

Camila Cristina Avila Martins

Estudo da metilação do DNA na hipertensão essencial em populações  
afro-brasileiras

Study of DNA methylation in essential hypertension in African-  
Brazilian populations

São Paulo

2022

Camila Cristina Avila Martins

Estudo da metilação do DNA na hipertensão essencial em populações  
afro-brasileiras

Study of DNA methylation in essential hypertension in African-  
Brazilian populations

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia  
Mingroni Netto

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:  
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Avila Martins, Camila Cristina  
Estudo da metilação do DNA na hipertensão  
essencial em populações afro-brasileiras / Camila  
Cristina Avila Martins ; orientadora Regina Célia  
Mingroni Netto -- São Paulo, 2022.

150 p. + anexo

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa  
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. Metilação de DNA . 2. Hipertensão Essencial.  
3. Epigenética . 4. Remanescentes de Quilombos. I.  
Mingroni Netto, Regina Célia , orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:  
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Camila Cristina Avila Martins

Estudo da metilação do DNA na hipertensão essencial em populações  
afro-brasileiras

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

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof<sup>a</sup>. Dra.

Regina Célia Mingroni Netto

Orientadora

São Paulo, em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

---

Dedico esse trabalho aos maiores investidores na Ciência Brasileira, às mães e pais de estudantes e pesquisadores no Brasil, e a todos aqueles que cedem suas informações, tempo e amostras à Ciência, pois, sem ambos, essa e outras pesquisas não teriam sido realizadas.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha orientadora, Professora Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pela dedicação e paciência desde minha Iniciação Científica, além da didática ímpar.

À Dra. Lilian Kimura, pela dedicação imensurável ao projeto dos quilombos, tornando esse trabalho possível por meio da atuação nas viagens de campo, auxílio na bancada e suporte científico e técnico.

À Dra. Mariana Maschietto por suas sugestões, ensinamentos e auxílio nas análises de metilação e interpretação dos resultados.

À Dra. Ana Cristina Krepischi pelas críticas, sugestões e interesse que ajudaram a fundamentar esse trabalho.

À Dra. Kelly Nunes, por sua contribuição acadêmica e disponibilidade em ajudar.

Ao Dr. Renan Lemes, pela paciência, disponibilidade e clareza em explicações conceituais.

Ao Dr. Lucas Alvizi pelas dicas e paciência em nortear minhas primeiras análises de metilação.

Ao companheiro de projeto dos quilombos, doutorando Vinicius Borges, não somente pela amizade, como também pelas inúmeras vezes em que se dispôs a ajudar e compartilhar experiências.

A todos os alunos, professores, médicos e técnicos que contribuíram anteriormente com a formação de conhecimento sobre as comunidades de remanescentes quilombolas do Vale do Ribeira e cujos trabalhos foram essenciais para minha formação e desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociência por fornecerem a infraestrutura que permitiu a realização desse projeto.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, pelo suporte ao longo de todo o trabalho, em especial à Maraisa Sebastião, ao Paulo Rogério, ao Israel Rubio e à Erika Takamoto de Camargo.

Aos funcionários do Centro de Estudos Sobre o Genoma Humano e Células Tronco pelo suporte técnico, em especial ao Ricardo Nonaka que sempre agiu de forma extremamente prestativa.

Às agências de fomento FAPESP (Processo CEPID 1998/14254-2 e 2013/08028-1) e CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Humana e “redondezas” que me acompanham ou acompanharam em bons e maus momentos da minha formação: Alex, André, Beatriz, Felipe, Giovanna, Gustavo, Jennifer, Larissa, Laura, Luiz Gustavo, Sara, Uirá, Vinícius e William.

À minha família, pelo amor, apoio, dedicação e incentivo sem os quais não viveria, em especial: ao meu irmão e meu eterno exemplo, Flavinho; ao meu Pai e melhor amigo, por fazer por mim o que não faria por ele mesmo; à minha Mãe, por ser a grande socorrista no meu mundo, me trazendo de volta à vida todas as vezes em que me esqueci de respirar; à Melanie, por me deixar estar em sua companhia por toda sua vida; ao Houdini, por me ensinar que coisas fofas também podem morder; ao Bluelomeu, pelo suporte emocional e felicidade que tenho só de olhar para o seu sorriso, e à Mila.

Aos indivíduos das comunidades quilombolas pela colaboração com esse estudo, tanto ao ceder informações, quanto tempo e amostras, sem as quais esse estudo não existiria. Espero profundamente que os frutos desse projeto sejam colhidos e possam fazer a diferença para vocês algum dia.

E, por fim, estranhamente, também agradeço à Pandemia, aos sufocos da vida e duas cirurgias seguidas, por me obrigar a lembrar o que realmente importa, embora deseje que, por favor, nunca mais se repitam.

## EPÍGRAFE

---

“얻는게 있으면 잃는게 있다.  
살면서 내가 얻은건 전부 내가 잃은 것들로 이룬거다.  
그말 무슨 뜻인지 이제 알겠어.  
겨울이 있어야 봄이 있고 어둠이 있어야 빛도 있고 죽음이 있어야 탄생도 있다.”

Se há algo a ganhar, há algo a perder.  
Tudo que ganhei na vida é conquistado com as coisas que perdi.  
Agora eu sei o que isso significa.  
Quando há inverno, há primavera; quando há escuridão, há luz; e quando há morte, há  
nascimento.

Tak Dong Kyung (탁동경), Doom at Your Service (어느 날 우리집 현관으로 멸망이  
들어왔다)  
(tradução livre)



## RESUMO

A hipertensão essencial (HE) é uma condição clínica definida pela elevação da pressão arterial (PA) a níveis superiores ou iguais a 140 mmHg (PA sistólica) e/ou 90 mmHg (PA diastólica). É uma doença multifatorial, prevalente no Brasil e responsável por altos custos financeiros e pessoais para a população. Embora os estudos de ligação e associação de todo o genoma tenham fornecido informações sobre os fundamentos genéticos de doenças complexas como a HE, esses estudos não explicam completamente a herdabilidade da condição. Estudar a HE do ponto de vista epigenético pode ajudar a preencher essa lacuna. Devido às características genéticas peculiares e à observação prévia de alta frequência de hipertensão, este estudo foi realizado em populações de remanescentes de quilombos no Vale do Ribeira - São Paulo. O objetivo da pesquisa foi avaliar se a suscetibilidade ao desenvolvimento de HE em populações afro-brasileiras está associada a alterações nos padrões de metilação do DNA. Para isso, realizamos uma avaliação genômica do nível de metilação do DNA de 94 amostras de sangue periférico de indivíduos normotensos (48) e hipertensos (46), para esclarecer se mecanismos regulatórios epigenéticos podem influenciar na origem da hipertensão essencial nestas populações. Utilizamos a plataforma Infinium Methylation EPIC BeadChip (850.000 sítios) e identificamos posições genômicas e regiões diferencialmente metiladas, comparando indivíduos normotensos e hipertensos. Os dados foram analisados por meio dos pacotes RnBeads e ChAMP e comparados com informações obtidas de bancos de dados como EWAS Atlas, GWAS Catalog, GeneCards, dados de literatura e ferramentas computacionais como VarElect e EWAS Toolkit. Dentre as posições genômicas (sítios CpG) diferencialmente metilados encontrados, destacaram-se aqueles localizados nos seguintes genes: *DRD2* (cg03691958), *SLC9A3* (cg25861340), *SLC24A4* (cg 20636399), *CA4* (cg18743730); *KLHL29* (cg20860188), *NTM* (cg01803766) e *BMP7* (cg11574151 e cg15851418). Dentre as regiões diferencialmente metiladas, destacamos as associadas aos genes: *ABAT*, *THBS1*, *PON3*, *CERS3*, *NUDT12*, *HLA-DQB2*, *KCNH2*, *GABBR1*, *MIR539*, *MIR487B* e *IL5RA*. Nossos achados sugerem que diferenças na metilação de genes relacionados ao controle da pressão arterial contribuem para a alta suscetibilidade à hipertensão essencial nessas populações. Também atestam a relevância de estender o estudo de metilação em regiões selecionadas para mais amostras de remanescentes de quilombos e de validar funcionalmente o papel da metilação associada a esses genes na origem da HE em pesquisas futuras.

## ABSTRACT

Essential hypertension (EH) is a clinical condition defined by the elevation of blood pressure (BP) to levels greater than or equal to 140 mmHg (systolic BP) and/or 90 mmHg (diastolic BP). It is a multifactorial disease, prevalent in Brazil and responsible for high financial and personal costs for the population. While genome-wide linkage and association studies have provided information about the genetic underpinnings of complex diseases such as EH, these studies do not completely explain the heritability of the condition. Studying EH from the epigenetic point of view can help to fill this gap. Due to peculiar genetic characteristics and the previous observation of a high frequency of hypertension, this study was conducted in populations of quilombo remnants in Vale do Ribeira - São Paulo. The objective of the research was to evaluate whether the susceptibility to the development of EH in African-Brazilian populations is associated with changes in DNA methylation patterns. For this, we performed a genomic evaluation of the DNA methylation level of DNA from 94 peripheral blood samples from normotensive (48) and hypertensive (46) individuals, to clarify whether epigenetic regulatory mechanisms can influence the origin of essential hypertension in these populations. We used the Infinium Methylation EPIC BeadChip platform (850,000 sites) and identified the genomic positions and regions differentially methylated, comparing normotensive and hypertensive individuals. Data were analyzed using RnBeads and ChAMP packages and cross-referenced with information obtained from databases such as EWAS Atlas, GWAS Catalog, GeneCards, literature data and computational tools such as VarElect and EWAS Toolkit. Among the differentially methylated genomic positions (CpG) sites found, those located in the following genes were highlighted: *DRD2* gene (cg03691958), *SLC9A3* (cg25861340), *SLC24A4* (cg 20636399), *CA4* (cg18743730); *KLHL29* (cg20860188), *NTM* (cg01803766) and *BMP7* (cg11574151 and cg15851418). Among the differentially methylated regions, we highlighted those associated with genes: *ABAT*, *THBS1*, *PON3*, *CERS3*, *NUDT12*, *HLA-DQB2*, *KCNH2*, *GABBR1*, *MIR539*, *MIR487B* and *IL5RA*. Our findings suggest that differences in the methylation of genes related to blood pressure control contribute to the high susceptibility to essential hypertension in these populations. They also indicate the relevance of extending the methylation study of selected regions to more samples from quilombo remnants and of validating, from the functional point of view, the role of methylation associated to these genes in the origin of EH in future research.

## SUMÁRIO

---

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL .....	10
1.1.1. Definição e epidemiologia da hipertensão arterial.....	10
1.1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial .....	12
1.2. EPIGENÉTICA .....	15
1.2.1. Definindo epigenética .....	15
1.2.2. Metilação de DNA .....	16
1.2.3. Modificação de histonas .....	18
1.2.4. Ação de RNAs não codificadores .....	19
1.2.5. Epigenética: Transmissão intergeracional e transgeracional .....	20
1.2.6. Técnicas de investigação da metilação do DNA .....	23
1.2.7. Hipertensão: aspectos genéticos e epigenéticos.....	24
1.3. ESTUDO DE POPULAÇÕES SEMI-ISOLADAS DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS.....	30
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	36
<b>VII. CONCLUSÕES</b> .....	37
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

## I. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL

#### 1.1.1. Definição e epidemiologia da hipertensão arterial

De acordo com a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia de 2016, a hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica definida pela elevação persistente da pressão arterial (PA) a níveis superiores ou iguais a 140 mm Hg de pressão arterial sistólica (PAS) e/ou 90 mm Hg de pressão arterial diastólica (PAD). Essa característica é decorrente de mecanismo multifatorial, pois o seu desenvolvimento resulta da interação entre diversos componentes genéticos e ambientais.

A HA pode ser classificada em essencial ou primária (cerca de 90% dos casos), quando sua manifestação não ocorre devido à existência de outra doença pré-existente, e secundária (aproximadamente 10%), quando se manifesta em consequência de outras doenças (Carey, et al., 2018). É frequente a associação da hipertensão com distúrbios metabólicos e alterações funcionais e/ou estruturais em órgãos-alvo. Além disso, algumas condições como a dislipidemia, a obesidade e o diabetes, agravam o quadro clínico. Frequentemente ocorre de forma assintomática, dificultando seu diagnóstico. São considerados fatores de risco para o desenvolvimento da HA o envelhecimento, o sobrepeso e a obesidade, o consumo excessivo de sódio e álcool, o sedentarismo, o tabagismo e o estresse (Carey, et al., 2018; World Health Organization (WHO), 2021). A Sociedade Brasileira de Cardiologia, seguindo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - 2020, classifica o *status* da pressão arterial de acordo com a Tabela 1.

Dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizado em 2017, indicam que houve um aumento na prevalência de hipertensão autorreferida no Brasil, passando de 22,6% em 2006 para 24,3% em 2017. Entre os adultos com idade  $\geq 65$  anos, a porcentagem foi de 60,9%, enquanto na faixa etária de 18 a 44 anos esse valor é menor (de 18 a 24 anos: 3,7%; de 25 a 34 anos: 10,1% e de 35 a 44 anos: 17,3%), indicando que a frequência da pressão elevada tende a aumentar com a idade (Vigitel Brasil 2006, 2007; Vigitel Brasil 2017, 2018). A prevalência de diagnóstico médico de hipertensão arterial em mulheres é superior à dos homens (26,4% contra 21,2%) e, em 2017, a capital brasileira com o maior percentual de hipertensos foi o Rio de Janeiro, com 30,7% (Vigitel Brasil 2017, 2018). Tais observações são condizentes com os resultados obtidos no estudo conduzido por Oliveira *et al.* que visou estimar a prevalência de hipertensão em

idosos da cidade de São Paulo a partir de dados obtidos em 2010. A prevalência de hipertensão em indivíduos com idade  $\geq 60$  anos foi de 79,5%, dos quais 51% não estavam com a doença controlada, sendo que o tanto o diagnóstico quanto o controle da hipertensão estiveram associados a fatores socioeconômicos, demográficos e de acesso à saúde (Oliveira, *et al.*, 2019). A tabela 2 lista dados de prevalência para a hipertensão no Brasil, obtidos em diferentes pesquisas, anos e áreas. É interessante observar os maiores valores de prevalência em mulheres em relação aos homens na maior parte das pesquisas realizadas e a alta prevalência de hipertensão nas populações de remanescentes de quilombos, incluindo as estudadas por nosso grupo apresentada para comparação.

Tabela 1: Classificação da PA de acordo com a medição casual ou no consultório a partir de 18 anos de idade: classificação é definida de acordo com a PA no consultório e pelo nível mais elevado de PA, sistólica ou diastólica. A HA sistólica isolada, caracterizada pela PAS  $\geq 140$  mmHg e PAD  $< 90$  mmHg, é classificada em 1, 2 ou 3, de acordo com os valores da PAS nos intervalos indicados. A HA diastólica isolada, caracterizada pela PAS  $< 140$  mmHg e PAD  $\geq 90$  mmHg, é classificada em 1, 2 ou 3, de acordo com os valores da PAD nos intervalos indicados. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica. Tabela modificada a partir do quadro 3.4 das Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial -2020 (Barroso, *et al.*, 2020).

Classificação	PAS (mm Hg)		PAD (mm Hg)
Pressão arterial ótima	$< 120$	e	$< 80$
Pressão arterial normal	120-129	e/ou	80-84
Pré-hipertensão	130-139	e/ou	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	e/ou	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	e/ou	100-109
Hipertensão estágio 3	$\geq 180$	e/ou	$\geq 110$

Os custos financeiros e pessoais gerados por essa condição clínica são altos: segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde entre 2006 e 2016 a mortalidade total por hipertensão no país foi de 489.896 indivíduos e dados do DATASUS referentes ao ano de 2016 demonstraram que cerca de R\$ 61,2 milhões foram gastos entre internação (Sistema de Informações Hospitalares - SIH) e atendimento ambulatorial (Sistema de Informações Ambulatoriais - SAI), com o total de 983.256 procedimentos realizados no país pelo SUS relacionados a essa doença.

No mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a pressão arterial elevada contribui para cerca de 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares a cada ano, sendo que a prevalência mundial é de cerca de 31% acima de 20 anos (Mills, *et al.*, 2016).

Tabela 2: Prevalência de hipertensão no Brasil. Dados da PNS considerando diagnóstico médico autorreferido de hipertensão arterial e dados da VIGITEL, considerando frequência de diagnóstico médico de hipertensão arterial. VIGITEL: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. PNS: Pesquisa nacional de saúde. \*Dados das comunidades de remanescentes de quilombos estudados por nosso grupo de pesquisa.

Estudo	% geral	Área	Observação
VIGITEL,2006 (Vigitel Brasil 2006, 2007)	21,6%	Capitais	Predomínio entre mulheres (24,4% vs 18,4%)
VIGITEL,2014 (Vigitel Brasil 2014, 2015)	24,8%	Capitais	Predomínio entre mulheres (26,8% vs 22,5%)
VIGITEL,2017 (Vigitel Brasil 2017, 2018)	24,3%	Capitais	Predomínio entre mulheres (26,4% vs 21,7%)
VIGITEL,2019 (Vigitel Brasil 2019, 2020)	24,5%	Capitais	Predomínio entre mulheres (27,3% vs 21,2%)
PNS, 2019 (Pesquisa Nacional em Saúde, 2019)	23,9%	Urbana e rural	Predomínio entre mulheres (26,4% vs 21,1%) e em áreas urbanas (24% vs 23,2%).
Comunidades quilombolas da Bahia (Bezerra, et al., 2013)	45,4%	Rural	Sem diferença significativa entre homens e mulheres
*Comunidades remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira-SP (Kimura, et al., 2012)	41,6%	Rural	Sem diferença significativa entre homens e mulheres
Comunidades quilombolas de Goiás, Kalunga (Paiva, 2017)	31,0%	Rural	Predomínio entre mulheres (36,94% vs 21,98%)
Comunidades quilombolas de Tocantins, Cocalinho (Paiva, 2017)	37,7%	Rural	Predomínio entre homens (40,7% vs 35,7%)
Comunidades quilombolas de Tocantins, Pé do Morro (Paiva, 2017)	50,1%	Urbana	Predomínio entre homens (57,7% vs 43,2%)
Comunidades quilombolas de Sergipe (Santos, et al., 2019)	26,0%	Rural	Sem diferença significativa entre homens e mulheres

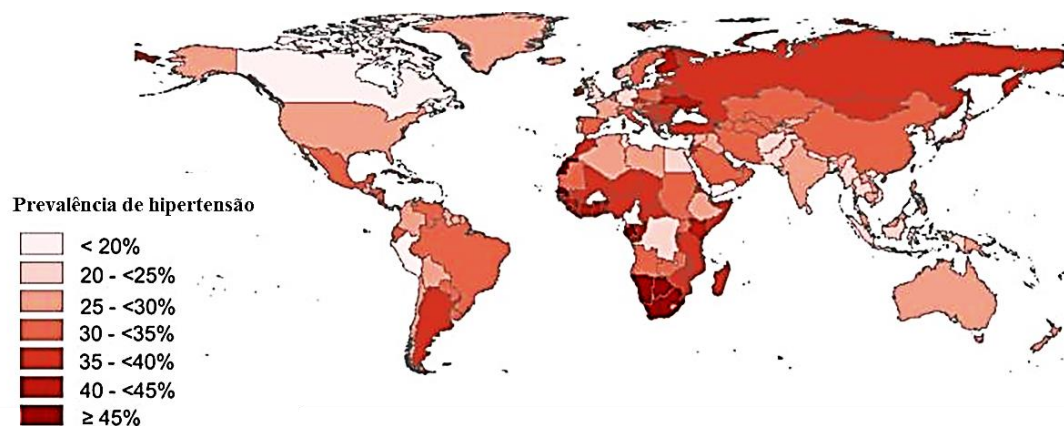


Figura 1: Prevalência de hipertensão padronizada mundialmente por idade e sexo em adultos de 20 anos ou mais, por país, em 2010. O mapa está sombreado de acordo com a prevalência, desde claro (prevalência mais baixa) até escuro (prevalência mais alta). Modificado a partir de Mills, *et al.*, (2016).

### 1.1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial

A homeostase da pressão arterial está associada a uma série de mecanismos fisiológicos, dentre eles o reflexo barorreceptor, a ação do hormônio antidiurético, o sistema renina-

angiotensina-aldosterona (SRAA), o sistema dopaminérgico, o equilíbrio de sódio e eletrólitos, o sistema endotelial e a transdução de sinais intracelulares (revisões em (John & Schmierder, 2003; Zeng, et al., 2004; Siffert, 2005; Silverthorn, 2010; Shahoud, et al., 2020) John & Schmierder, 2003; Zeng, *et al.*, 2004; Siffert, 2005; Silverthorn, 2010; Shahoud, *et al.*, 2020). Alguns desses mecanismos estão apresentados de forma resumida na Figura 2.

O reflexo barorreceptor atua na regulação da pressão arterial em resposta a mudanças agudas na pressão sanguínea. A percepção dessas alterações é executada por meio vários receptores sensoriais periféricos localizados dentro dos vasos sanguíneos, os barorreceptores, que são mecanorreceptores sensíveis ao estiramento de vasos. Uma vez ativados, a informação é transmitida ao sistema nervoso central e utilizada para regular a resistência vascular periférica e o débito cardíaco.

O hormônio antidiurético, ou vasopressina, produzido por células nervosas do hipotálamo, quando secretado, ocasiona a elevação da pressão arterial. Entre seus mecanismos de ação está o aumento da reabsorção de água no ducto coletor dos néfrons no rim – ocasionando incremento no volume plasmático e vasoconstrição, que eleva a resistência periférica. É sintetizado e liberado em resposta a fatores como: ação da angiotensina II, diminuição da pressão arterial captada pelos barorreceptores de alta pressão, baixo volume sanguíneo constatado pela diminuição do estiramento de vasos sanguíneos que sensibilizam barorreceptores de baixa pressão e alta osmolaridade sérica (revisão em Shahoud, *et al.*, 2020).

O sistema SRAA é uma das principais vias de regulação da pressão arterial. A renina, sintetizada nas células justaglomerulares dos rins, ao ser liberada na corrente sanguínea, catalisa a hidrólise do angiotensinogênio, liberando angiotensina I. Essa, por sua vez, é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (um potente vasoconstritor). A angiotensina II age por meio de dois receptores: o AT1 e o AT2, presentes em diversos tecidos. Por meio do receptor AT1, a angiotensina II atua no controle da pressão arterial ocasionando vasoconstrição, liberação de aldosterona pela glândula adrenal e estímulo da retenção de sal nos túbulos renais (revisões em Connell & Davies, 2005; Bader & Ganten, 2008; Siragy & Carey, 2010; Silverthorn, 2010). A aldosterona, por meio de ação nos rins via receptores mineralocorticoides, regula o volume do fluido corporal e mantém a homeostase de íons induzindo a reabsorção de íons sódio e água e elevando a excreção de íons potássio. Ela também modula o tônus vascular, 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).

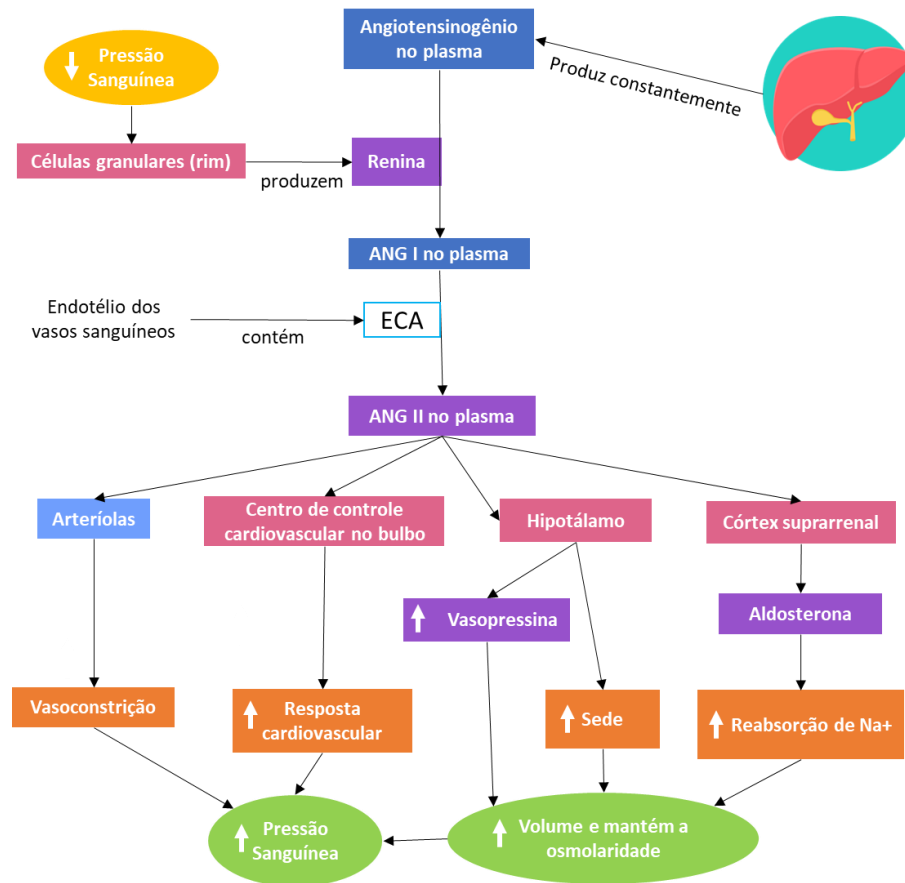


Figura 2: Esquema da regulação da pressão arterial pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, modificado de Silverthorn, (2010).

A dopamina, sintetizada nos túbulos renais proximais, exerce sua função por meio da ativação de receptores de superfície celular acoplados a proteína G que, quando estimulados, regulam a excreção de água e eletrólitos, como o sódio, modulando indiretamente a hemodinâmica renal e a liberação de hormônios e peptídeos vasoativos (revisões em Zeng, *et al.*, 2004; Jose, *et al.*, 2010).

Já o óxido nítrico é gerado constitutivamente nas células endoteliais por meio da conversão do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS tipo III). O óxido nítrico interfere na regulação do fluxo sanguíneo controlando o tônus vascular, adaptando o fluxo sanguíneo conforme a demanda metabólica de cada tecido e adaptando o calibre dos vasos conforme o volume do influxo sanguíneo (revisão em John & Schmierder, 2003).

Sinais intracelulares também podem influenciar a regulação da pressão arterial, controlando a atividade dos canais de íons sódio e hidrogênio, por exemplo, promovendo a elevação da reabsorção de íons sódio pelos túbulos renais. Isso ocasiona um incremento do



volume sanguíneo por meio da captação de água por osmose, acarretando o aumento da pressão arterial (Siffert, 2005).

Dessa forma, o estudo das variantes genéticas e das alterações epigenéticas em genes que codificam produtos gênicos diversos relacionados a esses sistemas é interessante para a compreensão do desenvolvimento da hipertensão e elas, de fato, têm sido amplamente investigadas (Stoll, et al., 2018).

## 1.2. EPIGENÉTICA

### 1.2.1. Definindo epigenética

O termo epigenética, cunhado originalmente por Waddington, foi usado para tentar explicar as complexas interações entre o desenvolvimento e o genoma que levam à produção do fenótipo, estando a princípio ligado ao contexto da biologia do desenvolvimento. Em seu artigo ele introduz o termo da seguinte forma, em tradução livre: *“Certamente precisamos lembrar que entre o genótipo e o fenótipo, e conectando-os um ao outro, está todo um complexo de processos de desenvolvimento. É conveniente ter um nome para este complexo: “epigenótipo” parece adequado”* (Waddington, 1942).

No entanto, o uso do termo se alterou nos últimos anos, mostrando um vínculo maior com os avanços mais recentes no campo da biologia molecular. Atualmente, a epigenética é descrita como campo do conhecimento que investiga alterações herdáveis, porém reversíveis, nos perfis de expressão gênica, mediadas por mecanismos não vinculados a alterações na sequência nucleotídica do DNA (derivada de Allis & Jenuwein, 2016; Pal & Tyler, 2016; Watson, et al., 2015; Klug, et al., 2010).

Por alterações herdáveis, temos alterações que são passadas de uma célula-mãe para células-filhas e, ocasionalmente de um indivíduo para sua prole (transmissão transgeracional), mas não obrigatoriamente. Quanto à regulação da expressão gênica, há diferentes níveis de regulação: o nível transcricional, relacionado a eventos de iniciação da transcrição que ocorrem na molécula de DNA, o pós-transcricional, relacionados ao RNA transcrito, e eventos pós-traducionais, que ocorrem com as proteínas após sua tradução (revisão em Strachan & Read, 2018). Por fim, essas mudanças reversíveis, porém, herdáveis, ocorrem por meio de alguns mecanismos moleculares hoje chamados de epigenéticos, sendo os três principais: metilação da citosina do DNA, modificação das caudas N-terminais das histonas e ação de RNAs não codificadores regulatórios. Nenhum deles está vinculado a alterações na sequência nucleotídica do DNA (revisão em Ngo & Hein, 2021).

Esses mecanismos desempenham um papel importante na regulação dos estados conformacionais da cromatina e da expressão gênica, pois padrões de metilação distintos, por exemplo, se associam a diferentes tipos celulares, tecidos, idade e condições fisiológicas de um organismo (Kim & Costello, 2017). Dessa forma, a regulação inadequada da expressão gênica ao nível epigenético pode ocasionar distúrbios nas funções celulares em tecidos ou órgãos que podem resultar no aparecimento de doenças, como hipertensão e obesidade (Kim & Costello, 2017; Stoll, et al., 2018). Nesse trabalho optamos por enfatizar a metilação do DNA.

### 1.2.2. Metilação de DNA

A metilação do DNA é uma modificação epigenética que pode regular a expressão gênica a nível transcricional. É caracterizada por uma modificação covalente na molécula de DNA que não afeta a sequência de nucleotídeos. Essa modificação consiste na adição do radical metil ( $\text{CH}_3$ ) ao carbono na posição 5 do anel de pirimidina nos resíduos de citosina, formando 5-metilcitosinas (5mC). Geralmente, essas citosinas precedem uma guanina formando dinucleotídeos CpG (citosina-fosfato-guanina onde C e G se conectam por uma ligação fosfodiéster), (revisão em Han, *et al.*, 2016).

A metilação do DNA é catalisada por enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMTs), que transferem o grupo metil de S-adenosilmetionina para as citosinas. Os principais doadores do radical metil (metionina, folato, colina e vitamina B12) são obtidos na dieta (Szyf, 2007). São conhecidos dois tipos gerais de DNMTs: aquelas que atuam na manutenção dos padrões de metilação pré-estabelecidos, como a DNMT1, e outras que atuam em processos de metilação *de novo*, isto é, em sítios sem metilação preexistente, como DNMT2, DNMT3a e DNMT3b (revisões em Han, *et al.*, 2016; Szyf, 2007; Ngo & Hein, 2021). DNMT3a e DNMT3b são necessárias para gerar novos padrões de metilação durante o desenvolvimento, em especial durante a gametogênese e a embriogênese inicial, enquanto a DNMT1 depende do DNA hemimetilado (sítios CpGs hemimetilados, característicos de fitas de DNA em processo de replicação), ou seja, uma vez que o padrão de metilação é estabelecido, a manutenção simétrica de sítios CpG metilados entre as fitas é mediado pela DNMT1 durante a replicação celular (revisões em Tollervey & Lunyak, 2012, Han, *et al.*, 2016 e Ngo & Hein, 2021).

A desmetilação do DNA, por sua vez, pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A passiva está associada a ausência de DNMT1 durante a replicação. Já a desmetilação ativa é promovida por enzimas específicas, as “ten-eleven translocation” (TET), que são capazes de catalisar a reação de oxidação das 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), que posteriormente são convertidas em 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC). A glicosilase de timina-DNA

(*thymine-DNA glycosylase* - TDG) também participa da desmetilação ativa, assim como o reparo de excisão de base (*base excision repair*, BER) que remove 5fC e 5caC do DNA (revisão em Ngo & Hein, 2021).

Apesar da metilação do DNA ocorrer na maior parte das vezes em dinucleotídeos CpG, ela não acontece exclusivamente apenas nesses sítios. Sabe-se que, em células embrionárias indiferenciadas, há a presença de metilação em outros tipos de dinucleotídeos (CpA, CpT ou CpC) e que isso pode estar relacionado com a pluripotência dessas células (Lister, *et al.*, 2009).

Os sítios de dinucleotídeos CpG podem ocorrer no genoma de forma agrupada, constituindo as ilhas CpG, ou aparecerem como sítios isolados, espalhados pelo genoma. Ilhas CpG são regiões extensas, com centenas de pares de base de DNA, onde citosinas se encontram, em geral, não metiladas e, por conta disso, se mantêm com a concentração esperada de CpG se comparadas ao restante do genoma, onde essas sequências sofreram depleção ao longo da evolução. Devido à natureza mutável dos dinucleotídeos CpG metilados, pois a citosina metilada ao ser desaminada origina a timina, esses sítios CpG tendem a serem perdidos, como é visto na maior parte do genoma, exceto nas Ilhas CpG onde as citosinas são mantidas geralmente desmetiladas (revisão em Strachan & Read, 2018). Aproximadamente 10% dos sítios CpG ocorrem em ilhas CpG, sendo que, frequentemente essas ilhas estão associadas às regiões promotoras de genes (revisão em Ngo & Hein, 2021).

A metilação do DNA em regiões promotoras está relacionada ao silenciamento gênico. No entanto, paradoxalmente, a metilação de sítios CpG localizados nos “corpos” dos genes está correlacionada com a ativação da transcrição, sendo que os sítios CpG metilados são mais frequentemente encontrados em “corpos” gênicos do que em regiões promotoras (revisões em Lister, *et al.*, 2009 e Ngo & Hein, 2021).

A transcrição gênica pode ser regulada pela metilação de DNA tanto de forma direta, quanto de forma indireta. Com a adição do radical metil à citosina do dinucleotídeo CpG, no contexto de região promotora, há a inibição direta da ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos, havendo o silenciamento da transcrição. No entanto, essa inibição pode ocorrer de forma indireta, por meio de proteínas chamadas *Methyl Binding Proteins* (MBP) (também conhecidas como *methylated DNA binding proteins*, MBD). As MBPs possuem afinidade pelo grupo metil e se ligam aos dinucleotídeos CpG de regiões promotoras, recrutando outras proteínas efetoras, como complexos remodeladores de cromatina, impedindo o acesso dos fatores de transcrição e, portanto, modulando a expressão gênica (Figura 3) (revisão em Ngo & Hein, 2021).

Por fim, o mecanismo de metilação do DNA está relacionado a vários processos biológicos relevantes como regulação gênica, diferenciação celular, interações DNA-proteínas, supressão da atividade de elementos transponíveis, embriogênese, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico e tumorigênese (Lister, *et al.*, 2009).

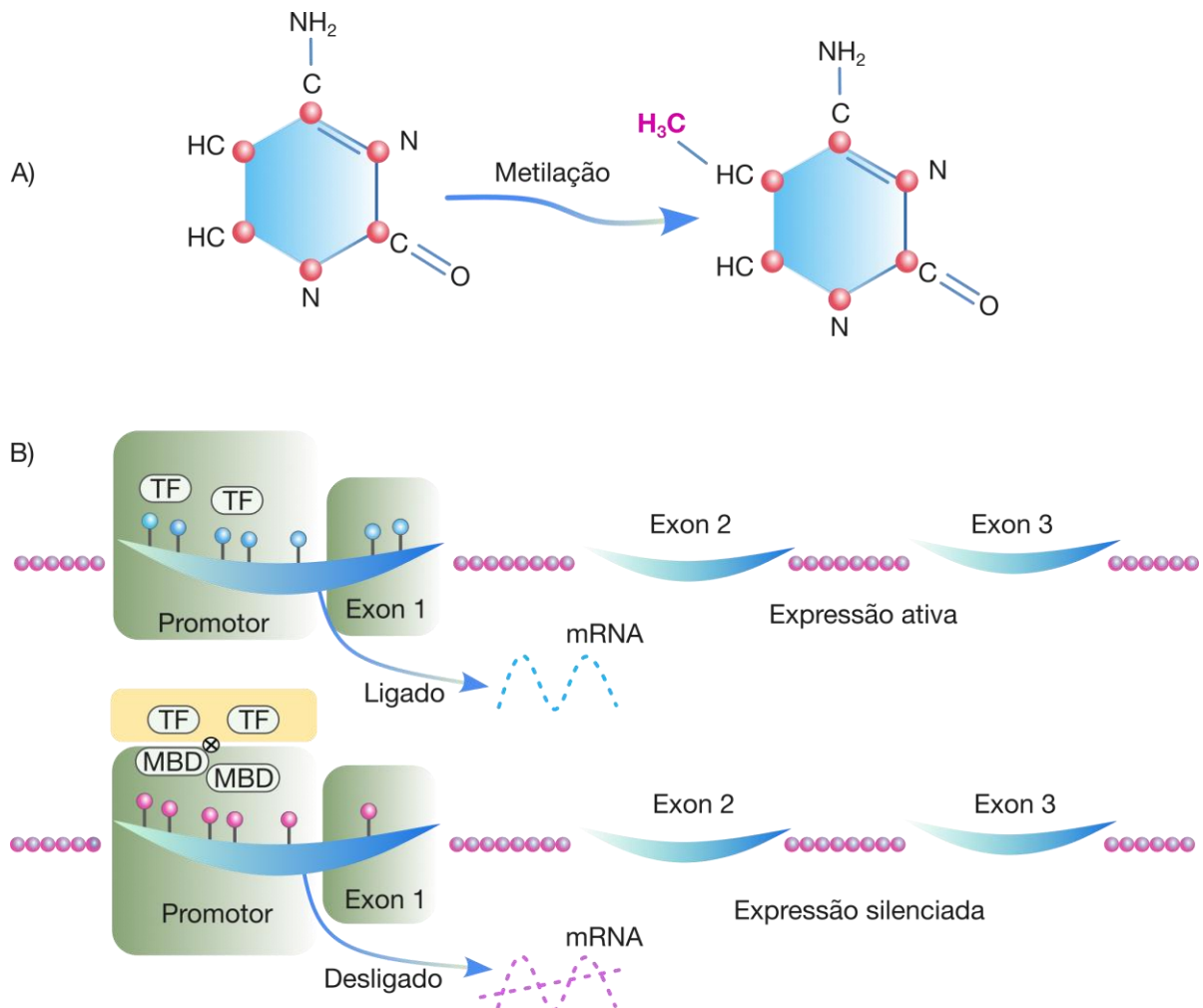


Figura 3: Metilação de DNA. A: representação da formação de 5mC causada pela metilação do DNA. B: no DNA não metilado (dinucleotídeos CG, círculos azuis nas barras), a cromatina não está condensada e os fatores de transcrição (TF) podem se ligar à região promotora do gene, permitindo a expressão do gene. A metilação do DNA (dinucleotídeo CG, círculos rosas com estrelas nas barras) atrai proteínas de ligação ao DNA (MBD- *methylated DNA binding proteins*) condensando a cromatina, impedindo a ligação do fator de transcrição e levando ao silenciamento da expressão do gene. Adaptado de Han, *et al.*, (2016).

### 1.2.3. Modificação de histonas

A molécula de DNA encontra-se complexada com proteínas formando uma estrutura chamada de cromatina. A unidade básica de organização da cromatina é o nucleossomo. Cada nucleossomo é composto por oito proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4, duas de cada)

formando um octâmero que é envolto por um segmento da molécula de DNA de 146 pares de bases (revisão em Szyf, 2007).

Essas proteínas contêm extremidades chamadas de N-terminais, ou caudas, constituídas por aminoácidos que estão acessíveis a modificações químicas, uma vez que não se encontram compactados dentro do octâmero de histonas. Essas modificações podem ser metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação e interferem diretamente na interação do DNA com as proteínas histonas, influenciando na acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA enrolado em torno do octâmero. As caudas N-terminais das histonas também são necessárias para estabilizar a fibra de 30 nm (estrutura formada em um dos níveis de compactação do DNA), contribuindo com sua formação. Isso é feito por meio da interação das caudas com os nucleossomos adjacentes. Assim, modificações químicas nas caudas das histonas têm influência tanto na formação da fibra de 30 nm quanto na formação de estruturas da cromatina de ordens superiores (revisões em Clapier & Cairns, 2009; Gardner, *et al.*, 2011). Além disso, as modificações nessas caudas podem levar à formação de regiões permissivas à interação com proteínas remodeladoras de nucleossomos que, quando recrutadas, são capazes de ocasionar alterações na conformação da cromatina, permitindo que outras proteínas interajam com a região como, por exemplo, fatores de transcrição com sítios de ligação na região (revisões em Clapier & Cairns, 2009; Gardner, *et al.*, 2011). Dessa forma, uma alteração nas caudas das histonas pode afetar o nível de expressão do gene presente em segmentos de DNA vizinhos (revisão em Szyf, 2007; Clapier & Cairns, 2009; Gardner, *et al.*, 2011).

#### **1.2.4. Ação de RNAs não codificadores**

Os RNAs não codificadores (ncRNA) são classes de RNAs que não são traduzidos em proteínas, mas que efetuam diversas funções importantes na célula. Eles podem ser agrupados em classes, considerando suas funções, em: ncRNAs com funções descritas como *housekeeping*, como o RNA transportador (RNAt) e RNA ribossomal (RNAr) que estão relacionados ao processo de tradução; RNAs reguladores, como os pequenos RNAs de interferência (*short interfering RNA* - siRNA), microRNAs (miRNA), pequenos RNAs que interage com a proteína PIWI (*PIWI-interacting small RNA*- piRNA), pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNA*- snRNA) e RNAs longos não codificadores (*long noncoding RNA* - lncRNA). (Pereira, 2017; Ngo & Hein, 2021). Os RNAs reguladores têm importante papel dentro dos mecanismos de regulação epigenética, atuando na regulação da organização da cromatina e no silenciamento gênico.

### 1.2.5. Epigenética: Transmissão intergeracional e transgeracional

Como mencionado anteriormente, o termo epigenética é usado para referir alterações moleculares que são herdáveis de uma célula-mãe para células-filhas, nos processos de divisão mitótica, mas, também, ocasionalmente, de um indivíduo para a sua prole. Supõe-se que essa segunda forma de transmissão poderia ocorrer por meio da indução de modificações epigenéticas na geração inicial (F0) causada por fatores ambientais (como dieta, estilo de vida, abuso de substâncias) de modo que essas, uma vez estabelecidas nos progenitores, poderiam ser transmitidas ao longo de várias gerações via linhagem germinativa (Blake & Watson, 2016).

Essa transmissão pode ser classificada em intergeracional ou transgeracional: o padrão de herança intergeracional é aquele em que a exposição parental a determinado fator indutor influencia diretamente o fenótipo de seus embriões ou fetos (a geração F1), assim como suas células germinativas (geração F2) se o feto for feminino; o padrão transgeracional é aquele em que os efeitos do indutor permanecem na geração F3, sendo essa a primeira geração em que o fenótipo realmente persiste, apesar de não haver mais a exposição primária ao fator indutor (Vaiserman, et al., 2017; Blake & Watson, 2016) (Figura 4).

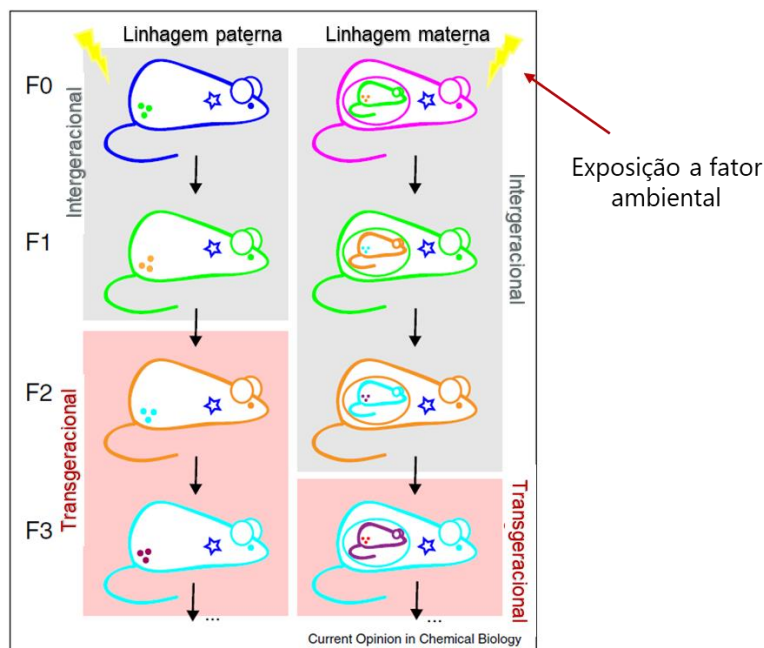


Figura 4: Comparando a herança epigenética transgeracional entre linhagens paternas e maternas. Adaptado de Blake & Watson, (2016).

Alguns estudos epidemiológicos e demográficos foram capazes de apresentar evidências fortes da existência de modificações de padrões de expressão gênica com transmissão intergeracional e transgeracional relacionados a algumas características

fenotípicas, em humanos. No entanto, é preciso destacar que ainda não há comprovação molecular em humanos de que isso ocorra. Além disso, tem sido demonstrado em alguns estudos realizados em animais que padrões epigenéticos herdáveis, distintamente da herança genética convencional, podem ser reversíveis e manter-se apenas por algumas gerações na ausência do fator indutor (Vaiserman, et al., 2017; Han, et al., 2016).

Entre exemplos de relatos clássicos que falam a favor da aplicação dessas ideias aos humanos destaca-se o caso dos indivíduos nascidos nos Países Baixos, expostos e não expostos à desnutrição no útero durante a fome holandesa de 1944-1945 (F1) e seus filhos (F2). Dados obtidos pelo estudo indicaram que a exposição à fome no útero da geração F1 estavam associados com um aumento da adiposidade neonatal da geração F2 e problemas de saúde na idade adulta, demonstrando que a exposição ao fator fome acarretou implicações não limitadas apenas à F1 (Painter, et al., 2008).

Outros fatores, como o hábito de fumar, também já foram relatados como associados a efeitos intergeracionais. Em um estudo realizado com filhos de pais fumantes demonstrou-se que o início do hábito de fumar antes da puberdade está associado com o aumento de risco de desenvolvimento de obesidade na adolescência em seus descendentes (Northstone, et al., 2014).

Alguns estudos de cunho epidemiológico demonstraram associação entre desnutrição durante o crescimento e a maior propensão ao desenvolvimento de doenças como obesidade e hipertensão na vida adulta. Destacamos aqui alguns estudos realizados com populações brasileiras:

Em um estudo realizado por Florêncio, *et al.*, com 315 famílias, considerando apenas indivíduos adultos, entre 18 e 60 anos, pertencentes a uma comunidade carente do estado de Alagoas, nordeste do Brasil, foi observada uma alta prevalência de hipertensão, além de ter sido observado que, nas mulheres, a altura estava correlacionada negativamente com a hipertensão e sobrepeso. Em outras palavras, mulheres mais baixas apresentavam maior prevalência dessas doenças (Florêncio, et al., 2004). É importante ressaltar que a altura é um importante indicador de desnutrição durante o desenvolvimento, sendo afetada tanto pelo consumo insuficiente de alimentos quanto por períodos prolongados de infecções, ambos fatores muito presentes em regiões pobres.

Já em um trabalho desenvolvido por Ferreira, *et al.*, cujo objetivo era investigar a prevalência e a associação entre a baixa estatura, sobrepeso, obesidade abdominal e o desenvolvimento de hipertensão arterial em 223 mulheres de baixa renda, entre 18 e 65 anos, o que se observou foi que a baixa estatura foi um importante fator de risco para hipertensão arterial. Nessa população adulta, a obesidade foi mais prevalente do que a desnutrição uma vez

que, apesar das condições de vida de extrema miséria e péssimas condições sanitárias, estava ocorrendo um processo de transição nutricional (Ferreira, et al., 2005).

Foi realizado um estudo que acompanhou durante 22 meses dois grupos de meninas, de 7 a 11 anos, em comunidades carentes em São Paulo, comparando aquelas que possuíam baixa estatura leve em relação à idade (mas peso compatível com a altura) com meninas com peso e altura normais (controles). Entre os achados do estudo, observou-se uma associação significativa entre a ingestão de energia e o aumento de peso em relação à altura nas meninas com baixa estatura leve, mas não nos controles (embora a diferença não tenha sido significativa entre os grupos) (Sawaya, et al., 1998). Em virtude dos achados, levantou-se a hipótese de que possa haver associação entre baixa estatura decorrente de desnutrição na infância e o aumento da susceptibilidade ao ganho de gordura corporal ao ingerir uma dieta rica em gordura. Em outros trabalhos do grupo foi constatado que as crianças moradoras de comunidades carentes atendidas possuíam altos níveis de pressão diastólica, tendo um risco aumentado de hipertensão e cardiopatia na vida adulta (Sawaya, 2006). Segundo Sawaya, o consumo de energia insuficiente durante o crescimento leva a um quadro de estresse no organismo que ocasiona um aumento de cortisol e diminuição da ação anabólica de síntese de tecidos dependentes de insulina, levando à diminuição do fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-1), hormônio responsável pelo crescimento. Com a razão cortisol: insulina alta e IGF-1 baixo, há diminuição do ganho de massa muscular e crescimento e aumento da razão cintura/quadril em detrimento da diminuição da oxidação de gordura corporal. Assim, haveria uma maior chance de que crianças malnutridas acumulem mais gordura corporal ao consumir dietas modernas, ricas em gorduras, e sejam sedentárias (Sawaya, et al., 1998; Sawaya, 2006).

Esses estudos indicam algumas tendências, como associação entre populações com baixa renda, presença de desnutrição e/ou infecções e/ou parasitoses e/ou anemias durante o desenvolvimento, transição nutricional, e a ocorrência de hipertensão e sobrepeso/obesidade. Todas essas observações corroboram a hipótese de programação fetal (hipótese de Barker) de que agravos nutricionais ocorridos durante um período crítico do crescimento e desenvolvimento induzem mecanismos adaptativos no organismo que aumentam o risco de indivíduos desenvolverem doenças quando adultos (Barker, 1994). A transição nutricional é caracterizada por alteração na estrutura da dieta e padrões de atividade física. A transição epidemiológica é caracterizada pela presença simultânea de doenças ocasionadas pela falta de acesso a serviços básicos de saneamento e saúde (doenças parasitárias, por exemplo) e doenças frequentes em populações das grandes metrópoles, como hipertensão e obesidade. Muitas vezes a transição epidemiológica está intimamente ligada à transição nutricional (Popkin, 2001).



Esses cenários nos levaram a formular a hipótese de que a alta prevalência de hipertensão nos remanescentes de quilombos, além de influenciada por fatores de susceptibilidade genética, possa também ter sido influenciada por um passado de desnutrição e doenças parasitárias que poderiam levar a mecanismos adaptativos mediados por modificações epigenéticas.

### **1.2.6. Técnicas de investigação da metilação do DNA**

A técnica de avaliação da metilação de DNA aceita como padrão-ouro é o método de sequenciamento após tratamento com bissulfito (Figura 5). Este método consiste no tratamento do DNA com bissulfito de sódio de forma a converter as citosinas não metiladas do genoma em uracilas por meio de desaminação, seguida da substituição dessas uracilas por timinas em ciclos subsequentes de amplificação por PCR e posterior sequenciamento. As citosinas metiladas são resistentes a este tratamento e permanecem inalteradas. Assim, pode-se determinar o nível de metilação dos sítios pelo sequenciamento (Patterson, et al., 2011). É frequente nessa metodologia a clonagem prévia dos amplicons seguida do sequenciamento de vários clones a fim de se obterem estimativas da frequência da metilação para cada sítio estudado. Essas técnicas permitem a avaliação de lócus específicos assim como estudos de cobertura genômica ampla.

Entre as estratégias experimentais para avaliação global da metilação estão as que utilizam *arrays* (microarranjos) de metilação, como o *MethylationEPIC (EPIC) BeadChip*. Essa técnica se inicia com o tratamento de DNA genômico total com bissulfito seguido da hibridização desse DNA com sondas imobilizadas no *array*, projetadas para interrogar sítios CpG individuais em amostras de DNA e avaliar o nível de metilação. Essa tecnologia se baseia em dois tipos de ensaios, o Infinium I e II. O Infinium I utiliza duas sondas por lócus CpG interrogado, uma que interage apenas com sítio metilado e outra com sítio não metilado. Já o Infinium II conta com apenas com um tipo de sonda por lócus, sendo capaz de reconhecer tanto sítios metilados quanto não metilados e distingui-los. Entre as regiões de cobertura desses microarranjos genômicos estão as regiões promotoras de genes, que incluem as regiões 5' não traduzidas (5'UTR) com sítios de início de transcrição (TSS) e primeiros exons dos genes (*IstExon*), assim como regiões do "corpo" (*body*) dos genes e regiões 3' não traduzidas (3'UTR); adicionalmente, existem sondas para avaliar o padrão de metilação em sequências intergênicas (IGR).

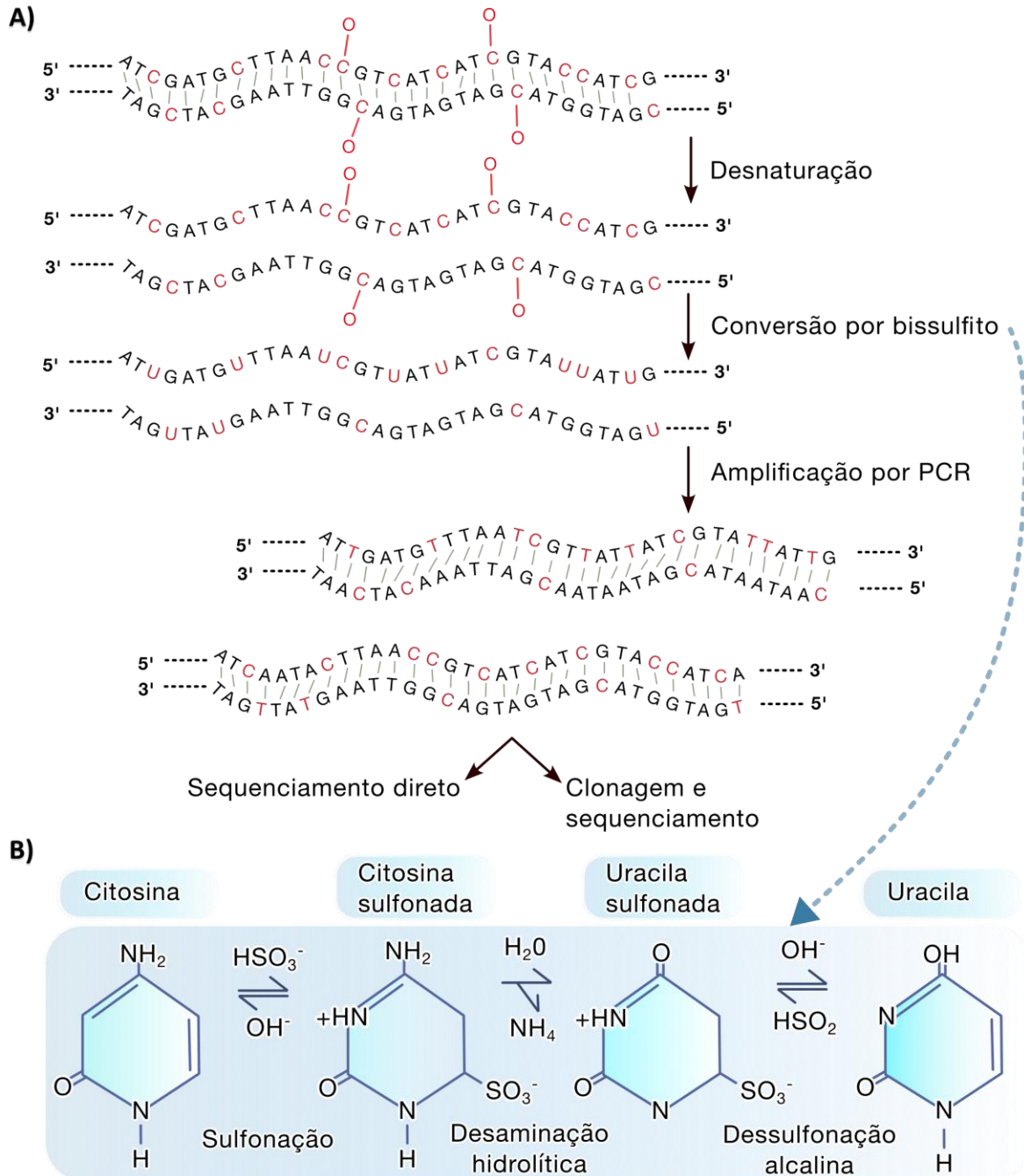


Figura 5: a) Esquema representando as etapas para análise da metilação de DNA após tratamento com bissulfito: a análise da metilação do DNA inclui quatro estágios principais, conforme mostrado; desnaturação, conversão por bissulfito, amplificação por PCR e análise por sequenciamento. Em (b), as modificações na molécula de citosina que ocorrem durante a conversão de bissulfito são representadas. Figura adaptada de Patterson, *et al.*, (2011).

### 1.2.7. Hipertensão: aspectos genéticos e epigenéticos

A busca pelos fatores hereditários que acarretam uma doença multifatorial como a hipertensão tem incluído a busca por variantes genéticas de duas classes gerais: variantes de

impacto elevado, que ocasionam formas monogênicas da condição, e variantes de impacto moderado ou leve, que aumentam a susceptibilidade.

Em geral, as variantes que ocasionam as formas monogênicas são raras na população, mas possuem grande efeito quando herdadas, como, por exemplo, as que estão relacionadas as síndromes de Liddle (OMIM 177200 e 618114) e hipercalemia-hipertensão de Gordon (OMIM 145260), nas quais uma única variante nos genes *SCNN1B* ou *SCNN1G* (para Liddle tipo 1 ou 2, respectivamente) ou nos genes *PHA2A*, *WNK4*, *WNK1*, *KLH3* ou *CUL3*, (para Gordon tipos IIA, IIB, IIC, IID e IIE, respectivamente) são suficientes para desencadear o fenótipo (Carey, et al., 2018). A identificação dessas variantes comumente foi feita em famílias com muitos indivíduos afetados por meio do estudo de ligação (GWLS, *Genome-wide linkage studies*), seguido de sequenciamento de genes candidatos. As variantes raras que ocasionam formas monogênicas de HA explicam apenas uma pequena parcela dos casos de HA.

As variantes de susceptibilidade, por outro lado, costumam ser frequentes na população, mas exibem pequenos efeitos que influenciam a PA. Na sua busca, são frequentes os estudos de associação, que requerem grandes números de indivíduos acometidos, genotipados em relação a polimorfismos genéticos em genes candidatos já conhecidos, ou então genotipados em relação a milhares de polimorfismos distribuídos por todo o genoma, caracterizando os chamados GWAS (*Genome-wide association studies*, estudos de associação genômica em larga escala). Esses estudos contribuíram significativamente para a descoberta de novos genes relacionados à pressão arterial. A busca por ambos os tipos de variantes relacionadas ao controle da PA tem sido realizada pelo nosso grupo de pesquisa, em algumas das comunidades remanescentes quilombolas do Vale do Ribeira: no estudo conduzido pela Dra. Lilian Kimura (Kimura, et al., 2012), por exemplo, foi feita a investigação da associação de variantes nos genes *ACE*, *AGT*, *ADD2*, *NOS3*, *GNB3* e *GRK4* e a PA. Nesse estudo foi observada associação significativa considerando o efeito combinado de duas variantes localizadas no gene *GNB3* e os níveis de PAD ( $P=0,040$ ), bem como a associação significativa da interação *NOS3-GRK4* em relação aos níveis de PAD, observada apenas no estudo caso-controle ( $P=0,004$ ), sugerindo potenciais sinais de associação multilocus. Além disso, há um estudo em andamento conduzido por Borges (2022) que visa mapear por meio estudos de ligação (GWLS) regiões cromossômicas candidatas a conter variantes raras que expliquem a PA elevada nessas populações específicas.

Cerca de 300 loci já foram identificados como associados à regulação da pressão arterial por meio de estudos de associação (GWAS Catalog, MacArthur, et al., 2017).

Individualmente essas variantes genéticas explicam menos de 0,1% da variação do fenótipo da PA e, em conjunto, menos de 3,5% da variância total da PA (Ehret, et al., 2016; Surendran, et al., 2016). As estimativas de herdabilidade total da HA inferidas a partir de estudos populacionais estão em torno de 30% a 50% (Carey, et al., 2018; Padmanabhan & Dominiczak, 2021) e, nas comunidades remanescentes quilombolas estudadas por nosso grupo, a herdabilidade estimada foi de 36,10% para PAS e 42,92% para PAD (Kimura, 2010). Assim, quando comparamos a herdabilidade total da HA inferida a partir de estudos populacionais e comparamos com o quanto da herdabilidade da HA é explicada por essas variantes (aproximadamente 27%; Padmanabhan & Dominiczak, 2021), percebemos que parte dessa herdabilidade não é explicada. Há que se considerar a possibilidade de que outros fatores também atuem para explicar essa “herdabilidade perdida”, como os fatores epigenéticos (Manolio, et al., 2009; Han, et al., 2016; Carey, et al., 2018).

A seguir, há um esquema apresentado por Carey *et al.* que leva em consideração determinantes genéticos, epigenéticos, sociais e ambientais da pressão arterial na origem da hipertensão primária (Figura 6) (revisão em Carey, *et al.*, 2018).

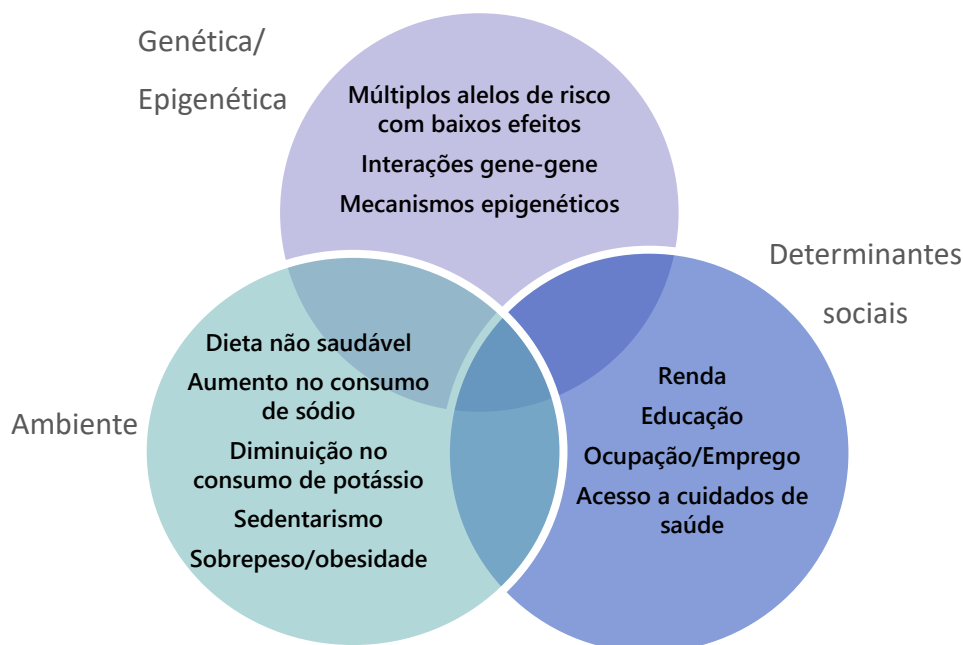


Figura 6: Representação esquemática dos principais determinantes da pressão arterial na hipertensão primária e suas interações em adultos. Adaptado de Carey, *et al.*, (2018).

Alguns trabalhos visaram avaliar do ponto de vista da metilação genes previamente associados à hipertensão por meio estudos de associação amplos do genoma (GWAS) ou genes

já fisiologicamente relacionados a essa doença complexa, como os que atuam nas principais vias de regulação da pressão arterial.

Em um estudo de GWAS conduzido por Kato *et al.* com indivíduos de ascendência europeia, leste e sul asiáticas, foram identificados 12 novos locos associados à pressão arterial, nos quais estão contidos genes relacionados à função do musculo liso vascular (*IGFBP3*, *KCNK3*, *PDE3A* e *PRDM6*) e função renal (*ARHGAP24*, *OSR1*, *SLC22A7* e *TBX2*). Conseguiram demonstrar que alguns SNPs que influenciam na pressão arterial estão associados com a metilação diferencial de múltiplos sítios CpGs próximos, indicando que a metilação de DNA pode estar envolvida na via regulatória que integra a variação genética à alteração na pressão arterial. Em adição, os efeitos da variação genética na metilação também puderam ser confirmados em recém-nascidos, em material de cordão umbilical, isto é, em indivíduos com menor histórico de exposições ambientais adversas (Kato, et al., 2015).

A hipermetilação do promotor de gene *ACE*, que codifica a enzima conversora de angiotensina, também já foi relacionada com a repressão transcricional em diferentes modelos *in vitro* (fígado, cólon, endotélio microvascular e pulmão) e em ratos (pulmões e fígado) (Rivière, et al., 2011). Além disso, no estudo de caso-controle com 96 indivíduos hipertensos e 96 controles, Fan *et al.* identificaram associação da metilação em dois sítios CpGs no promotor do gene *ACE2* (enzima conversora de angiotensina 2) com hipertensão essencial ( $P < 0,05$ ) (Fan, et al., 2017).

Em um estudo conduzido por Wang *et al.* observou-se a alteração na expressão do gene *AGT* em três condições distintas por meio de alterações epigenéticas: a estimulação por interleucina 6 (*IL6*) ocasionou desmetilação do DNA em torno do sítio promotor do *AGT*, levando ao aumento da sua acessibilidade em cultura de células humanas H295R. Da mesma forma, verificou-se que o excesso de aldosterona circulante foi associado com a hipometilação do DNA em torno do sítio de ligação de um fator de transcrição e aumento da expressão de *AGT* em um modelo de tecido adiposo visceral humano. Por fim, também foi visto que a alta ingestão de sal promoveu aumento da expressão de *AGT*, hipometilação do DNA em região próxima ao sítio de início da transcrição e redução da atividade de metilação de DNA em tecido adiposo visceral de rato (Wang, et al., 2014).

Outro trabalho teve como objetivo investigar se a metilação no promotor de *AGTRI* (receptor tipo I de angiotensina II) poderia contribuir com o risco de desenvolver hipertensão essencial. O nível de metilação de um dentre os cinco sítios CpGs testados após pirosequenciamento de bissulfito foi significativamente menor nos casos do que nos controles

( $6,74 \pm 4,32\%$  vs.  $9,66 \pm 5,45\%$ ,  $p = 0,007$ ) indicando que a hipometilação em *AGTRI* pode estar associada à hipertensão essencial (Fan, et al., 2015).

Em um estudo conduzido por Krause *et al.* foi determinado o estado de metilação nos promotores dos genes *NOS3*, que codifica a sintase de óxido nítrico e *ARG2* (que codifica arginase 2) em células endoteliais humanas isoladas de artéria umbilicais de crianças com peso reduzido ao nascimento (crescimento intrauterino restrito) e controles. Observou-se que a metilação do promotor de *NOS3* na região do elemento de resposta à hipóxia (HRE, -5369 a -5375) aumentou, enquanto a metilação no promotor do gene *ARG2* diminuiu no grupo com peso reduzido ao nascimento. Sabe-se que o aumento da expressão de arginase 1 suprime a atividade da oxido nítrico sintase. Esses achados indicam que pode haver disfunção endotelial vascular devida à alteração na regulação dos genes *NOS3* e *ARG2* em crianças com crescimento intrauterino reduzido, ocasionados por mecanismos epigenéticos (Krause, et al., 2013). Esses dados também são condizentes com estudos epidemiológicos que demonstram associação entre baixo peso ao nascimento e maior risco para desenvolvimento de hipertensão (Barker & Osmond, 1986; Barker, et al., 1993).

Mao *et al.* em um estudo comparando indivíduos com hipertensão essencial e controles, constataram que a hipermetilação do corpo do gene *SCNNIA* (subunidades alfa do canal de sódio epitelial, ENaC) estava associada com o risco para desenvolvimento da doença e que o nível de metilação nessa região poderia sofrer modificações por fatores como idade, gênero e utilização de anti-hipertensivos (Mao, et al., 2016).

Zhong *et al.* compararam indivíduos hipertensos e normotensos em relação a 6 sítios CpGs na região promotora do gene *SCNNIB*, que codifica subunidades beta do canal de sódio epitelial, relacionado com a homeostase da pressão arterial. Em dois dos seis houve diferenças significativas no nível de metilação entre casos e controles. Constataram também que essa metilação era afetada pela idade, gênero e uso de anti-hipertensivos (Zhong, et al., 2016).

Além disso, alterações do nível de metilação dos genes *ATIAR*, *AT1B*, *ECE-1C*, *ADD1*, *11 $\beta$ -HSD-2*, *NKCC1*, *NET*, *FABP3* e *GCK* já foram associadas à predisposição a hipertensão, seja pela diminuição ou aumento de expressão destes genes, achado que tem sentido fisiológico uma vez que todos esses genes atuam em vias de regulação da pressão arterial (revisões em Han, et al., 2016 e Markel & Redina, 2018).

Há também estudos de associação amplos do epigenoma, os EWAS (*epigenome-wide association study*). Nesse tipo de estudo busca-se por marcas epigenéticas quantificáveis (metilação de DNA) em todo o genoma em diferentes indivíduos. Um estudo de associação amplo do epigenoma de cerca de 600 afro-americanos adultos por meio do ensaio com o

Illumina HumanMethylation450K Bead Chip apontou associação entre o aumento da metilação no gene *ABCG1* com o desenvolvimento de síndrome metabólica. A síndrome metabólica é constituída pela associação de três doenças: diabetes, dislipidemia e elevação da pressão arterial. O gene *ABCG1* codifica uma proteína da família dos “*ATP-binding cassette transporters (ABC transporters)*” e está relacionado com a sinalização intra e extracelular e no transporte lipídico (Akinyemiju, et al., 2018).

Já o estudo de meta-análise conduzido por Richard *et al.*, contando com 17.010 indivíduos de ascendência europeia, afro-americana e hispânica, apontou para a associação de metilação de DNA em 13 sítios CpGs (8 em regiões intragênicas e 3 em intergênicas) com alterações na pressão arterial (Richard, et al., 2017). Em alguns dos sítios encontrados já havia associações genéticas moderadas previamente detectadas de alguns SNPs com a pressão arterial. Entretanto, esses sítios não haviam sido destacados como principais lócus relatados anteriormente para hipertensão por estudos de associação (GWAS), para qualquer ancestralidade. Esses sítios explicaram um adicional de 1,4% na variação interindividual na pressão arterial sistólica e 2,0% na diastólica dos indivíduos estudados, além de serem hereditários no que diz respeito à situação da sua metilação ( $h^2 > 30\%$ ), o que condiz com a hipótese de transmissão transgeracional de padrão de metilação. Os dois sítios CpGs com efeitos mais notáveis estão no lócus *PHGDH*, cg14476101 e no lócus *SLC7A11*, cg06690548 (Richard, et al., 2017). O gene *PHGDH* codifica a enzima fosfoglicerato desidrogenase envolvida na biossíntese de serina, havendo sugestões de que possa desempenhar papel na homeostase lipídica em tecidos normais (Kang, et al., 2020) e o gene *SLC7A11* codifica o transportador de membrana cisteína/glutamato que auxilia na proteção contra estresse oxidativo e morte celular ferroptótica (Lewerenz, et al., 2013). Por meio da técnica de randomização Mendeliana foi observado que a metilação no sítio cg08035323 (*TAF1B-YWHAQ*) influencia a pressão arterial, enquanto a pressão arterial tem influência sobre a metilação nos sítios cg00533891 (*ZMIZ1*), cg00574958 (*CPT1A*) e cg02711608 (*SLC1A5*) (Richard, et al., 2017). A randomização Mendeliana é um método que utiliza variantes genéticas como variáveis instrumentais de modo a fornecer evidências confiáveis sobre os efeitos de fatores de risco modificáveis em doenças, sendo que variáveis instrumentais são variáveis que estão associadas ao fator de risco de interesse, não se relacionam aos fatores de confusão e afetam o resultado apenas por meio do fator de risco (Davies, et al., 2018). Por outro lado, em análises de expressão gênica, seis genes foram identificados com evidências de associações triangulares entre metilação, expressão gênica e alteração na pressão: *TSPAN2*, *SLC7A11*, *UNC93B1*, *CPT1A*, *PTMS* e *LPCAT3*. Já na integração entre análises de randomização Mendeliana e de expressão

gênica foi proposto que a diminuição dos níveis de metilação no sítio cg23999170 ocasionam aumento da expressão do gene *TSPAN2* que, por sua vez, ocasiona aumento na pressão arterial diastólica (Richard, et al., 2017). *TSPAN2* é altamente expresso em tecidos vasculares, com papel importante para a contratilidade e diferenciação de células do músculo liso vascular (Zhao, et al., 2017).

Por meio de EWAS e análise de regiões diferencialmente metiladas (DMR) em amostras de sangue de cerca de 700 homens (364 europeus e 348 do sul da Ásia, migrantes para o Reino Unido), o estudo conduzido por Kazmi *et al.* investigou a associação entre pressão arterial diastólica, sistólica e hipertensão e a metilação do DNA. Encontrou-se associação entre um sítio CpG (cg07598370, próximo a *OR5AP2*) e pressão arterial diastólica na análise considerando ambos os grupos combinados, europeus e asiáticos, e três sítios CpGs associados à pressão arterial diastólica na análise considerando apenas europeus (cg04751533, no gene *AFAP*, cg00006122 próximo a *C12orf44* e cg16241714 em *CEBPD*). Esses achados podem ser um indício de que os padrões de metilação do DNA de sangue periférico entre europeus e asiáticos podem diferir em relação ao seu papel na definição da pressão arterial. O estudo sugere que isso possa acontecer devido à exposição a conjuntos de fatores de risco distintos para cada grupo ou que mecanismos distintos podem contribuir para a patogênese da hipertensão. Além desses sítios, foram identificadas DMRs para pressão arterial diastólica e sistólica, com efeitos conhecidos como infarto do miocárdio, cardiomiopatia dilatada e acidente vascular cerebral. Uma DMR associada à pressão arterial diastólica em *PRDM16* foi encontrada em comum entre os grupos europeus e asiáticos e três DMRs relacionadas à pressão arterial sistólica em *WRN*, *PTPRN2* e *CACNA1A* foram observadas em comum para europeus e asiáticos (Kazmi, et al., 2020).

### 1.3. ESTUDO DE POPULAÇÕES SEMI-ISOLADAS DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS

Localizado no sul do estado de São Paulo e no leste do estado do Paraná, o Vale do Ribeira é uma região composta por 31 municípios (9 paranaenses e 22 paulistas), cujos territórios apresentam alto nível de preservação de suas matas, além de grande diversidade ecológica. Concentra cerca de 21% dos remanescentes de Mata Atlântica do país, além de incluir a Bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape e o Complexo Estuarino Lagunar de Iguape-Cananéia-Paranaguá (Instituto Socioambiental, 2013).

A ocupação desse território tem origem no período pré-colombiano, sendo uma região de passagem para os ameríndios que, durante o inverno, deslocavam-se do planalto em direção



ao litoral para pesca (de Oliveira Junior, et al., 1998). Já no século XVI, com a chegada dos portugueses, começou-se a explorar economicamente a região e, com as bandeiras de mineração (expedições rumo ao interior), estabeleceram-se os primeiros povoados na região. Iporanga, em 1576, foi uma das primeiras cidades fundadas na região e, no século XVII, por conta da atividade de mineração, surgiu a cidade de Xiririca, atual Eldorado (Instituto Socioambiental, 2013; de Oliveira Junior, et al., 1998). Inicialmente essa exploração contou com mão de obra nativa. No entanto, sabe-se que houve resistência por parte dos nativos americanos, que não se sujeitavam a serem tratados como mão de obra escrava e se refugiavam em zonas do Vale (de Oliveira Junior, et al., 1998).

Muitos africanos foram trazidos para o Brasil durante o século XVII, e, no Vale do Ribeira, operaram como mão de obra escravizada ligada à mineração, primeira atividade econômica do Vale (Instituto Socioambiental, 2013; de Oliveira Junior, et al., 1998). Assim como os nativos, muitos negros fugidos se refugiavam em áreas da mata de difícil acesso aos colonizadores, formando pequenos grupos. Com o declínio da mineração de ouro na região e das lavouras de arroz, os ex-escravizados se fixaram em terras abandonadas pelos fazendeiros gerando comunidades negras na região que permanecem até o presente (Instituto Socioambiental, 2013). Logo, o histórico de ocupação do Vale do Ribeira promoveu a formação de populações tradicionais na região, como caiçaras, indígenas, agricultores familiares e quilombolas, bem como está ligada à construção social e cultural dessas populações (de Oliveira Junior, et al., 1998).

Atualmente, o Vale do Ribeira é a região que abriga o maior número de remanescentes de quilombos do estado de São Paulo. Segundo dados fornecidos pelo ITESP (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo), há 36 comunidades reconhecidas em todo o estado, das quais 29 estão distribuídas entre os municípios de Eldorado, Iporanga, Itaoca, Iguape, Barra do Turvo, Jacupiranga, Cananéia, Registro e Miracatu, localizados no Vale do Ribeira.

O conceito mais utilizado para definir “Remanescentes de Quilombos” no presente é o da Associação Brasileira de Antropologia (ABA): *“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”* (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP), 2000). Esse termo é uma atualização da noção histórica de “Quilombos” – *“Comunidades formadas pelos negros escravos, que fugiram do trabalho forçado e resistiram à captura por parte das forças escravocratas”* (Carvalho, et al., 1996) – que se tornou obsoleta em caracterizar as comunidades atuais, visto que o conceito não leva em consideração os aspectos socioculturais presentes nessas populações. Assim, desde que foi instituído pela

Constituição de 1988, o termo “Remanescente de Quilombo”, passou a ser empregado para “designar um legado, uma herança cultural e material que lhes confere uma referência presencial no sentimento de ser e pertencer a um lugar e a um grupo específico” (O’Dwyer, 2008). São comunidades que “desenvolveram práticas cotidianas de resistência na manutenção e reprodução de seus modos de vida característicos e na consolidação de um território próprio (...) no qual a ocupação da terra não é feita em termos de lotes individuais, predominando seu uso comum” (O’Dwyer, 2008).

Ao longo de cerca de vinte anos nosso grupo de pesquisa vem estudando algumas das comunidades de remanescentes de quilombos presentes no Vale do Ribeira (mais precisamente 12 delas) concentradas nos municípios de Iporanga, Barra do Turvo, Eldorado e Jacupiranga. As comunidades e os números totais de habitantes de cada uma delas com base em dados obtidos pelo nosso grupo, pelo grupo do Prof. Dr. Rui Murrieta do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP (IB/USP), por relatórios técnico-científicos do ITESP ([www.itesp.sp.gov.br](http://www.itesp.sp.gov.br)) e por comunicação pessoal são: Abobral (400), Galvão (110), São Pedro (130), Pilões (130), Maria Rosa (55), Pedro Cubas (260), André Lopes (290), Nhungara (440), Sapatu (290), Ivaporunduva (290), Poça (220) e Reginaldo (250) (Figura 7).

Essas comunidades tradicionalmente possuem um modo de vida rural, onde está presente a agricultura de subsistência, a caça e a pesca. No entanto, esse modo de vida vem sofrendo modificações recentes devido a vários fatores: houve um aumento no acesso por parte dessas populações a alimentos industrializados – que, em geral, são processados e com alto valor calórico – em detrimento da constante substituição da alimentação tradicional. A região do Vale do Ribeira, muito caracterizada por áreas de proteção ambiental, passa por recentes limitações de caça e pesca que também contribuem para essas mudanças nos costumes alimentares, de modo que, esses estão mais próximos aos hábitos alimentares de populações urbanas de baixa renda (Mingroni-Netto, et al., 2009).

As comunidades de remanescentes de quilombo não são totalmente isoladas, de modo que mantiveram algumas relações sociais e econômicas com os pequenos núcleos urbanos regionais, grandes proprietários rurais e autoridades locais (Instituto Socioambiental, 2013). Observa-se, por outro lado, algum distanciamento social, com casamentos ocorrendo entre indivíduos da mesma comunidade ou comunidades remanescentes próximas. A estimativa do coeficiente de endocruzamento ou de endogamia (*inbreeding*, F) para essas comunidades foi de  $F=0,0025$  e frequência de casamentos consanguíneos observada foi de 4,6% (Lemes, et al., 2014). Assim, pode-se considerar que estas populações sejam semi-isoladas.

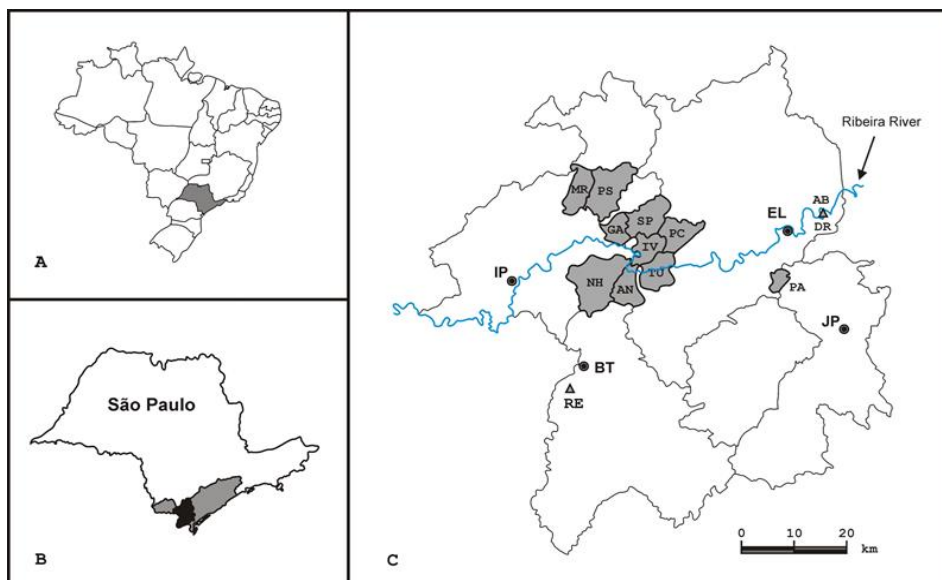


Figura 7: Localização das doze comunidades de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira estudadas, localizadas nos municípios de Iporanga (IP), Barra do Turvo (BT), Eldorado (EL) e Jacupiranga (JP). A: visão do mapa do Brasil com o estado de São Paulo destacado. B: visão do estado de São Paulo com o Vale do Ribeira destacado em cinza claro e os municípios onde as 12 comunidades estão localizadas em cinza escuro. C: visão dos municípios de Iporanga, Barra do Turvo, Eldorado e Jacupiranga com a localização das 12 comunidades de remanescentes de quilombos estudadas destacadas. AB: Abobral, GA: Galvão, SP: São Pedro, PS: Pilões, MR: Maria Rosa, PC: Pedro Cubas, AN: André Lopes, NH: Nhungara, TU: Sapatu, IV: Ivaporunduva, PA: Poça e RE: Reginaldo. (Figura elaborada por Renan Lemes).

Diversas pesquisas foram realizadas pelo Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (LGH-IB/USP) sobre essas comunidades, seguindo duas linhas de estudos principais: genética populacional e genética de doenças. Sobre genética populacional, foram realizados estudos de ancestralidade (Cotrim., et al., 2004; Kimura, et al., 2016), endocruzamento (Lemes, et al., 2014; Lemes, et al., 2018), demografia e seleção natural (Nunes, et al., 2016a; Nunes, et al., 2016b), enquanto que sobre doenças Mendelianas e multifatoriais, temas como o gene *FMR-1* relacionado à síndrome do X frágil (Angeli, et al., 2005), anemia falciforme (Auricchio, et al., 2007), obesidade (Angeli, et al., 2011) e hipertensão (Kimura, et al., 2012; Pereira, et al., 2014) foram abordados.

As populações de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira constituem um modelo interessante para o estudo das doenças complexas, como a hipertensão, devido a algumas características peculiares: (1) são populações afrodescendentes com uma prevalência elevada de hipertensão essencial, estimada em cerca de 40% (Kimura, et al., 2012). Diversos estudos indicaram a maior prevalência de hipertensão arterial em populações afrodescendentes em relação a outras populações, de modo que se passou a especular a existência de mecanismos de predisposição genética relacionados com seu desenvolvimento (Caulfield, et al., 1995; Cooper, et al., 1997; Swift & Macgregor, 2004; Malachias, et al., 2016) (2) foram

caracterizadas tanto clinicamente quanto genealogicamente, de modo que possuímos genealogias extensas, com informação de diversos indivíduos afetados e não afetados em duas ou mais gerações, viabilizando os estudos genéticos; (3) são populações semi-isoladas de indivíduos com ancestralidade similar — em parte por efeito fundador — e sujeitas a maior similaridade ambiental quando comparadas às populações de grandes cidades, o que as tornam um modelo menos influenciado por fatores de confusão, o que, portanto, aumenta o poder estatístico dos estudos.

## **II. JUSTIFICATIVA**

---

Tendo em vista a importância do estudo da hipertensão essencial, tanto do ponto de vista científico quanto social, e a disponibilidade de amostras bem caracterizadas clinicamente e geneticamente, tivemos como objetivo realizar um estudo sobre um dos mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA, e sua relação com a ocorrência da hipertensão em populações de remanescentes de quilombos. Esperamos que, com uma maior compreensão da regulação epigenética dos mecanismos de desenvolvimento da hipertensão, possamos contribuir para a identificação de novas moléculas alvo, que no futuro podem levar a novas descobertas para o tratamento dessa doença.

### III. OBJETIVOS

---

O objetivo deste projeto foi investigar a correlação entre o padrão de metilação de DNA em sangue periférico com a ocorrência da hipertensão arterial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira, em São Paulo. A hipótese é a de que fatores ambientais peculiares aos quais os quilombolas estão expostos levam a alterações epigenéticas, como a metilação de DNA, com potencial de modular a expressão de genes relacionados à pressão sanguínea. Os objetivos específicos são:

a. Identificar posições e regiões CpG diferencialmente metiladas entre indivíduos hipertensos e normotensos.

b. Realizar análises *in silico* dos genes associados a posições e regiões diferencialmente metiladas, para identificação de vias biológicas que possam explicar a susceptibilidade elevada à hipertensão.

c. Utilizar os resultados dessa avaliação preliminar para gerar hipóteses sobre a relação da metilação desses sítios com fatores ambientais pregressos e com a fisiologia da hipertensão, potencialmente testáveis com posterior extensão do estudo de metilação de regiões selecionadas a todas as amostras dos remanescentes de quilombos coletadas no LGH-IB/USP (cerca de 700), em pesquisas futuras do grupo.

## VIII. CONCLUSÕES

---

- Por meio da análise de dados de metilação gerados a partir do uso da plataforma de *array* de metilação EPIC BeadChip em amostras de sangue periférico, conseguimos identificar diferenças estatisticamente significativas no padrão de metilação ao comparar indivíduos hipertensos e normotensos pertencentes a comunidades remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira, em São Paulo. Identificamos tanto posições/sondas diferencialmente metiladas entre hipertensos e normotensos (DMPs: *Differentially Methylated Positions*) quanto segmentos extensos do genoma que mostraram alteração quantitativa nos níveis de metilação do DNA entre os grupos (DMRs: *Differentially Methylated Regions*).
- Após avaliação preliminar dos genes contidos em DMPs e DMRs levando em conta sua conexão com a fisiologia da hipertensão, dados da literatura e análise de vias biológicas associadas e enriquecimento funcional, destacamos os genes de interesse, com relação plausível entre o nível de metilação e a regulação da pressão arterial.
- Entre os sítios CpGs diferencialmente metilados (DMPs) encontrados destacaram-se os localizados nos genes *DRD2* (cg03691958), *SLC9A3* (cg25861340), *SLC24A4* (cg20636399), *CA4* (cg18743730), *KLHL29* (cg20860188), *BMP7* (cg11574151 e cg15851418) e *NTM* (cg01803766).
- Entre as regiões diferencialmente metiladas (DMRs), evidenciamos as associadas aos genes *ABAT*, *THBS1*, *PON3*, *CERS3*, *NUDT12*, *HLA-DQB2*, *KCNH2*, *GABBR1*, *MIR539*, *MIR487B* e *IL5RA*.
- Obtivemos resultados que sugerem a relevância da extensão do estudo de metilação de regiões selecionadas a mais as amostras dos remanescentes de quilombos coletadas no LGH-IB/USP (cerca de 700), em pesquisas futuras do grupo, além de estudos de expressão de RNA dos genes aqui identificados como relevantes.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Akinyemiju, T. et al., 2018. Epigenome-wide association study of metabolic syndrome in African-American adults. *Epigenetics*, Volume 10.
- Allis, C. D. & Jenuwein, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, Volume 17, p. 487–500.
- Angeli, C. B. et al., 2005. AGG interspersion patterns in the CGG repeat of the FMR1 gene and linked DXS548/FRAXAC1 haplotypes in Brazilian populations. *American Journal of Medical Genetics*, pp. 210-214.
- Angeli, C. B. et al., 2011. Multilocus analyses of seven candidate genes suggest interacting pathways for obesity-related traits in Brazilian populations. *Obesity (Silver Spring)*, pp. 1244-1251.
- Auricchio, M. T. B. d. M., Vicente, J. P., Meyer, D. & Mingroni-Netto, 2007. Frequency and Origins of Hemoglobin S Mutation in African-Derived Brazilian Populations. *Human Biology*, Volume 79, pp. 667-677.
- Bader, M. & Ganten, D., 2008. Update on tissue renin–angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine* volume, Volume 86, pp. 615-621.
- Barker, D. J. et al., 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, Volume 36, pp. 62-67.
- Barker, D. J. & Osmond, C., 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*, Volume 1, p. 1077–1081.
- Barker, D. J. P., 1994. *Mothers, babies, and disease in later life*. Londres: British Medical Journal Group.
- Barroso, W. K. S. et al., 2020. *Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020*, s.l.: s.n.
- Bezerra, V. M., Andrade, A. C. d. S., César, C. C. & Caiaffa, W. T., 2013. Comunidades quilombolas de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil: hipertensão arterial e fatores associados. *Cadernos de Saúde Pública*, 29(9), pp. 1889-1902.
- Blake, G. E. & Watson, E. D., 2016. Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Curr Opin Chem Biol*.
- Borges, V. M., 2022. *Investigação Genômica da Hipertensão Essencial em Populações Afro-Brasileiras*. s.l.:Tese em andamento (Doutorado em Ciências, na área de Biologia/Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Carey, R. M., 2010. Aldosterone and cardiovascular disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, Volume 17, pp. 194-198.
- Carey, R. . M., Muntner, P., Bosworth, H. B. & Whelton, P. K., 2018. Prevention and Control of Hypertension: JACC Health Promotion Series. *Journal of the American College of Cardiology*, pp. 1278-1293.



- Carvalho, J. J. d., Doria, S. Z. & Oliveira Jr., A. N. d., 1996. *O quilombo do Rio das Rãs : histórias, tradições, lutas*. Salvador: EDUFBA - Centro de Estudos Afro-Orientais.
- Caulfield, M. et al., 1995. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans.. *The Journal of clinical investigation*,.
- Clapier, C. R. & Cairns, B. R., 2009. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu Rev Biochem*, Volume 78, pp. 273-304.
- Connell, J. M. C. & Davies, E., 2005. The new biology of aldosterone. *The Journal of endocrinology*, Volume 186, pp. 1-20.
- Cooper, R. et al., 1997. The prevalence of hypertension in seven populations of west African origin. *Am J Public Health*.
- Cotrim,, N. H. et al., 2004. Polymorphic Alu Insertions in Six Brazilian African-Derived Populations. *American Journal of Human Biology* , Volume 16, pp. 264-277.
- Davies, N. M., Holmes, M. V. & Smith, G. D., 2018. Reading Mendelian randomisation studies: a guide, glossary, and checklist for clinicians. *BMJ*, Volume 362.
- de Oliveira Junior, A. N., Stucchi, D., Chagas, M. d. F. & Brasileiro, S. d. S., 1998. *Laudo Antropológico das Comunidades Negras de Ivaporunduva, São Pedro, Pedro Cubas, Sapatu Nhunguara, André Lopes, Maria Rosa e Pilões*, São Paulo: Instituto Socioambiental e Ministério Público Federal.
- Ehret, G. B., Ferreira, T., ... & Munroe, P. B., 2016. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. *Nat Genet*, pp. 1171-1184.
- Fan, R. et al., 2017. Preliminary analysis of the association between methylation of the ACE2 promoter and essential hypertension. *Molecular Medicine Reports*, Volume 15, pp. 3905-3911.
- Fan, R. et al., 2015. Association of AGTR1 promoter methylation levels with essential hypertension risk: a matched case-control study. *Cytogenetic and Genome Research*, Volume 147, pp. 95-102.
- Ferreira, H. d. S. et al., 2005. Hypertension, abdominal obesity and short stature: aspects of nutritional transition within a shantytown in the city of Maceió (Northeastern Brazil). *Revista de Nutrição*, 18(2), pp. 209-218.
- Florêncio, T. T., Ferreira, H. S., Cavalcante, J. C. & Sawaya, A. L., 2004. Short stature, obesity and arterial hypertension in a very low income population in North-eastern Brazil. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, Issue 14, pp. 26-33.
- Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP), 2000. *Negros do Ribeira: reconhecimento étnico e conquista do território*. 2 - (Cadernos do ITESP; 3) ed. São Paulo: Editora Gráfica.
- Funder, J. W., 2010. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors in the Cardiovascular System. *Progress in Cardiovascular Diseases*, Volume 52, pp. 393-400.
- Gardner, K. E., Allis, C. D. & Strahl, B. D., 2011. OPERating ON Chromatin, a Colorful Language where Context Matters. *Journal of Molecular Biology*, 409(1), pp. 36-46.

Han, L. et al., 2016. DNA methylation and hypertension: emerging evidence and challenges. *Briefings in Functional Genomics*, Volume 15, pp. 460-469.

Instituto Socioambiental , 2013. *Inventário cultural de quilombos do Vale do Ribeira*. São Paulo: Instituto Socioambiental (ISA).

ITESP, 2019. *Comunidades Remanescentes de Quilombos*. [Online]

Available at: [http://201.55.33.20/?page\\_id=3483](http://201.55.33.20/?page_id=3483)

[Acesso em Junho 2021].

John, S. & Schmierder, R. E., 2003. Potential Mechanisms of Impaired Endothelial Function in Arterial Hypertension and Hypercholesterolemia. *Current Hypertension Reports*, Volume 5, p. 199–207.

Jose, P. A., Soares-da-Silva, P., Eisner, G. M. & Robin, F. A., 2010. Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: Role in blood pressure regulation. Volume 1802, pp. 1259-1267.

Kang, Y. P. et al., 2020. PHGDH supports liver ceramide synthesis and sustains lipid homeostasis. *Cancer & Metabolism*, Volume 8.

Kato, N. et al., 2015. Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation. *Nat Genet*, Volume 47, p. 1282–1293.

Kazmi, N. et al., 2020. Associations between high blood pressure and DNA methylation. *PLoS ONE*, Volume 15.

Kim, M. & Costello, J., 2017. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & Molecular Medicine*, Volume 49, p. e322.

Kimura, L., 2010. *Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo*, s.l.: s.n.

Kimura, L. et al., 2012. Multilocus Family-Based Association Analysis of Seven Candidate Polymorphisms with Essential Hypertension in an African-Derived Semi-Isolated Brazilian Population. *International Journal of Hypertension*.

Kimura, L. et al., 2016. Inferring paternal history of rural African-derived Brazilian populations from Y chromosomes. *American Journal of Human Biology*.

Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. & Palladino, M. A., 2010. *Conceitos de Genética*. 9 ed. s.l.:Artmed.

Krause, B. J. et al., 2013. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics*, 8(9), pp. 944-952.

Lemes, R. B. et al., 2018. Inbreeding estimates in human populations: Applying new approaches to an admixed Brazilian isolate. *PLoS ONE*.

Lemes, R. B. et al., 2014. Estimation of inbreeding and substructure levels in African-derived Brazilian quilombo populations. *Human Biology*, pp. 276-288.

- Lewerenz, J. et al., 2013. The Cystine/Glutamate Antiporter System xc<sup>-</sup> in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. Volume 10, p. 522–555.
- Lister, R. et al., 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, Volume 462, p. 315–322.
- MacArthur, J. et al., 2017. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research*.
- Malachias, M. V. B. et al., 2016. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, Setembro.
- Manolio, T. A. et al., 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, pp. 747-753.
- Mao, S. et al., 2016. Hypermethylation of SCNN1A gene-body increases the risk of essential hypertension. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016(9), pp. 8047-8056.
- Mills, K. T. et al., 2016. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*.
- Mingroni-Netto, R. C. et al., 2009. Doenças Modernas nos Antigos Quilombos: A Obesidade e a Hipertensão no Vale do Ribeira-SP. Em: *Saúde nos Quilombos*. São Paulo: s.n.
- Ministério da Saúde, 2020. *Hipertensão (pressão alta)*. [Online]  
Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hipertensao-pressao-alta>  
[Acesso em 2020].
- Ngo, V. & Hein, L., 2021. Chapter 2 - Epigenetics concepts: An overview. Em: *In Translational Epigenetics, Epigenetics in Cardiovascular Disease*. s.l.:Academic Press, pp. 19-40.
- Northstone, K. et al., 2014. Prepubertal start of father's smoking and increased body fat in his sons: further characterisation of paternal transgenerational responses. *Eur J Hum Genet*.
- Nunes, K. et al., 2016b. Population variation of HLA genes in rural communities in Brazil, the. *Human Immunology*, Volume 77, pp. 447-448.
- Nunes, K. et al., 2016a. HLA imputation in an admixed population: An assessment of the 1000 Genomes data as a training set. *Human Immunology*.
- O'Dwyer, E. C., 2008. Terras de quilombos no Brasil: direitos territoriais em construção. *Ariús Revista de ciências Humanas e Artes*, 14(1/2), pp. 9-16.
- Oliveira, I. M., Duarte, Y. A. d. O. & Zanetta, D. M. T., 2019. Prevalence of Systemic Arterial Hypertension Diagnosed, Undiagnosed, and Uncontrolled in Elderly Population: SABE Study. *Journal of Aging Research*.
- Padmanabhan, S. & Dominiczak, A. F., 2021. Genomics of hypertension: the road. *Nature Reviews Cardiology*, Volume 18, p. 235–250.
- Painter, R. et al., 2008. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life.

- Paiva, S. G., 2017. *Fatores de risco para doenças cardiovasculares em quilombos contemporâneos do Brasil Central : parâmetros demográficos, socioeconômicos, ancestralidade genética e saúde*. Brasília(DF): Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB).
- Pal, S. & Tyler, J. K., 2016. Epigenetics and aging. *Science Advances*, 2(7, e1600584).
- Patterson, K., Molloy, L., Qu, W. & Clark, S., 2011. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, Volume 56.
- Pereira, T. C. (., 2017. *Introdução ao universo dos non-coding RNAs*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Pereira, T. V. et al., 2014. Multivariate meta-analysis of the association of G-protein beta 3 gene (GNB3) haplotypes with cardiovascular phenotypes. *Mol Biol Rep*.
- Pesquisa Nacional em Saúde, 2019. *Painel de Indicadores de Saúde – Pesquisa Nacional de Saúde*. [Online]  
Available at: <https://www.pns.icict.fiocruz.br/painel-de-indicadores-mobile-desktop/>  
[Acesso em Julho 2021].
- Popkin, B. M., 2001. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. *The Journal of Nutrition*, 131(3), pp. 871S-873S.
- Richard, M. A. et al., 2017. DNA Methylation Analysis Identifies Loci for Blood Pressure Regulation. *The American Journal of Human Genetics*, Volume 101, pp. 888-902.
- Rivière, G. et al., 2011. Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics*, Volume 6, pp. 478-489.
- Santos, D. M. S., Prado, B. S., Oliveira, C. C. d. C. & Almeida-Santos, M. A., 2019. Prevalência da Hipertensão Arterial Sistêmica em Comunidades Quilombolas do Estado de Sergipe, Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, Volume 113, pp. 383-390.
- Sawaya, A. L., 2006. Malnutrition: longterm consequences and nutritional recovery effects. *Estudos Avançados* .
- Sawaya, A. L. et al., 1998. Mild Stunting Is Associated with Higher Susceptibility to the Effects of High Fat Diets: Studies in a Shantytown Population in São Paulo, Brazil. *The Journal of Nutrition*, Volume 128, pp. 425S-420S.
- Shahoud, J. S., Sanvictores, T. & Aeddula, N. R., 2020. *Physiology, Arterial Pressure Regulation*. Treasure Island (FL): StatPearls [Internet].
- Siffert, W., 2005. G Protein Polymorphisms in Hypertension, Atherosclerosis, and Diabetes. *Annual Review of Medicine*, Volume 56, pp. 17-28.
- Silverthorn, D. U., 2010. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 5. ed ed. s.l.:Artmed.
- Siragy, H. M. & Carey, R. M., 2010. Role of the Intrarenal Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*, Volume 31, pp. 541-550.

- Stoll, S., Wang, C. & Qiu, H., 2018. DNA Methylation and Histone Modification in Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Strachan, T. & Read, A. P., 2018. Basic principles of nucleic acid structure and gene expression. Em: *Human Molecular Genetics*. 5 ed. s.l.:Garland Science.
- Strachan, T. & Read, A. P., 2018. Gene regulation and the epigenome. Em: *Human Molecular Genetics*. 5 ed. s.l.:Garland Science.
- Sung, Y. J. et al., 2018. A Large-Scale Multi-ancestry Genome-wide Study Accounting for Smoking Behavior Identifies Multiple Significant Loci for Blood Pressure. *The American Journal of Human Genetics*, Volume 102, pp. 375-400.
- Surendran, P., Drenos, F., ... & Munroe, P. B., 2016. rans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nature Genetics*, p. 1151–1161.
- Swift, P. A. & Macgregor, G. A., 2004. Genetic variation in the epithelial sodium channel: a risk factor for hypertension in people of African origin. *Adv Ren Replace Ther*.
- Szyf, M., 2007. The Dynamic Epigenome and its Implications in Toxicology. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 100(1), p. 7–23.
- Tollervey, J. R. & Lunyak, V. V., 2012. Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics*, pp. 823-840.
- Vaiserman, A. M., Koliada, A. K. & Jirtle, R. L., 2017. Non-genomic transmission of longevity between generations: potential mechanisms and evidence across species. *Epigenetics & Chromatin*.
- Vigitel Brasil 2006, 2007. *Vigitel Brasil 2006: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*, Brasília: s.n.
- Vigitel Brasil 2014, 2015. *Vigitel Brasil 2014 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*, Brasília: s.n.
- Vigitel Brasil 2017, 2018. *VIGITEL BRASIL 2017 - ESTIMATIVAS SOBRE FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS NAS CAPITAIS DOS 26 ESTADOS BRASILEIROS E NO DISTRITO FEDERAL EM 2017*, Brasília: s.n.
- Vigitel Brasil 2019, 2020. *VIGITEL BRASIL 2019 - Estimativas Sobre Frequência e Distribuição Sociodemográfica de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas nas Capitais dos 26 Estados Brasileiros e no Distrito Federal em 2019*, Brasília: s.n.
- Waddington, C. H., 1942. The epigenotype. *Endeavour*, Volume 1, pp. 18-20.
- Wang, F. et al., 2014. Dynamic CCAAT/enhancer binding protein-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. *Hypertension*, Volume 63, pp. 281-288.
- Watson, J. D. et al., 2015. *Biologia Molecular do Gene*. 7 ed. s.l.:Artmed.

World Health Organization (WHO), 2021. *Hypertension*. [Online]  
Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>  
[Acesso em 05 Novembro 2021].

Zeng, C. et al., 2004. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiological genomics*, Volume 19, pp. 233-246.

Zhao, J. et al., 2017. Selective expression of TSPAN2 in vascular smooth muscle is independently regulated by TGF- $\beta$ 1/SMAD and myocardin/serum response factor. *The FASEB Journal*, pp. 2576-2591.

Zhong, Q. et al., 2016. Association of SCNN1B promoter methylation with essential hypertension. *Molecular Medicine Reports*, Volume 14, pp. 5422-5428.