de patrilinhagens e do DNA mitocondrial (análise de matrilinhagens). Os estudos com o cromossomo Y (Macedo-Souza, 2003; Kimura e col., 2010 – Anexo I) revelaram uma contribuição de cromossomos Y de origem predominantemente européia (60%) na composição dos remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira, seguida pela africana (35%). Apenas uma pequena parcela dos cromossomos Y mostrou-se de origem ameríndia (5%). Já o estudo do DNA mitocondrial (Rincon, 2009) revelou um panorama distinto, onde a contribuição genética indígena na composição dos remanescentes de quilombo é muito expressiva, chegando a ser predominante em algumas comunidades (78% em Galvão e 75% em São Pedro, por exemplo). Os resultados globais obtidos nas comunidades remanescentes de quilombos indicam alta frequência de DNA mitocondrial ameríndio (50%) e africano (48%) e uma presença reduzida de contribuição européia (da ordem de 1% a 2%). Esses resultados são de certa maneira semelhantes aos obtidos por Alves-Silva e col., (2000) com o estudo do

DNA mitocondrial, e Carvalho-Silva e col., (2001) com o estudo do cromossomo Y, em populações brasileiras predominantemente caucasóides de centros urbanos, cujos resultados ilustram um retrato da assimetria entre as contribuições genética masculina de origem européia, e feminina de origens ameríndia e africana (quadro grosseiramente semelhante ao encontrado nos remanescentes de quilombos).

Foi possível destacar o importante papel da mulher indígena e africana na fixação e estabelecimento das comunidades quilombolas, evidenciado pela grande contribuição de material genético mitocondrial dessas duas origens. Esses dados são corroborados agora pela detecção de uma contribuição média de 21,3% de ancestralidade ameríndia pelos marcadores INDEL.

Duas são as possíveis explicações para a expressiva contribuição européia nos remanescentes de quilombos: parte dos escravos que constituíram os quilombos já era descendente de europeus ou, na manutenção das comunidades quilombolas, a miscigenação com europeus continuou ocorrendo. Essas duas hipóteses não são mutuamente exclusivas. Os escravos negros homens, muitas vezes mestiços filhos do senhor branco com sua escrava negra, estavam submetidos a cargas de trabalho bem mais penosas do que as mulheres, o que poderia incitar mais a fuga de homens do que de mulheres; se os quilombos tinham poucas mulheres africanas, provavelmente o homem africano se uniu às nativas, aprendendo a usufruir dos recursos locais para sua sobrevivência, fato esse que acabou se refletindo na composição genética atual dos remanescentes de quilombos.

De um modo geral, as dez populações analisadas apresentam um grau baixo de diferenciação genética, fator evidenciado pelos valores de Fst encontrados quando as populações são comparadas duas a duas.

As análises de distância genética e escalonamento multidimensional (Figura 3.4) não agrupam Galvão (GA) e São Pedro (SP) como o esperado pelos relatos e registros, pois de acordo com o Instituto Sócio-Ambiental (em parceria com o Instituto de Terras de São Paulo), um dos fundadores de São Pedro seria Bernardo Furquim, um escravo fugido da região de Campinas, que havia se casado com duas mulheres e teve 24 filhos que se estabeleceram na região, inclusive nas outras comunidades. Iniciou-se um processo de povoamento da região onde se localiza as comunidades de Galvão e São Pedro. Bernardo Furquim teria chegado por volta de 1830 às terras de Pedro Cubas e Ivaporunduva. A formação de Galvão está estreitamente relacionada a de São Pedro, pois ambas se originam do mesmo grupo de parentesco que tem como fundador Bernardo Furquim. (Agenda Socioambiental - ISA, 2008).

As análises agrupam Ivaporunduva (IV), São Pedro (SP) e Nhunguara (NH) proximamente. A ocupação das terras de Nhunguara está relacionada à expansão de grupos ao entorno, como Ivaporunduva e São Pedro. Infere-se que São Pedro e Ivaporunduva são importantes na consolidação da ocupação negra no Vale do Ribeira, uma vez que disponibilizaram mulheres que possibilitaram a fixação de negros foragidos (Oliveira Jr e col., 2000). Os principais troncos familiares que deram origem à Nhunguara foram os Maia, os Vieira (que acabaram se deslocando para São Pedro) e os Dias (que têm origem nas terras de Ivaporunduva). André Lopes (AN), que também aparece relativamente próxima a esse agrupamento, tem sua história entrelaçada a da comunidade de Nhunguara, pois compartilham estreitas relações sociais e de parentesco. A ocupação de André Lopes também se deu a partir de expansões de grupos negros estabelecidos no entorno de Ivaporunduva, São Pedro e Nhunguara. Sapatu foi formada por negros que fugiram do recrutamento forçado na Guerra do Paraguai e pelo estabelecimento de famílias vindas de outras comunidades, como é o caso de Júlio Furquim, um dos netos de Bernardo Furquim, que veio da comunidade de São Pedro (Agenda Socioambiental - ISA, 2008). Apesar disso, Sapatu (TU) não se agrupa com São Pedro e Galvão.

Maria Rosa (MR) e Pilões (PS), apesar de geograficamente próximas, também não se agrupam de acordo com os marcadores utilizados (Figura 2.4). Segundo um relato de Pedro Rodrigues, umas das lideranças de Pilões, em 1678 aproximadamente, um casal (senhor Lino e dona Quentim) já morava na região. A ocupação de Pilões passou por dois ciclos econômicos: o do ouro e o da cultura de arroz e cana-de-açúcar. Pedro menciona ainda a existência de escravos na Fazenda Santana, localizada próxima a Pilões. Maria Rosa encontra-se praticamente em frente a Pilões. Benedita Dias da Costa, moradora da comunidade de Maria Rosa, diz que quando sua bisavó se casou, já encontrou a localidade ocupada por negros, tendo ela se casado com um desses moradores (Oliveira Jr e col., 2000).

Até o momento, não encontramos registros detalhados sobre as origens da comunidade de Abobral. Segundo uma ficha de caracterização da comunidade feita pelo ITESP, a família de Frutuoso Honorato Costa e Pedro Alexandre Castelo (este já falecido) já estava estabelecida na região há pelo menos três gerações. Não há fato conhecido que justifique, em princípio, o agrupamento de Abobral (AB) com Pedro Cubas (PC).

Uma possível explicação para o fato de não observarmos agrupamentos genéticos concordantes com os registros e relatos de formação das comunidades seria devido às amostras analisadas não serem representativas dos núcleos familiares que constituem os verdadeiros elos de parentesco entre as comunidades. Ainda é possível que eventos recentes de "gargalo", decorrentes da significativa redução do tamanho populacional, tenham influenciado os nossos resultados, como é o caso de Maria Rosa e Pilões. Em 1998,

Pilões tinha 250 habitantes e Maria Rosa registrava 140 habitantes. No entanto, em 2001, essas populações apresentavam apenas 128 e 56 habitantes respectivamente (Oliveira Jr. e col., 2000). Uma vez que os valores de Fst encontrados são de fato muito pequenos, não ultrapassando 5%, essa tentativa de agrupamento entre as populações pode ser parcialmente artificial. Os dados indicam ainda que, de modo geral, existe um intenso fluxo gênico entre todas as populações estudadas.

### 4.6. Conclusões

Os marcadores de ancestralidade autossômicos do tipo INDEL constituem evidências genéticas que corroboram as evidências históricas de tripla miscigenação (européia, africana e ameríndia) na formação e manutenção das populações afro-descendentes do Vale do Ribeira. Os baixos índices Fst mostram ainda que as 10 populações estudadas são muito semelhantes sob o ponto de vista genético, fenômeno que deve ser consequência de intenso fluxo gênico (migrações) entre elas.

# CAPÍTULO 5

## 5. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos: estudo transversal

### 5.1. Introdução

Mais de um quarto da população mundial adulta tem hipertensão essencial. Na América do Norte, aproximadamente um em cada três adultos tem hipertensão arterial (Arora & Newton-Che, 2010). No entanto, as estimativas sobre a ocorrência da hipertensão arterial não são as mesmas em todas as populações. Nos Estados Unidos, por exemplo, a hipertensão arterial se manifesta mais precocemente, é mais frequente e mais grave entre pessoas afro-descendentes do que entre pessoas de origem européia (Young e col., 2005).

Estudos recentes mostram que a hipertensão essencial pode apresentar prevalências elevadas, tanto em populações urbanas como em populações rurais, um quadro epidemiológico completamente distinto de décadas atrás (Thorogood e col., 2007; Kengne e col., 2007; Oladapo e col., 2010).

Estudos brasileiros realizados entre 1980 e 2001 observaram prevalências de hipertensão arterial entre 10% e 42%, dependendo da região, sub-grupo e critério diagnóstico utilizado (Lessa, 2001). Ainda não se tem um consenso no que diz respeito à prevalência da hipertensão no Brasil, porém trabalhos das décadas de 1950 e 1960 trouxeram à tona a natureza complexa e potencialmente poligênica da hipertensão essencial e da regulação da pressão arterial (revisão em Ehret, 2010). O papel de um grande número de genes candidatos tem sido avaliado desde então em estudos de associação. Os genes candidatos para os estudos de associação com a hipertensão essencial são selecionados por estarem envolvidos em vias regulatórias da pressão arterial. Por exemplo, genes relacionados ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) ou ao transporte renal de sódio são os mais explorados (Rafiq e col., 2010).

A hipertensão essencial tem herdabilidade média estimada em pelo menos 30% (revisão em Ehret, 2010), o que dá suporte à busca pelo conhecimento das bases genéticas da doença.

Contudo, inúmeros fatores podem contribuir para a complexidade e manifestação da hipertensão essencial. Dentre esses se destacam a ancestralidade, faixa etária, gênero e fatores ambientais (tais como sedentarismo, tabagismo, entre outros). Além disso, a hipertensão essencial é uma doença de manifestação tardia e um fenótipo tipicamente heterogêneo, cuja manifestação é supostamente ocasionada pela ação de múltiplas variantes genéticas com efeitos pequenos. Em conjunto, essas características afetam fortemente o poder estatístico dos estudos de associação, sejam eles com base familiar ou com base em

indivíduos não aparentados, fazendo da pesquisa das bases genéticas da hipertensão essencial um desafio na prática (Pereira e col., 2003).

O número total de alelos e genes que contribuem para a elevação da pressão arterial ainda é desconhecido. Apesar de não se saberem quantos genes influenciam a regulação da pressão arterial, a vasta literatura sobre genes da hipertensão essencial indica que alelos de muitos locos contribuem para o fenótipo final, e as combinações desses alelos podem variar de indivíduo para indivíduo.

Frequentemente, as associações relatadas em estudos iniciais não apresentam reprodutibilidade (revisões em Kato e col., 1999; Zintzaras e col., 2006; Pereira e col., 2007; Ji e col., 2010). Esses achados controvertidos podem ser explicados, em parte, devido à heterogeneidade ambiental entre as diversas populações estudadas. Ademais, o fato de resultados dos estudos de associação não serem replicados ou validados em diferentes populações também pode refletir arquiteturas genéticas diferentes na qual as interações gene-gene são mais regra do que exceção, e os efeitos das variantes em estudo podem estar camuflados pelos efeitos das variantes que não estão sendo analisadas (Gu e col., 2006). De fato, é possível que certos genes tenham seu efeito mais pronunciado em certos grupos populacionais. Ou ainda, a falta de reprodutibilidade dos resultados pode ser reflexo de associações espúrias resultantes da presença de estratificação populacional entre as amostras dos grupos caso e controle (Pritchard & Rosenberg, 1999). Para os estudos caso-controle, talvez o tipo de estudo mais difundido até o momento, é essencial que os indivíduos do grupo caso sejam provenientes da mesma população que os indivíduos do grupo controle, ou seja, que ambos apresentem o mesmo *background* genético. As frequências alélicas dos polimorfismos investigados podem ser diferentes entre os grupos populacionais, o que pode gerar artefatos estatísticos e levar a achados espúrios de associação.

A grande prevalência de hipertensão essencial em populações afro-descendentes tem gerado especulações a respeito da possibilidade de existirem peculiaridades genéticas nesses grupos que determinam maior susceptibilidade à hipertensão. Diversos estudos constataram que a hipertensão arterial tem maior incidência em populações negras do que em outros grupos populacionais (Caufield e col., 1995; Cooper e Rotimi, 1997; Chobanian e col., 2003; revisão em Agyemang & Bhopal., 2003; Swift e MacGregor, 2004; Young e col., 2005).

Os remanescentes de quilombos caracterizam-se como populações de ancestralidade majoritariamente africana e que vivem atualmente em áreas outrora ocupadas por escravos negros fugidos, alforriados ou abandonados. Nos dias atuais, seu modo de vida tradicionalmente rural vem sofrendo transformações devido às imposições

de leis ambientais que dificultam sua agricultura de subsistência, a caça e a criação de certos animais. Os remanescentes de quilombos passam pelo processo denominado transição epidemiológica, que dá espaço ao aumento da incidência de doenças do mundo industrializado, como a hipertensão essencial. Nossas investigações clínicas preliminares indicaram que esse é um dos problemas de saúde mais frequentes entre os adultos das comunidades de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.

Por meio de um estudo transversal, investigamos nas populações afro-descendentes do Vale do Ribeira a associação entre polimorfismos em genes candidatos previamente conhecidos e a hipertensão essencial.

## 5.2. Objetivos

São os objetivos desse capítulo:

- Caracterizar as populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeiro em relação à ocorrência da pressão arterial elevada.
- Utilizar resultados de estimativas de ancestralidade individual para verificar se existe estratificação populacional em uma sub-amostra de hipertensos e normotensos das populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.
- Investigar a associação entre sete polimorfismos em seis genes candidatos e a hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.

## 5.3. Amostras e métodos

### 5.3.1. Amostras e determinação dos genótipos

Nossa casuística foi composta por 759 indivíduos das doze populações remanescentes de quilombos, que foram selecionados segundo os critérios estabelecidos no item 3.1 do capítulo 3, a fim de se manter as características de ancestralidade quilombola da amostra.

Os 759 indivíduos foram genotipados em relação a sete polimorfismos (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) em seis genes candidatos: *ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* e *GRK4* (Tabela I.5), de acordo com os protocolos descritos no capítulo 3.

Tabela I.5: Genes candidatos selecionados e vias de atuação na regulação da pressão arterial.

| Gene e via | Polimorfismo |
|---|---|
| **Sistema renina-angiotensina-aldosterona** | |
| *ACE* (*angiotensin-converting enzyme*) | I/D (rs1799752) |
| *AGT* (*angiotensinogen*) | M235T (rs669) |
| **Equilíbrio de sódio e homeostase do volume sanguíneo** | |
| *ADD2* (*β-Adducin*) | A/C (rs3755351) |
| **Sistema endotelial** | |
| *NOS3* (*nitric oxide synthase endothelial*) | Glu298Asp (rs1799983) |
| **Transdução de sinais intracelulares** | |
| *GNB3* (*G protein β3 subunit*) | C825T (rs5443)<br>G-350A (rs5441) |
| **Sistema dopaminérgico e equilíbrio de íons** | |
| *GRK4* (*G protein-coupled receptor kinase 4*) | A486V (rs1801058) |

### 5.3.2. Caracterização clínica e antropométrica

A amostra de 759 indivíduos foi dividida por gênero (homens e mulheres). As médias e medianas dos parâmetros idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC = peso Kg/altura$^2$ m), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), circunferências da cintura (Cc) e do quadril (Cq) e razão cintura-quadril (RCQ = Cc / Cq) foram comparadas por meio do teste t de *Student* com o ajuste de *Welch* para heterocedasticidade de variâncias. O grau de atividade física (GAF), por se tratar de uma variável com distribuição assimétrica, foi comparado entre os grupos pelo teste U de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. O teste t e o teste de *Mann-Whitney* foram realizados por meio do pacote estatístico *SPSS v.13* (*Statistical Package for the Social Science* - Ins. Chicago, IL, USA).

### 5.3.3. Influência das variáveis clínicas e antropométricas sobre a pressão arterial e a hipertensão

Para avaliarmos quais variáveis clínicas explicam as variações da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), realizamos análises de regressão linear múltipla pelo método *backward*. Excluímos dessa análise os indivíduos que faziam uso de fármacos anti-hipertensivos; incluímos, portanto, 624 indivíduos nas análises.

Com a finalidade de averiguarmos os efeitos dos parâmetros clínicos e antropométricos no *status* da pressão arterial (hipertenso ou normotenso), realizamos uma análise de regressão logística também pelo método *backward*. Nessa análise foram incluídos todos os 759 indivíduos da casuística.

As covariáveis IMC, circunferência da cintura e a razão cintura-quadril foram incluídas em três modelos de análise distintos, por serem intimamente relacionadas umas com as outras. As variáveis independentes idade, gênero e GAF foram incluídas nos três

modelos de regressão linear e logística. Foram considerados significativos resultados com $P < 0,05$.

As análises de regressão linear e logística foram realizadas por meio do pacote estatístico *SPSS v.13* (*Statistical Package for the Social Science* - Ins. Chicago, IL, USA).

### 5.3.4. Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

A aderência das proporções genotípicas observadas àquelas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada pelo método exato (Guo & Thompson, 1992) por meio do *Stata 8.0 software* (*College Station*, TX).

### 5.3.5. Análise da presença de estratificação populacional

Um sub-grupo 307 indivíduos aleatoriamente amostrado do grupo de 759 pessoas foi genotipado em relação a um painel de 48 marcadores do tipo INDEL (ver capítulo 3). Dessa sub-amostra, nem todos os indivíduos tinham dados completos sobre a pressão arterial e uso de medicamentos anti-hipertensivos, portanto, incluímos apenas 288 amostras nas análises.

Para verificarmos se os grupos dos indivíduos hipertensos e normotensos não diferiam em relação às estimativas de ancestralidade, comparamos as estimativas de ancestralidade africana, européia e ameríndia entre os dois grupos por meio do teste de *Mann-Whitney*, para variáveis não paramétricas, utilizando o pacote estatístico *SPSS v.13* (*Statistical Package for the Social Science* - Ins. Chicago, IL, USA).

### 5.3.6. Estudos de associação

#### 5.3.6.1. Definição dos grupos hipertensos e normotensos

Foram considerados hipertensos aqueles indivíduos que apresentaram média das duas medidas da pressão sistólica superior ou igual a 140mmHg e/ou média das duas medidas da pressão diastólica superior ou igual a 90mmHg. Também foram considerados hipertensos aqueles que haviam sido diagnosticados anteriormente como hipertensos e faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos, mesmo que a média das medidas de pressão apresentassem valores inferiores a 140/90mmHg (critério recomendado pela OMS - Organização Mundial da Saúde). Os demais indivíduos foram considerados, portanto, normotensos.

Além do critério OMS, adotou-se um critério que define como hipertensos os indivíduos com PAS $\geq$ 160mmHg e/ou PAD $\geq$ 95mmHg, ou fazendo uso de medicamentos anti-hipertensivos, que inclui primariamente indivíduos em estágios mais

graves da hipertensão essencial (estágios 2 e 3, ou hipertensão sistólica isolada moderada a grave). Este fenótipo comensura com os critérios do JNC (*Joint National Commitee on detection, evaluation and treatment of high blood pressure*), permitindo uma comparação direta com os achados de estudos prévios mais antigos (Dong e col., 1999; Larson e col., 2000).

### 5.3.6.2. Desenho do estudo

Selecionamos 385 indivíduos não aparentados em primeiro grau da amostra de 759 indivíduos incluídos no estudo. Realizamos um estudo transversal com quatro abordagens distintas: (i) avaliando o efeito individual dos polimorfismos no risco da hipertensão essencial e (ii) na variação da pressão sanguínea (i.e. a pressão arterial como um fenótipo contínuo); (iii) avaliando os efeitos dos haplótipos no gene *GNB3* no risco da hipertensão essencial e na variação da pressão arterial; e (iv) avaliando os efeitos multilocos de interação gene-gene sobre o risco da hipertensão essencial.

#### i. Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos no risco de hipertensão essencial

A primeira etapa da análise estatística consistiu em analisar os efeitos dos marcadores genéticos de modo individual. Para esse fim, a estatística MAX foi utilizada. Segundo Gonzalez e col. (2008), a estatística MAX nada mais é do que o maior valor do $\chi^2$ do efeito da variante quando múltiplos modelos são ajustados para diferentes modos de herança genética. Dada a incerteza sobre o verdadeiro modo de ação das variantes estudadas, a lógica desse teste é avaliar todos os possíveis modelos genéticos plausíveis, onde o resultado final será a estatística mais significativa das estatísticas observadas. No presente trabalho, os modelos dominante, aditivo e recessivo foram testados. O modelo aditivo foi computado assumindo um efeito log-aditivo (i.e. um modelo multiplicativo na escala *odds ratio*), A estatística MAX, assim, é dada como o max ($\chi^2_{rec}, \chi^2_{add}\ \chi^2_{domi}$) (leia-se o máximo de), onde $\chi^2 = z^2$. Z é a estatística normal padrão do efeito do marcador genético oriunda de um modelo de regressão logística ajustado para potenciais fatores de confusão, tais como idade, gênero e índice de massa corporal. Como o ajuste de múltiplos modelos a partir dos mesmos dados aumenta a probabilidade do erro do tipo-I (i.e. falsos-positivo), o erro do tipo I foi mantido constante em 5% pela construção de uma distribuição nula da estatística MAX no banco de dados para cada marcador. Foram utilizadas 5000 permutações do *status* dos indivíduos (1= caso, 0=controle). As codificações para os genótipos homozigotos para o alelo tipo selvagens, heterozigotos e

homozigotos para o alelo de risco foram: 0, 0 e 1 para o modelo recessivo; 0, 1 e 2 para o modelo log-aditivo e 0, 1 e 1 para o modelo dominante.

**ii. Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos na variação da pressão sanguínea**

Diferentemente da seção anterior, essa etapa levou em consideração a pressão sangüínea como uma variável continua. Nessa etapa, foram utilizadas duas abordagens: análise de variância de uma via (ANOVA) e regressão linear múltipla. Enquanto a ANOVA é uma abordagem livre de premissas do modelo genético (i.e. não faz qualquer suposição sobre o modelo genético), a regressão múltipla requer a suposição de um modelo genético. A estatística MAX foi utilizada como mencionado anteriormente, exceto pela diferença de que a variável dependente (i.e. PAS ou PAD) é contínua. Além disso, o modelo aditivo é ajustado assumindo um efeito linear aditivo, enquanto a estatística MAX é dada pelo max ($t_{\text{rec}}, t_{\text{add}}\ t_{\text{domi}}$), onde $t$ é a estatística $t$ de *Student*. O efeito do marcador genético oriunda de um modelo de regressão linear ajustado para potenciais fatores de confusão

**iii. Avaliação de efeitos haplotípicos no risco da hipertensão essencial e na variação da pressão sanguínea**

Foram estimadas as frequências haplotípicas dos marcadores C825T e G-350A no *GNB3* por técnicas de máxima verossimilhança (Tregouet e col., 2004).

Uma vez estimadas, essas frequências foram comparadas entre hipertensos e normotensos e seus efeitos investigados em relação à pressão sanguínea como fenótipo contínuo e no risco de desenvolvimento de hipertensão. Nessas análises, as inferências de um melhor ajuste dos modelos alternativos (i.e. presença de desequilibro de ligação e efeitos haplotípicos aditivos significativos no fenótipo) foram realizadas por testes de razão de verossimilhança em um procedimento em dois estágios. No primeiro estágio, para cada hipótese de interesse um modelo completo (*full*) ajustado para variáveis de confusão bem como os efeitos haplotípicos (modelo 1: alternativo) foi construído. Então, um modelo aninhado (modelo 0: nulo) sem efeitos foi ajustado. A hipótese de um melhor ajuste do modelo alternativo foi testada pelo teste de razão de máxima verossimilhança que assume a seguinte forma: $\Delta = 2(l_1 - l_0)$, onde $l_1$ e $l_0$ são os logaritmos naturais das verossimilhanças no modelo alternativo e nulo, respectivamente. $\Delta$ tem aproximadamente uma distribuição do $\chi^2$ com $n$ graus de liberdade (gl), onde $n$ é o número de gl do modelo alternativo menos o número de gl do modelo nulo. Os efeitos de cada haplótipo nos fenótipos (sejam eles binários ou contínuos) foram estimados por modelos de

regressão com parametrizações apropriadas para haplótipos como discutido previamente (Tregouet e col., 2004) sempre ajustados para fatores de confusão. O haplótipo T825/G-350 serviu como haplótipo de referência (basal).

As análises estatísticas foram realizadas por meio do THESIAS 3.1 *software* (http://genecanvas.ecgene.net/).

**iv. Avaliação dos efeitos multilocos**

Para avaliar possíveis efeitos de interação gene-gene no risco de desenvolver a hipertensão essencial, foi aplicado o método de redução de dimensionalidade generalizada.

*Redução de dimensionalidade de múltiplos fatores generalizada (GMDR)*

**Princípios da GMDR: MDR**

O entendimento da lógica da GMDR é facilitado pela discussão dos princípios da MDR, um caso particular de redução de dimensionalidade de múltiplos fatores.

A MDR (do inglês, *multifactor dimensionality reduction)* é uma técnica de *mineração de dados*, e objetiva prospectar possíveis interações aditivas ou multiplicativas entre os *n* loci estudados. Introduzida em 2001 por Ricthie e col., a MDR é um método não-paramétrico que reduz o espaço *n* dimensional em uma dimensão com dois níveis: *alto* e *baixo* risco, respectivamente. Em resumo, a lógica da técnica é prospectar qual(is) combinação(ções) de variáveis categóricas (por exemplo, genótipos, fatores ambientais) discriminam com maior acurácia indivíduos afetados (*alto risco*) dos indivíduos não afetados (*baixo risco*). O processo da MDR geralmente inicia-se com a divisão aleatória de um conjunto de dados em duas partes; uma de treinamento (geralmente 90% dos dados) e uma de teste (geralmente 10% dos dados). Na parte que contém 90% dos dados, o algoritmo de classificação é treinado, enquanto a eficiência desse classificador será avaliada na porção independente de teste (os 10% restantes dos dados).

De acordo com Ritchie *et al.* (2001), as principais etapas da MDR são as seguintes:

(1) A razão entre casos e controles é computada, isto é, $\pi = \frac{casos}{controles}$.

(2) Divisão dos dados em teste e treino.

(3) Enumeração de todas as $2^n$-1 possíveis combinações dos locos avaliados.

(4) Com a porção de treinamento, dentro de cada combinação de locos, todos os possíveis compósitos genotípicos são formados, e o número de indivíduos casos e controles é computado dentro de cada combinação. Se a $\pi$ para o i-ésimo compósito

genotípico for maior ou igual ao $\pi$ observado para todo o banco de dados, a combinação é classificada como de alto risco, ou baixo risco caso contrário.

(5) Todos os compósitos genotípicos de alto risco são combinados, e recebem o atributo 1 (isto é, o algoritmo prediz indivíduos portadores desses genótipos como *afetados*), ao passo que todos os indivíduos com compósitos genotípicos de baixo risco são classificados como *não afetados*. (6) Com base no verdadeiro *status* dos indivíduos e em seu *status* predito pelo modelo, uma matriz de confusão ou tabela 2x2 de diagnóstico é formada. Estatísticas de tabelas de contingência (por exemplo, acurácia de classificação, isto é, a porcentagem total de indivíduos corretamente classificados) são usadas para testar a eficiência do modelo. (7) Dentre todas as possíveis $2^n$-1 combinações de loci, são selecionadas as *j* melhores combinações de loci para *n* igual a 1, 2, 3, 4, e assim por diante. A melhor combinação dentro de cada categoria é aquela de melhor desempenho na predição do *status* verdadeiro dos indivíduos analisados. (8) Para cada uma das *j* melhores combinações de loci, o modelo aprendido na fase de treino é aplicado na porção de teste, e uma nova estatística de acurácia é calculada. (9) Todo esse processo é repetido 10 vezes com divisões aleatórias, mas diferentes, para reduzir a probabilidade de resultados espúrios. (10) Uma média é computada a partir das 10 estatísticas de acurácia de treinamento e das 10 estatísticas de acurácia de teste. (11) Em cada uma das 10 repetições, o melhor modelo dentro de cada categoria de *n* loci ($n$ = 1,2,...,n-1) é anotado, e o número de vezes que cada combinação de loci é considerada como a que melhor define a consistência da validação cruzada. A inferência estatística é efetuada com base na estatística de acurácia de teste por meio da construção de uma distribuição nula por técnicas de re-amostragem (por exemplo, permutação ou *bootstrap*). Nesse capítulo, a distribuição nula foi construída por meio de 5000 permutações do verdadeiro *status* (1= hipertenso, 0 = normotenso) dos indivíduos.

## 5.4. Resultados

### Caracterização clínica e antropométrica da amostra total

A Tabela II.5 resume os resultados da análise estatística descritiva do universo de 759 indivíduos incluídos no estudo, divididos de acordo com o gênero, das doze populações de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.

Tabela II.5: Dados demográficos e antropométricos na amostra de 759 indivíduos do Vale do Ribeira de acordo com o gênero.

| Parâmetros | Mulheres | | | | Homens | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N** | **Média** | **Mediana** | **DP** | **N** | **Média** | **Mediana** | **DP** | ***P**** |
| Idade (anos) | 419 | 42,5 | 39,2 | 17,7 | 337 | 43,2 | 41,6 | 17,3 | 0,382 |
| Peso (Kg) | 418 | 61,6 | 60,45 | 13,44 | 337 | 64,6 | 65,30 | 10,44 | < 0,001 |
| Altura (m) | 417 | 1,55 | 1,55 | 0,07 | 338 | 1,67 | 1,67 | 0,08 | < 0,001 |
| IMC (Kg/m$^2$) | 417 | 25,87 | 25,25 | 5,20 | 337 | 23,70 | 23,39 | 3,15 | < 0,001 |
| PAS (mmHg) | 416 | 128,5 | 123,5 | 23,70 | 339 | 130,7 | 128,0 | 21,6 | 0,184 |
| PAD (mmHg) | 416 | 80,2 | 80,0 | 12,7 | 339 | 80,9 | 80,0 | 13,1 | 0,421 |
| Cc (cm) | 415 | 84,02 | 83,33 | 11,66 | 335 | 82,25 | 81,00 | 8,29 | 0,015 |
| Cq (cm) | 415 | 97,83 | 96,67 | 10,50 | 335 | 86,12 | 85,67 | 80,08 | < 0,001 |
| RCQ | 415 | 0,86 | 0,86 | 0,06 | 335 | 0,96 | 0,96 | 0,06 | < 0,001 |
| GAF | 417 | 2,21 | 2 | 0,75 | 337 | 3,26 | 4 | 1,04 | < 0,001 |

N: número de indivíduos; DP: desvio-padrão; IMC: índice de massa corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; Cc: circunferência da cintura; Cq: circunferência do quadril; RCQ: razão cintura-quadril; GAF: grau de atividade física. *valores de *P* considerados significativos ($P < 0,05$) adotando-se intervalo de confiança de 95%.

Observamos diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres em relação aos parâmetros Peso, Altura, IMC, Cc, Cq e GAF.

Os gráficos abaixo ilustram as comparações feitas entre mulheres e homens em relação ao Grau de Atividade Física (Figura 1.5).

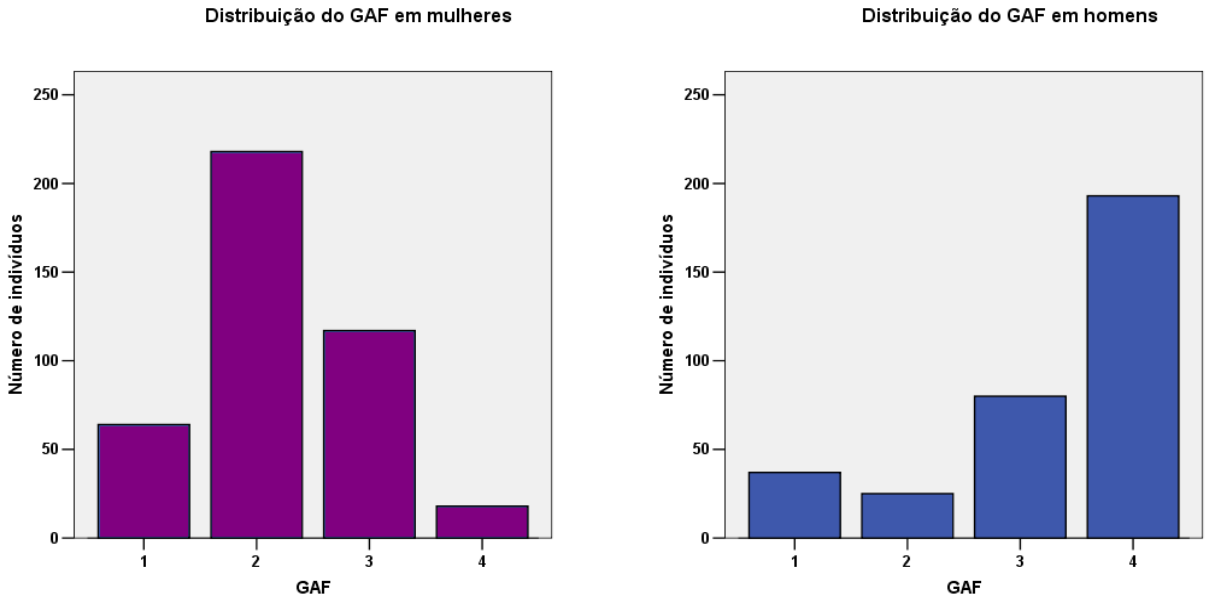
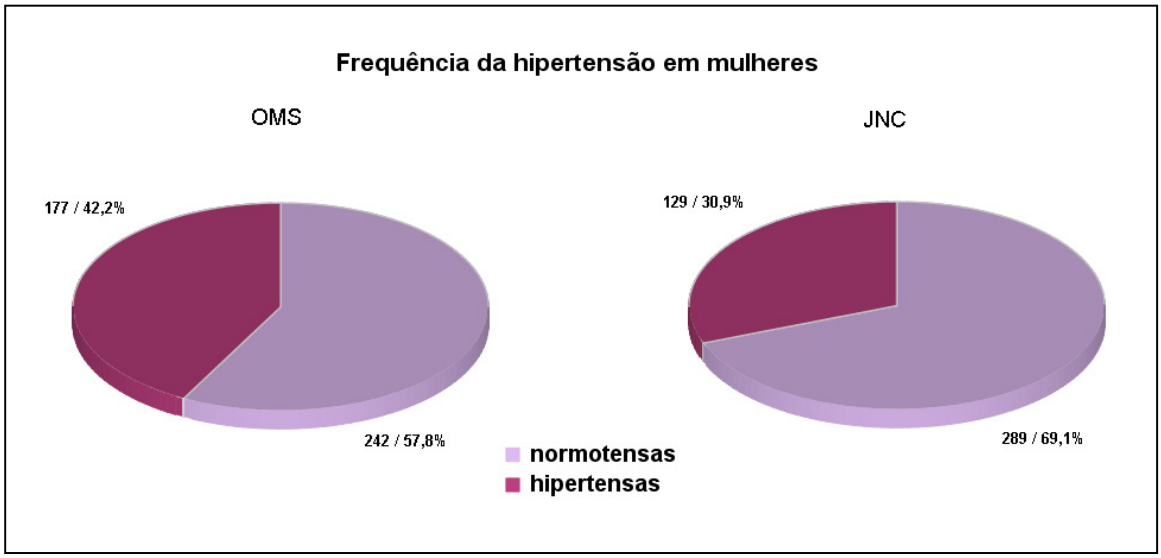



Figura 1.5: Distribuição do grau de atividade física (GAF) em homens e mulheres.

Ao compararmos a distribuição do Grau de Atividade Física – GAF, constatamos que os homens em geral têm uma rotina de atividade física muito mais intensa do que as mulheres.

A Figura 2.5 mostra as frequências da hipertensão essencial em homens e mulheres.



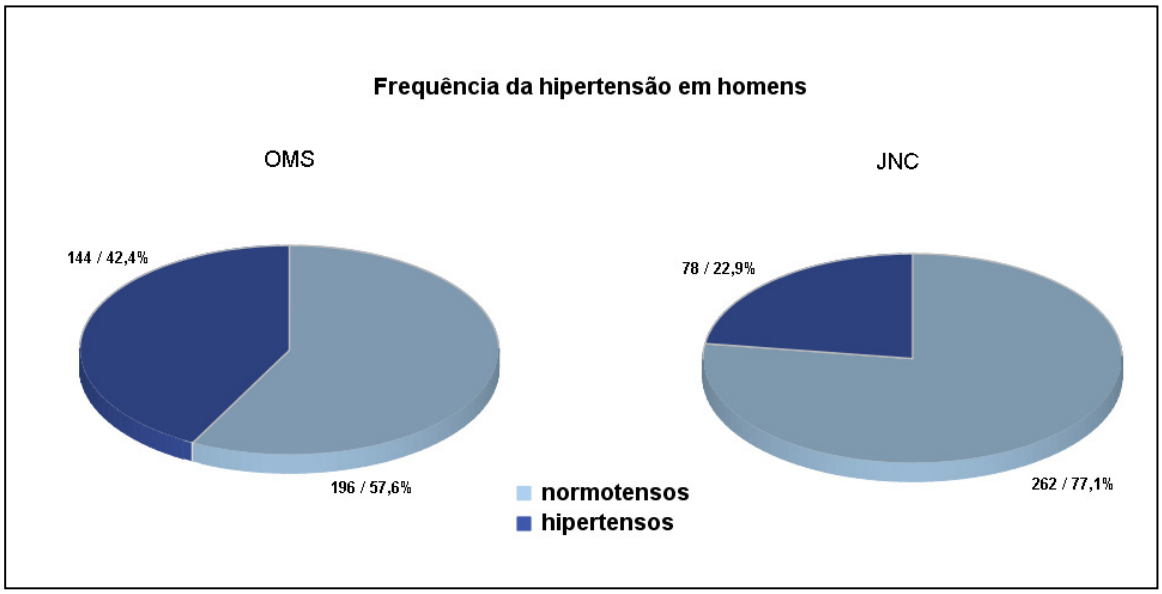




Figura 2.5: Frequência da hipertensão essencial em homens e mulheres dos remanescentes de quilombos, considerando os dois fenótipos da hipertensão (OMS = PAS ≥ 140 / PAD ≥ 90 mm Hg / uso de medicamentos e JNC = PAS ≥ 160 / PAD ≥ 95 mm Hg / uso de medicamentos).

Ao classificar os indivíduos como hipertensos e normotensos, separados por gênero (Figura 2.5), percebemos que há elevada frequência de homens e mulheres hipertensos (42,4% e 42,2% pelo critério OMS e 22,9% e 30,9% pelo critério JNC, respectivamente).

A Figura 3.5 mostra a frequência da hipertensão em cada população de remanescente de quilombo, em ambos os gêneros. Em algumas populações, a frequência de hipertensos é maior do que a de normotensos.

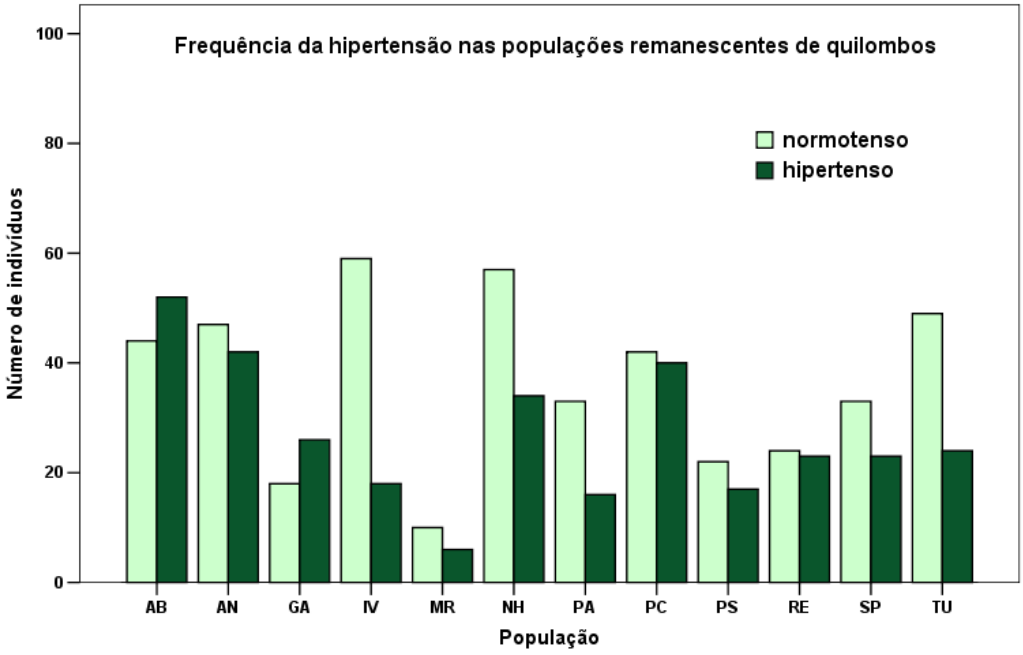
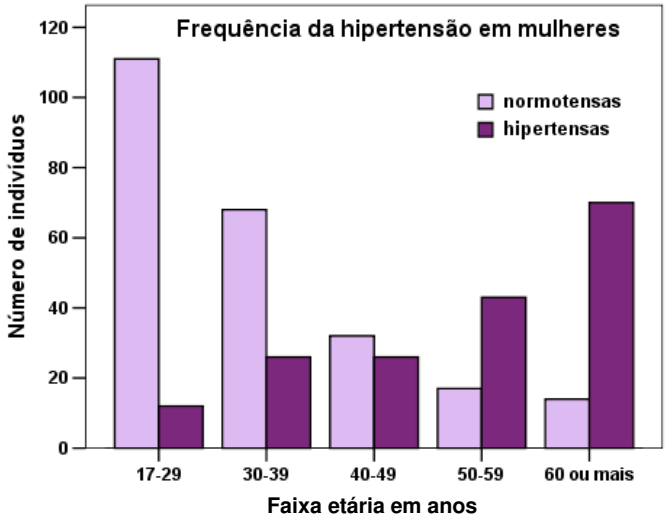



Figura 3.5: Frequência da hipertensão em cada população, considerando todos os indivíduos. AB: Abobral. AN: André Lopes. GA: Galvão. IV: Ivaporunduva. MR: Maria Rosa. NH: Nhunguara. PA: Poça. PC: Pedro Cubas. PS: Pilões. RE: Reginaldo. SP: São Pedro. TU: Sapatu.

A Figura 4.5 mostra a frequência da hipertensão nas comunidades de quilombo nas amostras divididas por gênero e faixa etária. Observamos que há aumento da frequência da hipertensão entre pessoas com mais idade, como esperado.



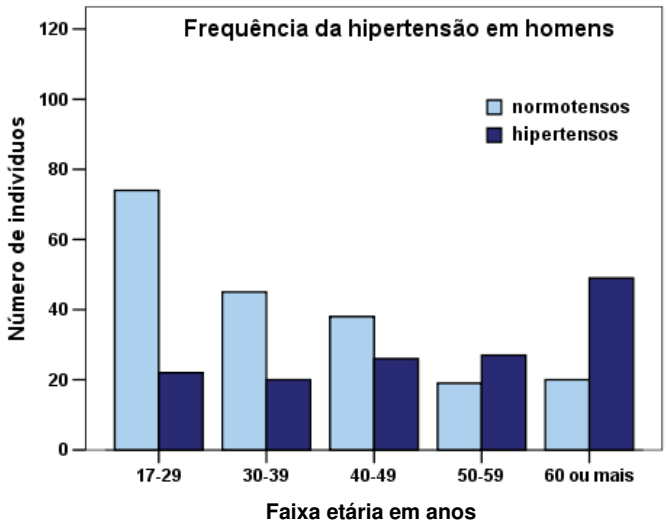




Figura 4.5: Frequência da hipertensão em homens e mulheres em cada faixa etária, no total das doze populações remanescentes de quilombos.

## Regressão linear múltipla e Pressão Arterial

A Tabela III.5 resume os resultados das análises de regressão linear múltipla, que procuram explicar as variações da pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão arterial diastólica (PAD), em função das variáveis clínicas e antropométricas estudadas.

No modelo incluindo o IMC, a equação ajustada para as variáveis independentes explica 22,5% da variância da PAS e 11,3% da variância da PAD. No modelo incluindo a Cc, a equação ajustada para as variáveis independentes explica 23,5% da variância da PAS e 11,5% da variância da PAD. No modelo incluindo a RCQ, a equação ajustada para as variáveis independentes explica 21,0% da variância da PAS e 8,2% da variância da PAD.

Tabela III.5: Modelos de regressão linear múltipla considerando a PAS e a PAD. β: coeficiente de regressão. EP(β): erro-padrão de β.

| Covariáveis | PAS | | | PAD | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | β | EP(β) | *P* | β | EP(β) | *P* |
| Intercepto | 83,883 | 5,085 | <0,001 | 56,194 | 3,209 | <0,001 |
| Gênero | 2,824 | 1,811 | 0,119 | 0,582 | 1,143 | 0,611 |
| Idade | 0,588 | 0,047 | <0,001 | 0,218 | 0,030 | <0,001 |
| GAF | 0,270 | 0,844 | 0,750 | 0,649 | 0,533 | 0,224 |
| IMC | 0,697 | 0,179 | <0,001 | 0,509 | 0,113 | <0,001 |
| | $R^2$ ajustado = 0,225 | | | $R^2$ ajustado = 0,113 | | |
| Intercepto | 71,865 | 6,528 | <0,001 | 50,232 | 4,147 | <0,001 |
| Gênero | 2,348 | 1,771 | 0,185 | -0,113 | 1,125 | 0,920 |
| Idade | 0,536 | 0,049 | <0,001 | 0,184 | 0,031 | <0,001 |
| GAF | 0,262 | 0,849 | 0,757 | 0,801 | 0,540 | 0,138 |
| Cc | 0,383 | 0,078 | <0,001 | 0,240 | 0,049 | <0,001 |
| | $R^2$ ajustado = 0,235 | | | $R^2$ ajustado = 0,115 | | |
| Intercepto | 79,994 | 11,622 | <0,001 | 67,719 | 7,401 | <0,001 |
| Gênero | -1,050 | 2,295 | 0,647 | -0,664 | 1,461 | 0,650 |
| Idade | 0,566 | 0,051 | <0,001 | 0,222 | 0,033 | <0,001 |
| GAF | 0,339 | 0,863 | 0,694 | 0,841 | 0,550 | 0,126 |
| RCQ | 26,177 | 14,040 | 0,063 | 0,932 | 8,940 | 0,917 |
| | $R^2$ ajustado = 0,210 | | | $R^2$ ajustado = 0,082 | | |

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; GAF: grau de atividade física; IMC: índice de massa corporal; Cc: circunferência da cintura; RCQ: razão cintura-quadril.

Os resultados acima indicam que a idade, o IMC e a Cc são covariáveis associadas às variações da PAS e da PAD.

## Regressão logística múltipla e a chance de hipertensão

A Tabela IV.5 resume os resultados das análises de regressão logística múltipla, que procuram relacionar quais covariáveis influenciam na chance de hipertensão.

Tabela IV.5: Valores de p na análise de regressão logística, considerando o *status* da pressão arterial (0 = normotenso; 1 = hipertenso), *odds ratio* e intervalo de confiança (IC), em três modelos de regressão distintos. β = coeficiente de regressão. EP(β) = erro-padrão de β.

| Covariáveis | β | EP(β). | P | *Odds Ratio* | IC de 95,0% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | inferior | superior |
| Intercepto | -5,757 | 0,655 | <0,001 | 0,003 | - | - |
| Gênero | 0,003 | 0,207 | 0,990 | 1,003 | 0,668 | 1,504 |
| Idade | 0,070 | 0,006 | <0,001 | 1,073 | 1,061 | 1,085 |
| GAF | 0,112 | 0,099 | 0,255 | 1,119 | 0,922 | 1,358 |
| IMC | 0,081 | 0,020 | <0,001 | 1,084 | 1,043 | 1,127 |
| Intercepto | -6,817 | 0,829 | <0,001 | 0,001 | - | - |
| Gênero | -0,111 | 0,204 | 0,587 | 0,895 | 0,600 | 1,335 |
| Idade | 0,066 | 0,006 | <0,001 | 1,068 | 1,056 | 1,080 |
| GAF | 0,125 | 0,100 | 0,214 | 1,133 | 0,931 | 1,378 |
| Cc | 0,040 | 0,009 | <0,001 | 1,040 | 1,023 | 1,058 |
| Intercepto | -3,965 | 1,336 | 0,003 | 0,019 | - | - |
| Gênero | -0,240 | 0,252 | 0,339 | 0,786 | 0,480 | 1,288 |
| Idade | 0,069 | 0,006 | <0,001 | 1,071 | 1,059 | 1,084 |
| GAF | 0,114 | 0,099 | 0,250 | 1,121 | 0,923 | 1,361 |
| RCQ | 0,457 | 1,589 | 0,774 | 1,579 | 0,070 | 35,548 |

GAF: grau de atividade física; IMC: índice de massa corporal; Cc: circunferência da cintura; RCQ: razão cintura-quadril.

Os resultados acima indicam que a idade, o IMC e a Cc são covariáveis associadas à chance aumentada de desenvolver hipertensão.

## Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

A Tabela V.5 mostra as frequências alélicas, as frequências genotípicas e os resultados dos testes de exatos realizados para verificar se os genótipos seguem as proporções $p^2$, 2pq, $q^2$ (equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) em relação aos sete polimorfismos nos seis genes candidatos estudados. A hipótese nula de equilíbrio é aceita quando $P > 0{,}05$. Em Galvão (GA) e São Pedro (SP) essa hipótese nula foi rejeitada em relação ao polimorfismo *ACE I/D*, da mesma maneira que Abobral (AB) em relação ao polimorfismo *NOS3 Glu298Asp*, Pilões (PS) e o conjunto de todas as populações em relação ao polimorfismo *GNB3 G-350A*. Como foram realizados 91 testes, espera-se que 4 a 5 deles forneçam resultados significativos ao acaso; os resultados significativos, portanto, devem ser interpretados com cautela.

Tabela V.5: Frequências alélicas e genotípicas e resultados dos testes de χ2 (1 grau de liberdade) [teste exato foi utilizado] para verificar se as populações se encontram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. N = número de indivíduos que foram testados em cada população.

| **Populações** | | ***ACE* (N, %)** | | | **Frequência alélica (%)** | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | II | ID | ID | I | D | |
| **Abobral** | 96 | 25 (26) | 38 (40) | 33 (34) | 46 | 54 | 0,06 |
| **Galvão** | 44 | 2 (5) | 27 (61) | 15 (34) | 35 | 65 | 0,04 |
| **São Pedro** | 55 | 13 (24) | 15 (27) | 27 (49) | 37 | 63 | <0,01 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 36 (44) | 35 (43) | 11 (13) | 65 | 35 | 0,63 |
| **Pilões** | 39 | 4 (10) | 21 (54) | 14 (36) | 37 | 63 | 0,50 |
| **André Lopes** | 89 | 22 (25) | 45 (51) | 22 (25) | 50 | 50 | 0,99 |
| **Nhunguara** | 91 | 34 (37) | 43 (47) | 14 (15) | 61 | 39 | 0,99 |
| **Sapatu** | 73 | 12 (16) | 29 (40) | 32 (44) | 36 | 64 | 0,22 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 26 (34) | 35 (45) | 16 (21) | 56 | 44 | 0,49 |
| **Maria Rosa** | 16 | 1 (6) | 10 (63) | 5 (31) | 38 | 63 | 0,32 |
| **Poça** | 50 | 17 (34) | 25 (50) | 8 (16) | 59 | 41 | 0,99 |
| **Reginaldo** | 47 | 8 (17) | 29 (62) | 10 (21) | 48 | 52 | 0,15 |
| **Total** | 759 | 200 (26) | 352 (46) | 207 (27) | 50 | 50 | 0,05 |

| | | ***NOS3* (N, %)** | | | **Frequência alélica (%)** | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | GG | GT | TT | G | T | |
| **Abobral** | 96 | 83 (86) | 8 (8) | 5 (5) | 91 | 9 | <0,01 |
| **Galvão** | 44 | 21 (48) | 20 (45) | 3 (7) | 70 | 30 | 0,72 |
| **São Pedro** | 55 | 43 (78) | 10 (18) | 2 (4) | 87 | 13 | 0,19 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 52 (63) | 30 (37) | 0 (0) | 82 | 18 | 0,06 |
| **Pilões** | 39 | 30 (77) | 8 (21) | 1 (3) | 87 | 13 | 0,48 |
| **André Lopes** | 89 | 63 (71) | 24 (27) | 2 (2) | 84 | 16 | 0,99 |
| **Nhunguara** | 90 | 77 (86) | 13 (14) | 0 (0) | 93 | 7 | 0,99 |
| **Sapatu** | 73 | 49 (60) | 26 (32) | 6 (7) | 81 | 19 | 0,28 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 45 (58) | 26 (34) | 6 (8) | 75 | 25 | 0,38 |
| **Maria Rosa** | 16 | 13 (81) | 3 (19) | 0 (0) | 91 | 9 | 0,99 |
| **Poça** | 50 | 31 (62) | 17 (34) | 2 (4) | 79 | 21 | 0,99 |
| **Reginaldo** | 47 | 40 (85) | 6 (13) | 1 (2) | 91 | 9 | 0,28 |
| **Total** | 758 | 547 (72) | 185 (24) | 26 (3) | 84 | 16 | 0,05 |

| | | ***AGT* (N, %)** | | | **Frequência alélica (%)** | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | CC | CT | TT | C | T | |
| **Abobral** | 96 | 54 (56) | 34 (35) | 8 (8) | 74 | 26 | 0,43 |
| **Galvão** | 44 | 23 (52) | 20 (45) | 1 (2) | 75 | 25 | 0,25 |
| **São Pedro** | 55 | 27 (49) | 23 (42) | 5 (9) | 70 | 30 | 0,99 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 53 (65) | 25 (30) | 4 (5) | 80 | 20 | 0,73 |
| **Pilões** | 39 | 12 (31) | 21 (54) | 6 (15) | 58 | 42 | 0,74 |
| **André Lopes** | 89 | 56 (63) | 29 (33) | 4 (4) | 79 | 21 | 0,99 |
| **Nhunguara** | 91 | 61 (67) | 25 (27) | 5 (5) | 81 | 19 | 0,31 |
| **Sapatu** | 73 | 40 (55) | 29 (40) | 4 (5) | 75 | 25 | 0,99 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 39 (51) | 32 (42) | 6 (8) | 71 | 29 | 0,99 |
| **Maria Rosa** | 16 | 13 (81) | 2 (13) | 1 (6) | 88 | 13 | 0,19 |
| **Poça** | 50 | 33 (66) | 14 (28) | 3 (6) | 80 | 20 | 0,38 |
| **Reginaldo** | 47 | 10 (21) | 28 (60) | 9 (19) | 51 | 49 | 0,25 |
| **Total** | 759 | 421 (55) | 282 (37) | 56 (7) | 74 | 26 | 0,35 |

Tabela V.5 (continuação).

| Populações | | *GNB3 C825T* (N, %) | | | Frequência alélica (%) | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | CC | CT | TT | C | T | |
| **Abobral** | 96 | 16 (17) | 45 (47) | 35 (36) | 40 | 60 | 0,83 |
| **Galvão** | 44 | 17 (39) | 23 (52) | 4 (9) | 65 | 35 | 0,51 |
| **São Pedro** | 55 | 18 (33) | 25 (45) | 12 (22) | 55 | 45 | 0,59 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 4 (5) | 36 (44) | 42 (51) | 27 | 73 | 0,40 |
| **Pilões** | 39 | 10 (26) | 20 (51) | 9 (23) | 51 | 49 | 0,99 |
| **André Lopes** | 89 | 17 (19) | 50 (56) | 22 (25) | 47 | 53 | 0,29 |
| **Nhunguara** | 90 | 14 (16) | 39 (43) | 37 (41) | 37 | 63 | 0,50 |
| **Sapatu** | 73 | 14 (19) | 30 (41) | 29 (40) | 40 | 60 | 0,23 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 17 (22) | 38 (49) | 22 (29) | 47 | 53 | 0,99 |
| **Maria Rosa** | 16 | 3 (19) | 6 (38) | 7 (44) | 38 | 63 | 0,59 |
| **Poça** | 50 | 4 (8) | 17 (34) | 29 (58) | 25 | 75 | 0,47 |
| **Reginaldo** | 47 | 8 (17) | 22 (47) | 17 (36) | 40 | 60 | 0,99 |
| **Total** | 758 | 142 (19) | 351 (46) | 265 (35) | 42 | 58 | 0,18 |

| | | *GNB3 G-350A* (N, %) | | | Frequência alélica (%) | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | AA | AG | GG | G | A | |
| **Abobral** | 96 | 7 (7) | 31 (32) | 58 (60) | 23 | 77 | 0,39 |
| **Galvão** | 44 | 10 (23) | 15 (34) | 19 (43) | 40 | 60 | 0,06 |
| **São Pedro** | 55 | 13 (24) | 25 (45) | 17 (31) | 46 | 54 | 0,59 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 4 (5) | 31 (38) | 47 (57) | 24 | 76 | 0,99 |
| **Pilões** | 39 | 8 (21) | 9 (23) | 22 (56) | 32 | 68 | 0,01 |
| **André Lopes** | 89 | 6 (7) | 27 (30) | 56 (63) | 22 | 78 | 0,35 |
| **Nhunguara** | 90 | 7 (8) | 34 (38) | 49 (54) | 27 | 73 | 0,79 |
| **Sapatu** | 73 | 7 (10) | 22 (30) | 44 (60) | 25 | 75 | 0,12 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 17 (22) | 34 (44) | 26 (34) | 44 | 56 | 0,36 |
| **Maria Rosa** | 16 | 7 (44) | 5 (31) | 4 (25) | 59 | 41 | 0,29 |
| **Poça** | 50 | 7 (14) | 16 (32) | 27 (54) | 30 | 70 | 0,10 |
| **Reginaldo** | 47 | 2 (4) | 28 (60) | 17 (36) | 34 | 66 | 0,05 |
| **Total** | 758 | 95 (13) | 277 (37) | 386 (51) | 31 | 69 | <0,01 |

| | | *ADD2* (N, %) | | | Frequência alélica (%) | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | AA | AC | CC | A | C | |
| **Abobral** | 96 | 11 (11) | 36 (38) | 49 (51) | 30 | 70 | 0,33 |
| **Galvão** | 44 | 6 (14) | 14 (32) | 24 (55) | 30 | 70 | 0,15 |
| **São Pedro** | 55 | 3 (5) | 23 (42) | 29 (53) | 26 | 74 | 0,74 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 6 (7) | 31 (38) | 45 (55) | 26 | 74 | 0,78 |
| **Pilões** | 39 | 4 (10) | 20 (51) | 15 (38) | 36 | 64 | 0,73 |
| **André Lopes** | 89 | 15 (17) | 44 (49) | 30 (34) | 42 | 58 | 0,99 |
| **Nhunguara** | 90 | 11 (12) | 42 (47) | 37 (41) | 36 | 64 | 0,99 |
| **Sapatu** | 73 | 16 (22) | 34 (47) | 23 (32) | 45 | 55 | 0,64 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 10 (13) | 35 (45) | 32 (42) | 36 | 64 | 0,99 |
| **Maria Rosa** | 16 | 0 (0) | 4 (25) | 12 (75) | 13 | 88 | 0,99 |
| **Poça** | 50 | 3 (6) | 25 (50) | 22 (44) | 31 | 69 | 0,33 |
| **Reginaldo** | 47 | 8 (17) | 20 (43) | 19 (40) | 38 | 62 | 0,54 |
| **Total** | 758 | 93 (12) | 328 (43) | 337 (44) | 34 | 66 | 0,33 |

Tabela V.5 (continuação).

| Populações | | *GRK4* (N, %) | | | Frequência alélica (%) | | $P_{HWE}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $N_{total}$ | CC | CT | TT | C | T | |
| **Abobral** | 96 | 52 (54) | 34 (35) | 10 (10) | 72 | 28 | 0,22 |
| **Galvão** | 44 | 24 (55) | 18 (41) | 2 (5) | 75 | 25 | 0,70 |
| **São Pedro** | 55 | 40 (73) | 12 (22) | 3 (5) | 84 | 16 | 0,14 |
| **Pedro Cubas** | 82 | 44 (54) | 36 (44) | 2 (2) | 76 | 24 | 0,13 |
| **Pilões** | 39 | 27 (69) | 11 (28) | 1 (3) | 83 | 17 | 0,99 |
| **André Lopes** | 89 | 44 (49) | 37 (42) | 8 (9) | 70 | 30 | 0,99 |
| **Nhunguara** | 90 | 45 (50) | 39 (43) | 6 (7) | 72 | 28 | 0,61 |
| **Sapatu** | 73 | 41 (56) | 24 (33) | 8 (11) | 73 | 27 | 0,14 |
| **Ivaporunduva** | 77 | 45 (58) | 30 (39) | 2 (3) | 78 | 22 | 0,34 |
| **Maria Rosa** | 16 | 14 (88) | 1 (6) | 1 (6) | 91 | 9 | 0,10 |
| **Poça** | 50 | 24 (48) | 24 (48) | 2 (4) | 72 | 28 | 0,29 |
| **Reginaldo** | 47 | 21 (45) | 21 (45) | 5 (11) | 67 | 33 | 0,99 |
| **Total** | 758 | 421 (56) | 287 (38) | 50 (7) | 74 | 26 | 0,92 |

## Estimativas da ancestralidade

A Figura 5.5 (gráficos do tipo *Boxplots*) mostra as medianas, os intervalos interquartis e pontos atípicos da distribuição das variáveis analisadas (estimativas de ancestralidade), comparando os indivíduos normotensos e hipertensos.

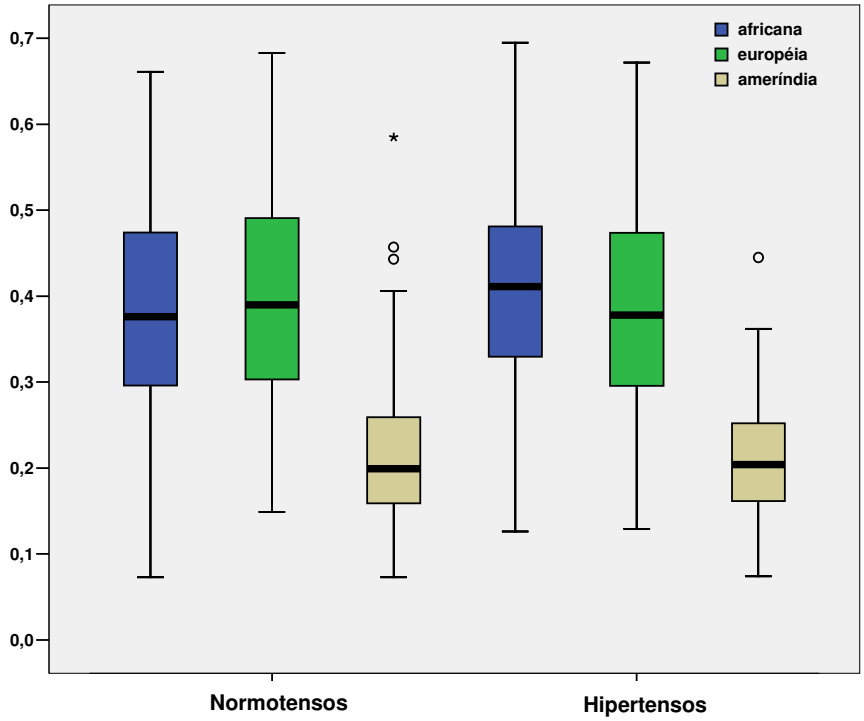



Figura 5.5: Gráficos mostrando o intervalo interquartil referente às estimativas de ancestralidade africana, européia e ameríndia, entre os normotensos e hipertensos genotipados em relação ao painel de INDEL.

A Tabela VI.5 resume os resultados do teste de *Mann-Whitney* comparando hipertensos e normotensos da sub-amostra genotipada em relação ao painel de 48 marcadores INDEL.

Tabela VI.5: Resultados do teste de *Mann-Whitney* comparando normotensos (169 indivíduos) e hipertensos (119 indivíduos) dos remanescentes de quilombo em relação a suas estimativas de ancestralidade.

| | **Normotensos** | | | | **Hipertensos** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Ancestralidade** | | Porcentagem | | | | Porcentagem | | | |
| | N | P25º | Mediana | P75º | N | P25º | Mediana | P75º | *P* |
| africana | 169 | 0,290 | 0,376 | 0,474 | 119 | 0,329 | 0,411 | 0,481 | 0,272 |
| européia | 169 | 0,303 | 0,390 | 0,492 | 119 | 0,295 | 0,378 | 0,474 | 0,418 |
| ameríndia | 169 | 0,159 | 0,199 | 0,259 | 119 | 0,161 | 0,204 | 0,253 | 0,845 |

P25º refere-se ao percentil 25; P75º refere-se ao percentil 75.

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os hipertensos e normotensos em relação às proporções estimadas de miscigenação (Tabela VI.5).

## Estudos de associação

Uma vez que nossas análises anteriores demonstraram que a ancestralidade das sub-amostras de hipertensos e normotensos não difere significativamente, o problema da estratificação populacional está minimizado. Portanto, as análises descritas nas seções seguintes não incluíram a estimativa de ancestralidade como covariável.

Investigamos a associação dos polimorfismos com a hipertensão por quatro abordagens: (i) efeito individual dos polimorfismos no risco da hipertensão essencial; (ii) efeito individual dos polimorfismos na variação da pressão sanguínea; (iii) efeitos dos haplótipos no gene *GNB3* no risco da hipertensão essencial e na variação da pressão arterial; e (iv) efeitos multilocos de interação gene-gene sobre o risco da hipertensão essencial.

As análises foram ajustadas para gênero, idade e IMC (parâmetros sabidamente associados ao risco de hipertensão).

### (i). Resultados da estatística MAX e o *status* da hipertensão

As Tabelas VII.5 e VIII.5 resumem os resultados da estatística MAX quando a hipertensão foi tratada como fenótipo dicotômico (normotenso x hipertenso), pelo critério OMS (PAS ≥ 140mmHg e/ou PAD ≥ 90mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos) e pelo critério JNC (PAS ≥ 160mmHg e/ou PAD ≥ 95mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos.

Tabela VII.5: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico. Frequências dos genótipos, alelos menos frequentes e valores de *P*. Análises ajustadas para gênero, idade e IMC. [a] Valores de *P* para a Estatística MAX - OMS. MAF, frequência do alelo mais raro. *P*EHW, equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

| ***Status* segundo o critério OMS** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gene/*Status* | Genótipos, n(%) | | | *P* EHW | MAF | *P* MAX[a] |
| *ACE* (I/D) | | | | | | |
| | **I/I** | **I/D** | **D/D** | | | |
| Hipertenso | 40 (22,35) | 90 (50,28) | 49 (27,37) | 0,9999 | 0,475 | 0,276 |
| Normotenso | 53 (25,98) | 91 (44,61) | 60 (29,41) | 0,1252 | 0,483 | |
| *NOS3* (*G*lu298Asp) | | | | | | |
| | **Glu/Glu** | **Glu/Asp** | **Asp/Asp** | | | |
| Hipertenso | 128 (71,51) | 47 (26,26) | 4 (2,23) | 0,9999 | 0,154 | 0,918 |
| Normotenso | 149 (73,04) | 50 (24,51) | 5 (2,45) | 0,7786 | 0,147 | |
| *GNB3* (C825T) | | | | | | |
| | **C/C** | **C/T** | **T/T** | | | |
| Hipertenso | 42 (23,46) | 75 (41,90) | 62 (34,64) | 0,0488 | 0,444 | 0,062 |
| Normotenso | 22 (10,78) | 110 (53,92) | 72 (35,29) | 0,0520 | 0,377 | |
| *GNB3* (G-350A) | | | | | | |
| | **G/G** | **A/G** | **A/A** | | | |
| Hipertenso | 91 (50,84) | 62 (34,64) | 26 (14,53) | 0,0092 | 0,318 | 0,271 |
| Normotenso | 103 (50,49) | 85 (41,67) | 16 (7,84) | 0,8653 | 0,287 | |
| *AGT* (M235T) | | | | | | |
| | **Thr/Thr** | **Thr/Met** | **Met/Met** | | | |
| Hipertenso | 93 (51,96) | 72 (40,22) | 14 (7,82) | 0,9999 | 0,279 | 0,563 |
| Normotenso | 121 (59,31) | 68 (33,33) | 15 (7,35) | 0,2479 | 0,240 | |
| *ADD2* (A/C) | | | | | | |
| | **A/A** | **A/C** | **C/C** | | | |
| Hipertenso | 27 (15,08) | 69 (38,55) | 83 (46,37) | 0,0672 | 0,344 | 0,524 |
| Normotenso | 21 (10,29) | 94 (46,08) | 89 (43,63) | 0,6402 | 0,333 | |
| *GRK4* (A486V) | | | | | | |
| | **Ala/Ala** | **Ala/Val** | **Val/Val** | | | |
| Hipertenso | 98 (54,75) | 73 (40,78) | 8 (4,47) | 0,3156 | 0,249 | 0,587 |
| Normotenso | 116 (56,86) | 71 (34,80) | 17 (8,33) | 0,2017 | 0,257 | |

Os resultados tabulados acima indicam que o polimorfismo GNB3 C825T está marginalmente associado ao risco de hipertensão essencial ($P = 0{,}062$).

Tabela VIII.5: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico. Frequências dos genótipos, alelos menos frequentes e valores de *P*. Análises ajustadas para gênero, idade e IMC. [b] Valores de *P* para a Estatística MAX - JNC. MAF, frequência do alelo mais raro. *P*EHW, equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

| | ***Status* segundo o critério JNC** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gene/*Status* | Genótipos, n(%) | | | *P* EHW | MAF | *P* MAX[b] |
| *ACE* (I/D) | | | | | | |
| | **I/I** | **I/D** | **D/D** | | | |
| Hipertenso | 28 (21,21) | 66 (50,00) | 38 (28,79) | 0,9999 | 0,462 | 0,171 |
| Normotenso | 65 (25,90) | 115 (45,82) | 71 (28,29) | 0,2064 | 0,488 | |
| *NOS3* (*G*lu298Asp) | | | | | | |
| | **Glu/Glu** | **Glu/Asp** | **Asp/Asp** | | | |
| Hipertenso | 96 (72,73) | 33 (25,00) | 3 (2,27) | 0,9999 | 0,148 | 0,944 |
| Normotenso | 181 (72,11) | 64 (25,50) | 6 (2,39) | 0,8092 | 0,151 | |
| *GNB3* (C825T) | | | | | | |
| | **C/C** | **C/T** | **T/T** | | | |
| Hipertenso | 35 (26,52) | 51 (38,64) | 46 (34,85) | 0,0137 | 0,458 | 0,036 |
| Normotenso | 29 (11,55) | 134 (53,39) | 88 (35,06) | 0,0456 | 0,382 | |
| *GNB3* (G-350A) | | | | | | |
| | **G/G** | **A/G** | **A/A** | | | |
| Hipertenso | 68 (51,52) | 47 (35,61) | 17 (12,88) | 0,0660 | 0,307 | 0,445 |
| Normotenso | 126 (50,20) | 100 (39,84) | 25 (9,96) | 0,4518 | 0,299 | |
| *AGT* (M235T) | | | | | | |
| | **Thr/Thr** | **Thr/Met** | **Met/Met** | | | |
| Hipertenso | 71 (53,79) | 50 (37,88) | 11 (8,33) | 0,6603 | 0,273 | 0,808 |
| Normotenso | 143 (56,97) | 90 (35,86) | 18 (7,17) | 0,5013 | 0,251 | |
| *ADD2* (A/C) | | | | | | |
| | **A/A** | **A/C** | **C/C** | | | |
| Hipertenso | 21 (15,91) | 51 (38,64) | 60 (45,45) | 0,0861 | 0,352 | 0,600 |
| Normotenso | 27 (10,76) | 112 (44,62) | 112 (44,62) | 0,9999 | 0,331 | |
| *GRK4* (A486V) | | | | | | |
| | **Ala/Ala** | **Ala/Val** | **Val/Val** | | | |
| Hipertenso | 73 (55,30) | 54 (40,91) | 5 (3,79) | 0,2416 | 0,242 | 0,381 |
| Normotenso | 141 (56,18) | 90 (35,86) | 20 (7,97) | 0,3231 | 0,259 | |

Os resultados tabulados acima indicam que o polimorfismo GNB3 C825T está significativamente associado ao risco de hipertensão essencial ($P = 0{,}036$).

### (ii). Resultados da análise estatística MAX e a pressão arterial sistólica e diastólica

A Tabela IX.5 resume os resultados da análise estatística MAX quando a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo.

Tabela IX.5: Resultados da análise estatística MAX para a pressão arterial como fenótipo contínuo. Frequências dos genótipos, alelos menos frequentes e valores P. Análises ajustadas para gênero, idade e IMC. dp = desvio padrão. [a] Valores de *P* para a Estatística MAX. MAF, frequência do alelo mais raro. *P*EHW, equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. PAS = pressão arterial sistólica. PAD = pressão arterial diastólica.

| Gene/PA | | Genótipos (n), média ± dp | | | *P* EHW | MAF | *P* MAX[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *ACE* (I/D) | | | | | | | |
| | | **I/I (74)** | **I/D (147)** | **D/D (86)** | | | |
| | PAS | 125,03 ± 20,49 | 130,05 ± 23,26 | 125,52 ± 23,34 | 0,4931 | 0,480 | 0,153 |
| | PAD | 79,36 ± 11,24 | 80,53 ± 12,47 | 81,09 ± 12,89 | | | 0,266 |
| *NOS3* (*G*lu298Asp) | | | | | | | |
| | | **Glu/Glu (221)** | **Glu/Asp (78)** | **Asp/Asp (8)** | | | |
| | PAS | 127,58 ± 21,83 | 127,55 ± 25,45 | 127,62 ± 20,57 | 0,6629 | 0,153 | 0,823 |
| | PAD | 80,19 ± 11,96 | 80,91 ± 13,49 | 81,50 ± 9,81 | | | 0,778 |
| *GNB3* (C825T) | | | | | | | |
| | | **C/C (39)** | **C/T (160)** | **T/T (108)** | 0,0941 | 0,388 | 0,304 |
| | PAS | 133,08 ± 20,62 | 127,14 ± 24,00 | 126,22 ± 21,30 | | | 0,219 |
| | PAD | 83,72 ± 14,21 | 79,67 ± 12,37 | 80,30 ± 11,29 | | | |
| *GNB3* (G-350A) | | | | | | | |
| | | **G/G (157)** | **A/G (119)** | **A/A (31)** | | | |
| | PAS | 126,56 ± 22,65 | 127,84 ± 23,42 | 131,67 ± 20,19 | 0,2713 | 0,295 | 0,706 |
| | PAD | 81,25 ± 13,04 | 79,26 ± 11,74 | 80,55 ± 10,17 | | | 0,094 |
| *AGT* (M235T) | | | | | | | |
| | | **Thr/Thr (178)** | **Thr/Met (107)** | **Met/Met (22)** | 0,2836 | 0,246 | |
| | PAS | 126,70 ± 21,62 | 128,62 ± 24,45 | 127,57 ± 23,16 | | | 0,729 |
| | PAD | 80,60 ± 12,13 | 80,50 ± 12,42 | 78,36 ± 13,22 | | | 0,591 |
| *ADD2* (A/C) | | | | | | | |
| | | **A/A (35)** | **A/C (133)** | **C/C (139)** | 0,7001 | 0,331 | |
| | PAS | 129,86 ± 22,90 | 125,75 ± 22,47 | 128,74 ± 22,90 | | | 0,641 |
| | PAD | 81,71 ± 11,40 | 79,99 ± 11,86 | 80,47 ± 12,94 | | | 0,768 |
| *GRK4* (A486V) | | | | | | | |
| | | **Ala/Ala (175)** | **Ala/Val (110)** | **Val/Val (22)** | 0,4470 | 0,251 | |
| | PAS | 127,96 ± 22,52 | 127,11 ± 21,54 | 126,77 ± 29,91 | | | 0,888 |
| | PAD | 80,72 ± 12,10 | 80,91 ± 11,74 | 75,41 ± 15,57 | | | 0,153 |

Os resultados acima indicam que nenhum dos polimorfismos investigados está associado a variações da pressão arterial sistólica ou diastólica.

**(iii) Efeitos haplotípicos das variantes C825T e G-350A do gene *GNB3***

O teste da razão de verossimilhança compara dois modelos: um completo (full) e outro reduzido. O completo contem os efeitos das covariáveis não genéticas somados aos efeitos haplotípicos. O modelo reduzido contem apenas os efeitos da covariáveis. Um valor de *P* menor que 0,05 sugere que o ajuste do modelo completo é estatisticamente superior ao modelo nulo, sugerindo a presença de efeitos haplotípicos significativos no fenótipo avaliado. O modelo completo é marginalmente significativo em relação ao modelo reduzido para a PAS ($\chi 2$ = 7,041, com 3 gl e *P* = 0,070) e significativo para a PAD ($\chi 2$ = 11,072, com 3 gl e *P* = 0,011), ou seja, há evidências de que os efeitos dos haplótipos no gene *GNB3* são significativos na variação da pressão arterial. Em relação ao *status* da hipertensão essencial como fenótipo, tanto para o critério OMS ($\chi 2$ = 5,292, com 3 gl e *P* = 0,152) como para o critério JNC ($\chi 2$ = 3,693, com 3 gl e *P* = 0,297), os efeitos haplotípicos são inexistentes ou fracos.

As Tabelas X.5 e XI.5 resumem os resultados das análises haplotípicas do gene *GNB3*, considerando os dois polimorfismos estudados nesse gene (C825T e G-350A).

Em uma primeira análise a hipertensão foi tratada como variável dicotômica (hipertenso x normotenso. O modelo de regressão logística indica que o haplótipo C825/G-350 prediz risco de hipertensão essencial (pelo critério OMS), mesmo após correções com gênero, idade e IMC (OR = 1,733; IC 95% = 1,055 – 2,845), sugerindo que portadores desse haplótipo têm uma chance aumentada de serem hipertensos 1,73 vezes maior em relação aos portadores do haplótipo T825/G-350 (Tabela X.5).

Na segunda análise (Tabela XI.5) foram avaliadas a PAS e a PAD como fenótipos contínuos da hipertensão. Os modelos de regressão linear indicam que o haplótipo C825/G-350 estaria associado a um aumento na média esperada da PAS e da PAD (diferença média esperada, $\Delta$ = 6,07; IC de 95%: 1,64 – 10,50; *P* = 0,007 e $\Delta$ = 3.75; IC de 95%: 1,16 – 6,35; *P* = 0,005, respectivamente) comparado ao haplótipo basal.

Tabela X.5: Resultados das análises haplotípicas, comparando o fenótipo de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *Joint National Commitee* (JNC). β: coeficiente de regressão. EP(β): erro-padrão de β; IC: intervalo de confiança.

**_Status_ segundo o critério OMS**

| | Frequência (%) | | β | EP(β) | *P* | OR (95% IC) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Casos | Controle | | | | |
| **Haplótipos** | | | | | | |
| TG | 43,94 | 52,79 | Referência | - | - | 1,000 |
| TA | 11,64 | 9,46 | 0,457 | 0,341 | 0,180 | 1,580 (0,809 – 3,085) |
| CG | 24,21 | 18,53 | 0,550 | 0,253 | 0,029 | 1,733 (1,055 – 2,845) |
| CA | 20,20 | 19,21 | 0,052 | 0,222 | 0,816 | 1,053 (0,681 – 1,628) |
| **Covariáveis** | | | | | | |
| Gênero (0 = F; 1 = M) | | | 0,078 | 0,264 | 0,769 | 1,081 (0,644 – 1,813) |
| Idade (anos) | | | 0,069 | 0,008 | < 0,001 | 1,071 (1,055 – 1,088) |
| IMC (Kg/m$^2$) | | | 0,111 | 0,034 | 0,001 | 1,117 (1,046 – 1,1936) |

**_Status_ segundo critério JNC**

| | Frequência (%) | | β | EP(β) | *P* | OR (95% IC) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Casos | Controle | | | | |
| **Haplótipos** | | | | | | |
| TG | 43,92 | 50,90 | Referência | - | - | 1,000 |
| TA | 10,25 | 10,85 | -0,008 | 0,374 | 0,982 | 0,992 (0,476 – 2,067) |
| CG | 25,40 | 19,22 | 0,437 | 0,252 | 0,083 | 1,548 (0,945 – 2,535) |
| CA | 20,43 | 19,03 | 0,004 | 0,229 | 0,986 | 1,004 (0,640 – 1,575) |
| **Covariáveis** | | | | | | |
| Gênero (0 = F; 1 = M) | | | -0,344 | 0,275 | 0,211 | 0,709 (0,414 – 1,215) |
| Idade (anos) | | | 0,070 | 0,008 | < 0,001 | 1,072 (1,056 – 1,090) |
| IMC (Kg/m$^2$) | | | 0,114 | 0,034 | 0,001 | 1,120 (1,049 – 1,198) |

F = feminino; M = masculino.

Tabela XI.5: Resultados das análises haplotípicas, nas quais a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo. Δ: diferença média esperada entre os efeitos dos haplótipos. PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica. β: coeficiente de regressão. EP(β): erro-padrão de β.

| PAS | Média Esperada do Fenótipo (95% IC) | β | EP(β) | *P* | Δ(95% IC) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Haplótipos** | | | | | |
| TG | 36,043 (28,214 – 43,872) | Referência | - | - | 1,000 |
| TA | 42,116 (32,359 – 51,873) | 6,073 | 3,029 | 0,045 | 6,073 (0,135 – 12,010) |
| CG | 42,110 (33,460 – 50,759) | 6,067 | 2,260 | 0,007 | 6,067 (1,638 – 10,496) |
| CA | 36,552 (27,920 – 45,184) | 0,509 | 2,169 | 0,815 | 0,509 (-3,742 – 4,759) |
| **Covariáveis** | | | | | |
| Gênero (0 = F; 1 = M) | | 4,075 | 2,408 | 0,091 | 4,075 (-0,645 – 8,794) |
| Idade (anos) | | 0,622 | 0,068 | < 0,001 | 0,622 (0,489 – 0,756) |
| IMC (Kg/m$^2$) | | 0,978 | 0,304 | 0,001 | 0,978 (0,383 – 1,574) |
| **PAD** | **Média Esperada do Fenótipo (95% IC)** | **β** | **EP(β)** | ***P*** | **Δ(95% IC)** |
| **Haplótipos** | | | | | |
| TG | 27,412 (22,676 – 32,148) | Referência | - | - | 1,000 |
| TA | 28,956 (23,036 – 34,876) | 1,544 | 1,939 | 0,426 | 1,544 (-2,258 – 5,346) |
| CG | 31,167 (26,536 – 35,798) | 3,755 | 1,322 | 0,005 | 3,755 (1,164 – 6,346) |
| CA | 25,993 (20,654 – 31,333) | -1,419 | 1,286 | 0,269 | -1,419 (-3,939 – 1,102) |
| **Covariáveis** | | | | | |
| Gênero (0 = F; 1 = M) | | 1,610 | 1,351 | 0,208 | 1,698 (-0,949 – 4,349) |
| Idade (anos) | | 0,222 | 0,037 | < 0,001 | 0,222 (0,149 – 0,295) |
| IMC (Kg/m$^2$) | | 0,587 | 0,184 | 0,001 | 0,587 (0,227 – 0,947) |

F = feminino; M = masculino.

A média esperada do fenótipo, medida em mmHg, é uma média esperada do fenótipo para cada dose do haplótipo condicionada num vetor de covariáveis assumindo valor zero (Tregouet e col., 2004).

### (iv) Resultados das análises de interação gene-gene

A Tabela XII.5 resume os resultados dos melhores modelos preditivos obtidos pelas análises GMDR, que sugerem interações de alta ordem potenciais entre as variantes investigadas no risco da hipertensão essencial. Todas as análises foram ajustadas para gênero, idade e IMC. Os melhores modelos de interação entre 2, 3, e 5 locos foram: *NOS3/GRK4*, *ACE/A-350G/AGT* e *ACE/A-350G/AGT/ADD2/GRK4* (dois modelos), com uma acurácia média balanceada de teste de 60% (*P*=0,006), 59% (*P* =0,019), e 58% e 59% (*P* =0,040 e 0,025), respectivamente.

Tabela XII.5: Melhores modelos preditivos de interação gene-gene obtidos pelas análises GMDR. PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica. [a] Baseado em 5.000 permutações. Resultados ajustados para gênero, idade e IMC.

| Modelo | Acurácia Balanceada de Treinamento | Acurácia Balanceada de Teste | Validação Cruzada | Valor *P*[a] |
|---|---|---|---|---|
| ***Status* segundo o critério OMS (hipertenso x normotenso)** | | | | |
| *A-350G* | 0,5633 | 0,5568 | 5 | 0,0618 |
| *A-350G,GRK4* | 0,6004 | 0,5419 | 7 | 0,1500 |
| *A-350G,ADD2,GRK4* | 0,6469 | 0,5475 | 6 | 0,1232 |
| *C825T, A-350G,AGT,GRK4* | 0,7070 | 0,5954 | 4 | 0,0144 |
| *ACE, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,7830 | 0,5779 | 7 | 0,0400 |
| *ACE, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,8610 | 0,5540 | 10 | 0,1280 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,9059 | 0,5400 | 10 | 0,2320 |
| ***Status* segundo o critério JNC (hipertenso x normotenso)** | | | | |
| *C825T* | 0,5701 | 0,5498 | 8 | 0,1082 |
| *A-350G,AGT* | 0,6117 | 0,6046 | 5 | 0,0030 |
| *ACE, A-350G,AGT* | 0,6594 | 0,5895 | 7 | 0,0188 |
| *ACE,NOS3, C825T,ADD2* | 0,7139 | 0,5926 | 4 | 0,0166 |
| *ACE,NOS3, A-350G,AGT,ADD2* | 0,7723 | 0,4869 | 2 | 0,5906 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,ADD2* | 0,7723 | 0,4667 | 2 | 0,7424 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2* | 0,8539 | 0,5215 | 9 | 0,3174 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,8991 | 0,4637 | 10 | 0,7254 |
| **Pressão arterial sistólica** | | | | |
| *ADD2* | 0,5782 | 0,5755 | 10 | 0,0254 |
| *ADD2,GRK4* | 0,6015 | 0,5359 | 7 | 0,1922 |
| *ACE, C825T,ADD2* | 0,6579 | 0,5864 | 4 | 0,0238 |
| *ACE, C825T,AGT,ADD2* | 0,7214 | 0,5367 | 3 | 0,2038 |
| *ACE, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,8037 | 0,5906 | 9 | 0,0252 |
| *ACE, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,8725 | 0,5392 | 10 | 0,2206 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,9112 | 0,5224 | 10 | 0,3460 |
| **Pressão arterial diastólica** | | | | |
| *A-350G* | 0,5563 | 0,5528 | 7 | 0,1024 |
| *NOS3,GRK4* | 0,6109 | 0,5997 | 9 | 0,0056 |
| *C825T, A-350G,ADD2* | 0,6598 | 0,5646 | 3 | 0,0742 |
| *ACE,NOS3,ADD2,GRK4* | 0,7304 | 0,5766 | 4 | 0,0462 |
| *ACE,NOS3, C825T,AGT,ADD2* | 0,8035 | 0,5501 | 5 | 0,1424 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2* | 0,8814 | 0,5806 | 8 | 0,0652 |
| *ACE,NOS3, C825T, A-350G,AGT,ADD2,GRK4* | 0,9230 | 0,5652 | 10 | 0,1572 |

## 5.5. Discussão

### Aspectos clínicos

As análises de regressão linear e logística indicaram que os parâmetros não-genéticos que parecem explicar melhor as variações da pressão arterial e o risco de hipertensão são a idade, o IMC e a Cc (Tabelas III.5 e IV.5).

A hipertensão frequentemente coexiste com distúrbios metabólicos adversos como a intolerância à glicose, resistência à insulina, aumento do colesterol total e a obesidade (Chuang e col., 2006). O Índice de Massa Corporal (IMC) é o mais utilizado para avaliar a obesidade em humanos. Valores elevados de IMC estão associados a um aumento no risco de morte por doenças cardiovasculares. No entanto, o IMC não leva em conta a distribuição da gordura corporal. A circunferência da cintura (Cc) e a razão cintura-quadril (RCQ) são outros indicadores frequentemente usados, e estes, por sua vez, representam o acúmulo de gordura abdominal (Deshmukh e col., 2006).

O acúmulo de gordura abdominal tem sido relacionado ao risco aumentado de doenças cardiovasculares em diversas populações no mundo (Okosun e col., 1999[a,b]; Molarius e col., 1999; Sichieri e col., 2000; Lee e col., 2000; Foucan e col., 2002; Olinto e col.; 2004; Gus e col., 2008). A RCQ pode não ser um bom indicador do acúmulo de gordura abdominal por sofrer forte influência da estrutura pélvica do indivíduo. Portanto, indivíduos obesos e não obesos podem apresentar o mesmo valor de RCQ (Okosun e col., 2001). Já a Cc é altamente correlacionada ao acúmulo de gordura nos tecidos viscerais, o que a tornaria um indicador melhor para prever aumento no risco de doenças cardiovasculares (Foucan e col., 2002). Nossos resultados indicam que o IMC e a Cc, além da idade, são as covariáveis não genéticas que melhor explicam a variação do valor da pressão arterial, e são associadas ao risco aumentado de hipertensão essencial nas populações de quilombos.

Apesar das mulheres das populações de remanescentes de quilombos apresentarem frequências aumentadas de sobrepeso e obesidade (Angeli, 2008), a frequência de hipertensão não é maior do que a observada em homens, quando consideramos hipertensos aqueles que apresentaram a PAS $\geq$ 140mmHg e/ou PAD $\geq$ 90mmHg, ou faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos (critério OMS). No entanto, quando consideramos o fenótipo mais extremo (critério JNC), apesar da frequência da hipertensão ser menor no total das populações (27,2%), as mulheres apresentam maior frequência (30,9%) do que os homens (22,7%).

Encontramos elevada frequência de hipertensos entre os indivíduos dos remanescentes de quilombos (42,3%) classificados pelo critério OMS. Essa frequência é

mais elevada que as encontradas em populações da África subsaariana, principalmente de áreas urbanas (revisões em Bourne e col., 2002; Addo e col., 2007).

Não podemos deixar de considerar que essas frequências podem estar superestimadas, pois a cobertura da nossa pesquisa não foi completa (a cobertura média das doze populações foi de 60,71%). É possível que aqueles indivíduos que apresentam histórico da doença tenham maior probabilidade de procurar nosso atendimento, causando um viés na frequência da hipertensão nessas comunidades.

Por outro lado, a elevada frequência de hipertensos encontrada nas populações de remanescentes de quilombos pode ser reflexo de um processo de transição demográfica e nutricional, que abriu espaço para o consumo de alimentos industrializados ricos em sódio. Relatos obtidos durante as entrevistas, principalmente dos indivíduos mais idosos, constatam que o consumo de produtos alimentícios industrializados é recente. Apesar de grande parte desses indivíduos viverem em relativo isolamento, os alimentos industrializados (tais como óleo, açúcar refinado, refrigerantes, cerveja, massas, salgadinhos, biscoitos, entre outros) podem ser adquiridos hoje muito mais facilmente que há 30 anos devido à melhoria do acesso e do transporte até as cidades. As restrições à caça e pesca na região do Vale do Ribeira teve grande impacto nos hábitos nutricionais dessas populações, levando-as a adotar hábitos alimentares mais semelhantes ao de populações urbanas de baixa renda. Consequentemente essas populações vêm sendo afetadas por doenças frequentes do mundo ocidental e moderno, como a obesidade e a hipertensão.

**Aspectos genéticos**

Um problema frequentemente encontrado em estudos de associação é a presença da estratificação populacional. No nosso estudo, verificamos se havia diferenças significativas em relação às proporções de miscigenação em uma sub-amostra de indivíduos remanescentes de quilombos que foi genotipada em relação a um painel de marcadores de ancestralidade, dividindo-a em hipertensos e normotensos. Nossos resultados indicaram que as proporções de miscigenação africana, européia e ameríndia entre os grupos hipertensos e normotensos não diferem significativamente. O resultado era esperado, uma vez que as amostras selecionadas para o estudo provêm de populações geograficamente próximas, relativamente isoladas ainda nos dias atuais. Apesar de miscigenadas, todas apresentam uma história de miscigenação semelhante, com contribuição similar de africanos, europeus e ameríndios em suas formações (discussão detalhada no capítulo 4).

As análises estatísticas MAX, que foram utilizadas para investigar o efeito individual dos polimorfismos nas variações da pressão arterial e no risco de hipertensão, demonstraram que apenas o polimorfismo C825T no gene *GNB3* estaria associado ao risco

de hipertensão, principalmente quando consideramos o fenótipo mais extremo para classificar um indivíduo como hipertenso (critério JNC). As análises haplotípicas do gene *GNB3* revelaram que cada cópia do haplótipo C825/G-350 aumenta em 1,73 vezes a chance de hipertensão comparado ao efeito de uma cópia do haplótipo basal T825/G-350. Polimorfismos no gene *GNB3* foram anteriormente associados à hipertensão em populações diversas (Dong e col., 1999; Hengstenberg e col., 2001; Li e col., 2004; Yamamoto e col., 2004; Grove e col., 2007), mas diversos outros trabalhos não replicaram os resultados de associação significativa (Brand e col., 1999; Huang e col., 2003; Wang e col., 2004; Gu e col., 2006). Dong e col. (1999), por exemplo, avaliaram a associação do polimorfismo C825T e a hipertensão em uma população de afro-descendentes ingleses, considerando hipertensos os indivíduos que apresentassem valores de pressão arterial ≥ 160/95 mm Hg, ou que faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos. Encontraram uma associação significativa entre o alelo T e o risco de hipertensão. No entanto, Larson e col. (2000), utilizando o mesmo critério de diagnóstico, não encontraram nenhuma associação significativa entre o polimorfismo C825T e a hipertensão em uma população de afro-descendentes dos EUA. Bagos e col. (2007) constataram que em populações africanas, a frequência do alelo T é maior, seguida pelas frequências em asiáticos e caucasianos. Vargens e col. (2008) estudaram uma população miscigenada do Rio de Janeiro, que se auto-identificavam como negros, pardos ou brancos, em relação à distribuição do polimorfismo C825T no gene *GNB3*, e também encontraram frequências mais elevadas do alelo T entre os negros. Nossos resultados mostraram que a frequência do alelo 825T é maior nas populações afro-descendentes remanescentes de quilombos. Comparativamente, a frequência do alelo C825 é maior no grupo dos hipertensos (44,4%) em relação aos normotensos (37,7%). A presença de heterogeneidade entre os resultados de estudos prévios e do nosso estudo pode ser explicada, em parte, devido aos critérios nem sempre uniformes utilizados para classificar hipertensos e normotensos, ou ainda pelo diferentes métodos estatísticos empregados, que podem fornecer resultados diferenciados dependendo dos ajustes e modelos considerados nas análises. Ainda, o polimorfismo em questão pode não ter efeito biológico no fenótipo, mas atuar como um marcador em desequilíbrio de ligação com possíveis variantes que verdadeiramente modulam a pressão sanguínea.

O estudo de Young e col. (2005) demonstrou uma correlação entre PAS, frequência do alelo T e a latitude na qual a população estudada se encontra, ou seja, latitudes elevadas estariam associadas à elevação da pressão arterial sistólica, mas a frequência do alelo T é menor nas populações que vivem nessas latitudes. Em outras palavras, o alelo 825T estaria associado à hipertensão apenas em elevadas latitudes. Os

resultados da meta-análise de Bagos e col. (2007) chamam a atenção para dois estudos em populações afro-descendentes (Dong e col., 1999; Larson e col., 2000), com resultados controvertidos, encontrando associação positiva na população inglesa e negativa na população norte-americana, contradição que poderia ser explicada pela diferença de latitude dos dois países e o fato de haver associação entre a presença do alelo T e a hipertensão em latitudes mais elevadas.

Modelos de predição por GMDR revelaram interações de alta ordem entre as variantes avaliadas em nosso estudo e o risco de hipertensão. Williams e col. (2004), em um estudo caso-controle em uma população de Gana, analisaram um painel de genes candidatos (*ACE*, *AGT*, *NOS3*, *GRK4* e outros genes), que se sobrepõe em parte ao do nosso estudo, e encontraram evidência de interação entre o gene *ACE* e *GRK4*. Kumar e col. (2009) investigaram o papel de polimorfismos nos genes *ACE*, *AGT* e *NOS3*, numa população indiana, e detectaram interações entre os genes *ACE*/*AGT* e *ACE*/*NOS3*, associados à hipertensão. Nossos resultados indicaram interações significativas entre os genes *ACE*, *GRK4*, *GNB3*, *AGT* e *ADD2*, corroborando em parte os resultados da literatura.

Estes achados enfatizam a importância de análises multilocos, pois essa abordagem pode fornecer mais informações sobre os fatores de risco genéticos da hipertensão do que as análises unilocos.

**Limitações do estudo**

O presente estudo apresenta algumas limitaçoes dignas de comentário. Primeiro, o número amostral reduzido resulta em baixo poder estatístico na detecção de efeitos genéticos pequenos. Para esse estudo, por exemplo, o poder estatístico (para um nível de significância de 5%) para as análises de locus simples computado por técnicas de simulação variou entre 24 e 64% dependendo da freqüência (*f*) das variantes de risco (*f* = 10%, 20%, 30% e 40%), do efeito genético verdadeiro (capturado pela *odds ratio* = 1.1, 1.2 , 1.3 e 1.4) e do modelo genético (dominante, multiplicativo e recessivo). Dessa forma, o presente estudo não pode excluir completametne associações individuais entre as variantes estudadas e a pressão arterial na população quilombola. Similarmente, a mesma inferência é válida para as análises de interação gene-gene, onde o baixo poder não descarta potenciais interações não observadas pelo presente estudo.

Ademais, é preciso discernir epistasia biológica da interação. De fato, os métodos aplicados na presente investigação avaliam interações estatísticas entre as variantes selecionadas. De modo importante, os resultados de interações estatísticas não podem facilmente serem traduzidos para uma interpretação biológica. Essa cautela na interpretação

de análises multilocus deve-se principalmente ao fato de as variantes estudadas terem pouca probabilidade de serem as variantes causais, isto é, elas provavalmente atuam somente como marcadores em desequilíbrio de ligação com possíveis variantes que verdadeiramente modulam a pressão sanguínea. Outros fatores que limitam a conexão entre interação estatística e interação biológica são a heterogeneidade genética dentro dos locos estudados, erro de amostragem (isto é, chance) e fatores metodológicos, tais como o erro de genotipagem; que pode influenciar de maneira significativa nos resultados, principalmente devido ao tamanho reduzido do presente estudo, e a presença de fatores de confusão importantes para o estudo da hipertensão essencial (consumo de álcool, tabagismo, níveis de colesterol total, etc.), que não foram considerados nessa investigação. O ajuste para essas covariáveis pode aumentar ou anular potenciais interações estatísticas observadas, ressaltando a importância de uma interpretação circunspecta das interações estatísticas aqui observadas.

Embora a estratificação populacional seja uma das grandes limitações e uma fonte de grande preocupação para os estudos em epidemiologia genética (Pritchard & Rosenberg, 1999; Cardon & Palmer, 2003), o presente estudo demonstrou uma relativa similaridade da porcentagem de ancestralidade entre ambos hipertensos e normotensos. Por conseguinte, pode-se concluir que esse fator não é um problema grave às inferências aqui apresentadas.

### 5.6. Conclusões

Nossos resultados indicaram associação significativa entre os polimorfismos do *GNB3*, bem como interações de alta ordem potenciais entre as variantes nos genes *ACE*, *GRK4*, *GNB3*, *AGT* e *ADD2* no risco de hipertensão. Esses resultados reforçam a hipótese de uma etiologia poligênica na regulação da pressão arterial e no risco de hipertensão nas populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - SP.

# CAPÍTULO 6

## 6. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos: estudo baseado em famílias

### 6.1. Introdução

A hipertensão essencial é uma doença comum, emergindo nas últimas décadas como um dos mais importantes problemas de saúde pública em muitas populações do mundo todo (Cooper e col., 1999; Chobanian e col., 2003; Lawes e col., 2008; Oladapo e col., 2010). Múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos em sua patogênese.

Apesar de nas últimas décadas terem sido identificados muitos genes responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão essencial, ainda existe grande dificuldade em se apontar quais seriam os mais promissores a explicar a regulação da pressão arterial e o risco de hipertensão essencial.

Utilizar metodologias e desenhos de estudos diversificados pode ser um caminho para resolver e explicar contradições a respeito da contribuição dos fatores genéticos na hipertensão arterial.

Muitos pesquisadores focalizaram a abordagem de seleção de genes candidatos nos estudos de associação em busca de locos de susceptibilidade à hipertensão. No entanto, esta abordagem apresenta inconsistências dos resultados em estudos realizados nas diferentes populações (revisão no capítulo 1).

Uma razão importante para a inconsistência nos resultados pode ser a detecção de associações espúrias devido à presença de estratificação populacional (Pritchard & Rosenberg, 1999). Os estudos de associação baseados em famílias representam uma alternativa para contornar a estratificação populacional, uma vez que utilizam amostras de indivíduos controle e afetados provenientes da mesma família. Dessa maneira, casos e controles podem ser adequadamente pareados, evitando resultados de associação falso-positivos.

Um dos mais populares testes de associação baseados em famílias é o TDT (*Transmition Disequilibrium Test*), proposto por Spielman e col. (1993). O método avalia a frequência de transmissão de um alelo associado à uma determinada doença, ou do alelo alternativo, de pais heterozigotos para os filhos afetados. Extensões do TDT surgiram posteriormente (revisão no capítulo 1, pág. 15). O FBAT (*Family-Based Association Test*), proposto por Laird e col. (2000) e Rabinowitz & Laird (2000), unificou os testes de associação baseados em famílias por ser mais abrangente, permitindo análises de famílias com composições heterogêneas, incorporando informações genotípicas não somente de

trios (como no TDT). Esse método tem a vantagem de também tolerar a falta de informações genotípicas parentais.

Aproximadamente 30-50% da variação da pressão arterial na população geral é determinada por fatores genéticos (Li e col., 2009). Estudos familiares demonstraram alta concordância da pressão arterial entre pais e filhos e entre irmãos, com taxas variando de 20 a 66%. Estudos de gêmeos mostraram maior correlação das medidas de pressão arterial entre os monozigóticos (56-62%) do que entre os dizigóticos (21-28%) [revisão em Rafiq e col., 2010]; estudos de irmãos adotivos demonstraram que esses irmãos apresentam menor concordância nos valores de pressão arterial do que irmãos biológicos, reforçando a hipótese de que o agrupamento familiar dos valores de pressão arterial não podem simplesmente ser atribuído apenas ao ambiente compartilhado, mas que a hereditariedade é um fator relevante (Rosskopf e col., 2007).

Estudos baseados em famílias investigaram a associação entre polimorfismos em genes diversos e a hipertensão essencial (Ju e col., 2003; Newhouse e col., 2005; Guzmán e col., 2006; Li e col., 2009), resposta a fármacos anti-hipertensivos (Huang e col., 2003; Jiang e col., 2005), e outros fenótipos relacionados à hipertensão essencial (Tomaszewski e col., 2004; Wang e col., 2004b; Baker e col., 2007), com resultados controvertidos.

Os remanescentes de quilombos, populações afro-descendentes que ainda vivem em áreas rurais semi-isoladas, passam por processos de transição nutricional e epidemiológica importantes, evidenciados, por exemplo, pela elevada frequência de hipertensão essencial encontrada por meio de nossas investigações clínicas preliminares.

As comunidades quilombolas constituem material interessante para estudos de doenças multifatoriais como a hipertensão, pois apresentam modo de vida semelhante e compartilham um ambiente mais homogêneo quando comparados às populações de hospitais de grandes centros urbanos. Além disso, os estudos de associação baseados em famílias podem ser favorecidos, pois existem genealogias extensas, com diversos afetados e com informações de duas ou mais gerações, em diversos núcleos familiares.

No presente estudo, investigamos nas populações remanescentes de quilombos o efeito de polimorfismos em seis genes previamente relacionados à hipertensão essencial em outras populações, por meio de um estudo de associação baseado em famílias.

## 6.2. Objetivo

Realizar análises de transmissão de genótipos em genes candidatos em genealogias dos remanescentes de quilombos, utilizando o FBAT (que leva em consideração a estrutura heterogênea das genealogias), com o objetivo de evidenciar o papel desses genótipos na origem da hipertensão essencial.

## 6.3. Amostras e métodos

### 6.3.1. Amostras e determinação dos genótipos

Os 759 indivíduos da nossa casuística foram genotipados em relação a sete polimorfismos (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) em seis genes candidatos: *ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* e *GRK4* (Tabela I.6), de acordo com os protocolos descritos no capítulo 3. A Tabela I.5 (capítulo 5, pág. 67), mostra as vias de regulação nas quais esses genes atuam.

### 6.3.2. Construção das genealogias

As genealogias completas das populações remanescentes de quilombos foram desenhadas manualmente por vários membros da equipe de pesquisa, utilizando-se as informações obtidas nas entrevistas realizadas com cada indivíduo, na primeira ou na segunda etapa da pesquisa (Anexo V).

Informatizamos as genealogias completas, redesenhando-as com o auxílio do programa GenoPro2007 ®, versão 2.0.

Os desenhos das genealogias foram utilizados na construção de planilhas no formato *ped*, que expressam as relações de parentesco entre os indivíduos e que podem ser analisadas por pacotes computacionais de análise de segregação. Cada indivíduo genotipado recebeu uma identificação numérica, que o vinculou a uma genealogia específica. Indivíduos que não foram genotipados, mas que representavam as conexões entre indivíduos genotipados em suas respectivas genealogias, também receberam identificações numéricas. Assim, 1.626 indivíduos foram incluídos na planilha no formato *ped*.

### 6.3.3. Desenho do estudo

#### 6.3.3.1. Definição dos indivíduos hipertensos e normotensos

Os 759 indivíduos da nossa casuística foram incluídos em 79 genealogias. Realizamos um estudo de associação baseado em famílias, avaliando a segregação dos genótipos investigados, considerando dois fenótipos binários para a hipertensão (classificados de acordo com o critério OMS e JNC), e também considerando a pressão arterial como fenótipo contínuo.

O critério recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) classifica como hipertensos aqueles indivíduos que apresentaram média das duas medidas da pressão sistólica superior ou igual a 140mmHg e/ou média das duas medidas da pressão diastólica superior ou igual a 90mmHg. Também foram considerados hipertensos aqueles que haviam sido diagnosticados anteriormente como hipertensos e faziam uso de medicamentos anti-hipertensivos.

O fenótipo que comensura com os critérios do JNC (*Joint National Commitee on detection, evaluation and treatment of high blood pressure*) é definido por PAS $\geq$ 160mmHg e/ou PAD $\geq$ 95mmHg, ou fazendo uso de medicamentos anti-hipertensivos, e inclui primariamente indivíduos em estágios mais graves da hipertensão essencial.

#### 6.3.3.2. Estudo de associação baseado em famílias

Para as análises de associação baseadas em famílias, utilizamos o *software* FBAT (http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html).

Em linhas gerais, os testes de associação baseados em famílias, propostos por Rabinowitz and Laird (2000), agrupados no FBAT, seguem duas etapas: na primeira é definido o teste estatístico que reflete a associação entre o loco do marcador polimórfico e o loco do gene de susceptibilidade; na segunda etapa calcula-se a distribuição dos genótipos (distribuição de $S$) dos marcadores sob a hipótese nula de que os genótipos da prole apresentam uma distribuição casual. Havendo informações sobre os indivíduos parentais, a distribuição nula é obtida pelo condicionamento das informações genotípicas observadas em todos os outros membros da família aos genótipos dos indivíduos parentais. Na ausência de informações genotípicas completas sobre os indivíduos parentais, a distribuição nula é obtida, não somente condicionando-se as informações genotípicas dos outros membros da família aos genótipos de qualquer um dos parentais, mas também avaliando a configuração genotípica da prole, ou seja, qualquer informação genotípica de um dos pais ou da prole é suficiente para serem feitas inferências estatísticas em relação aos genótipos ausentes dos indivíduos parentais. Quando os genótipos dos indivíduos parentais são

conhecidos, a distribuição dos genótipos da prole é computada de acordo com a segregação mendeliana.

O programa analisa informações de núcleos familiares, pares de irmãos, ou a combinação de ambos, para testar a associação entre fenótipo e genótipos, levando em conta informações de mais de um filho na prole.

O FBAT provê uma estatística Z e o seu nível de significância (*P*) correspondente. O teste é definido por $Z = (S - E[S]) / \sqrt{V}$, onde $S = \sum_{ij} T_{ij} X_{ij}$, sendo $T_{ij}$ uma função condicionada ao fenótipo e $X_{ij}$ uma função definida pelo genótipo do *j*-ésimo filho da família *i* em relação ao loco testado; $E[S]$ é a esperança de $S$. Valores positivos de Z são indicativos de alelos de risco e valores negativos de Z são indicativos de alelos protetores.
Os testes foram realizados utilizando um modelo aditivo, sob a hipótese nula de "não associação". Diversos estudos têm demonstrado que o modelo aditivo apresenta bom poder estatístico, mesmo quando o fenótipo seja melhor explicado por outro modelo de herança (Knapp, 1999; Tu e col., 2000; Horvath e col., 2001).

As análises no FBAT foram conduzidas levando-se em consideração (i) o *status* da hipertensão (variável binária) e (ii) a pressão sanguínea como variável contínua. Nessa segunda abordagem, as pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram analisadas em duas etapas: (a) um modelo considerando apenas a PAS e outro modelo considerando apenas a PAD; (b) um único modelo considerando a PAS e a PAD conjuntamente.

#### 6.3.3.3. Herdabilidade da pressão arterial

Estimamos os valores de herdabilidade da pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica por meio do *software* QTDT, disponível no endereço eletrônico http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/QTDT/index.html (Abecasis e col., 2000). Para se obter a estimativa de herdabilidade, estimou-se a contribuição do componente de variância poligênica (Vg) para a variação do fenótipo quando considerado um modelo completo (variância poligênica + variância ambiental) e comparou-se esta à variância total observada num modelo nulo que apresenta apenas variância ambiental (Ve). Ou seja, a herdabilidade de um fenótipo corresponde a uma estimativa da porcentagem da variação desse fenótipo (quantitativo) que pode ser explicada por fatores genéticos, e é calculada por meio da razão entre a variância poligênica e a variância total (Herdabilidade = Vg/Ve + Vg).

## 6.4. Resultados

### Associação entre os sete polimorfismos e a hipertensão essencial

A Figura 1.6 exemplifica uma das genealogias desenhadas com o auxílio do programa GenoPro2007 ®, versão 2.0, que foi utilizada na construção das planilhas *ped*.

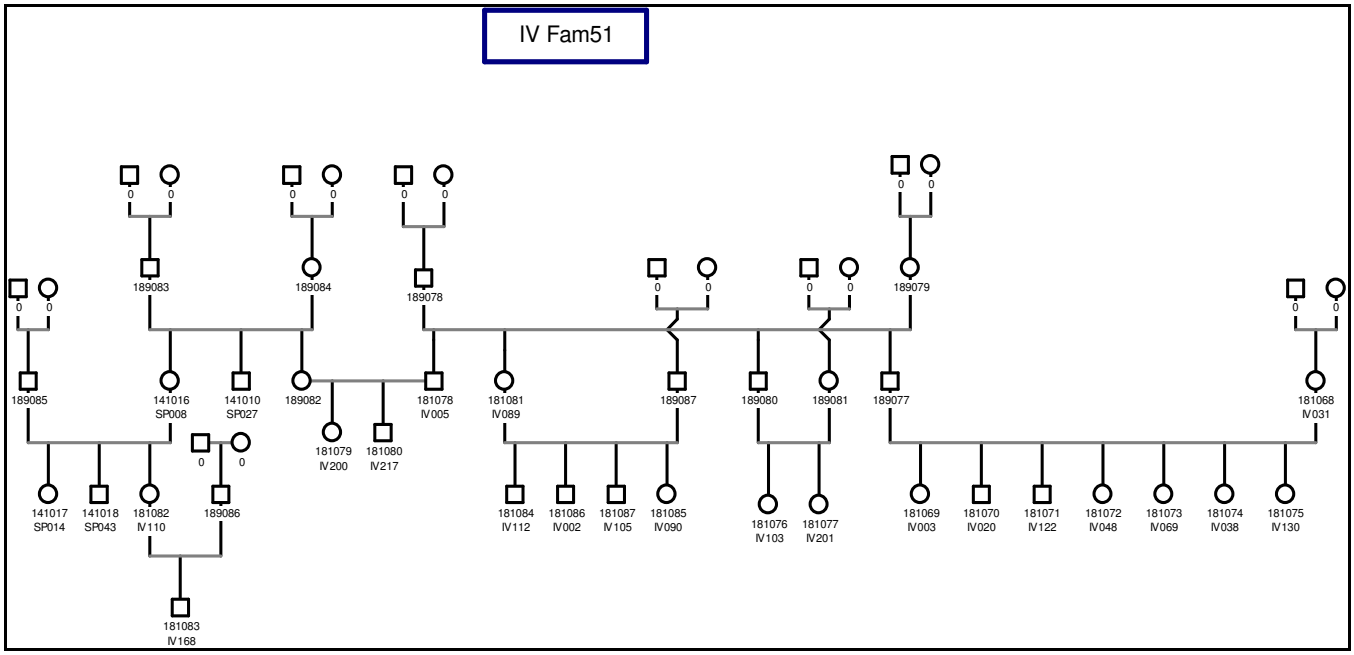



Figura 1.6: Exemplo de genealogia informatizada por meio do programa GenoPro2007 ®, versão 2.0.

#### (i) Segregação dos genótipos e o *status* da hipertensão

Foram obtidos 528 núcleos familiares a partir das 79 genealogias construídas. As Tabelas I.6 e II.6 resumem os resultados do FBAT, em relação ao sete polimorfismos estudados, nas famílias das doze comunidades remanescentes de quilombos, quando a hipertensão essencial foi tratada como fenótipo binário (hipertenso x normotenso), pelos critérios OMS e JNC.

Tabela I.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério OMS). Freq = frequência alélica. Famílias = número de famílias informativas. S = teste estatístico para o número observado de alelos transmitidos. E(S) = valor esperado de S sob a hipótese nula de não associação. Var (S) = variância de S. Z = estatística Z.

| | | | ***Status* segundo o critério OMS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Loco** | **Alelo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| *ACE* | I | 0,498 | 37 | 1,667 | 13,318 | 0,457 | 0,648 |
| rs1799752 | D | 0,502 | | -1,667 | 13,318 | -0,457 | |
| *NOS3* | G | 0,844 | 19 | 3,500 | 4,901 | 1,581 | 0,114 |
| rs1799983 | T | 0,156 | | -3,500 | 4,901 | -1,581 | |
| *GNB3 (C825T)* | C | 0,411 | 38 | 0,833 | 13,319 | 0,228 | 0,819 |
| rs5443 | T | 0,589 | | -0,833 | 13,319 | -0,228 | |
| *GNB3 (G-350A)* | A | 0,314 | 29 | -8,000 | 11,523 | -2,357 | 0,018 |
| rs5441 | G | 0,686 | | 8,000 | 11,523 | 2,357 | |
| *AGT* | C | 0,726 | 47 | 4,867 | 18,114 | 1,143 | 0,253 |
| rs669 | T | 0,274 | | -4,867 | 18,114 | -1,143 | |
| *ADD2* | A | 0,331 | 35 | 5,767 | 11,237 | 1,720 | 0,085 |
| rs3755351 | C | 0,669 | | -5,767 | 11,237 | -1,720 | |
| *GRK4* | C | 0,757 | 33 | -6,567 | 12,510 | -1,857 | 0,063 |
| rs1801058 | T | 0,243 | | 6,567 | 12,510 | 1,857 | |

Os resultados acima indicam que o polimorfismo G-350A no gene *GNB3* está significativamente associado ao risco de hipertensão essencial ($P$ = 0,018).

Tabela II.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério JNC). Freq = frequência alélica. Famílias = número de famílias informativas. S = teste estatístico para o número observado de alelos transmitidos. E(S) = valor esperado de S sob a hipótese nula de não associação. Var (S) = variância de S. Z = estatística Z.

| | | | ***Status* segundo o critério JNC** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Loco** | **Alelo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| *ACE* | I | 0,498 | 26 | -0,417 | 10,483 | -0,129 | 0,898 |
| rs1799752 | D | 0,502 | | 0,417 | 10,483 | 0,129 | |
| *NOS3* | G | 0,844 | 19 | 1,000 | 4,651 | 0,464 | 0,643 |
| rs1799983 | T | 0,156 | | -1,000 | 4,901 | -0,464 | |
| *GNB3 (C825T)* | C | 0,411 | 26 | -2,833 | 8,472 | -0,973 | 0,330 |
| rs5443 | T | 0,589 | | 2,833 | 8,472 | 0,973 | |
| *GNB3 (G-350A)* | A | 0,314 | 25 | -9,500 | 7,735 | -3,416 | 0,001 |
| rs5441 | G | 0,686 | | 9,500 | 7,735 | 3,416 | |
| *AGT* | C | 0,726 | 31 | 1,500 | 9,917 | 0,476 | 0,634 |
| rs669 | T | 0,274 | | -1,500 | 9,917 | -0,476 | |
| *ADD2* | A | 0,331 | 24 | 3,667 | 7,852 | 1,309 | 0,191 |
| rs3755351 | C | 0,669 | | -3,667 | 7,852 | -1,309 | |
| *GRK4* | C | 0,757 | 20 | -2,167 | 8,064 | -0,763 | 0,445 |
| rs1801058 | T | 0,243 | | 2,167 | 8,064 | 0,763 | |

Os resultados acima indicam que o polimorfismo G-350A no gene *GNB3* está significativamente associado ao risco de hipertensão essencial ($P$ = 0,001).

**(ii) Segregação dos genótipos e a pressão arterial como fenótipo contínuo**

As Tabelas III.6 e IV.6 resumem os resultados do FBAT, em relação ao sete polimorfismos estudados, nas famílias das doze comunidades remanescentes de quilombos, quando a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo, em um modelo de análise que leva em consideração apenas (a) a PAS ou a PAD e (b) um modelo único no qual a PAS e a PAD são consideradas conjuntamente.

Tabela III.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica, analisadas separadamente. Freq = frequência alélica. Famílias = número de famílias informativas. S = teste estatístico para o número observado de alelos transmitidos. E(S) = valor esperado de S sob a hipótese nula de não associação. Z = estatística Z.

| Pressão arterial sistólica | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Loco** | **Alelo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| *ACE* | I | 0,498 | 91 | 1133,500 | 400224,013 | 1,792 | 0,073 |
| rs1799752 | D | 0,502 | 91 | -1133,500 | 400224,013 | -1,792 | 0,073 |
| *NOS3* | G | 0,844 | 60 | 547,417 | 178932,731 | 1,294 | 0,196 |
| rs1799983 | T | 0,156 | 60 | -547,417 | 178932,731 | -1,294 | 0,196 |
| *GNB3 (C825T)* | C | 0,411 | 88 | 309,250 | 478913,987 | 0,447 | 0,655 |
| rs5443 | T | 0,589 | 88 | -309,250 | 478913,987 | -0,447 | 0,655 |
| *GNB3 (G-350A)* | A | 0,314 | 75 | -130,500 | 380208,147 | -0,212 | 0,832 |
| rs5441 | G | 0,686 | 75 | 130,500 | 380208,147 | 0,212 | 0,832 |
| *AGT* | C | 0,726 | 95 | 769,767 | 410222,866 | 1,202 | 0,229 |
| rs669 | T | 0,274 | 95 | -769,767 | 410222,866 | -1,202 | 0,229 |
| *ADD2* | A | 0,331 | 91 | 446,467 | 371629,404 | 0,732 | 0,464 |
| rs3755351 | C | 0,669 | 91 | -446,467 | 371629,404 | -0,732 | 0,464 |
| *GRK4* | C | 0,757 | 73 | -866,367 | 396512,210 | -1,376 | 0,169 |
| rs1801058 | T | 0,243 | 73 | 866,367 | 396512,210 | 1,376 | 0,169 |

| Pressão arterial diastólica | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Loco** | **Alelo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| *ACE* | I | 0,498 | 94 | 830,750 | 170747,705 | 2,010 | 0,044 |
| rs1799752 | D | 0,502 | 94 | -830,750 | 170747,705 | -2,010 | 0,044 |
| *NOS3* | G | 0,844 | 60 | 287,833 | 77203,139 | 1,036 | 0,300 |
| rs1799983 | T | 0,156 | 60 | -287,833 | 77203,139 | -1,036 | 0,300 |
| *GNB3 (C825T)* | C | 0,411 | 85 | 274,167 | 201664,054 | 0,611 | 0,542 |
| rs5443 | T | 0,589 | 85 | -274,167 | 201664,054 | -0,611 | 0,542 |
| *GNB3 (G-350A)* | A | 0,314 | 75 | -105,667 | 155819,737 | -0,268 | 0,789 |
| rs5441 | G | 0,686 | 75 | 105,667 | 155819,737 | 0,268 | 0,789 |
| *AGT* | C | 0,726 | 96 | 275,667 | 173414,059 | 0,662 | 0,508 |
| rs669 | T | 0,274 | 96 | -275,667 | 173414,059 | -0,662 | 0,508 |
| *ADD2* | A | 0,331 | 92 | 363,500 | 159848,069 | 0,909 | 0,363 |
| rs3755351 | C | 0,669 | 92 | -363,500 | 159848,069 | -0,909 | 0,363 |
| *GRK4* | C | 0,757 | 71 | -542,833 | 165413,491 | -1,335 | 0,182 |
| rs1801058 | T | 0,243 | 71 | 542,833 | 165413,491 | 1,335 | 0,182 |

Os resultados na Tabela III.6 indicam que o polimorfismo I/D no gene *ACE* está significativamente associado às variações da PAD (*P* = 0,044).

Tabela IV.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica analisadas conjuntamente. Freq = frequência alélica. Famílias = número de famílias informativas. S = teste estatístico para o número observado de alelos transmitidos. E(S) = valor esperado de S sob a hipótese nula de não associação. Z = estatística Z.

| PAS + PAD | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Loco** | **Alelo** | **Freq** | **Famílias** | | **S-E(S)** | **Z** | ***P*** |
| *ACE* rs1799752 | I | 0,498 | 91 | PAS | 1133,500 | 1,792 | 0,036 |
| | D | 0,502 | | | -1133,500 | -1,792 | |
| | I | 0,498 | 94 | PAD | 830,750 | 2,010 | |
| | D | 0,502 | | | -830,750 | -2,010 | |
| *NOS3* *rs1799983* | G | 0,844 | 60 | PAS | 547,417 | 1,294 | 0,133 |
| | T | 0,156 | | | -547,417 | 1,036 | |
| | G | 0,844 | 60 | PAD | 287,833 | -1,294 | |
| | T | 0,156 | | | -287,833 | -1,036 | |
| *GNB3 (C825T)* *rs5443* | C | 0,411 | 88 | PAS | 309,250 | 0,447 | 0,851 |
| | T | 0,589 | | | -309,250 | -0,447 | |
| | C | 0,411 | 85 | PAD | 247,167 | 0,611 | |
| | T | 0,589 | | | -274,167 | -0,611 | |
| *GNB3 (G-350A)* *rs5441* | A | 0,314 | 75 | PAS | -130,500 | -0,212 | 0,580 |
| | G | 0,686 | | | 130,500 | 0,212 | |
| | A | 0,314 | 75 | PAD | -105,667 | -0,268 | |
| | G | 0,686 | | | 105,667 | 0,268 | |
| *AGT* *rs669* | C | 0,726 | 95 | PAS | 769,767 | 1,202 | 0,301 |
| | T | 0,274 | | | -769,767 | -1,202 | |
| | C | 0,726 | 96 | PAD | 275,667 | 0,662 | |
| | T | 0,274 | | | -275,667 | -0,662 | |
| *ADD2* *rs3755351* | A | 0,331 | 91 | PAS | 446,467 | 0,732 | 0,418 |
| | C | 0,669 | | | -446,467 | -0,732 | |
| | A | 0,331 | 92 | PAD | 363,500 | 0,909 | |
| | C | 0,669 | | | -363,500 | -0,909 | |
| *GRK4* *rs1801058* | C | 0,757 | 73 | PAS | -866,367 | -1,376 | 0,088 |
| | T | 0,243 | | | 866,367 | 1,376 | |
| | C | 0,757 | 71 | PAD | -542,833 | -1,335 | |
| | T | 0,243 | | | 542,833 | 1,335 | |

Os resultados na Tabela IV.6 indicam que o polimorfismo I/D no gene *ACE* está significativamente associado às variações da PAS e da PAD (*P* = 0,036).

A Tabela V.6 resume os resultados do FBAT, em relação aos haplótipos no gene *GNB3* (variantes C825T e G-350A), nas famílias das doze comunidades remanescentes de quilombos, quando a hipertensão essencial foi tratada como fenótipo binário (hipertenso x normotenso), pelos critérios OMS e JNC.

Tabela V.6: Resultados do FBAT em relação aos haplótipos no gene *GNB3*. Freq = frequência haplotípica. Famílias = número de famílias informativas. S = teste estatístico para o número observado de haplótipos transmitidos. E(S) = valor esperado de S sob a hipótese nula de não associação. Var (S) = variância de S. Z = estatística Z.

| ***Status* segundo o critério OMS** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Haplótipo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| TG | 0,503 | 16 | 4,850 | 8,103 | 1,704 | 0,088 |
| CG | 0,205 | 12 | 2,483 | 8,775 | 0,838 | 0,402 |
| CA | 0,186 | 13 | -2,650 | 4,661 | -1,227 | 0,220 |
| TA | 0,105 | 12 | -4,684 | 9,488 | -1,520 | 0,128 |
| ***Status* segundo o critério JNC** | | | | | | |
| **Haplótipo** | **Freq** | **Famílias** | **S-E(S)** | **Var(S)** | **Z** | ***P*** |
| TG | 0,503 | 28 | 7,156 | 8,593 | 2,441 | 0,015 |
| CG | 0,205 | 23 | 1,927 | 3,835 | 0,984 | 0,325 |
| CA | 0,186 | 23 | -4,344 | 4,823 | -1,978 | 0,050 |
| TA | 0,105 | 17 | -4,740 | 2,067 | -3,297 | 0,001 |

Os resultados acima indicam que o haplótipo T825/A-350 tem efeito protetor (*P* = 0,001). O haplótipo de risco é o T825/G-350 (*P* = 0,015). Estes efeitos foram evidenciados na análise que levou em consideração o fenótipo mais extremo da hipertensão (critério JNC).

**Herdabilidade da pressão arterial**

A Tabela VI.6 resume os resultados das estimativas de herdabilidade da pressão arterial sistólica e da pressão arterial diastólica, obtidas a partir das 79 genealogias das populações remanescentes de quilombos.

Tabela VI.6: Variância atribuída ao componente ambiental (Ve), variância atribuída ao componente poligênico (Vg), herdabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). Valores de *P* significativos < 0,05, adotando-se intervalo de confiança de 95%.

| Fenótipos | Ve | Vg | Herdabilidade | *P* |
|---|---|---|---|---|
| PAS | 252,19 | 142,50 | 36,10% | $3 \times 10^{-4}$ |
| PAD | 82,73 | 62,22 | 42,92% | $4 \times 10^{-7}$ |

A herdabilidade estimada (ajustada para idade, gênero e IMC) para a pressão arterial sistólica foi de 36,10%, e para a pressão arterial diastólica foi de 42,92%.

## 6.5. Discussão

As análises do FBAT demonstraram que o polimorfismo G-350A no gene *GNB3* está associado significativamente ao risco de hipertensão essencial nas famílias das populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira (Tabela I.6 e II.6). O alelo A-350 corresponde ao alelo de risco. Os resultados do estudo de associação baseado em famílias confirmam as tendências apontadas pelo estudo transversal descrito no capítulo 5, realizado com indivíduos não aparentados em primeiro grau, em relação ao gene *GNB3*. No estudo transversal, o polimorfismo C825T no mesmo gene é o que está associado ao risco de hipertensão essencial.

Um resultado marginalmente significativo de associação foi encontrado entre o gene *GRK4* e o risco de hipertensão essencial (critério OMS) nas famílias das comunidades remanescentes de quilombos (Tabela I.6). Resultados marginalmente significativos não precisam necessariamente ser descartados, uma vez que o número de famílias informativas é relativamente pequeno.

Quando a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo, observamos associação significativa entre o polimorfismo *ACE* I/D e a PAD analisada individualmente e ambas as pressões arteriais (PAS e PAD) analisadas conjuntamente. Wang e col., (2004) investigaram em famílias chinesas a associação entre a variação da pressão arterial e três genes candidatos (*ACE*, *ADD1* e o gene da sintase de aldosterona), e observaram interação entre os três genes, associada à variação da pressão arterial sistólica.

As análises haplotípicas não revelaram associação significativa entre os haplótipos no gene *GNB3* e o risco de hipertensão essencial nas famílias, quando o fenótipo foi

classificado de acordo com o critério OMS. Uma possível explicação para a não detecção de associação nessa abordagem pode ser o número reduzido de famílias com indivíduos informativos em relação aos haplótipos (Tabela V.6). No entanto, quando o fenótipo mais extremo foi analisado (critério JNC), o haplótipo T825/G-350 está significativamente associado ao risco de hipertensão essencial, e o haplótipo T825/A-350 tem efeito protetor ($P$ = 0,015 e $P$ = 0,001, respectivamente).

Em um trabalho utilizando a mesma metodologia, porém investigando o polimorfismo C825T, não foi encontrada associação entre o gene *GNB3* e a hipertensão essencial em famílias de uma população chinesa (Huang e col., 2003).

Nossos resultados com as análises de segregação em famílias vêm corroborar os achados do estudo transversal, sugerindo real participação do gene *GNB3* na gênese da hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.

As análises do QTDT mostram que a PAS e a PAD possuem herdabilidade estimada em 36,10% e 42,92%, respectivamente (Tabela II.6). Rotimi e col. (1999) estimaram herdabilidade da PAS e da PAD em 45% e 43%, respectivamente, em uma população da Nigéria. Outras estimativas estão próximas de 25%, em populações diversas (revisão em van Rijn e col., 2007). de Oliveira e col., (2008) estimaram a herdabilidade da PAS em 25,9% e da PAD em 26,2%, estudando uma população rural miscigenada do Brasil. Espera-se que a herdabilidade de fenótipos relacionados ao risco de doenças cardiovasculares (como a circunferência da cintura, níveis de colesterol, níveis de pressão arterial, entre outros) variem devido à combinação de fatores ambientais (modo de vida, exemplo) com a variabilidade genética existente entre as diferentes populações (de Oliveira e col., 2008).

**Limitações do estudo**

O presente estudo apresenta algumas limitações a serem discutidas. O número de famílias que satisfazem as condições necessárias para o estudo é relativamente pequeno, resultando em baixo poder estatístico. Por isso resultados marginalmente significativos não necessariamente precisam ser descartados, e outras associações existentes podem não estar sendo observadas.

Outros aspectos podem ainda ser avaliados, como por exemplo, a herdabilidade da hipertensão como fenótipo binário.

As análises processadas no FBAT não foram ajustadas para covariáveis sabidamente associadas à hipertensão essencial (idade, IMC e gênero), devido a limitações do próprio programa. Outros métodos precisam ser explorados para que possamos inserir covariáveis e assim ajustar mais adequadamente os modelos de análises.

Outras abordagens, como por exemplo, avaliar interações gene-gene e a segregação das combinações das variantes nas famílias, podem complementar e enriquecer os estudos de associação nas populações quilombolas, extraindo o máximo de informações genéticas que possam explicar melhor a susceptibilidade à hipertensão nessas populações com características genealógicas potencialmente interessantes.

### 6.6. Conclusões

Nossos resultados mostraram que a pressão arterial é um fenótipo com elevada herdabilidade, justificando a investigação das bases genéticas que conferem susceptibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos. Além disso, nossos resultados de transmissão em famílias indicaram associação significativa entre o gene *GNB3* e a hipertensão essencial, corroborando nossos resultados do estudo transversal com indivíduos não aparentados, o que dá suporte à associação real entre o gene *GNB3* e a hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos.

# REFERÊNCIAS

Abe-Sandes K, Silva WA Jr, Zago MA. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. Hum Biol. 2004 Feb; 76(1):77-86. Review.

Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Lashley K, Chen Y, Christman M, Rotimi C. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. PLoS Genet. 2009 Jul; 5(7):e1000564.

Addo J, Smeeth L, Leon DA. Hypertension in sub-saharan Africa: a systematic review. Hypertension. 2007 Dec; 50(6):1012-8. Review.

Agenda socioambiental de comunidades quilombolas do Vale do Ribeira / editores: Kátia M. Pacheco dos Santos, Nilto Tatto. Instituto Socioambiental, 2008.

Agyemang C, Bhopal R. Is the blood pressure of people from African origin adults in the UK higher or lower than that in European origin white people? A review of cross-sectional data. J Hum Hypertens. 2003 Aug; 17(8):523-34. Review.

Akey J, Jin L, Xiong M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? Eur J Hum Genet. 2001 Apr; 9(4):291-300.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet. 2000 Aug; 67(2):444-61. Erratum in: Am J Hum Genet 2000 Sep; 67(3):775.

Angeli, CB. Susceptibilidade Genética e Outros Fatores de Risco Associados ao Sobrepeso e à Obesidade em Populações Afro-descendentes do Vale do Ribeira-SP. Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2008.

Arora P, Newton-Cheh C. Blood pressure and human genetic variation in the general population. Curr Opin Cardiol. 2010 Mar 10.

Arpini-Sampaio Z, Costa MC, Melo AA, Carvalho MF, Deus MS, Simões AL. Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. Hum Biol. 1999 Feb; 71(1):69-85.

Bae Y, Park C, Han J, Hong YJ, Song HH, Shin ES, Lee JE, Han BG, Jang Y, Shin DJ, Yoon SK. Interaction between GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms in essential hypertension in Koreans. J Hum Hypertens. 2007 Feb; 21(2):159-66.

Bagos PG, Elefsinioti AL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ. The GNB3 C825T polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis of 34 studies including 14,094 cases and 17,760 controls. J Hypertens. 2007 Mar; 25(3):487-500.

Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. J Mol Med. 2008 Jun; 86(6):615-21.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010; 50:439-65. Review.

Baker M, Rahman T, Hall D, Avery PJ, Mayosi BM, Connell JM, Farrall M, Watkins H, Keavney B. The C-532T polymorphism of the angiotensinogen gene is associated

with pulse pressure: a possible explanation for heterogeneity in genetic association studies of AGT and hypertension. Int J Epidemiol. 2007 Dec; 36(6):1356-62.

Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB. Human population genetic structure and inference of group membership. Am J Hum Genet. 2003 Mar; 72(3):578-89.

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. Ann Hum Genet. 2006 Sep; 70(Pt 5):658-65.

Bengra C, Mifflin TE, Khripin Y, Manunta P, Williams SM, Jose PA, Felder RA. Genotyping of essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogeneous PCR method with universal energy transfer primers. Clin Chem. 2002 Dec; 48(12):2131-40.

Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, Schork NJ, Richard E, Salem RM, Nievergelt CM, Bakris GL, Middleton JP, Norris KC, Wright J, Hiremath L, Contreras G, Appel LJ, Lipkowitz MS; AASK Study Investigators. G-protein-coupled receptor kinase 4 polymorphisms and blood pressure response to metoprolol among African Americans: sex-specificity and interactions. Am J Hypertens. 2009 Mar; 22(3):332-8.

Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P, Torielli L, Cusi D, Ferrandi M, et al. Two point mutations within the adducing genes are involved in blood pressure variation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26; 91(9):3999-4003.

Bianchi G, Ferrari P, Staessen JA. Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. Hypertension. 2005 Mar; 45(3):331-40. Review.

Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. Curr Opin Cardiol. 2007 May; 22(3):176-84. Review.

Bis JC, Smith NL, Psaty BM, Heckbert SR, Edwards KL, Lemaitre RN, Lumley T, Rosendaal FR. Angiotensinogen. Met235Thr polymorphism, angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, and the risk of nonfatal stroke or myocardial infarction in hypertensive patients. Am J Hypertens. 2003 Dec; 16(12):1011-7.

Boehnke M, Langefeld CD. Genetic association mapping based on discordant sib pairs: the discordant-alleles test. Am J Hum Genet. 1998 Apr; 62(4):950-61.

Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. Ann Hum Genet. 2004 Mar; 68(Pt 2):139-53.

Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, Silva-Júnior WA, Bonatto SL, da Silva MC, Weimer TA. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. Hum Biol. 1997 Apr; 69(2):141-59.

Bortolini MC, Da Silva WA Junior WA, De Guerra DC, Remonatto G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MC, Zago MA, Salzano FM. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings

according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. Am J Hum Biol. 1999; 11(4):551-563.

Bourne LT, Lambert EV, Steyn K. Where does the black population of South Africa stand on the nutrition transition? Public Health Nutr. 2002 Feb; 5(1A):157-62. Review.

Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J, Grobbee D, Schmidt S, Schunkert H, Schuster H, Sharma AM, Soubrier F. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. Hypertension. 1998 Mar; 31(3):725-9.

Brand E, Herrmann SM, Nicaud V, Ruidavets JB, Evans A, Arveiler D, Luc G, Plouin PF, Tiret L, Cambien F. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit beta3 is not related to hypertension. Hypertension. 1999 May; 33(5):1175-8.

Callegari-Jacques SM., Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v. 51, p. 166-174, 1999.

Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. Lancet. 2003 Feb 15; 361(9357):598-604. Review.

Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, Righetti M, Nembri P, Amar K, Gatti M, Macciardi F, et al. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. Hypertension. 1995 Mar; 25(3):320-6.

Carey RM. Aldosterone and cardiovascular disease. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010 Jun;17(3):194-8. Review.

Carvalho JJ, SJ Doria, ANJ Oliveira – histórias, tradição e lutas. EDUFBA, Salvador, 1995.

Carvalho BM, Bortolini MC, Batista dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AKC. Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations. Genet Mol Biol. vol 31, n.1 São Paulo, 2008.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. Am J Hum Genet. 2001 Jan; 68(1):281-6.

Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJ. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. J Clin Invest. 1995 Aug; 96(2):687-92.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. The History and Geography of Human Genes. Princeton University Press, USA, 1996.

Cavalli-Sforza LL. The DNA revolution in population genetics. Trends Genet. 1998 Feb; 14(2):60-5. Review.

Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. Nat Genet. 2003 Mar; 33 Suppl:266-75. Review.

Cayres-Vallinoto IMV, Vallinoto ACR, Valente CMD, Guerreiro JF. Allele frequency distributions of six hypervariable loci (D1S80, APOB, D4S43, vW1, F13A and DYS19) in two African-Brazilian communities from the Amazon region. Genet Mol Biol, vol.26 n.3 São Paulo, 2003.

Chen W, Srinivasan SR, Li S, Boerwinkle E, Berenson GS. Gender-specific influence of NO synthase gene on blood pressure since childhood: the Bogalusa Heart Study. Hypertension. 2004 Nov; 44(5):668-73.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003 Dec; 42(6):1206-52.

Chuang SY, Chou P, Hsu PF, Cheng HM, Tsai ST, Lin IF, Chen CH. Presence and progression of abdominal obesity are predictors of future high blood pressure and hypertension. Am J Hypertens. 2006 Aug; 19(8):788-95.

Citterio L, Lanzani C, Manunta P, Bianchi G. Genetics of primary hypertension: The clinical impact of adducin polymorphisms. Biochim Biophys Acta. 2010 Apr 8.

Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. J Endocrinol. 2005 Jul; 186(1):1-20. Review.

Cooper R, Rotimi C. Hypertension in blacks. Am J Hypertens. 1997 Jul; 10(7 Pt 1):804-12. Review.

Cooper RS, Rotimi CN, Ward R. The puzzle of hypertension in African-Americans. Sci Am. 1999 Feb; 280(2):56-63.

Cooper RS, Wolf-Maier K, Luke A, Adeyemo A, Banegas JR, Forrester T, Giampaoli S, Joffres M, Kastarinen M, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M. An international comparative study of blood pressure in populations of European vs. African descent. BMC Med. 2005 Jan 5; 3:2.

Cotrim NH, Auricchio MT, Vicente JP, Otto PA, Mingroni-Netto RC. Polymorphic Alu insertions in six Brazilian African-derived populations. Am J Hum Biol. 2004 May-Jun; 16(3):264-77.

Crawford AG, Cote C, Couto J, Daskiran M, Gunnarsson C, Haas K, Haas S, Nigam SC, Schuette R. Prevalence of obesity, type II diabetes mellitus, hyperlipidemia, and hypertension in the United States: findings from the GE Centricity Electronic Medical Record database. Popul Health Manag. 2010 Jun; 13(3):151-61.

Cui J, Zhou X, Chazaro I, DeStefano AL, Manolis AJ, Baldwin CT, Gavras H. Association of polymorphisms in the promoter region of the PNMT gene with essential hypertension in African Americans but not in whites. Am J Hypertens. 2003 Oct;16(10):859-63.

Da Silva WA Jr, Bortolini MC, Meyer D, Salzano FM, Elion J, Krishnamoorthy R, Schneider MP, De Guerra DC, Layrisse Z, Castellano HM, Weimer TD, Zago MA. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. Am J Phys Anthropol. 1999 Aug; 109(4):425-37.

De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. Hum Biol. 2007 Dec; 79(6):667-77.

Deshmukh PR, Gupta SS, Dongre AR, Bharambe MS, Maliye C, Kaur S, Garg BS. Relationship of anthropometric indicators with blood pressure levels in rural Wardha. Indian J Med Res. 2006 May; 123(5):657-64.

de Oliveira CM, Pereira AC, de Andrade M, Soler JM, Krieger JE. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. BMC Med Genet. 2008 Apr 22; 9:32.

Dornelles CL, Callegari-Jacques, SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHLP, Hickmann, Geiger CJ, Salzano FM. Genetics, surnames, grandparents nationalities, and ethnic admixture in Southern Brazil: do the parents of variation coincide? Genet Mol Biol. vol 22, n.2 São Paulo, June 1999.

Di Pasquale P, Cannizzaro S, Paterna S. Does angiotensin-converting enzyme gene polymorphism affect blood pressure? Findings after 6 years of follow-up in healthy subjects. (2004). Eur J Heart Fail. Jan;6(1):11-6.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Revista Brasileira de Hipertensão, São Paulo, v.17, n.1. Jan/Mar 2010. Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP. Association between the C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. Hypertension. 1999 Dec; 34(6):1193-6.

Ehret GB. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. Curr Hypertens Rep. 2010 Feb; 12(1):17-25. Review.

Ekpo EB, Udofia O, Eshiet NF, Andy JJ. Demographic, life style and anthropometric correlates of blood pressure of Nigerian urban civil servants, factory and plantation workers. J Hum Hypertens. 1992 Aug;6(4):275-80.

Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D. Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. J Psychopharmacol. 2006 Jul; 20(4 Suppl):19-26. Review.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online. 2005; 1:47-50.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics. 2003 Aug; 164(4):1567-87.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Mol Ecol Notes. 2007 Jul 1; 7(4):574-578.

Fejerman L, Wu X, Adeyemo A, Luke A, Zhu X, Hicks C, Cooper RS. The effect of genetic variation in angiotensinogen on serum levels and blood pressure: a comparison of Nigerians and US blacks. J Hum Hypertens. 2006 Nov; 20(11):882-7.

Felder RA, Sanada H, Xu J, Yu PY, Wang Z, Watanabe H, Asico LD, Wang W, Zheng S, Yamaguchi I, Williams SM, Gainer J, Brown NJ, Hazen-Martin D, Wong LJ, Robillard JE, Carey RM, Eisner GM, Jose PA. G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19; 99(6):3872-7.

Fornage M, Amos CI, Kardia S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. Circulation. 1998 May 12; 97(18):1773-9.

Foucan L, Hanley J, Deloumeaux J, Suissa S. Body mass index (BMI) and waist circumference (WC) as screening tools for cardiovascular risk factors in Guadeloupean women. J Clin Epidemiol. 2002 Oct; 55(10):990-6.

Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis. 2010 Mar-Apr; 52(5):393-400. Review.

Frisancho RA. Anthropometric Standards for the Assessment of Growth and Nutritional Status. 1990. The University of Michigan Press, USA.

Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 2009. World Health Organization.

González JR, Carrasco JL, Dudbridge F, Armengol L, Estivill X, Moreno V. Maximizing association statistics over genetic models. Genet Epidemiol. 2008 Apr; 32(3):246-54.

Guerreiro JF, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos EJM, Vallinoto ACR, Cayres-Vallinoto IMV, Aguiar GFS, Batista dos Santos SE. Genetical-Demographic Data From Two Amazonian Populations Composed of Descendants of African Slaves: Pacoval and Curiau. Genet Mol Biol. vol.22, n.2 São Paulo, June 1999.

Gu D, Su S, Ge D, Chen S, Huang J, Li B, Chen R, Qiang B. Association study with 33 single-nucleotide polymorphisms in 11 candidate genes for hypertension in Chinese. Hypertension. 2006 Jun; 47(6):1147-54.

Guo SW, Thompson EA. Biometrics. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. 1992 Jun; 48(2):361-72.

Gus M, Cichelero FT, Moreira CM, Escobar GF, Moreira LB, Wiehe M, Fuchs SC, Fuchs FD. Waist circumference cut-off values to predict the incidence of hypertension: an estimation from a Brazilian population-based cohort. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009 Jan; 19(1):15-9.

Guzmán B, Cormand B, Ribasés M, González-Núñez D, Botey A, Poch E. Implication of chromosome 18 in hypertension by sibling pair and association analyses: putative involvement of the RKHD2 gene. Hypertension. 2006 Nov; 48(5):883-91.

Grove ML, Morrison A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hoelscher DM, Bray MS. Gene-environment interaction and the GNB3 gene in the Atherosclerosis Risk in Communities study. Int J Obes (Lond). 2007 Jun; 31(6):919-26.

Harrap SB. Blood pressure genetics: time to focus. J Am Soc Hypertens. 2009 Jul-Aug;3(4):231-7.

Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Doring A, Lowel H, Hense HW, Fischer M, Riegger GA, Holmer SR. Higaki. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2001 Mar; 49(4):820-7.

Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. Eur J Hum Genet. 2001 Apr; 9(4):301-6.

Huang X, Ju Z, Song Y, Zhang H, Sun K, Lu H, Yang Z, Jose PA, Zhou G, Wang M, Wang W, Feng S, Hui R. Lack of association between the G protein beta3 subunit gene and essential hypertension in Chinese: a case-control and a family-based study. J Mol Med. 2003 Nov; 81(11):729-35.

International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Waye MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallée C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T, Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D,

Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archevêque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K, Jamieson R, Stewart J. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):851-61.

Ismail M, Akhtar N, Nasir M, Firasat S, Ayub Q, Khaliq S. Association between the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in young Pakistani patients. J Biochem Mol Biol. 2004 Sep 30; 37(5):552-5.

Jáchymová M, Horký K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, Martásek P. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 8; 284(2):426-30.

Jain S, Tang X, Narayanan CS, Agarwal Y, Peterson SM, Brown CD, Ott J, Kumar A. Angiotensinogen gene polymorphism at -217 affects basal promoter activity and is associated with hypertension in African-Americans. J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36889-96.

Jardim PC, Carneiro O, Carneiro SB, Baiocchi MN. [Arterial blood pressure in the remaining isolated black community of a quilombo north of Goiás-Kalunga]. Arq Bras Cardiol. 1992 Apr; 58(4):289-93.

Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo AP, Hata A, Corvol P, Lalouel JM. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. Am J Hum Genet. 1997 Jun; 60(6):1448-60.

Ji LD, Zhang LN, Shen P, Wang P, Zhang YM, Xing WH, Xu J. Association of angiotensinogen gene M235T and angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphisms with essential hypertension in Han Chinese population: a meta-analysis. J Hypertens. 2010 Mar; 28(3): 419-28.

Jiang S, Hsu YH, Niu T, Xu X, Xing H, Chen C, Wang X, Zhang Y, Peng S, Xu X. A common haplotype on methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on blood pressure in essential hypertension patients--a family-based association study. Clin Exp Hypertens. 2005 Aug;27(6):509-21.

Johnson AD, O'Donnell CJ. An open access database of genome-wide association results. BMC Med Genet. 2009 Jan 22; 10:6.

Jose PA, Soares-da-Silva P, Eisner GM, Felder RA. Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: Role in blood pressure regulation. Biochim Biophys Acta. 2010 Feb 12.

Ju Z, Zhang H, Sun K, Song Y, Lu H, Hui R, Huang X. Alpha-adducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: a case-control and family-based study. J Hypertens. 2003 Oct; 21(10):1861-8.

Kajiyama N, Saito Y, Miyamoto Y, Yoshimura M, Nakayama M, Harada M, Kuwahara K, Kishimoto I, Yasue H, Nakao K. Lack of association between T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. Hypertens Res. 2000 Nov; 23(6): 561-5.

Kardia SL, Sun YV, Hamon SC, Barkley RA, Boerwinkle E, Turner ST. Interactions between the adducin 2 gene and antihypertensive drug therapies in determining blood pressure in people with hypertension. BMC Med Genet. 2007 Sep 13; 8:61.

Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. Hypertension. 1999 Apr; 33(4):933-6.

Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H. High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project. Hum Mol Genet. 2008 Feb 15; 17(4):617-27.

Kedzierska K, Ciechanowski K, Safranow K, Bober J, Golembiewska E, Kwiatkowska E, Kabat-Koperska J, Ostrowski M, Adler G, Chlubek D. GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms on the sodium-proton exchanger and the prevalence of essential hypertension in males. Arch Med Res. 2006 Jan; 37(1):150-7.

Kendrew J (ed) The Encyclopedia of Molecular Biology. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1994.

Kengne AP, Awah PK, Fezeu L, Mbanya JC. The burden of high blood pressure and related risk factors in urban sub-Saharan Africa: evidences from Douala in Cameroon. Afr Health Sci. 2007 Mar;7(1):38-44.

Khawaja MR, Taj F, Ahmad U, Saleheen D, Jafar T, Frossard PM. Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism with essential hypertension in an adult Pakistani Pathan population. Int J Cardiol. 2007 Mar 2; 116(1):113-5.

Kishimoto T, Misawa Y, Kaetu A, Nagai M, Osaki Y, Okamoto M, Yoshida S, Kurosawa Y, Fukumoto S. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. Prev Med. 2004 Nov; 39(5):927-31.

Kimura, L; Macedo-Souza, LI; Rincon, D; Vicente, JP, Auricchio, MTBM, Otto, PA; Mingroni-Netto, RC. Origin and Diversity of Y Chromosome in African-derived Brazilian Populations. Manuscrito submetido ao American Journal of Human Biology. 2010.

Klein HS. The Atlantic Slave Trade. Cambridge University Press, 1999.

Knapp M. A note on power approximations for the transmission/disequilibrium test. Am J Hum Genet. 1999 Apr; 64(4):1177-85.

Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW, De La Vega FM, Seldin MF. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. Hum Mutat. 2009 Jan; 30(1):69-78.

Kumar A, Li Y, Patil S, Jain S. A haplotype of the angiotensinogen gene is associated with hypertension in african americans. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005 May-Jun; 32(5-6):495-502. Review.

Kumar R, Nejatizadeh A, Arif E, Akhtar S, Gupta M, Tyagi S, Goyal AK, Jain SK, Qadar Pasha MA. Multi-locus interactions of vascular homeostasis genes in essential hypertension: a gender-based study. Clin Chim Acta. 2009 Jul; 405(1-2):87-93.

Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. J Hypertens. 1998 Jan; 16(1):31-5.

Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). J Med Genet. 2000 Nov; 37(11):831-5.

Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. Genet Epidemiol. 2000; 19 Suppl 1:S36-42.

Laird NM, Lange C. Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. Nat Rev Genet. 2006 May; 7(5):385-94. Review.

Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. Hypertension. 2000 Jun; 35(6):1297-300.

Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A; International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. Lancet. 2008 May 3; 371(9623):1513-8. Review.

Lazzeroni LC, Lange K. A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. Hum Hered. 1998 Mar-Apr; 48(2):67-81.

Lee ZS, Critchley JA, Chan JC, Anderson PJ, Thomas GN, Ko GT, Young RP, Chan TY, Cockram CS, Tomlinson B. Obesity is the key determinant of cardiovascular risk factors in the Hong Kong Chinese population: cross-sectional clinic-based study. Hong Kong Med J. 2000 Mar; 6(1):13-23.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaco no Brasil. Rev Bras Hipertens 8: 383-92, 2001.

Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level,

endothelial function, and blood pressure in African Americans. Am J Hypertens. 2004 Jul; 17(7):560-7.

Li B, Ge D, Wang Y, Zhao W, Zhou X, Gu D, Chen R. G protein beta 3 subunit gene variants and essential hypertension in the northern Chinese Han population. Ann Hum Genet. 2005 Jul; 69(Pt 4):468-73.

Li WW, Niu WQ, Zhang Y, Wu S, Gao PJ, Zhu DL. Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. J Hypertens. 2009 Jun; 27(6):1194-201.

Luizon MR, Mendes-Junior CT, De Oliveira SF, Simões AL. Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. Am J Hum Biol. 2008 Jan-Feb; 20(1):86-90.

Macedo-Souza LI. Variabilidade Molecular do Cromossomo Y em Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2003.

Marcun Varda N, Zagradisnik B, Herodez SS, Kokalj Vokac N, Gregoric A. Polymorphisms in four candidate genes in young patients with essential hypertension. Acta Paediatr. 2006 Mar; 95(3):353-8.

Marro ML, Scremin OU, Jordan MC, Huynh L, Porro F, Roos KP, Gajovic S, Baralle FE, Muro AF. Hypertension in beta-adducin-deficient mice. Hypertension. 2000 Sep; 36(3):449-53.

Martin ER, Kaplan NL, Weir BS. Tests for linkage and association in nuclear families. Am J Hum Genet. 1997 Aug; 61(2):439-48.

Martín DN, Andreu EP, Ramírez Lorca R, García-Junco PS, Vallejo Maroto I, Santos RA, Miranda Guisado ML, Grijalvo OM, Ortiz JV, Carneado de la Fuente J. G-protein beta-3 subunit gene C825 T polymorphism: influence on plasma sodium and potassium concentrations in essential hypertensive patients. Life Sci. 2005 Oct 21; 77(23):2879-86.

Matsubara M, Metoki H, Katsuya T, Kikuya M, Suzuki M, Michimata M, Araki T, Hozawa A, Tsuji I, Ogihara T, Imai Y. T+31C polymorphism (M235T) of the angiotensinogen gene and home blood pressure in the Japanese general population: the Ohasama Study. Hypertens Res. 2003 Jan; 26(1):47-52.

Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. Hypertension. 1998 Jul; 32(1):3-8.

Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. J Clin Epidemiol. 1999 Dec; 52(12):1213-24.

Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. BMC Nephrol. 2005 Jan 11; 6(1):1.

Moore JH. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. Hum Hered. 2003; 56(1-3):73-82.

Morshed M, Khan H, Akhteruzzaman S. Association between angiotensina I-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in selected individuals of the Bangladeshi population. J Biochem Mol Biol. 2002 May 31; 35(3):251-4.

Namkung J, Kim K, Yi S, Chung W, Kwon MS, Park T. New evaluation measures for multifactor dimensionality reduction classifiers in gene-gene interaction analysis. Bioinformatics. 2009 Feb 1; 25(3):338-45.

Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, Farrall M, Clayton D, Brown M, Samani N, Dominiczak A, Connell JM, Webster J, Lathrop GM, Caulfield M, Munroe PB. Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. Hum Mol Genet. 2005 Jul 1; 14(13):1805-14.

Niu T, Yang J, Wang B, Chen W, Wang Z, Laird N, Wei E, Fang Z, Lindpaintner K, Rogus JJ, Xu X. Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese. Hypertension. 1999 Feb; 33(2):698-702.

Norton GR, Brooksbank R, Woodiwiss AJ. Gene variants of the renin-angiotensin system and hypertension: from a trough of disillusionment to a welcome phase of enlightenment? Clin Sci (Lond). 2010 Jan 26; 118(8):487-506. Review.

O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, 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. 1998 May 12;97(18):1766-72.

Okosun IS, Prewitt TE, Cooper RS. Abdominal obesity in the United States: prevalence and attributable risk of hypertension. J Hum Hypertens. 1999 Jul; 13(7):425-30. (a)

Okosun IS, Forrester TE, Rotimi CN, Osotimehin BO, Muna WF, Cooper RS. Abdominal adiposity in six populations of West African descent: prevalence and population attributable fraction of hypertension. Obes Res. 1999 Sep; 7(5):453-62. (b)

Okosun IS, Choi S, Dent MM, Jobin T, Dever GE. Abdominal obesity defined as a larger than expected waist girth is associated with racial/ethnic differences in risk of hypertension. J Hum Hypertens. 2001 May; 15(5):307-12.

Oladapo OO, Salako L, Sodiq O, Shoyinka K, Adedapo K, Falase AO. A prevalence of cardiometabolic risk factors among a rural Yoruba south-western Nigerian population: a population-based survey. Cardiovasc J Afr. 2010 Jan-Feb; 21(1):26-31.

Olinto MT, Nacul LC, Gigante DP, Costa JS, Menezes AM, Macedo S. Waist circumference as a determinant of hypertension and diabetes in Brazilian women: a population-based study. Public Health Nutr. 2004 Aug; 7(5):629-35.

Oliveira Jr AN, Stucchi D, Chagas MF, Brasileiro SS. Comunidades Negras de Ivaporunduva, São Pedro, Pedro Cubas, Sapatu, Nhunguara, André Lópes, Maria Rosa e Pilões in Andrade T, Pereira CAC, Andrade MRO (eds.) - Negros do Ribeira: reconhecimento étnico e conquista do território. ITESP: Páginas e Letras. São Paulo, SP, Brasil: Editora Gráfica, 2000.

Park EY, Ahn HM, Lee JA, Hong YM. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in Korean hypertensive adolescents. Heart Vessels. 2009 May; 24(3):193-8.

Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrell RE, Shriver MD. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. Am J Hum Genet. 1998 Dec; 63(6):1839-51.

Parra EJ, Kittles RA, Argyropoulos G, Pfaff CL, Hiester K, Bonilla C, Sylvester N, Parrish-Gause D, Garvey WT, Jin L, McKeigue PM, Kamboh MI, Ferrell RE, Pollitzer WS, Shriver MD. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. Am J Phys Anthropol. 2001 Jan; 114(1):18-29.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7; 100(1):177-82.

Pedroso Jr. NN, Murrieta, RSS, Adams C. A Agricultura de Corte e Queima: um Sistema em Transformação. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Humanas, v. 3, p. 153-174, 2008.

Pereira AC, Mota GF, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes. Hypertension. 2003 Jan;41(1):25-30.

Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. Atherosclerosis. 2006 Jan; 184(1):193-200.

Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, Pereira AC, Krieger JE. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. J Hypertens. 2007 Sep; 25(9):1763-74. Review.

Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. Hum Hered. 2006; 62(4):190-5.

Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, de La Sierra A. G-Protein beta(3) subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. Hypertension. 2000 Jan; 35(1 Pt 2):214-8.

Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, Lefkowitz RJ. Characterization of the G protein-coupled receptor

kinase GRK4. Identification of four splice variants. J Biol Chem. 1996 Mar 15; 271(11):6403-10.

Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. Am J Hum Genet. 1999 Jul; 65(1):220-8.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000 Jun; 155(2):945-59.

Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de O Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. Hum Biol. 2000 Aug; 72(4):597-617.

Procopciuc L, Jebeleanu G, Surcel I, Puscas M. Angiotensinogen gene M235T variant and pre-eclampsia in Romanian pregnant women. J Cell Mol Med. 2002 Jul-Sep; 6(3):383-8.

Rabinowitz D, Laird N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. Hum Hered. 2000 Jul-Aug; 50(4):211-23.

Rafiq S, Anand S, Roberts R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? J Cardiovasc Transl Res. 2010 Jun; 3(3):189-96.

Renfrew C, Boyle K. Archeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe. Cambridge: McDonald Institute for Archaeological Research, 2000.

Ribeiro D. The Brazilian People: The Formation and Meaning of Brazil. University Press of Florida, 2000.

Ribeiro GG, De Lima RR, Wiezel CE, Ferreira LB, Sousa SM, Rocha DM, Canas Mdo C, Nardelli-Costa J, Klautau-Guimarães Mde N, Simões AL, Oliveira SF. Afro-derived Brazilian populations: male genetic constitution estimated by Y-chromosomes STRs and AluYAP element polymorphisms. Am J Hum Biol. 2009 May-Jun; 21(3):354-6.

Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira JM, Lobato MR, Carvalho BM, Guerreiro JF, Batista Dos Santos SE. Dissimilarities in the process of formation of Curiaú, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. Am J Hum Biol. 2002 Jul-Aug; 14(4):440-7.

Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos NP, dos Santos AK, Pereira R, Amorim A, Gusmão L, Zago MA, dos Santos SE. Assessing interethnic admixture using an X-linked insertion-deletion multiplex. Am J Hum Biol. 2009 Sep-Oct; 21(5):707-9.

Richart T, Thijs L, Kuznetsova T, Tikhonoff V, Zagato L, Lijnen P, Fagard R, Wang J, Bianchi G, Staessen JA. Intra-erythrocyte cation concentrations in relation to the C1797T beta-adducin polymorphism in a general population. J Hum Hypertens. 2007 May; 21(5):387-92.

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. 1990 Oct; 86(4):1343-6.

Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science. 1996 Sep 13; 273(5281):1516-7.

Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. Am J Hum Genet. 2001 Jul; 69(1):138-47.

Rincon, D. Estudos de DNA Mitocondrial em Populações Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira-São Paulo. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2009.

Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón FJ, Hernández-Perera O, Fiuza-Pérez MD, Anabitarte-Prieto A, Losada-Cabrera A. Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population. J Hum Hypertens. 2000 Dec; 14(12):789-93.

Rosário TM, Scala LC, França GV, Pereira MR, Jardim PC. Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT. Arq Bras Cardiol. 2009 Dec; 93(6):622-8, 672-8.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. Science. 2002 Dec 20; 298(5602):2381-5.

Rosskopf D, Schürks M, Rimmbach C, Schäfers R. Genetics of arterial hypertension and hypotension. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2007 Feb;374(5-6):429-69. Jan 30. Review.

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000; 132:365-86.

Sakuma T, Hirata RD, Hirata MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. J Clin Lab Anal. 2004; 18(6):309-16.

Sallese M, Mariggiò S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. J Biol Chem. 1997 Apr 11; 272(15):10188-95.

Salzano FM, Freire-Maia N. Problems in the Human Biology. A study of Brazilian Population. Detroit, USA, Wayne State University Press, 1970.

Salzano FM. Human races: myth, invention or reality? *Interciência*, 22(5): 221-227 (1997). URL: http://www.interciencia.org.ve

Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc*, v. 74, n. 2, p. 223-63, Jun 2002.

Salzano FM, Bortolini MC. Evolution and Genetics of Latin American Population. Cambridge, University Press, 2002.

Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S, Hashimoto S, Watanabe T, Moore JH, Ritchie MD, Williams SM, Pezzullo JC, Sasaki M, Eisner GM, Jose PA, Felder RA. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension. Clin Chem. 2006 Mar; 52(3):352-60.

Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. Atherosclerosis. 2006 Jun; 186(2):428-32.

Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. Hum Mutat. 2010 Feb; 31(2):184-90.

Sartori M, Semplicini A, Siffert W, Mormino P, Mazzer A, Pegoraro F, Mos L, Winnicki M, Palatini P. G-protein beta3-subunit gene 825T allele and hypertension: a longitudinal study in young grade I hypertensives. Hypertension. 2003 Nov; 42(5):909-14.

Scliar MO, Vaintraub MT, Vaintraub PM, Fonseca CG. Brief communication: Admixture analysis with forensic microsatellites in Minas Gerais, Brazil: the ongoing evolution of the capital and of an African-derived community. Am J Phys Anthropol. 2009 Aug; 139(4):591-5.

Seidlerová J, Staessen JA, Bochud M, Nawrot T, Casamassima N, Citterio L, Kuznetsova T, Jin Y, Manunta P, Richart T, Struijker-Boudier HA, Fagard R, Filipovský J, Bianchi G. Arterial properties in relation to genetic variations in the adducin subunits in a white population. Am J Hypertens. 2009 Jan; 22(1):21-6.

Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. Life Sci. 2000 May 19; 66(26):2557-62.

Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R, Ferrell RE. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. Am J Hum Genet. 1997 Apr; 60(4):957-64.

Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger GA, Siffert W. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. Hypertension. 1998 Sep; 32(3):510-3.

Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 May; 24(5):614-8.

Sichieri R, Oliveira MC, Pereira RA. High prevalence of hypertension among Black and Mulatto women in a Brazilian survey. Ethn Dis. 2001 Autumn;11(3):412-8.

Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat Genet. 1998 Jan; 18(1):45-8.

Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Du P Heyns A, Epplen JT, Fridey J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Al Moutaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Rosskopf D, et al. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. J Am Soc Nephrol. 1999 Sep; 10(9):1921-30. (a)

Siffert W, Naber C, Walla M, Ritz E. G protein beta3 subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. J Hypertens. 1999 Aug; 17(8):1095-8. (b)

Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. Annu Rev Med. 2005; 56:17-28. Review.

Siragy HM, Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. Am J Nephrol. 2010;31(6):541-50.

Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na+ channel trafficking. Endocrinology. 2005 Dec; 146(12):5079-85.

Speirs HJ, Katyk K, Kumar NN, Benjafield AV, Wang WY, Morris BJ. Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension. J Hypertens. 2004 May; 22(5):931-6.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet. 1993 Mar; 52(3):506-16.

Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. Am J Hum Genet. 1998 Feb; 62(2):450-8.

Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensina converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. J Hypertens. 1997 Dec; 15(12 Pt 2):1579-92.

Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. J Hypertens. 1999 Jan; 17(1):9-17.

Staessen JA, Kuznetsova T, Zhang H, Maillard M, Bochud M, Hasenkamp S, Westerkamp J, Richart T, Thijs L, Li X, Brand-Herrmann SM, Burnier M, Brand E. Blood pressure and renal sodium handling in relation to genetic variation in the DRD1 promoter and GRK4. Hypertension. 2008 Jun; 51(6):1643-50.

Stracham T, Read A. Human Molecular Genetics. 4th ed. Garland Science, USA. 2010.

Sun C, Wang JJ, Islam FM, Heckbert SR, Klein R, Siscovick DS, Klein BE, Wong TY. Hypertension genes and retinal vascular calibre: the Cardiovascular Health Study. J Hum Hypertens. 2009 Sep; 23(9):578-84.

Swift PA, Macgregor GA. Genetic variation in the epithelial sodium channel: a risk factor for hypertension in people of African origin. Adv Ren Replace Ther. 2004 Jan; 11(1):76-86. Review.

Tang H, Quertermous T, Rodriguez B, Kardia SL, Zhu X, Brown A, Pankow JS, Province MA, Hunt SC, Boerwinkle E, Schork NJ, Risch NJ. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. Am J Hum Genet. 2005 Feb; 76(2):268-75.

Thibonnier M, Schork NJ. The genetics of hypertension. Curr Opin Genet Dev. 1995 Jun; 5(3):362-70.

Thorogood M, Connor M, Tollman S, Lewando Hundt G, Fowkes G, Marsh J. A cross-sectional study of vascular risk factors in a rural South African population: data from the Southern African Stroke Prevention Initiative (SASPI). BMC Public Health. 2007 Nov 13;7:326.

Tikhonoff V, Kuznetsova T, Stolarz K, Bianchi G, Casiglia E, Kawecka-Jaszcz K, Nikitin Y, Tizzone L, Wang JG, Staessen JA. beta-Adducin polymorphisms, blood pressure, and sodium excretion in three European populations. Am J Hypertens. 2003 Oct; 16(10):840-6. (a)

Tikhonoff V, Kuznetsova T, Stolarz K, Bianchi G, Casiglia E, Kawecka-Jaszcz K, Nikitin Y, Tizzone L, Wang JG, Staessen JA; European Project on Genes in Hypertension Investigators. Blood pressure phenotypes in relation to the beta-adducin C1797T polymorphism in the European Project on Genes in Hypertension (EPOGH). Blood Press Monit. 2003 Aug; 8(4):151-4. (b)

Tishkoff SA, Williams SM. Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease. Nat Rev Genet. 2002 Aug; 3(8):611-21. Review.

Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, Hajat C, Raleigh SM, Palmer TM, Caulfield M, Burton PR, Samani NJ. Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population. Hypertension. 2008 Jun;51(6):1658-64.

Tomaszewski M, Charchar FJ, Lacka B, Pesonen U, Wang WY, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, Dominiczak AF. Epistatic interaction between beta2-adrenergic receptor and neuropeptide Y genes influences LDL-cholesterol in hypertension. Hypertension. 2004 Nov; 44(5):689-94.

Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2004;68:165-77.

Tripodi G, Valtorta F, Torielli L, Chieregatti E, Salardi S, Trusolino L, Menegon A, Ferrari P, Marchisio PC, Bianchi G. Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. J Clin Invest. 1996 Jun 15; 97(12):2815-22.

Tripodi G, Florio M, Ferrandi M, Modica R, Zimdahl H, Hubner N, Ferrari P, Bianchi G. Effect of Add1 gene transfer on blood pressure in reciprocal congenic strains of Milan rats. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Nov 12; 324(2):562-8.

Tsai CT, Fallin D, Chiang FT, Hwang JJ, Lai LP, Hsu KL, Tseng CD, Liau CS, Tseng YZ. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele. Hypertension. 2003Jan; 41(1):9-15.

Tu IP, Balise RR, Whittemore AS. Detection of disease genes by use of family data. II. Application to nuclear families. Am J Hum Genet. 2000 Apr; 66(4):1341-50.

Umscheid CA, Gross R, Weiner MG, Hollenbeak CS, Tang SS, Turner BJ. Racial disparities in hypertension control, but not treatment intensification. Am J Hypertens. 2010 Jan;23(1):54- 61.

Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. Biotechniques. 2004 Aug; 37(2):226-31.

van Rijn MJ, Schut AF, Aulchenko YS, Deinum J, Sayed-Tabatabaei FA, Yazdanpanah M, Isaacs A, Axenovich TI, Zorkoltseva IV, Zillikens MC, Pols HA, Witteman JC, Oostra BA, van Duijn CM. Heritability of blood pressure traits and the genetic contribution to blood pressure variance explained by four blood-pressure-related genes. J Hypertens. 2007 Mar; 25(3):565-70.

Vargens DD, Almendra L, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of the GNB3 825C>T polymorphism among Brazilians: impact of population structure. Eur J Clin Pharmacol. 2008 Mar; 64(3):253-6.

Vehaskari VM. Heritable forms of hypertension. Pediatr Nephrol. 2009 Oct; 24(10):1929-37. Review.

Wang JG, Staessen JA, Barlassina C, Fagard R, Kuznetsova T, Struijker-Boudier HA, Zagato L, Citterio L, Messaggio E, Bianchi G. Association between hypertension and variation in the alpha- and beta-adducin genes in a white population. Kidney Int. 2002 Dec; 62(6):2152-9.

Wang X, Wang S, Lin R, Jiang X, Cheng Z, Turdi J, Ding J, Wu G, Lu X, Wen H. GNB3 gene C825T and ACE gene I/D polymorphisms in essential hypertension in a Kazakh genetic isolate. J Hum Hypertens. 2004 Sep; 18(9):663-8. (a)

Wang JG, Liu L, Zagato L, Xie J, Fagard R, Jin K, Wang J, Li Y, Bianchi G, Staessen JA, Liu L. Renal function in relation to three candidate genes in a Chinese population. J Mol Med. 2004 Oct; 82(10):715-22. (b)

Wang Y, Li B, Zhao W, Liu P, Zhao Q, Chen S, Li H, Gu D. Association study of G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants with essential hypertension in northern Han Chinese. Ann Hum Genet. 2006 Nov; 70(Pt 6):778-83.

Watkins WS, Ricker CE, Bamshad MJ, Carroll ML, Nguyen SV, Batzer MA, Harpending HC, Rogers AR, Jorde LB. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of

Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. Am J Hum Genet. 2001 Mar; 68(3):738-52.

Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. Am J Hum Genet. 2002 Oct; 71(4):854-62.

Williams SM, Ritchie MD, Phillips JA 3rd, Dawson E, Prince M, Dzhura E, Willis A, Semenya A, Summar M, White BC, Addy JH, Kpodonu J, Wong LJ, Felder RA, Jose PA, Moore JH. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach. Hum Hered. 2004; 57(1):28-38.

Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 9; 316(3):744-8.

Yoo JH. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with essential hypertension in men born during the Pacific War. Mech Ageing Dev. 2005 Aug;126(8):899-905.

Young JH, Chang YP, Kim JD, Chretien JP, Klag MJ, Levine MA, Ruff CB, Wang NY, Chakravarti A. Differential susceptibility to hypertension is due to selection during the out-of-Africa expansion. PLoS Genet. 2005 Dec; 1(6):e82.

Zagato L, Modica R, Florio M, Torielli L, Bihoreau MT, Bianchi G, Tripodi G. Genetic mapping of blood pressure quantitative trait loci in Milan hypertensive rats. Hypertension. 2000 Nov; 36(5):734-9.

Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. Physiol Genomics. 2004 Nov 17; 19(3):233-46. Review.

Zöllner S, von Haeseler A. A coalescent approach to study linkage disequilibrium between single-nucleotide polymorphisms. Am J Hum Genet. 2000 Feb; 66(2):615-28.

Zhao Q, Su SY, Chen SF, Li B, Gu DF. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. Chin Med J (Engl). 2006 Jul 5; 119(13):1065-71.

Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. Am J Hum Genet. 2001 May; 68(5):1139-48.

Zhu H, Lu Y, Wang X, Treiber FA, Harshfield GA, Snieder H, Dong Y. The G protein-coupled receptor kinase 4 gene affects blood pressure in young normotensive twins. Am J Hypertens. 2006 Jan; 19(1):61-6.

Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. Hypertension. 2006 Oct; 48(4):700-10.

***Web sites***

FBAT home page: http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html

Fundação Palmares: http://www.palmares.gov.br

International collaborative study on multilocus interactions in essential hypertension: http://www.hypertensiongenetics.org

ISA (Instituto Socioambiental): http://www.socioambiental.org/

ITESP (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo "José Gomes da Silva"): http://www.itesp.sp.gov.br/

*Primer3 software*: www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3

STRUCTURE software: http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html

THESIAS 3.1 *software* (http://genecanvas.ecgene.net/).

# Anexo I

Cópia do manuscrito submetido ao American Journal of Human Biology

# ORIGIN AND DIVERSITY OF Y CHROMOSOMES IN AFRICAN-DERIVED BRAZILIAN POPULATIONS

**Kimura, Lilian[a]; Macedo-Souza, Lúcia Inês[a]; Rincon, Daniel[a]; Vicente, João Pedro[b], Auricchio, Maria Teresa Balester de Mello[a], Otto, Paulo Alberto[a]; Mingroni-Netto, Regina Célia[a].**

**[a]Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo - Brazil. CEP: 05508-090**

**[b]Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, São Paulo - Brazil. CEP: 05403-000**

Corresponding author: Regina Célia Mingroni Netto
Tel.: +55 11 3091 74 78; fax: +55 11 3091 74 78.
E-mail address: renetto@ib.usp.br (R.C. Mingroni-Netto).

**Abstract**

The present Brazilian population was formed by three main geographical groups: Amerindian, African and European. The Africans were brought to Brazil as slaves in large numbers during four centuries. During this period, many communities, named *quilombos,* were founded by runaway or abandoned slaves.

There are many *quilombo* remnants in the Vale do Ribeira region, located at the borders of the rain forest, in the southern part of São Paulo State. In order to shed light on their population structure and their history, we used seven Y chromosome markers, two microsatellites DYS19 and DYS390, and five biallelic markers, the SNPs DYS199 (or M3), M242, M168, sY81 (DYS271 or M2) and one polymorphic *Alu* insertion, DYS287 (YAP), to investigate 313 individuals from ten *quilombo* populations. The biallelic markers indicated that about 30% of Y chromosomes are African, 61% are European and a small proportion, Amerindian (9%). These proportions resulted from the demographic phenomenon of directional mating of European males to Amerindian and African females, which is consistent with historical records. Haplotype diversity analysis suggests, for most of the *quilombos*, the presence of predominant (or founder) male haplotypes, some of them having a key role in their foundation. The present study helped to trace the history of social interactions occurred during the formation and expansion of the Vale do Ribeira populations.

**Keywords**: Y – chromosome, UEPs, microsatellites, African-derived populations

## Introduction

The present Brazilian population resulted from the melting of three main population groups: indigenous people (Amerindians), Portuguese, who first came to Brazil in the 16th century, and Africans, who were brought as slaves for about four centuries (Salzano and Bortolini, 2002). It is believed that there were about 2.5 million Amerindians living in Brazil at the time of its discovery, a population now reduced to less than 300.000. Europeans, mainly Portuguese settlers, arrived in Brazil in search of unsettled land and valuable goods for trade in Europe: about 500.000 male Portuguese colonizers, usually alone, arrived from 1500 to 1800, (Salzano and Freire-Maia, 1970; Ribeiro, 2000).

The Africans arrived in Brazil as slaves in great numbers, the majority arriving from Congo and Angola after 1550. Many others also arrived from Benin, Nigeria, Senegal and Gambia. In 1845, shipping from Mozambique also began, lasting until the end of the 19th century. It is estimated that approximately 4 million Africans were brought to Brazil as slaves (Klein, 1999; Ribeiro, 2000).

Before the abolition of slavery in Brazil (in 1888), many communities, named *quilombos*, were founded in isolated areas by runaway or abandoned African slaves. According to *Fundação Cultural Palmares* (http://www.palmares.gov.br), 1,289 rural African-derived *quilombo* remnants were registered until 2008 in Brazilian territory. Besides Africans, *quilombos* attracted outcast people from other groups. Because they remained at least partially isolated, they can be regarded as relics of the African genetic contribution to the Brazilian population.

The study of molecular polymorphic markers can reconstruct the history of human migration. Y chromosome markers were widely employed to reconstruct male history throughout the world (e.g. Hammer et al., 1997; Jobling and Tyler-Smith, 2000; Underhill et al., 2000; Underhill et al., 2001; Hammer et al., 2001; Cruciani et al., 2002; Xue et al., 2006; Underhill and Kivisild, 2007; Karafet et al., 2008; Goebel et al., 2008; Henn et al., 2008; Wolinsky, 2008; Heyer et al., 2009). These studies enabled the identification of geographic specific Y chromosome lineages. A summary of systems of classification of Y chromosomes in clades and haplogroups was presented in The Y Chromosome Consortium (2002).

Many studies have been conducted to ascertain the genetic profile of the Brazilian population, using different kinds of molecular markers, and Y chromosome studies have helped to address important questions about the origins of populations in South America. Some studies addressed the arrival date and origins of the first Americans in the Pleistocene (e.g. Pena et al., 1995; Santos et al., 1995; Underhill et al., 1996; Rodriguez-Delfin et al., 1997; Bianchi et al., 1998; Santos et al., 1999;

Karafet et al., 1999; Tarazona-Santos et al., 2001; Seielstad et al., 2003; Bortolini et al., 2003; Jobling and Tyler-Smith, 2003; Mulligan et al., 2004; Zegura et al., 2004; Goebel et al., 2008; Dillehay, 2009). Others investigated patterns of genetic admixture in present Brazilian populations (e.g. Rodriguez-Delfin et al., 1997; Guerreiro et al., 1999; Bortolini et al., 1999; Carvalho-Silva et al., 2001; Ribeiro-dos-Santos et al., 2002; Abe-Sandes et al., 2004; Cainé et al., 2005; Grattapaglia et al., 2005; Góes et al., 2005; Marrero et al., 2005; Marrero et al., 2007; Ferreira et al., 2006; Silva et al., 2006; Carvalho-Silva et al., 2006; Pereira et al., 2007; Domingues et al., 2007; Hünemeier et al., 2007; Palha et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Leite et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Guerreiro-Junior et al., 2009). Among populations classified as "white" from four different geographical regions of Brazil, the vast majority of the Y chromosomes were of European origin (more than 80% in average), with low frequency of sub-Saharan African chromosomes (less than 3% in average) and virtual absence of Amerindian contribution (Rodriguez-Delfin et al., 1997; Santos et al., 1999; Carvalho-Silva et al., 2001, 2006; Cainé et al., 2005; Góes et al., 2005; Ferreira et al., 2006). Different patterns were obtained, however, when mitochondrial DNA was studied: 39% of the mitochondrial DNA was of European origin, 28% of African origin, and 33% was Amerindian (Alves-Silva et al., 2000). Differences between the results obtained with mitochondrial DNA markers and Y chromosome analysis were expected because of the nature of European colonization: an important fraction of Brazil´s population arose mainly from male European settlers who fathered the offspring of indigenous and slave women (Ribeiro, 2000).

The present study aimed to determine how Amerindians, Europeans and Africans contributed to the Y chromosome pool in African-derived populations. We analyzed ten *quilombo* remnant populations located near the Ribeira River, in the southern part of the state of São Paulo, in order to determine their origins, patterns of genetic diversity and to estimate genetic admixture, based on Y chromosome markers. We also compared the results to a sample from the city of São Paulo, mostly composed of European-derived individuals.

## Subjects and Methods

### *Populations studied*

The total numbers of inhabitants and individuals analyzed in each *quilombo* population are summarized in Table 1. A sample of 37 unrelated males from the city of São Paulo was also analyzed: these individuals either work at the University of São Paulo or are normal individuals drawn from families attending our genetic counseling unit. The localization of the *quilombo* populations investigated is shown in Auricchio et

al. (2007). This study was approved by the ethics committee of the Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Informed consent was obtained from all participants in the study.

*Selection of Polymorphic loci*

The following set of seven Y chromosome polymorphic markerswas selected: two microsatellites (DYS19 and DYS390) and five biallelic markers (UEPs): the SNPs DYS199 (or M3), M242, M168, sY81 (DYS271 or M2) and one polymorphic *Alu* insertion (DYS287, also known as YAP).

The set of bi-allelic markers selected was shown to be useful in defining the most likely origin of a Y chromosome in the Brazilian context. The YAP *Alu* insertion (DYS287), firstly described by Hammer et al., (1995) is present in Asia (clade D), Europe and Africa (clade E), where it occurs with higher frequencies (The Y Chromosome Consortium, 2002). European Y chromosomes with the YAP insertion can be distinguished from the African haplogroups E3a* to E3a6* by the genotype at SNP sY81 (DYS271 or M2), as shown by Pereira et al. (2000). There are certain ancient African Y chromosome lineages that lack the YAP insertion (clades A and B or haplogroups I and II according to Underhill et al., 2001), however, they can be identified by genotyping the SNP M168 (Underhill et al., 2001). The YAP insertion is virtually absent in all Amerindian lineages. The SNP DYS199 (M3) presents the T allele as exclusive of Amerindians. It characterizes the haplogroups Q3* to Q3c*, presently found in very high frequencies (around 90%) in Native American populations (Pena et al., 1995; Santos et al., 1995). Figure 1 shows the hierarchical strategy of sample genotyping used to determine the origin of Y chromosomes.

The microsatellites DYS19 and DYS390 were selected because they were widely employed in previous population studies. They allowed estimates of haplotypic diversity and of ethnic admixture.

*PCR amplification and genotyping*

The primers sequences for the microsatellites DYS19 and DYS390 were the same as those in Roewer et al. (1992) and in Kayser et al. (1997), respectively; DYS199 was genotyped according to the protocol of Santos et al. (1999); M168 according to Underhill et al. (2001); DYS271 (M2) was studied according to Rosser et al. (2000) and locus YAP was amplified according to Hammer et al (1995). M242 primers (forward: 5'CCTGGGCAATACGCATTTAT3'; reverse: 5'TTTCGCTTTAAGGGCTTTCA3') were designed by *Primer3* software (Rozen & Skalestsky, 2000) and PCR was performed according to a protocol based on Underhill et al. (2000).

YAP PCR products were analyzed after electrophoresis in a 6% polyacrilamide gel stained with silver nitrate (Santos et al., 1993). DYS19 and DYS390 PCR products were analyzed in MegaBACE$^{TM}$ 1000 (GE Healthcare, United Kingdom). DYS199, M168 and sY81 (M2) PCR products were digested with *MfeI*, *HinfI* and *NlaIII*, respectively, analyzed in 6% polyacrilamide gel and subjected to silver staining. M242 PCR products were purified by Exonuclease I (5U) and Shrimp Alkaline Phosphatase (1U) and sequencing reaction was analyzed in a MegaBACE$^{TM}$ 1000 (GE Healthcare, United Kingdom).

*Data analysis*

Due to the small size of the populations, and to founder effects, our samples necessarily contained related individuals. Fisher exact tests and chi-squared tests were performed to ascertain whether the *quilombo* samples presented significant differences in genotypic frequencies when closely related individuals (with r ≥ ¼) relationship coefficient equal or larger than ¼) were taken into account or not. Since no significant differences were observed in the genotypic frequencies between the two groups (with only one exception in the Pedro Cubas sample for the YAP locus), we decided to include all samples in the final analysis, in order to have larger sample sizes and more realistic diversity indexes (data not shown).

The haplotypic and allelic frequencies of all seven markers were estimated by direct counting. Diversity indexes and haplotypic diversity indexes were estimated for all loci using the Arlequin v2.0 software (Schneider et al., 2000). This package was also used to evaluate the degrees of inter- and intrapopulational genetic variation by means of genetic distance (*Fst*) (Wright, 1951; Nei, 1986). A *Fst* matrix was used to construct phylogenetic trees displaying the relationships between such populations, based on the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987), and built using the MEGA 3.1 software (Kumar et al., 2004).

The neighbor-joining tree that displayed the samples from *quilombo* populations and the city of São Paulo population was built with all seven selected markers.

Previously published studies frequently employ different sets of Y-Chromosome STR and UEP polymorphic markers. For these reason, the tree that included the previously published worldwide populations, the samples from *quilombo* populations and the city of São Paulo, was built after pooling haplotypic frequencies for a limited group of loci, DYS19, DYS199, DYS390 and YAP, the ones most frequently analyzed in different populations. Previously reported published populations were Amerindian (Bianchi et al., 1998; Kayser et al., 2001a, 2001b; Bortolini et al., 2003), Bantu Africans (Thomas et al., 2000; Forster et al., 2000), Black Brazilians (Rodriguez-Delfin et al.,

1997), white Brazilians (Rodriguez-Delfin et al., 1997; Carvalho-Silva et al., 2001) and Portuguese (Gonzalez-Neira et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001).

Genetic admixture estimates were obtained using the program Admix95 (available at http://www.genetica.fmed.edu.uy). This analysis was performed with the microsatellite markers, DYS19 and DYS390, and included the same parental samples used in the neighbor-joining tree (Amerindian, Bantu Africans and Portuguese).

## Results

The allelic frequencies for all the populations analyzed are presented in Table 1. The haplotype frequencies and their probable origins are presented in Table 2. The haplotype diversity indexes for all populations are presented in Table 3.

A neighbor-joining tree that displays the populations analyzed by our group and a neighbor-joining tree that includes the pools of allelic frequencies from reference populations are presented in Figures 2 e 3, respectively.

The genetic admixture estimates using Amerindian, Bantu and Portuguese as parental populations and Amerindians are presented in Table 4.

## Discussion

In all African-derived populations here reported, the biallelic marker analysis indicated a great European contribution in Y chromosome lineages (61%), followed by African lineages (30%) and a small Amerindian contribution (9%) (Table 2). The highest frequencies of European Y chromosomes were found in Maria Rosa (100%) and Galvão (86%). The African contribution was larger (53%) than European (35%) only in the Nhunguara population. Amerindian contribution was not detected in Abobral, Galvão, São Pedro, Pilões, Maria Rosa and Sapatu and was found at low frequencies in the four populations it was detected: Ivaporunduva (18%), Nhunguara (12%), Pedro Cubas (8%) and André Lopes (4%) (Table 2).

Although the genetic admixture estimates based on microsatellite loci DYS19 and DYS390 also revealed Portuguese as an important parental contributor to the constitution of Y-chromosome lineages (41.8%), the Bantu Africans contribution was detected in a higher frequency (39.5%) than the value (30%) obtained with Y-chromosome UEPs (Table 4). This can be related to the nature of the markers typed. A set of two microsatellite markers is less precise in admixture estimates when compared to the direct information obtained by slow evolving biallelic markers, most of them geographic specific.

The significant European contribution in *quilombo* male genetic constitution shown by the biallellic markers is similar to what was observed with other Brazilian *quilombo* populations (Bortolini et al., 1999; Ribeiro-dos-Santos et al., 2002; Abe-Sandes et al., 2004; Ribeiro et al., 2009) and several other previous studies performed with white (Rodriguez-Delfin et al., 1997; Carvalho-Silva et al., 2001, 2006; Cainé et al., 2005; Marrero et al., 2005; Guerreiro-Junior et al., 2009), African-derived urban Brazilian populations (Domingues et al., 2007; Hünemeier et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; Guerreiro-Junior et al., 2009) and admixed Brazilian population samples (Góes et al., 2005; Grattapaglia et al., 2005; Silva et al., 2006; Palha et al., 2007; Pereira et al., 2007; Leite et al., 2008).

While the study of the Y-chromosome diversity in Brazilian populations of various sources showed prominent European contribution, the analysis of mitochondrial DNA, performed on similar populations, in contrast, revealed higher frequencies of African and Amerindian female lineages (e.g. Alves-Silva et al., 2000; Ribeiro-dos-Santos et al., 2007; Silva et al., 2006; Feio-dos-Santos et al., 2006; Carvalho et al., 2008; Barbosa et al., 2008). The same was observed in the *quilombo* populations here reported (Rincon et al., manuscript in preparation). We found reduced frequency of European (1.5%), but high frequency of African (49.2%) and Amerindian (49.3%) mitochondrial haplogroups.

As already mentioned, the high frequency of Y European chromosomes in *quilombos* can be explained by directional mating of European males with African and Amerindian females during colonial period, a result consistent with historical records about the formation of the Brazilian population (Freyre, 1946; Ribeiro, 2000). Before the mid-19$^{th}$ Century, the vast majority of Europeans immigrants were males. Similar patterns of sexually biased gene flow were described in several other populations from Latin America, like Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica and Cuba (Bortolini et al., 1999; Rocco et al., 2002; Carvajal-Carmona et al., 2003; Martinez-Marignac et al., 2004; Bortolini et al., 2004; Bedoya et al., 2006; Mazieres et al., 2008), reflecting a trend of the Iberian colonization of Latin America (Gonçalves et al., 2008).

A greater number of different haplotypes was observed in the total sample from the *quilombos* (30), when compared to only 20 haplotypes found in São Paulo (Table 2), thus the haplotipic diversity index for the pooled *quilombo* remnants (0.9520) was higher than that observed in São Paulo (0.9086) (Table 3). The above results should be considered with caution, since the semi-isolation of the *quilombo* communities should lead to a certain degree of variability loss, when compared to São Paulo; the sample size of the latter sample is not large as to permit this inference.

Founder haplotypes, here considered as the most frequent ones, and their origins can be helpful to understand the history of the *quilombos*. The

-/A/C/T/14/24/C haplotype, of European origin, was the most frequent in André Lopes (Table 2). In Nhunguara, the most frequent haplotype (+/G/C/T/15/21/C) is of African origin. Ivaporunduva was the only population in which there was no clear predominant lineage. The most frequent haplotype observed in both Galvão (67%) and São Pedro (27%) was -/A/C/T/15/24/C and is certainly European, probable of Portuguese origin (Table 2). According to historical and genealogical data, this should probably be the Y chromosome haplotype inherited from Bernardo Furquim, a slave who arrived in the area around 1850. He had at least two different wives, having with them at least 24 children (Almeida, 1955; Oliveira Jr. et al., 2000). Some of his children founded these two *quilombo* populations and possibly some of the others (Pedro Cubas, Sapatu and Ivaporunduva). Galvão presents the lowest haplotypic diversity index (0.5436) of all the populations analyzed (Table 3), due to the high frequency of the haplotype inherited from Bernardo Furquim. This haplotype (-/A/C/T/15/24/C) was the most frequently detected in all *quilombo* populations (16.3% of the pool of *quilombos*, Table 2), except in Maria Rosa, thus supporting the idea of his key role as a *quilombo* founder in the Ribeira River Valley.

In Pedro Cubas, the most frequent haplotype (+/G/C/T/16/21/C; 32%), of Bantu African origin, was found in the oldest member of the population, allegedly a descendant of Gregório Marinho, the runaway slave who is said to be one of the founders of this population. In Abobral, the most frequent haplotype (-/A/C/T/14/25/C; 42%) was European, probable of Portuguese origin. The haplotype present in oldest family of Abobral is, however, of African origin, being the second most frequent in all quilombos (+/G/C/T/17/21/C; 21%). Although the most frequent haplotype observed in Pilões was of Portuguese origin (and also the most frequent in the sample from São Paulo), we also observed in this population two of the most important haplotypes from a historical perspective: that of Bernardo Furquim (-/A/C/T/15/24/C) and the one present in oldest family of Abobral (+/G/C/T/17/21/C). In Maria Rosa, all haplotypes were of Portuguese origin. Surely, the data is rather limited due to the small size of this population and, therefore, the number of Y chromosomes analyzed (7).

In the neighbor-joining tree built with haplotype frequencies in the *quilombos*, São Paulo and other previously reported populations (Figure 3), the *quilombos* of André Lopes, Ivaporunduva and Pedro Cubas were close to the Amerindian populations, but kept distant from the other *quilombo* remnants. The remaining populations (São Pedro, Galvão, Sapatu, Pilões, Maria Rosa and Abobral) were closer to Portuguese and White Brazilian populations, probably due to the European ancestral contribution and the lack of Amerindian Y chromosomes. Nhunguara was the community that showed the closest genetic relationship with Bantu and African-derived Brazilian populations.

The genetic proximity observed between the populations of Galvão and São Pedro (Figures 2 and 3) is confirmed by historical records that support their common genealogical background. They are also geographically very close, which might have kept a reasonable rate of genetic flow between them. Pilões and Maria Rosa, also geographically close, did not cluster together as expected, probably due to a recent population bottleneck. In 1998, Pilões had 250 and Maria Rosa 140 inhabitants, respectively, whereas in 2001 they had only 128 and 56 inhabitants (Oliveira Jr. et al., 2000).

As expected, other Brazilian African-derived populations and African Bantu populations grouped together, the same being observed with White Brazilian and Portuguese populations.

Summing up, our results indicate a diverse genetic background in the formation of the *quilombo* populations, having revealed a high patrilinear genetic contribution of Europeans. The demographic phenomena of directional mating, which explains the asymmetric genetic contribution observed, was certainly a prominent process during the formation of the Brazilian population, including African-derived populations, and this is reflected nowadays in the populations of the Ribeira River Valley. The presence of predominant haplotypes and genealogical data reinforce the pattern of origin of *quilombos* from a limited number of male individuals, some of them having a key role in the origin of these populations.

**Table 3.** Individual diversity indexes DYS19, DYS390, DYS199, DYS271, M168, M242, and YAP loci, average diversity indexes and total (haplotype) diversity indexes in the 10 isolates, in the city of São Paulo and in the set of all isolates.

| | | Molecular Markers (i.d +/- se) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Populations | N | DYS19 | DYS390 | DYS199 | DYS271 | M168 | M242 | YAP | X (i.d +/- se) | Hd (i.d +/- se) |
| Abobral | 33 | 0.7056 +/- 0.0545 | 0.6610 +/- 0.0431 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.4244 +/- 0.0607 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.4924 +/- 0.0416 | 0.3262 +/- 0.0268 | 0.7689 +/- 0.0564 |
| Galvão | 21 | 0.3368 +/- 0.1098 | 0.5476 +/- 0.1188 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.2684 +/- 0.1133 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.3810 +/- 0.1005 | 0.2191 +/- 0.0632 | 0.5476 +/- 0.1188 |
| São Pedro | 22 | 0.6190 +/- 0.0970 | 0.7922 +/- 0.0497 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.3810 +/- 0.1005 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.4156 +/- 0.0902 | 0.3154 +/- 0.0482 | 0.8874 +/- 0.0406 |
| PedroCubas | 40 | 0.7346 +/- 0.0349 | 0.6038 +/- 0.0422 | 0.1457 +/- 0.0724 | 0.5007 +/- 0.0313 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.1457 +/- 0.0724 | 0.5077 +/- 0.0237 | 0.3769 +/- 0.0396 | 0.8654 +/- 0.0395 |
| Pilões | 15 | 0.5905 +/- 0.1060 | 0.5143 +/- 0.1164 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.4396 +/- 0.1120 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.4190 +/- 0.1132 | 0.2805 +/- 0.0639 | 0.7048 +/- 0.1120 |
| Maria Rosa | 7 | 0.6667 +/- 0.1598 | 0.6667 +/- 0.1598 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.1905 +/- 0.0457 | 0.8571 +/- 0.1023 |
| Sapatu | 33 | 0.6193 +/- 0.0503 | 0.6193 +/- 0.0503 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.3145 +/- 0.0873 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.3068 +/- 0.0864 | 0.2657 +/- 0.0392 | 0.8295 +/- 0.0292 |
| André Lópes | 46 | 0.6415 +/- 0.0497 | 0.6135 +/- 0.0482 | 0.0869 +/- 0.0560 | 0.3273 +/- 0.0723 | 0.0869 +/- 0.0560 | 0.0869 +/- 0.0560 | 0.4598 +/- 0.0478 | 0.3290 +/- 0.0551 | 0.8818 +/- 0.0248 |
| Nhunguara | 51 | 0.5584 +/- 0.0716 | 0.6424 +/- 0.0387 | 0.2155 +/- 0.0701 | 0.5085 +/- 0.0169 | 0.1151 +/- 0.0592 | 0.2155 +/- 0.0701 | 0.5102 +/- 0.0149 | 0.3951 +/- 0.0488 | 0.7631 +/- 0.0662 |
| Ivaporunduva | 45 | 0.7475 +/- 0.0253 | 0.6253 +/- 0.0375 | 0.3044 +/- 0.0746 | 0.4895 +/- 0.0350 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.3044 +/- 0.0746 | 0.4895 +/- 0.0350 | 0.4229 +/- 0.0403 | 0.8657 +/- 0.0192 |
| Total Quilombos | 313 | 0.7100 +/- 0.0153 | 0.6766 +/- 0.0146 | 0.1176 +/- 0.0243 | 0.4265 +/- 0.0204 | 0.0325 +/- 0.0141 | 0.1176 +/- 0.0243 | 0.4667 +/- 0.0147 | 0.3639 +/- 0.0182 | 0.9520 +/- 0.0178 |
| São Paulo | 37 | 0.7508 +/- 0.0462 | 0.6562 +/- 0.0425 | 0.0556 +/- 0.0518 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0000 +/- 0.0000 | 0.0556 +/- 0.0518 | 0.3630 +/- 0.0784 | 0.2687 +/- 0.0387 | 0.9086 +/- 0.0064 |

X – Mean values.
Hd – Haplotypic diversity.

**Table 4.** Genetic admixture estimates based on genotypes for the loci DYS19 and DYS390. References of the parental populations studied: Amerindian (Bianchi et al., 1998; Kayser et al., 2001; Bortolini et al., 2003), Bantu Africans (Thomas et al., 2000; Forster et al., 2000) and Portuguese (Gonzalez-Neira et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001). Acceptable estimates of genetic admixture could not be obtained for Abobral and Pilões. The data from these two localities could, however, be pooled to the other eight to get the genetic admixture estimates for the whole set of all communities, shown in the line "total" of the table.

| | **Amerindian** | **Bantu** | **Portuguese** |
|---|---|---|---|
| **André Lopes** | 0.0835 ± 0.0290 | 0.3435 ± 0.0215 | 0.5729 ± 0.0394 |
| **Galvão** | 0.0019 ± 0.0353 | 0.3644 ± 0.0262 | 0.6337 ± 0.0479 |
| **Ivaporunduva** | 0.1806 ± 0.0705 | 0.4445 ± 0.0178 | 0.3749 ± 0.0565 |
| **Maria Rosa** | 0.0819 ± 0.0036 | 0.0150 ± 0.0023 | 0.9031 ± 0.0014 |
| **Nhunguara** | 0.0910 ± 0.1383 | 0.6375 ± 0.0765 | 0.2715 ± 0.0701 |
| **Pedro Cubas** | 0.1313 ± 0.0343 | 0.5481 ± 0.0158 | 0.3206 ± 0.0321 |
| **São Pedro** | 0.0570 ± 0.0038 | 0.3826 ± 0.0012 | 0.5600 ± 0.0039 |
| **Sapatu** | 0.0839 ± 0.1885 | 0.3364 ± 0.0759 | 0.5797 ± 0.1132 |
| **Total Quilombos** | 0.1858 ± 0.0036 | 0.3953 ± 0.0023 | 0.4188 ± 0.0014 |
| **São Paulo** | 0.1398 ± 0.0313 | 0.1999 ± 0.0232 | 0.6603 ± 0.0426 |

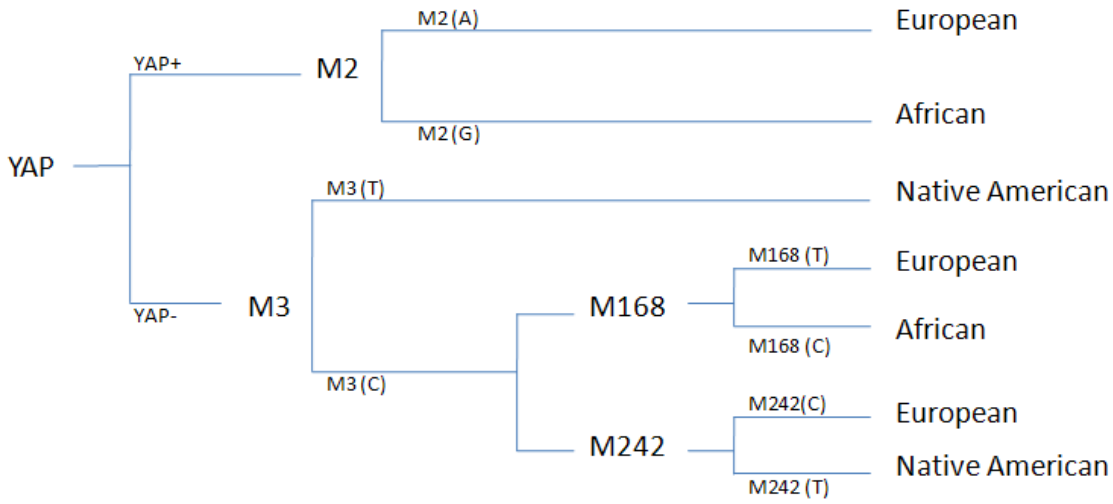



**Figure 1**. Hierarchic strategy for genotyping Y chromosome markers (UEPs), to determine the probable origin of Y chromosome lineages.

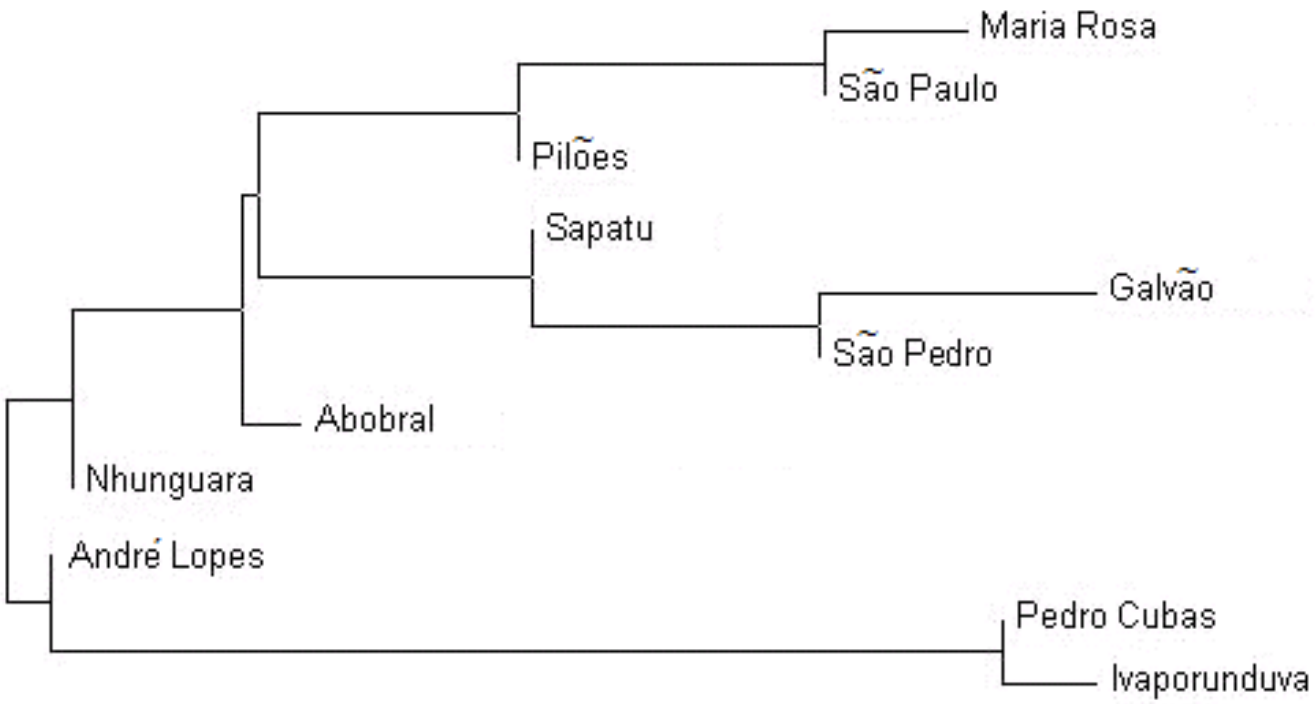



**Figure 2.** Neighbour-joining tree of *quilombo* remnant populations relationships and a sample of unrelated individuals from São Paulo. This tree was derived from a *Fst* matrix, calculated from the haplotype frequencies of seven Y chromosome markers (DYS19, DYS390, DYS199, DYS271, M168, M242, YAP). The *Fst* values were obtained using Arlequin v2.0 software and the neighbor-joining tree were build using MEGA 3.1 software (Saitou and Nei, 1987; Kumar et al., 2004).

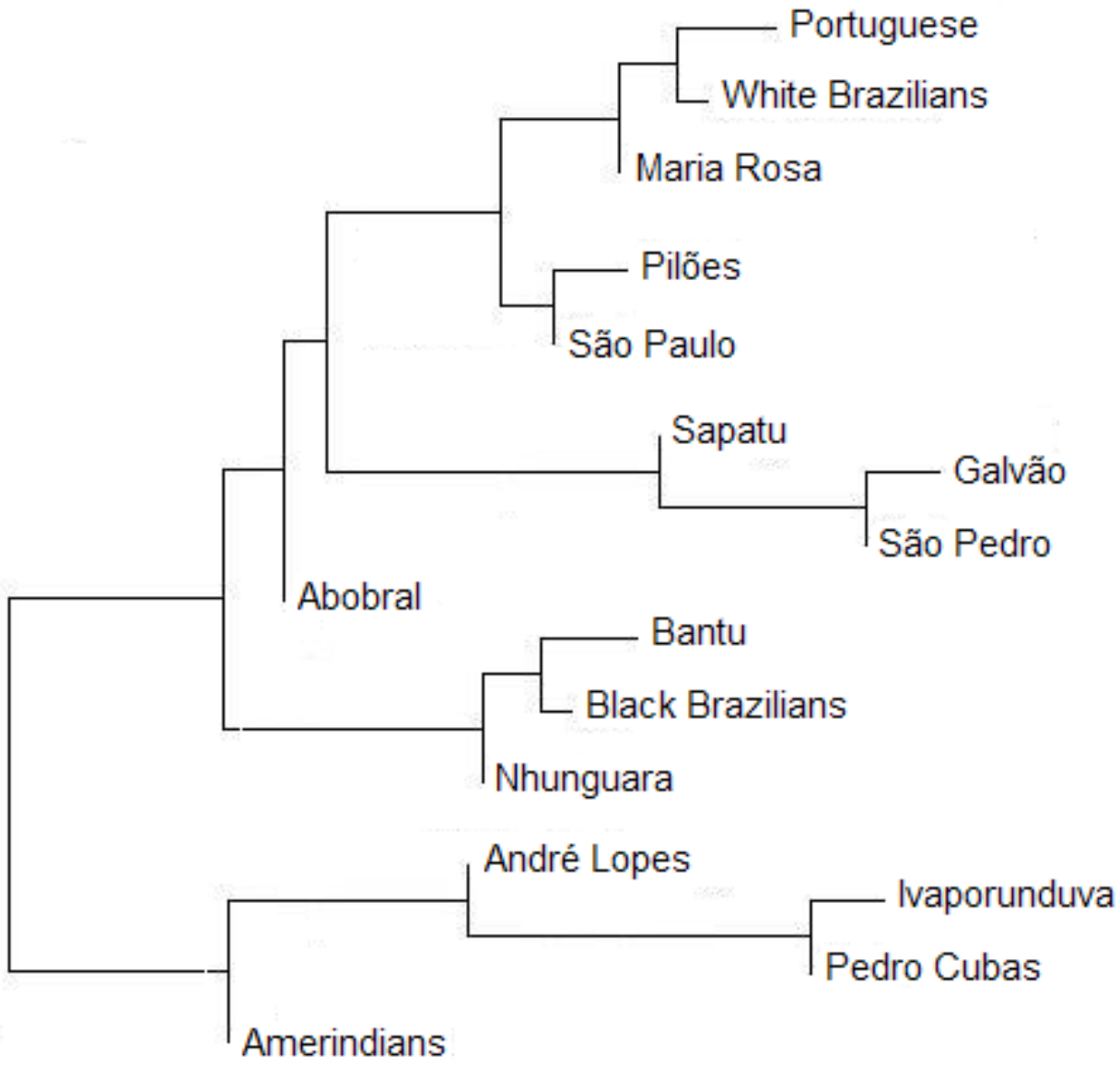



**Figure 3.** Neighbour-joining tree of *quilombo* populations, a sample of unrelated individuals from São Paulo and other populations. The reference populations were: Amerindian (Bianchi et al., 1998; Kayser et al., 2001; Bortolini et al., 2003), Bantu Africans (Thomas et al., 2000; Forster et al., 2000), Black Brazilians (Rodriguez-Delfin et al., 1997), white Brazilians (Rodriguez-Delfin et al., 1997; Carvalho-Silva et al., 2001) and Portuguese (Gonzalez-Neira et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001).This tree was derived from a *Fst* matrix, calculated directly from the haploype frequencies of four Y chromosome polymorphic markers (DYS19, DYS199, DYS390, YAP). The *Fst* values were obtained using Arlequin v2.0 software and the neighbor-joining tree was build using MEGA 3.1 software (Saitou and Nei, 1987; Kumar et al., 2004).

**Acknowledgements**

We thank the people living in the *quilombo* populations. We also thank C. B. Angeli, E. Pardono, N. H. Cotrim for helping with the genealogical inferences and with the collection of samples; Dr. Roberto Maluf and Dr. Franklin A. S. Kono, for clinical assistance; Dr. Diogo Meyer, N. H. Cotrim, R. S. Francisco, R. F. Ramalho and K. Nunes for the assistance with the computing programs; and Dr. Dario Gratapaglia for sizing reference alleles in loci DYS390 and DYS19. This study was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## References


Abe-Sandes K, Silva WA, Jr., Zago MA. 2004. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. Hum Biol 76(1):77-86.

Almeida AP. 1955. Memória Histórica de Xiririca (Eldorado Paulista). São Paulo, Brasil: Departamento do Arquivo do Estado de São Paulo, Secretaria da Educação.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet 67(2):444-61.

Auricchio MTBM, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. 2007. Frequency and origins of HBB*S mutation in African-derived Brazilian populations. Human Biology 79(9):667-678.

Barbosa ABG, Silva LAF, Azevedo DA, Balbino V, Mauricio-da-Silva D. 2008. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. Journal of Forensic Science 53(1):142-146.

Bedoya G, Montoya P, Garcia J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, Labuda D, Alvarez V, Ospina J, Hedrick PW and others. 2006. Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. Proc Natl Acad Sci U S A 103(19):7234-9.

Bianchi NO, Catanesi CI, Bailliet G, Martinez-Marignac VL, Bravi CM, Vidal-Rioja LB, Herrera RJ, Lopez-Camelo JS. 1998. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of New World native populations. Am J Hum Genet 63(6):1862-71.

Bortolini MC, Da Silva WAJW, De Guerra DC, Remonatto G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MC, Zago MA, Salzano FM. 1999. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. Am J Hum Biol 11(4):551-563.

Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT and others. 2003. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. Am J Hum Genet 73(3):524-39.

Bortolini MC, Thomas MG, Chikhi L, Aguilar JA, Castro-De-Guerra D, Salzano FM, Ruiz-Linares A. 2004. Ribeiro´s typology, genomes, and Spanish colonialism, as viewed from Gran Canaria and Colombia. Genetics and Molecular Biology 27(1):1-8.

Caine LM, Pontes L, Abrantes D, Lima G, Pinheiro F. 2005. Genetic data of eight Y-chromosome STRs in males from Santa Catarina, Brazil. J Forensic Sci 49(5):1125-7.

Carvajal-Carmona LG, Ophoff R, Service S, Hartiala J, Molina J, Leon P, Ospina J, Bedoya G, Freimer N, Ruiz-Linares A. 2003. Genetic demography of Antioquia (Colombia) and the Central Valley of Costa Rica. Hum Genet 112(5-6):534-41.

Carvalho BM, Bortolini MC, Batista-dos-Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AKC. 2008. Mitochondrial DNA mapping of social-interactions in Brazilian Amazonian African-descendent populations. Genetics and Molecular Biology 31(1):12-22.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. 2001. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. Am J Hum Genet 68(1):281-6.

Carvalho-Silva DR, Tarazona-Santos E, Rocha J, Pena SD, Santos FR. 2006. Y chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers. Genetica 126(1-2):251-60.

Chakraborty R. 1985. A note on the calculation of random RP and its sampling variance. Hum Biol 57(4):713-7.

Chakraborty R. 1985. Paternity testing with genetic markers: are Y-linked genes more efficient than autosomal ones? Am J Med Genet 21(2):297-305.

Chakraborty R. 1985. Some analytical explorations for detecting familial aggregation of disease traits. Prog Clin Biol Res 194:21-37.

Chakraborty R, Gershowitz H, Ferrell RE, Barton SA, Schull WJ. 1985. Immunoglobulin (Gm and Km) allotypes in the Aymara of Chile and Bolivia. Ann Hum Biol 12(6):533-43.

Consortium YC. 2002. A nomenclature system for the tree of human Ychromosomal binary haplogroups. Genome Research 12:339-348.

Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, Modiano D, Holmes S, Destro-Bisol G, Coia V and others. 2002. A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. Am J Hum Genet 70(5):1197-214.

Dillehay TD. 2009. Probing deeper into first American studies. Proc Natl Acad Sci U S A 106(4):971-8.

Domingues PM, Gusmao L, da Silva DA, Amorim A, Pereira RW, de Carvalho EF. 2007. Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci. Int J Legal Med 121(3):238-41.

Feio-Dos-Santos AC, Carvalho BM, Batista dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK. 2006. Nucleotide variability of HV-I in admixed population of the Brazilian Amazon Region. Forensic Sci Int 164(2-3):276-7.

Ferreira LB, Mendes-Júnior CT, Wiezel CEV, Luizon MR, Simões AL. 2006. Y-STR diversity and ethnic admixture in the White and Mulatto Brazilian population samples. Genetics and Molecular Biology 29(4):605-607.

Forster P, Rohl A, Lunnemann P, Brinkmann C, Zerjal T, Tyler-Smith C, Brinkmann B. 2000. A short tandem repeat-based phylogeny for the human Y chromosome. Am J Hum Genet 67(1):182-96.

Freyre G. 1946. The Masters and the Slaves: A Study in the Development of Brazilian Civilization: Alfred A. Knopf.

Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH. 2008. The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. Science 319(5869):1497-502.

Góes ACS, Carvalho EF, Iva Gomes I, Silva DA, Gil EHF, Amorim A, Gusmão L. 2005. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). International Journal of Legal Medicine 119:70-76.

Goncalves VF, Carvalho CM, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SD. 2008. The phylogeography of African Brazilians. Hum Hered 65(1):23-32.

Gonzalez-Neira A, Gusmao L, Brion M, Lareu MV, Amorim A, Carracedo A. 2000. Distribution of Y-chromosome STR defined haplotypes in Iberia. Forensic Sci Int 110(2):117-26.

Grattapaglia D, Kalupniek S, Guimaraes CS, Ribeiro MA, Diener PS, Soares CN. 2005. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. Forensic Sci Int 149(1):99-107.

Guerreiro JF, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos EJM, Vallinoto ACR, Cayres-Vallinoto IMV, Aguiar GFS, Santos SEB. 1999. Genetical-demographic data from two Amazonian populations composed of descendants of African slaves: Pacoval and Curiaú. Genetics and Molecular Biology 22:163-167.

Guerreiro-Junior V, Bisso-Machado R, Marrero A, Hunemeier T, Salzano FM, Bortolini MC. 2009. Genetic signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. Genetics and Molecular Biology 32(1):1-11.

Hammer MF. 1995. A recent common ancestry for human Y chromosomes. Nature 378(6555):376-8.

Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, Zegura SL. 2001. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. Mol Biol Evol 18(7):1189-203.

Hammer MF, Spurdle AB, Karafet T, Bonner MR, Wood ET, Novelletto A, Malaspina P, Mitchell RJ, Horai S, Jenkins T and others. 1997. The geographic distribution of human Y chromosome variation. Genetics 145(3):787-805.

Henn BM, Gignoux C, Lin AA, Oefner PJ, Shen P, Scozzari R, Cruciani F, Tishkoff SA, Mountain JL, Underhill PA. 2008. Y-chromosomal evidence of a pastoralist migration through Tanzania to southern Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 105(31):10693-8.

Heyer E, Balaresque P, Jobling MA, Quintana-Murci L, Chaix R, Segurel L, Aldashev A, Hegay T. 2009. Genetic diversity and the emergence of ethnic groups in Central Asia. BMC Genet 10:49.

http://www.genetica.fmed.edu.uy.

http://www.itesp.org.br. Instituto de Terras do Estado de São Paulo.

http://www.palmares.gov.br. Fundação Palmares.

Hunemeier T, Carvalho C, Marrero AR, Salzano FM, Junho Pena SD, Bortolini MC. 2007. Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. Am J Phys Anthropol 133(2):854-67.

Jobling MA, Tyler-Smith C. 2000. New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection. Trends Genet 16(8):356-62.

Jobling MA, Tyler-Smith C. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nat Rev Genet 4(8):598-612.

Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. Genome Res 18(5):830-8.

Karafet TM, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J, Goldman D, Klitz W, Harihara S, de Knijff P and others. 1999. Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. Am J Hum Genet 64(3):817-31.

Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhovel W, Underhill PA, Stoneking M. 2001a. Independent histories of human Y chromosomes from Melanesia and Australia. Am J Hum Genet 68(1):173-190.

Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M and others. 1997. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. International Journal of Legal Medicine 110:125-133.

Kayser M, Krawczak M, Excoffier L, Dieltjes P, Corach D, Pascali V, Gehrig C, Bernini LF, Jespersen J, Bakker E and others. 2001b. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. Am J Hum Genet 68(4):990-1018.

Klein HS. 1999. The Atlantic Slave Trade: Cambridge University Press. 256 p.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:510-163.

Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CH, Raimann PE, Schwengber SP, Sortica VA, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML and others. 2008. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. Am J Hum Biol 20(3):359-63.

Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Junior WA, Bortolini MC. 2005. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Am J Hum Biol 17(4):496-506.

Marrero AR, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, Salzano FM, Bortolini MC. 2007. Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. Am J Phys Anthropol 132(2):301-10.

Martinez Marignac VL, Bertoni B, Parra EJ, Bianchi NO. 2004. Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. Hum Biol 76(4):543-57.

Mazieres S, Guitard E, Crubezy E, Dugoujon JM, Bortolini MC, Bonatto SL, Hutz MH, Bois E, Tiouka F, Larrouy G and others. 2008. Uniparental (mtDNA, Y-chromosome) polymorphisms in French Guiana and two related populations--implications for the region's colonization. Ann Hum Genet 72(Pt 1):145-56.

Mulligan CJ, Hunley K, Cole S, Long JC. 2004. Population genetics, history, and health patterns in native americans. Annu Rev Genomics Hum Genet 5:295-315.

Nei M. 1986. Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. *In* Evolutionary perspective and the new genetics (H. Gershowitz, ed.). New York, USA: Alan R. Liss.

Oliveira Jr NA, Stucchi D, Chagas MF, Brasileiro SS. 2000. Comunidades Negras de Ivaporunduva, São Pedro, Pedro Cubas, Sapatu, Nhunguara, André Lópes, Maria Rosa e Pilões *in* Andrade T, Pereira CAC, Andrade MRO (eds.) - Negros do Ribeira: reconhecimento étnico e conquista do território. ITESP: Páginas e Letras. São Paulo, SP, Brasil: Editora Gráfica.

Palha TJBF, Rodrigues EMR, B. SSE. 2007. Y-chromosomal STR haplotypes in a population from the Amazon region, Brazil. Forensic Science International 166:233-239.

Pena SJD. 1995. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. Nature Genetics 11:15-16.

Pereira L, Brion M, Prata MJ, Jobling MA, Carracedo A, Amorim A. 2000. Gradient of Y chromosome haplogroup 21 across the Western Iberia. Progress in Forensic Genetics 8:281-283.

Pereira RW, Monteiro EH, Hirschfeld GC, Wang AY, Grattapaglia D. 2007. Haplotype diversity of 17 Y-chromosome STRs in Brazilians. Forensic Sci Int 171(2-3):226-36.

Ribeiro D. 2000. The Brazilian People: The Formation and Meaning of Brazil.: University Press of Florida.

Ribeiro GG, De Lima RR, Wiezel CE, Ferreira LB, Sousa SM, Rocha DM, Canas Mdo C, Nardelli-Costa J, Klautau-Guimaraes Mde N, Simoes AL and others. 2009. Afro-derived Brazilian populations: male genetic constitution estimated by Y-chromosomes STRs and AluYAP element polymorphisms. Am J Hum Biol 21(3):354-6.

Ribeiro-dos-Santos AK, Carvalho BM, Feio-dos-Santos AC, dos Santos SE. 2007. Nucleotide variability of HV-I in Afro-descendents populations of the Brazilian Amazon Region. Forensic Sci Int 167(1):77-80.

Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira JM, Lobato MR, Carvalho BM, Guerreiro JF, Batista Dos Santos SE. 2002. Dissimilarities in the process of formation of Curiau, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. Am J Hum Biol 14(4):440-7.

Rocco PP, Morales CG, Moraga MV, Miquel JFP, Nervi FO, Llop ER, Carvallo PS, Rothhammer FE. 2002. Composición genética de la población chilena: Distribución de polimorfismos de DNA mitocondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. Revista Médica de Chile 130:125-131.

Rodriguez-Delfin L, Santos SE, Zago MA. 1997. Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with blacks, whites, and Japanese from Brazil. Ann Hum Genet 61(Pt 5):439-48.

Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Epplen JT. 1992. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. Hum Genet 89(4):389-94.

Rosser ZH, Zerjal T, Hurles ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, Amos W, Armenteros M, Arroyo E, Barbujani G and others. 2000. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. Am J Hum Genet 67(6):1526-43.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132:365-86.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Salzano FM, Bortolini MC. 2002. Evolution and Genetics of Latin American Population. Cambridge, editor: Cambridge, University Press.

Salzano FM, Freire-Maia N. 1970. Problems in the Human Biology. A study of Brazilian Population. Detroit, USA: Wayne State University Press.

Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, Osipova L, Crawford MH, Mitchell RJ. 1999. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. Am J Hum Genet 64(2):619-28.

Santos FR, Pena SD, Epplen JT. 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum Genet 90(6):655-6.

Santos FR, Pena SD, Tyler-Smith C. 1995. PCR haplotypes for the human Y chromosome based on alphoid satellite DNA variants and heteroduplex analysis. Gene 165(2):191-8.

Schneider S, Roessli D, Excoffier. L. 2000. Arlequin (ver 2000) - a software for population genetic data analysis: Geneva: University of Geneva.

Seielstad M, Yuldasheva N, Singh N, Underhill P, Oefner P, Shen P, Wells RS. 2003. A novel Y-chromosome variant puts an upper limit on the timing of first entry into the Americas. Am J Hum Genet 73(3):700-5.

Silva DA, Carvalho E, Costa G, Tavares L, Amorim A, Gusmao L. 2006. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. Am J Hum Biol 18(6):829-37.

Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Labarga CM, Rickards O, Tyler-Smith C, Pena SD, Santos FR. 2001. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. Am J Hum Genet 68(6):1485-96.

Thomas MG, Parfitt T, Weiss DA, Skorecki K, Wilson JF, le Roux M, Bradman N, Goldstein DB. 2000. Y chromosomes traveling south: the cohen modal haplotype and the origins of the Lemba--the "Black Jews of Southern Africa". Am J Hum Genet 66(2):674-86.

Underhill PA, Jin L, Zemans R, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. 1996. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. Proc Natl Acad Sci U S A 93(1):196-200.

Underhill PA, Kivisild T. 2007. Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. Annu Rev Genet 41:539-64.

Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Mirazon Lahr M, Foley RA, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. 2001. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. Ann Hum Genet 65(Pt 1):43-62.

Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonne-Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P and others. 2000. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. Nat Genet 26(3):358-61.

Wolinsky H. 2008. Our history, our genes. Population genetics lets researchers look back in time at human migrations. EMBO Rep 9(2):127-9.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15:323-354.

Xue Y, Zerjal T, Bao W, Zhu S, Shu Q, Xu J, Du R, Fu S, Li P, Hurles ME and others. 2006. Male demography in East Asia: a north-south contrast in human population expansion times. Genetics 172(4):2431-9.

Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. Mol Biol Evol 21(1):164-75.

# Anexo II

Cópia do parecer emitido pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que aprovou o projeto de pesquisa "Variabilidade molecular em populações brasileiras: um estudo do gene da síndrome do cromossomo X Frágil".

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@ icb.usp.br

São Paulo, 14 de fevereiro de 2001.

**PARECER 111 /CEP**

Prezada Professora,

Atendendo sua solicitação a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua décima nona reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: ***"VARIABILIDADE MOLECULAR NAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS: UM ESTUDO DO CROMOSSOMO X FRÁGIL"***.

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão a qual sugere que V.Sa. faça algumas modificações no *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* conforme documento anexo.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Vice-Presidente da Comissão de Ética
em Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP
Em exercício

Ilma. Sra.
Profa. Dra. REGINA CÉLIA MINGRONI NETTO
Departamento de Biologia – IB USP

# Anexo III

Cópia do parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (CEP) do Instituto de Biociências da USP, que aprovou o projeto de pesquisa a que se refere o presente trabalho.

CÓPIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Instituto de Biociências

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA**

**PROTOCOLO CEP-IBUSP – 034/2005**
**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** "Fatores Genéticos Associados à Hipertensão em Populações Afro-Brasileiras"

**Pesquisador Responsável:** Lílian Kimura

**Orientadora:** Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

**Objetivos do projeto de pesquisa:** Verificar a importância de genes já sabidamente relacionados a hipertensão em uma amostra de quilombolas do Vale do Ribeira.

**Local da realização do projeto, duração e financiamento:** O projeto será desenvolvido no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP. O projeto é financiado pela FAPESP/CEPID e também conta com a colaboração do Prof. Dr. José Eduardo Kriger e o Dr. Alexandre Pereira (INCOR; HC). O projeto é de mestrado, com duração de 2 anos, a partir de 01/08/2005.

**Comentários:** Serão estudados alguns genes já sabidamente relacionados a predisposição à hipertensão em indivíduos Afro-Brasileiros, remanescentes de quilombos, do Vale do Ribeira-SP. Serão incluídos pelo menos 700 indivíduos, sendo que as amostras de DNA já foram coletadas, para projetos anteriores e previamente aprovados pelos Comitês de Ética do ICB (Parecer 111) e do IB (Parecer 012/2004). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado informa que com as amostras de DNA coletadas serão realizadas pesquisas que possam permitir a caracterização de doenças da população bem como da variabilidade genética da população em questão, portanto, este TCLE é pertinente ao presente protocolo de pesquisa. Os pesquisadores informam que só serão incluídos novos indivíduos na pesquisa que concordem em participar e, portanto, que assinarem o TCLE. Vale lembrar que o procedimento confere risco mínimo ao indivíduo. A metodologia de caso-controle é adequado ao propósito da pesquisa.

**Considerações:** O projeto apresentado preenche todos os pré-requisitos éticos conforme resolução CNS 196/96. Diante do Exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS – 196/96, aprova o projeto de pesquisa proposto. A pesquisadora responsável deverá apresentar, ao CEP, relatórios anual e final.

**Situação: Projeto APROVADO.**

São Paulo, 14 de junho de 2005.

Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos Bueno
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

# Anexo IV

Cópia do termo de consentimento autorizando a coleta de sangue para uso em pesquisa genética.

LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Eu, _____

RG nº _____, abaixo assinado(a), concordo com a coleta de meu sangue, pela equipe do Laboratório de Genética Humana do Depto. de Genética e Biologia Evolutiva (IB-USP), para o uso em pesquisa que visa identificar genes causadores de doenças e estudar a variabilidade genética das populações. Concordo também que os resultados dessas pesquisas sejam divulgados em publicações científicas.

( ) Desejo conhecer os resultados do estudo de doenças genéticas realizado em meu sangue

( ) Não desejo conhecer os resultados do estudo de doenças genéticas realizado em meu sangue.

São Paulo, _____ de _____ de 200__

_____

Paciente

Rua do Matão 277 - sala 349 - Edifício André Dreyfus - Cidade Universitária - Fone: 3091-7478

**Endereço Postal:** Laboratório de Genética Humana, Depto. Genética e Biologia Evolutiva - IB-USP
Caixa Postal 11461
05422-970 - São Paulo, SP

# Anexo V

Questionário aplicado a cada indivíduo na segunda etapa da coleta de dados.

**Questionário de Pesquisa**

**I. IDENTIFICAÇÃO:** **Código do Participante:** [ ]

1.1 Nome: _____

1.2. Data de Nascimento: _____

1.3. Data da Entrevista: _____

**II. DADOS DEMOGRÁFICOS:**

2.1 Sexo: [ ]

| |
|---|
| 1- masculino<br>2- feminino |

2.2 Estado Civil: [ ]

| | |
|---|---|
| 1- solteiro(a)<br>2- casado(a) | 3- separado<br>4- viúvo |

**III. FATORES COMPORTAMENTAIS:**

**ATIVIDADE FÍSICA:**

| | |
|---|---|
| Leia as opções abaixo para o entrevistado | Marque somente uma opção |

3.1. Qual o grau de atividade física que você exerce durante suas atividades diárias: [ ]

**1.)** Você tem que estar sentado para exercer suas atividades?
Você não caminha muito enquanto trabalha?
**Exemplos:** relojoeiro, radialista, costureira, trabalhador de escritório, salgadeira

**2.)** Você caminha bastante enquanto trabalha, mas não tem que levar nem carregar coisas pesadas?
**Exemplos**: empregado do comércio, trabalho em indústria ou em escritório, professor, laboratório

**3.)** Você caminha e move muitas coisas ou sobe e desce escada ou ladeira?
**Exemplos:** carpinteiro, trabalhador de agricultura, mecânica, ou indústria pesada

**4.)** Sua atividade requer grande esforço físico, como por exemplo mover ou levantar coisas pesadas ou cortar, sacudir objetos pesados?
**Exemplo:** construção civil, trabalho agrícola pesado ou indústria

3.2. Quantos dias da semana você pratica alguma atividade física? [ ] dias

3.3 Quanto tempo duram esses episódios de atividade física? [ ] minutos

**TABAGISMO:**

3.4. Você já fumou cigarros? [ ]

1- sim e ainda fumo (continuar entrevista)
2- sim, no passado, mas não atualmente vá para questão 3.6

3.5. Em média, quantos cigarros você fuma atualmente? [ ] por dia
[ ] por semana

3.6. Quantos anos você tinha quando começou a fumar regularmente? [ ] anos

3.7. Quantos anos você tinha quando parou de fumar? [ ] anos

**CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA:**

3.8. Durante os últimos 12 meses com que freqüência média você tem ingerido bebida alcoólica? [ ]

| | |
|---|---|
| 1- Bebe diariamente | 5- Bebe de 1 a 3 vezes por mês |
| 2- Se embriaga ao menos 1 vez por mês | 6- Menos de 1 vez ao mês |
| 3- Bebe de 1 a 3 vezes por semana | |
| 4- Bebe de 4 a 6 vezes por semana | 7- Nenhuma |

**IV. SOMENTE PARA MULHERES:**

4.1. Quantos anos você tinha quando teve sua primeira menstruação? [ ] anos

4.2. Você ainda está tendo menstruação? [ ]

1- Sim, como de costume
2- Sim, mas com irregularidades
3- Não

4.3. Quantos anos você tinha quando sua menstruação desapareceu completamente? [ ] anos

4.4. Você está tomando pílula ou injeção anticoncepcional? [ ]

1- Sim
2- Não

**V. DOENÇAS EXISTENTES:**

Alguma vez um médico ou outro profissional de saúde já lhe disse que você tem:

1- Sim
2- Não
3- Não sei

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 5.1. Pressão Alta? | | Idade de diagnóstico: | | anos |
| 5.2. Diabetes? | | | | anos |
| 5.3. Colesterol alto? | | | | anos |
| 5.4. Angina? | | | | anos |
| 5.5. Infarto do coração? | | | | anos |
| 5.6. Derrame? | | | | anos |
| 5.7. Insuficiência cardíaca? | | | | anos |
| 5.8. Cálculo Renal? | | | | anos |
| 5.9. Perda de função renal? | | | | anos |
| 5.10. Doença no Rim? | | | | anos |
| 5.11. Câncer? | | Tipo? | | anos |
| 5.12. Diálise? | | | | anos |
| 5.13. Depressão? | | | | anos |
| 5.14. Varizes? | | | | anos |
| 5.15. Insuficiência arterial? | | | | anos |
| 5.16. Doença do Pulmão? | | | | anos |

Você está atualmente tomando remédio para tratar alguma destas doenças?

6.1.Qual a sua raça:

6.2.Qual a sua raça (pelo entrevistador):

| | |
|---|---|
| 1. Branco | 4. Índio |
| 2. Mulato (ou pardo) | 5. Oriental |
| 3. Negro | 6. Outros mestiços |

**Questionário de Pesquisa** **Código do Participante:** ☐

**Dados de Exame Físico:**

Pressão Arterial 1 medida: ☐ PAS ☐ PAD

Pressão Arterial 2 medida: ☐ PAS ☐ PAD

Pressão Arterial 3 medida: ☐ PAS ☐ PAD

Peso (em gramas): ☐ ☐

Altura (em cm): ☐ ☐

Circunferência Abdominal (em cm): ☐ ☐ ☐

Quadril (em cm): ☐ ☐ ☐

Perímetro Braquial (em cm) ☐ ☐ ☐

Prega Cutânea (em mm) - TRICEPS ☐ ☐ ☐

Prega Cutânea (em mm) - ESCAPULA ☐ ☐ ☐

Glicose ☐ Paciente em jejum? ☐

Hemoglobina ☐

Grupo sangüíneo ☐

Coletado plasma? ☐ 1- Sim 2- Não

Coletado soro? ☐ 1- Sim 2- Não

Coletada urina? ☐ 1- Sim 2- Não

# Anexo VI

Questionários específicos para cada gênero, aplicados para obtenção das informações genealógicas dos indivíduos.

**FICHA INDIVIDUAL FEMININA**

**Data da entrevista:_____** **REGISTRO:_____**

I. *Nome* .....…….....
II. *Nome da Comunidade:* ……....
III. *Local de Nascimento:*.....
IV. *Data de nascimento:* .....

| | | *Local e data de nascimento* | *Onde mora* |
|---|---|---|---|
| *Nome do pai* | | | |
| *Nome da mãe* | | | |
| *Avô paterno* | | | |
| *Avó paterna* | | | |
| *Avô materno* | | | |
| *Avó materna* | | | |
| *Irmãos* | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

*Estado Civil:*.....
*Nome do esposo atual:*.....
*Número de filhos:*.....
*Casamentos anteriores (nome) :* .....
*Número de filhos:*.....
*Escolaridade:* .....
*Local de estudo:* .....
*Religião: atual:*.....
*Nascida:*.....
*Ocupação Atual:*.....
*Anterior:*.....
*Horas de trabalho diário:*.....
*Renda:*.....
*Produção Irregular Caça:*.....
*Pesca:*.....
*Coleta:*.....

***V. Exames complementares:***

Grupos sangüíneos:
Glicemia: g/dl
Hemoglobina : mg/dl
Pressão arterial:

***VI. Antropometria***

**Altura:**
**Peso:**
**Perímetro Braquial:**
**Prega Cutânea:**

***VII. Epidemiologia***

1. Histórico de Doenças: .....
.....
.....
.....
2. Tratamento: .....
.....
.....
.....

3. Histórico da Moléstia Atual:.....
.....
.....
.....
4. Doenças na última semana: .....
.....
.....
5.Tratamento:.....
.....
6.Vacinas recebidas na infância? .....
7. Vacinas recebidas de adulto: .....
8. Saúde oral
Já foi ao dentista?..... Local de tratamento:.....
Cáries.....
Infecções: .....
Já perdeu quantos dentes?.....
Escova os dentes?..... Freqüência:.....
Usa fio dental?..... Freqüência:.....
9. Hábitos
Fuma? ..... Freqüência:.....
Bebe? ..... Freqüência.....

***VIII.Alimentação***

Última refeição:.....

Número de refeições diárias:.....

Café da manhã:.....

Almoço:.....

Café da Tarde: .....

Jantar:.....

***IX. História Reprodutiva:***

Quantos filhos já teve? .....
Abortos..... Nascidos Vivos.....Nascidos Mortos.....
Quantos filhos ainda vivem?
Com que idade teve o primeiro filho?.....
Com que idade teve o último filho?.....
Com que idade teve a primeira menstruação?.....
Ainda menstrua?..... Idade da Menopausa.....
Alguma vez tomou anticoncepcional?.....
Qual é ou teria sido seu número ideal de filhos?.....

***X. Entrevista***

Qual a história da sua família? .....
.....
.....
.....
Voce se considera quilombola? .....
.....
Você acha que o reconhecimento da sua comunidade como remanescente de quilombo lhe trará benefícios? .....
.....
..
.....
..
.....
..
Qual a sua opinião sobre as áreas de conservação no Vale?
.....
..
.....
..
.....
.
.....
.
Qual seria a melhor maneira do governo ajudar a sua família e sua comunidade?.
.....
..
.....
..
.....
.
.....
.Você gostaria que seus filhos e filhas ficassem na sua comunidade ou fossem morar na cidade? .....
.....
..
.....
..
.....
.
Quais cidades você já foi no Vale e fora do Vale?
.....
.
.....
.
.....
.
.....
.

APÊNDICE - História reprodutiva
FILHOS

Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……
Nome:…….....
Data e local de nascimento……...
Tipo de parto……Ainda vive?……

**FICHA INDIVIDUAL MASCULINA**

**Data da entrevista:……** **REGISTRO:_____**

*I. Nome .....……*
*II. Nome da Comunidade: …….*
*III. Local de Nascimento:.....*
*IV. Data de nascimento: .....*

| | | *Local e data de nascim.* | *Onde mora* |
|---|---|---|---|
| *Nome do pai* | | | |
| *Nome da mãe* | | | |
| *Avô paterno* | | | |
| *Avó paterna* | | | |
| *Avô materno* | | | |
| *Avó materna* | | | |
| *Irmãos* | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

*Estado Civil:.....*
*Nome da esposa atual:.....*
*Número de filhos:.....*
*Casamentos anteriores (nome) : .....*
*Número de filhos:.....*
*Escolaridade: .....*
*Local de estudo: .....*
*Religião: atual:.....*
*Nascido:.....*
*Ocupação Atual:.....*
*Anterior:.....*
*Horas de trabalho diário:.....*
*Renda:..... Origem: .....*
*Produção Irregular Caça:.....*
*Pesca:.....*
*Coleta:.....*

***V. Exames complementares:***

Grupos sangüíneos:
Glicemia: g/dl
Hemoglobina : mg/dl
Pressão arterial:

***VI. Antropometria***

**Altura:**
**Peso:**
**Perímetro Braquial:**
**Prega Cutânea:**

***VII. Epidemiologia***

1. Histórico de Doenças: .....
.....
.....
.....
2. Tratamento: .....
.....
.....
.....

3. Histórico da Moléstia Atual:.....
.....
.....
.....
4. Doenças na última semana: .....
.....
.....
5.Tratamento:.....
.....
6.Vacinas recebidas na infância? .....
7. Vacinas recebidas de adulto: .....
8. Saúde oral
Já foi ao dentista?..... Local de tratamento:.....
Cáries.....
Infecções: .....
Já perdeu quantos dentes?.....
Escova os dentes?..... Freqüência:.....
Usa fio dental?..... Freqüência:.....
9. Hábitos
Fuma? ..... Freqüência:.....
Bebe? ..... Freqüência.....

***VIII.Alimentação***

Última refeição:.....

Número de refeições diárias:.....

Café da manhã:.....

Almoço:.....

Café da Tarde: .....

Jantar:.....

*IX. Entrevista*

Qual a história da sua família? .....
.....
.....
.....
Voce se considera quilombola? .....
.....
Você acha que o reconhecimento da sua comunidade como remanescente de quilombo lhe trará benefícios? .....
.....
..
.....
..
.....
..
Qual a sua opinião sobre as áreas de conservação no Vale?
.....
..
.....
..
.....
.
.....
.
Qual seria a melhor maneira do governo ajudar a sua família e sua comunidade?.
.....
..
.....
..
.....
.
.....
.Você gostaria que seus filhos e filhas ficassem na sua comunidade ou fossem morar na cidade? .....
.....
..
.....
..
.....
.
Quais cidades você já foi no Vale e fora do Vale?
.....
.
.....
.
.....
.
.....
.