



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOLOGIA**

RAFAEL HENRIQUE CARVALHO SILVA

**RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO C677T NO GENE DA
ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASE
(MTHFR) E HIPERTENSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS DE
DUAS POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA AMAZÔNIA**

BELÉM-PA

2017

RAFAEL HENRIQUE CARVALHO SILVA

**RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO C677T NO GENE DA
ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASE
(MTHFR) E HIPERTENSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS DE
DUAS POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA AMAZÔNIA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo.

BELÉM-PA

2017

RAFAEL HENRIQUE CARVALHO SILVA

RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASE (MTHFR) E HIPERTENSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS DE DUAS POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA AMAZÔNIA.

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: ___/___/___

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo

Faculdade de Ciências Biológicas (ICB) - UFPA - Orientador

Prof^a. Dr^a. Délia Cristina Figueira Aguiar

Faculdade de Ciências Biológicas (ICB) - UFPA - Membro

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonsalves

Faculdade de Ciências Biológicas (ICB) - UFPA – Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar esses quatro anos de graduação.

A minha orientadora Tereza Corvelo, pelo suporte, orientação, correção e incentivos.

Especialmente a Gyselly Matos, por toda sua paciência e orientação, sem a sua ajuda este e muitos outros trabalhos não poderiam ter sido produzidos.

A todos os graduandos, mestrandos e doutorandos do laboratório de imunogenética (ICB), que me suportaram e estiveram comigo em todos os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos.

A meus pais e família, pelo amor e incentivo incondicional.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a base para o meu ensino.

E a todos, que direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, muito obrigado.

RELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO C677T NO GENE DA ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUCTASE (MTHFR) E HIPERTENSÃO ARTERIAL EM INDIVÍDUOS DE DUAS POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DA AMAZÔNIA.

RESUMO

A enzima metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR) participa da via metabólica do aminoácido homocisteína (Hcy), convertendo-o em metionina. O SNP C677T no gene MTHFR promove a substituição de uma citosina por timina, reduzindo a atividade enzimática, levando a um acúmulo de Hcy, que tem sido relacionado a diferentes processos patológicos, como alterações cardiovasculares, hipertensão arterial, câncer, distúrbios neurológicos, entre outros. Neste sentido, este estudo objetivou identificar as frequências genotípicas e alélicas do SNP C677T e relacionar com os níveis de pressão arterial sistêmica de indivíduos de uma comunidade no vale do rio Tocantins e de duas comunidades no vale do rio Tapajós, todas no estado do Pará. No período compreendido entre junho de 2014 a setembro de 2016 foram coletadas amostras de sangue e dados sócio-demográficos de 311 indivíduos das comunidades avaliadas. A genotipagem do SNP C677T no gene MTHFR foi realizada por PCR-RFLP. Para aplicação dos testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5%. Nas comunidades do vale do Tocantins e do Tapajós verificou-se que havia entre os indivíduos amostrados uma maior proporção de mulheres (70%), de cor parda ou negra (80%) e possuindo apenas o ensino fundamental (70%). Observou-se diferença estatisticamente significativa em relação às características: idade, estado civil, ocupação e renda familiar dos indivíduos entre as regiões pesquisadas. A distribuição das frequências genotípicas e alélicas do SNP C677T no gene MTHFR diferiu entre os sujeitos das comunidades estudadas, sendo que, a frequência do genótipo mutante TT foi mais elevada na população do vale do rio Tocantins. A prevalência de hipertensos foi de 23% e 21,5%, nas populações do rio Tocantins e Tapajós, respectivamente. Foi constatada uma maior proporção do genótipo TT entre os habitantes do vale do rio Tapajós que apresentaram pressão arterial alterada, assim como a idade avançada constitui-se em um dos fatores de risco associado à hipertensão arterial em ambas as regiões estudadas. Tendo como base essas descobertas, a mutação C677T no gene da MTHFR quando em homozigose está associado com o risco de hipertensão entre a população do vale do rio Tapajós. Estes resultados preliminares são ainda inconclusivos e sugerem a necessidade de estudos posteriores para melhor avaliar a associação entre as variantes do gene MTHFR e hipertensão em residentes da bacia hidrográfica amazônica.

Palavras-Chave: SNP C677T, MTHFR, hipertensão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR).....	6
1.2 POLIMORFISMO NO GENE MTHFR	6
1.3 POLIMORFISMO C677T NO GENE MTHFR	7
1.3.1 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T	8
1.4 POLIMORFISMO C677T E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS	9
1.5 HOMOCISTEÍNA.....	11
1.6 PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 TIPO DE PESQUISA.....	15
2.2 CASUÍSTICA E LOCAL DE ESTUDO	15
2.3 INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO	17
2.4 EXAME CLÍNICO E VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO SANGUÍNEA	17
2.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
2.6 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS	18
2.6.1 Coleta das amostras de sangue	18
2.6.2 Extração do DNA total	19
2.6.3 Amplificação do segmento gênico da MTHFR e Detecção do SNP C677T pela Análise do Polimorfismo de Pequenos Fragmentos de Restrição - RFLP	19
2.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	20
3. RESULTADOS.....	21
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR)

A 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) é uma flavoproteína (dependente da flavina-adenina-dinucleotídeo) constituída por 656 aminoácidos (Kutzbach & Stoksad, 1971). Estruturalmente é um homodímero com subunidades de 77 kDa que apresenta dois domínios distintos: um domínio aminoterminal (-NH₂) catalítico e um domínio carboxi-terminal (-COOH) de 37 kDa, que contém o sítio de ligação para a S-adenosil metionina, localizado entre os dois domínios (Goyette *et al.*, 1994; Frosst *et al.*, 1995).

Goyette e colaboradores (1994,1998) identificaram o gene humano para a MTHFR na região cromossômica 1p36.3, apresentando 11 exons que variam em tamanho de 102 pares de bases (pb) a 432 pb e 10 íntrons de tamanhos que variam entre 250 pb e 1,5 kilobases (kb), que resultam em uma enzima cataliticamente ativa de aproximadamente 70 kiloDaltons (kDa).

A MTHFR possui um papel importante no processamento de aminoácidos, particularmente na conversão de homocisteína em metionina (Urpia, 2009). Esta enzima catalisa a redução irreversível da 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), principal e mais abundante, forma de folato circulante no organismo (Frosst *et al.*, 1995, Gokcen *et al.*, 2011). O folato é o doador universal de grupamentos metil (CH₃) para a síntese de nucleotídeos e para o processo de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), principal mecanismo epigenético de regulação gênica (Zacho *et al.*, 2011).

1.2 POLIMORFISMO NO GENE MTHFR

Os polimorfismos são frequentemente encontrados na sequência de ácido ribonucleico (DNA) e, ocorrem quando, para um mesmo *locus* gênico, existem um ou mais alelos, sendo que a frequência do alelo mais raro deve ser maior que 1% na população em geral (López-Cima *et al.*, 2007). Quando presentes em um determinado gene, os polimorfismos podem afetar sua

expressão e ocasionar alterações funcionais em seus produtos. Os polimorfismos mais abundantes são os de nucleotídeo único - SNP (do inglês *Single nucleotide polymorphism*), que são estáveis e amplamente distribuídos no genoma humano. Muitos SNP têm sido considerados como biomarcadores para suscetibilidade para vários processos de doença (Brookmoller *et al.*, 2008).

Diversas mutações no gene da MTHFR foram associadas à deficiência grave da MTHFR, e indivíduos com estas mutações podem vir a exibir atividade enzimática residual de 0% a 20%, além de apresentar, na infância ou na adolescência, retardo mental, disfunção motora, distúrbios psiquiátricos, entre outras anormalidades neurológicas, e risco elevado para doenças vasculares (Frosst *et al.*, 1995).

Das várias mutações que ocorrem no gene MTHFR, algumas resultam na síntese de variantes termolábeis da MTHFR, ou seja, variantes que exibem atividade enzimática mínima após a desativação por calor a 46°C (Kang *et al.*, 1988). Entre estas diversas mutações, o SNP C677T (rs1801133), resultante da transição de citosina (C) para timina (T) no códon 677 do gene MTHFR, é o mais comum encontrado na população em geral (Liew & Gupta, 2015).

Outro SNP, no mesmo gene da MTHFR, A1298C, resulta na alteração do códon de glutamato para a alanina, conduzindo a diminuição na atividade da MTHFR, a qual é mais pronunciada em homozigotos mutantes do que em heterozigotos. A presença do alelo C, entretanto, não foi associada à elevação de homocisteína plasmática ou à redução de ácido fólico no plasma, fenômenos evidentes na mutação C677T (Van der Put *et al.*, 1996).

1.3 POLIMORFISMO C677T NO GENE MTHFR

O gene humano que codifica a MTHFR foi mapeado na região cromossomal 1p36.3, de aproximadamente 17 Kb, apresentando 11 éxons (Rosemberg *et al.*, 2002), estando a mutação C677T localizada no éxon 04 deste gene.

Indivíduos homozigotos mutantes e heterozigotos com variante termolábil, que converte o códon da alanina para o códon da valina, em consequência da transição de citosina (C) para timina (T) no códon 677 no

gene que codifica a enzima MTHFR, apresentam diminuição na atividade dessa enzima em cerca de 70% e 35%, respectivamente, promovendo uma elevação moderada das concentrações plasmáticas do aminoácido homocisteína levando a um quadro de hiperhomocisteinemia (Kang, 1996; Zetterberg, 2004).

Destaca-se que, a mutação parece ser neutra em relação à concentração plasmática de homocisteína, quando o ácido fólico encontra-se em quantidades adequadas no organismo, mas, naqueles indivíduos com baixa concentração de ácido fólico, a homocisteína aumenta de forma acentuada nos indivíduos homozigotos 677TT e, em valores intermediários, nos heterozigotos. A região na qual se estabeleceu a mutação na enzima tem envolvimento com o ácido fólico e, quando as concentrações dessa vitamina estão adequadas, a enzima pode ser estabilizada (Melo, 2003).

1.3.1 PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO C677T

A frequência de alelos do SNP C677T varia de acordo com a população estudada, sendo que cerca de 8% da população geral tem genótipo homozigoto alterado para a variante termolábil (Van der Put *et al.*, 1996), podendo variar também de acordo com grupos étnicos residentes em um mesma região (Antonio-Véjar *et al.*, 2013)

Na China, a prevalência do genótipo mutante TT foi de 25,5% nos homens e de 24,3% nas mulheres (Li *et al.*, 2015). Na Indonésia e no Iran, a frequência dessa variante genotípica foi de 4,2% e 4,5%, respectivamente (Pramukarso *et al.*, 2015; Ghaznavi *et al.*, 2015). No Reino Unido, o genótipo TT atingiu frequência de 7%.

Wilcken *et al.* (2003) estudaram a distribuição geográfica e étnica do SNP C677T no gene MTHFR em mais de 7.000 recém-nascidos de 16 áreas da Europa, Ásia, Américas, Oriente Médio e Austrália. O genótipo TT foi particularmente comum no norte da China (20%), no sul da Itália (26%) e no México (32%). Houve também algumas evidências de gradientes geográficos na Europa (aumento do norte para o sul) e China (diminuição do norte para o sul). A frequência do genótipo TT foi baixa entre recém-nascidos de ascendência africana, intermediária entre recém-nascidos de origem europeia e

alta entre recém-nascidos de ascendência hispânico-americana. As áreas nos extremos da distribuição de frequência mostraram desvios das expectativas de Hardy-Weinberg (sul da Itália e sul da China). Estes resultados sugerem a existência de pressões seletivas que levam à uma variação acentuada.

Em um estudo realizado no estado de Guerrero no México, para avaliar a presença do SNP C677T no gene MTHFR em três diferentes grupos étnicos, os Nahuas, os Mixtecas e os Mestizas, verificou-se uma frequência do genótipo TT de 51,9%, 50% e 39%, respectivamente (Antonio-Véjar *et al.*, 2013). No Brasil, em um estudo semelhante, a prevalência de homozigotos foi de 10%, 1,45% e 1,2% em populações caucasianas, negras e indígenas respectivamente (Arruda *et al.*, 1998).

Outros estudos realizados no Brasil em diferentes capitais descreveram frequências genóticas de 34% para o genótipo CC; 13% TT; e 52% CT em Curitiba-Paraná (Herkenhoff *et al.*, 2012), no Recife-PE, a proporção de genótipo CC foi de 62%, de 29% CT e 8% de TT (Muniz *et al.*, 2006). Na cidade de Salvador-BA, em uma amostra de 300 indivíduos, 63% possuíam o genótipo CC, 31% CT e 6% TT (Urpia *et al.*, 2009).

1.4 POLIMORFISMO C677T E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS

A presença de mutações no gene da MTHFR gera interferência no metabolismo do folato, reduzindo sua disponibilidade em vias essenciais de síntese e metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Evidências apontam que falhas na disjunção do cromossomo 21, na meiose I materna, possam ocorrer em virtude de fenômenos de hipometilação do DNA devido ao metabolismo anormal do folato, decorrente de mutações nos genes que codificam as enzimas responsáveis pela via de remetilação da homocisteína em metionina (Grillo *et al.*, 2002).

James *et al.* (1999) avaliaram os níveis plasmáticos de homocisteína em mães americanas de filhos com Síndrome de Down (SD) e em mães controles, verificando que os níveis de homocisteína eram significativamente elevados e os níveis de metionina eram reduzidos nas mães que tinham a frequência da mutação MTHFR C677T aumentada em 2,6 vezes, quando comparadas com as mães controles. Porém, outros grupos de pesquisadores, também

estudando a associação entre a mutação do gene da MTHFR na posição 677 e a ocorrência de trissomia 21 em mulheres de nacionalidades diferentes concluíram que a mesma não é fator de risco para a ocorrência desta Síndrome (Gueant *et al.*, 2003; Boduroglu *et al.*, 2004; Takamura *et al.*, 2004).

Em outros estudos, a relação da mutação MTHFR C677T com o risco de ter filhos com SD somente foi observada quando associada com outras mutações em genes envolvidos no metabolismo do folato. Grillo *et al.* (2002) observaram que as mutações MTHFR 677C>T e MTHFR 1298 A>C eram mais prevalentes entre mães de crianças com SD que em mães controles, resultados similares foram observados ao relacionar MTHFR C677T e Metionina Sintetase Redutase (MTRR) A66G (O'Leary *et al.*, 2002).

O aumento nos níveis de homocisteína no organismo, causados pela mutação C677T, e conseqüente aumento do estresse oxidativo, suportam a hipótese de relação entre a mutação e aumento nos riscos de doenças cardiovasculares. Em uma metanálise realizada por Xuan *et al.* (2014), envolvendo 9.329 casos e 15.076 controles, foi observado que a mutação MTHFR 677 em homozigose (TT) é um fator de risco para cardiopatia congênita. Outros estudos associaram o polimorfismo com aumento de risco para Doença arterial Coronária (DAC), nos quais a prevalência de portadores do alelo foi maior no grupo de pacientes em relação aos controles (Jee *et al.*, 2002; Dedoussis *et al.*, 2005).

O SNP C677T na enzima MTHFR pode apresentar conseqüências diretas na incidência do câncer. Liew & Gupta (2015) observaram uma relação entre a deficiência de folato e o aumento da incidência de câncer, devido à depleção de timidina e a má incorporação de uracila no DNA, afetando o reparo e desestabilizando a molécula de DNA, o que pode levar a aberrações cromossômicas, bem como a redução na metilação da citosina nos deficientes em folato, o que pode resultar na expressão de pró-oncogenes e no potencial de transformação maligna.

Yan *et al.* (2014) e Lv *et al.* (2014) realizaram uma meta-análise onde constataram a significativa associação da mutação C677T ao risco do desenvolvimento de câncer gástrico entre indivíduos asiáticos e caucasianos, sendo maior nos indivíduos infectados por *H. pylori*. Lin *et al.* (2014) sugerem que a presença desta mutação, que parece influenciar na suscetibilidade do

câncer gástrico, pode fornecer informações importantes na pesquisa de biomarcadores para serem utilizados na terapêutica e em estratégias de prevenção do câncer.

1.5 HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido sulfurado produzido intercelularmente através da desmetilação da metionina provenientes da dieta (Vanucchi & Melo, 2009) que pode ocorrer por dois processos (Figura 1): a remetilação e a transulfuração, que ocorre quando há sobrecarga de metionina (Neves *et al.*, 2004). A concentração plasmática de homocisteína é influenciada tanto por fatores nutricionais, tais como o *status* do ácido fólico e as vitaminas B₆ e B₁₂, quanto por fatores hereditários, especialmente ligados às enzimas do metabolismo da metionina e da cisteína, como a metionina sintetase (MS), 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e cistationina β-sintetase (CβS), além de estados patológicos, como a redução da função renal (Saw *et al.*, 2001; Andreassi *et al.*, 2003).

No ciclo de remetilação da homocisteína, o folato 5-MTHF, participa na conversão de homocisteína em metionina, neste processo, sendo transformada em tetrahydrofolato (Coşar *et al.*, 2014). A etapa final necessita da enzima Metionina sintetase redutase (MSR) e da vitamina B12 que atua como cofator para a reação de síntese da metionina. No fígado, a metionina é catabolizada e transformada em S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosil-homocisteína (SAH) e o ciclo é completado com a transformação de SAH para homocisteína (Neves *et al.*, 2004).

Na via de transulfuração, a homocisteína é catabolizada irreversivelmente em cistationina pela enzima CβS dependente do fosfato piridoxal (vitamina B6). Nesta reação, a homocisteína sofre uma condensação com serina para formar a cistationina. A reação é positivamente regulada pela SAM, o que serve para promover a depleção de um excesso de homocisteína, quando os níveis plasmáticos de metionina estão altos. A enzima seguinte na reação, γ-cistationase, hidrolisa a cistationina para gerar cisteína (Bydlowski *et al.*, 1998, Neves *et al.*, 2004).

A alta concentração de Hcy, hiper-homocisteinemia (HHcy), está relacionada com aumento do risco para várias desordens no organismo, incluindo doenças cardiovasculares (Mandaviya *et al.*, 2014). A HHcy parece causar principalmente alterações do endotélio vascular, mediadas pelo efeito tóxico-oxidativo da homocisteína. No plasma, parte da homocisteína é auto-oxidada, formando superóxidos e peróxido de hidrogênio, o que poderia causar lesão da célula endotelial, ativação plaquetária e trombose (Durand *et al.*, 1997). O aumento na produção das espécies reativas de oxigênio pode também estar envolvido no dano ao DNA induzido pela homocisteína e apoptose celular, mediados pelo aumento da produção intracelular de peróxido de hidrogênio. Assim, sugere-se que, em concentrações elevadas, a homocisteína desempenhe papel genotóxico (Crott & Fenech, 2001).

As causas mais importantes relacionadas à HHcy incluem, a deficiência nutricional de folato e vitaminas do complexo B. deste modo, baixos níveis de vitamina B12 e/ou folato estão associados com altas concentrações de Hcy, bem como, com o aumento do risco de doenças cardiovasculares, complicações na gravidez e defeitos no tubo neural (Mandaviya *et al.*, 2014). No entanto, a concentração plasmática de homocisteína é influenciada por eventos hereditários, como mutações nas enzimas que atuam em sua via metabólica, como as enzimas MS, MTHFR e C β S (Andreassi *et al.*, 2003).

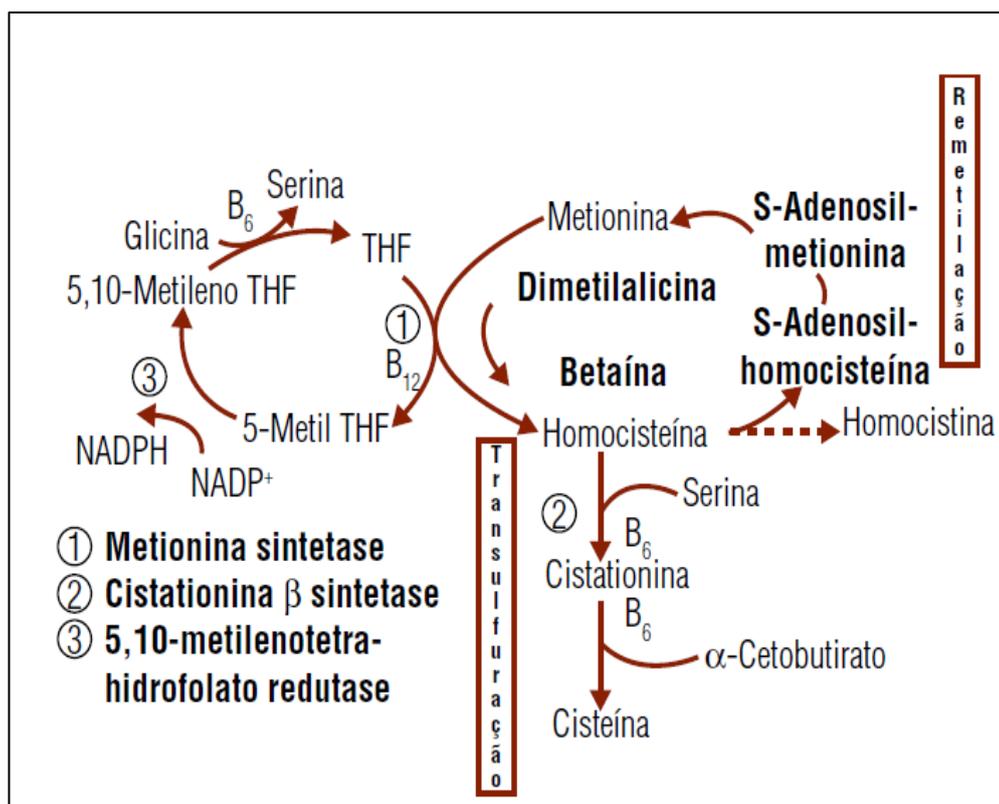


Figura 1. Vias metabólicas da homocisteína e as enzimas envolvidas. Fonte: Vanucchi & Melo, 2009.

1.6 PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A pressão arterial, medida em milímetros de mercúrio (mmHg), é aquela existente no interior do sistema arterial principal do corpo, fixado convencionalmente pelas pressões sistólica e diastólica. A medida mínima de pressão aceita é determinada pelo adequado funcionamento dos órgãos vitais sem sintomas de hipotensão, sendo normalmente maior do que 90 mmHg (sistólica) e 60 mmHg (diastólica), podendo variar entre os pacientes (Borges *et al.*, 2007).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) configura-se como uma doença crônica e um grave problema de saúde pública, que ocorre quando a pressão arterial atinge valores $\geq 130/80$ mmHg. A HAS também pode ser responsável pelo desenvolvimento de comorbidades, a exemplo da doença coronariana, acidentes vasculares cerebrais (AVC), insuficiência renal crônica, doenças vasculares periféricas, aneurismas, lesões nos vasos sanguíneos dos olhos, entre outras. As comorbidades consistem em complicações da hipertensão, diferentemente dos fatores de risco que são condições e comportamentos que

contribuem com o desenvolvimento da doença hipertensiva (Lolio, 1990; Machado *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da hipertensão não ocorre instantaneamente, há um conjunto de fatores que estão associados à sua evolução e agravamento. Estes fatores são conhecidos como fatores de risco e que, segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), são: idade, sexo/gênero e etnia, fatores socioeconômicos, ingestão de sal, excesso de peso e obesidade, ingestão de álcool, genética e sedentarismo.

Números da OMS (2014) indicam que há cerca de 600 milhões de hipertensos no mundo. A doença atinge, em média, 25% da população brasileira, com variações que vão de 22,3% a 43,9% na população adulta, chegando a mais de 50% na terceira idade e, surpreendentemente, a 5% dos 70 milhões de crianças e adolescentes no Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão – SBH (2012). A hipertensão causa anualmente a morte de 9,4 milhões de pessoas no mundo e é responsável por 45% dos ataques cardíacos e 51% dos derrames cerebrais (OMS, 2014).

Há, naturalmente, com o avançar da idade, redução da complacência dos vasos, enrijecimento das artérias, e diminuição de sua elasticidade, entre outros aspectos fisiopatológicos que comprometem a boa função cardíaca e contribuem de forma importante para o surgimento de HAS (Amado & Arruda, 2004). Esse fato é comprovado em estudos epidemiológicos, como o de Monteiro *et al.* (2005), em que a maior prevalência da doença ocorreu em pessoas mais velhas.

Nos últimos 10 anos, muitos *loci* foram associados à hipertensão através de estudos de genes candidatos. A identificação de genes susceptíveis é potencialmente útil para elucidar os mecanismos genéticos complexos da doença. Recentemente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em alguns genes candidatos têm mostrado conferir susceptibilidade à doença em alguns, mas não em todos os países europeus e asiáticos (Hong *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2011, Xi *et al.*, 2014).

O polimorfismo C677T na MTHFR tem sido relatado como associado à hipertensão em virtude do seu papel na catalisação da formação de 5-metilenotetrahidrofolato, co-substrato para a conversão de homocisteína em metionina. Estudos de associação têm sido relatados em diferentes populações

(Qian *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). Entretanto, um grande número de estudos subsequentes produziu resultados contrários (McColgan *et al.*, 2008; Hanzi *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

Diante do exposto, é relevante investigar a frequência do polimorfismo *MTHFR* C677T em diferentes populações, para avaliar o seu papel no aumento ou diminuição do risco de desenvolver determinados tipos de doenças. Assim, este estudo teve por objetivos estimar as frequências alélicas e genotípicas em função do SNP C677T presente no gene *MTHFR* em indivíduos de comunidades localizadas em diferentes regiões hidrográficas da Amazônia e comparar as distribuições genotípicas entre as populações estudadas, traçar o perfil sociodemográfico e identificar a prevalência da hipertensão arterial sistêmica, bem como, correlacionar os níveis de pressão arterial sistêmica com os genótipos do SNP C677T no gene *MTHFR* nos indivíduos avaliados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo transversal, analítico-descritivo, que incluiu dados epidemiológicos e amostras de DNA genômico de indivíduos residentes nos municípios de Itaituba e Limoeiro do Ajurú, ambos no Estado do Pará, obtidos no período compreendido entre julho de 2014 a setembro de 2016.

2.2 CASUÍSTICA E LOCAL DE ESTUDO

Durante o período compreendido entre junho de 2014 a setembro de 2016 foram realizadas cinco expedições científicas com equipe multiprofissional, duas em direção a Limoeiro do Ajurú, no vale do rio Tocantins e três para o município de Itaituba, vale do rio Tapajós, onde foram coletadas amostras de sangue dos voluntários residentes nas comunidades ribeirinhas localizadas no entorno destes municípios.

Durante as expedições científicas, foram realizadas as coletas de dados de cada participante através de questionários com questões direcionadas as

características sociodemográficas e clínico-epidemiológicas, incluindo informações pessoais (idade, sexo, etnia, escolaridade, estado civil), de estilo de vida (tabagismo, elitismo) e condições econômicas e de saúde (ocupação, renda, comorbidade).

O município de Itaituba possui várias comunidades distribuídas às margens do rio Tapajós, habitadas por famílias que vivem da agricultura particularmente da mandioca e da pesca de subsistência. A população estimada é de 97.343 habitantes dentro de um território de 62.041 Km² (IBGE, 2010). Neste município foram avaliados moradores das comunidades de Barreiras e São Luís do Tapajós.

A comunidade de Barreiras encontra-se a jusante da cidade de Itaituba e está situada à esquerda do rio Tapajós (Figura 2), cuja população estimada é de aproximadamente 930 habitantes, enquanto que, a comunidade de São Luiz do Tapajós encontra-se a montante da cidade de Itaituba, à margem direita do rio Tapajós (Figura 2), e possui uma população estimada de 620 habitantes (Dados coletados pelos agentes comunitários de saúde, 2009).

O município de Limoeiro do Ajurú limita-se ao norte com o Rio Tocantins (Figura 2), ao sul com o município de Cametá, a leste com o município de Igarapé Miri e a Oeste com o município de Oeiras do Pará. A sede do município posiciona-se às margens do Rio Tocantins (Prefeitura Municipal de Limoeiro do Ajuru, 2012). Possui uma população de 23.284 habitantes dentro de um território de 1.490 km² (IBGE, 2010), onde menos de 20% vive na área urbana. A maior parte da população sobrevive da pesca e da coleta do açaí.

Uma estratégia de amostra por conveniência foi utilizada através de recrutamento dos indivíduos durante palestras de esclarecimento do protocolo da pesquisa e convite para participação voluntária.

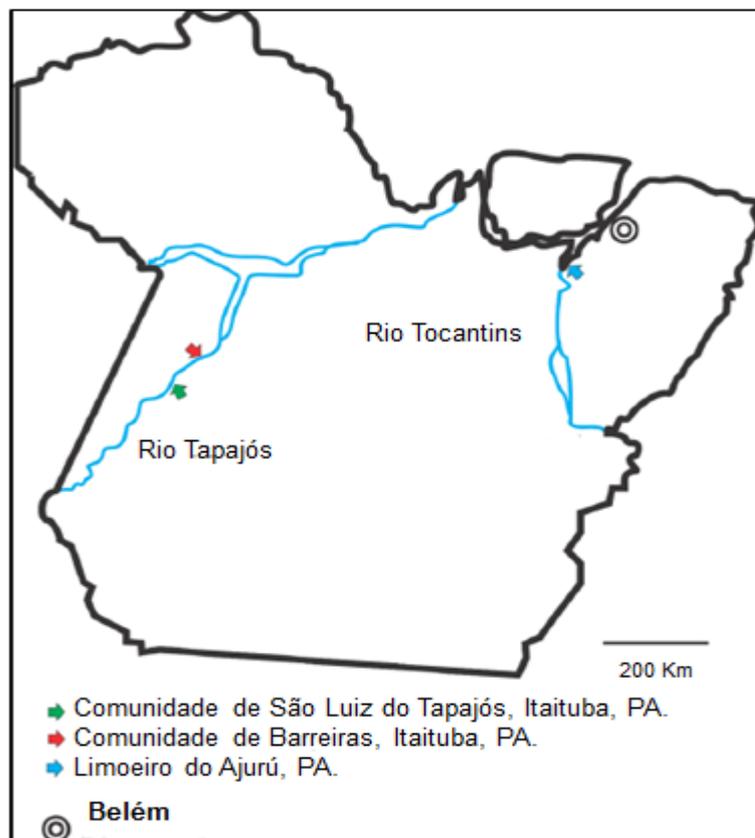


Figura 2. Mapa do estado do Pará com destaque nas regiões estudadas. A seta verde destaca a localização da comunidade de São Luiz do Tapajós, situada à margem direita do rio Tapajós. A seta vermelha indica a localização da comunidade de Barreiras, situada à margem esquerda do Rio Tapajós. A seta azul indica a localização do município de Limoeiro do Ajurú, situado às margens do rio Tocantins.

2.3 INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

Para o levantamento das informações epidemiológicas foi utilizado um questionário contendo questões referentes ao perfil sociodemográfico dos participantes da pesquisa (Anexo).

2.4 EXAME CLÍNICO E VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO SANGUÍNEA

O estudo incluiu um exame clínico geral de rotina que foi realizado por um médico clínico experiente. Adicionalmente, foi mensurada a pressão sanguínea sistólica e diastólica registrada em acréscimos de 1,0 cm Hg (10 mmHg) usando um esfigmomanômetro aneróide com estetoscópio Premium. Cada entrevistado teve sua pressão aferida duas vezes: uma no início da

entrevista e outra ao final, com intervalo mínimo de cinco minutos entre elas. Para fins de análise, foi considerada a segunda medida da pressão arterial. Ainda, a pressão arterial foi medida em ambos os braços, direito e esquerdo, e foi tirada uma média entre elas. Foi definido como hipertenso, segundo critérios estabelecidos pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), o indivíduo que apresentou pressão sistólica ≥ 130 mmHg (PAS ≥ 130 mmHg) e/ou pressão diastólica ≥ 85 mmHg (PAD ≥ 85 mmHg), ou indivíduos sabidamente hipertensos que estivessem em uso regular de medicação anti-hipertensiva cujos níveis pressóricos estivessem elevados ou não no momento da entrevista.

2.5 ASPECTOS ÉTICOS

Foram incluídos neste estudo indivíduos com faixa etária ≥ 18 anos, ou se menor de idade, mediante a autorização do responsável legal, residentes na comunidade pesquisada por mais de um ano e que concordaram em participar do estudo após as devidas orientações e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido.

Este protocolo de pesquisa foi submetido à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos NMT. Todos os participantes envolvidos na pesquisa concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assegurando-lhes a preservação do anonimato e sigilo no tratamento dos dados.

2.6 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

2.6.1 Coleta das amostras de sangue

Foram coletados 5,0 ml de sangue total dos indivíduos através de venopunção de rotina, sendo dispensados a seguir em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) para processamento imediato e em seguida estocado para posterior análise.

2.6.2 Extração do DNA total

O DNA, obtido a partir de amostra de sangue, foi isolado pelo método do Fenol-Clorofórmio modificado de Miller e colaboradores (1988). Brevemente, nos tubos contendo um volume de 300µl do DNA foram adicionados 500 µl de solução de lise de hemácias (RBC) e realizadas três lavagens, em seguida adicionou-se 500 µl de solução de lise de leucócitos e 10µl de proteinase K, incubando em banho-maria por 12 horas.

Após a incubação, volumes de 300µL de fenol e 300µl de clorofórmio foram adicionados em cada tubo. Os tubos foram agitados mecanicamente por 15 minutos e centrifugados por 5 minutos a 14000 rotações por minuto. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um tubo limpo e adicionado 500µl de solução clorofórmio/isopropanol (diluição 24:1), agitado por 15 minutos e centrifugado por 4 minutos a 14000 rpm, este procedimento foi repetido duas vezes. Ao sobrenadante límpido adicionou-se 900 µl de álcool isopropílico, para visualização da “nuvem” de DNA, centrifugou-se por 10 minutos e o sobrenadante é descartado.

Para a eliminação dos resíduos de álcool isopropílico os tubos são lavados com 200 µl de etanol a 80% e o excesso foi logo em seguida desprezado; a amostra ficou a temperatura ambiente para evaporação do álcool e adicionou-se 200 µl de água bidestilada autoclavada para hidratar o DNA.

2.6.3 Amplificação do segmento gênico da MTHFR e Detecção do SNP C677T pela Análise do Polimorfismo de Pequenos Fragmentos de Restrição - RFLP

a) **Detecção do segmento gênico da enzima MTHFR.** Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) 677-R (5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG GA -3') e 677-F (5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG -3') que amplificam um fragmento gênico de 198 pb (Gokcen *et al.*, 2011). A reação foi realizada contendo 8 µl de amostra de DNA, 5 µl tampão PCR 10x [50mMKCl/10mM Tris-HCl, pH8.7), 200uM de cada deoxinucleotideo, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, USA), 1µL de cada primer

(10pMol), 1,5 mM de $MgCl_2$ e água estéril até completar o volume final de 50 μ l. As condições da PCR foram: temperatura inicial de desnaturação de 92°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 92°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 61°C por 1 minuto e temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos; e por fim a temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto de cada PCR foi aplicado em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

b) **Análise de polimorfismo de pequenos fragmentos de restrição (RFLP).** O produto final da PCR de 198 pares de bases foi submetido à digestão enzimática pela endonuclease de restrição HinfI (Biolabs, New England) segundo instruções do fabricante. Para visualização dos fragmentos formados após a clivagem foi realizada eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

A representação genotípica da variante C677T do gene MTHFR foi baseada na presença ou ausência do sítio de restrição enzimático, de forma que as amostras que após a digestão apresentaram apenas o fragmento de 198 pb foram identificadas como 677 CC (normal), aquelas que apresentarem fragmentos de 198, 175 e 23 pb foram identificadas como 677 CT (heterozigotas), e as amostras com fragmentos de 175 e 23 pb foram caracterizadas como 677TT (homozigoto/mutante).

Um marcador de peso molecular de 100 pb (Kasvi, Curitiba, Brasil) foi aplicado em cada gel como referência.

2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram analisados através da estatística paramétrica utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007), considerando 95% o nível de significância de $p < 0,05$. As informações epidemiológicas e as frequências alélicas e genotípicas, bem como os dados de pressão arterial sistêmica foram comparadas entre os indivíduos das comunidades estudadas através do teste do qui-quadrado com a correção de Yates (X^2_{Yates}) e do Teste G. As distribuições de frequências genotípicas e alélicas foram avaliadas em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3. RESULTADOS

Este estudo envolveu um total de 311 pessoas, distribuídas em três comunidades, sendo a população de Limoeiro do Ajurú do vale do rio Tocantins e as comunidades de São Luiz do Tapajós e Barreiras, localizadas no município de Itaituba no vale do rio Tapajós. Na comunidade do vale do rio Tocantins foram coletadas amostras de sangue de 148 indivíduos nas comunidades do vale do rio Tapajós foram coletadas um total de 163 de amostras de sangue, sendo, 75 da comunidade de São Luiz do Tapajós e 88 da comunidade de Barreiras.

A média de idade na comunidade do vale do rio Tocantins foi de $40,96 \pm 16,57$ anos, com máxima e mínima de 86 e 14 anos, respectivamente. Enquanto nas comunidades do vale do rio Tapajós a média de idade foi de $46,65 \pm 16,0$ anos, com máxima e mínima de 80 e 14 anos, respectivamente.

De acordo com os dados obtidos dos participantes das três comunidades, uma no vale do rio Tocantins e duas no vale do rio Tapajós observou-se que havia uma maior proporção de mulheres, correspondendo a mais de 70% da amostra. A maioria dos sujeitos da pesquisa, ou seja, mais de 80%, eram pardos ou negros, sendo que mais de 60% deles possuía apenas o ensino fundamental e mais de 70% declararam não apresentar nenhuma comorbidade. Quanto aos hábitos de vida dos investigados, envolvendo o consumo de fumo e álcool, o número de indivíduos não tabagistas e não etilistas foi predominante na população de estudo. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na distribuição destas características entre as comunidades do Tocantins e do Tapajós.

Por outro lado, a comunidade do vale do rio Tocantins diferiu estatisticamente das comunidades do vale do rio Tapajós em relação às variáveis sociodemográficas: idade ($p= 0,03$), estado civil ($p= 0,0003$), ocupação ($p= 0,0011$) e renda familiar ($p= 0,001$), conforme verificado na tabela 1.

Em relação à faixa etária, 55% (171/311) dos indivíduos pesquisados tinham idade igual ou inferior a 45 anos, sendo que, 62% dos indivíduos da região do rio Tocantins tinham idade igual ou inferior a 45 anos, enquanto que,

entre a população do rio Tapajós, 51,5% tinha mais de 45 anos. A maioria da população era casada ou estava vivendo em união estável, correspondendo a 66% (205/311), mas, aproximadamente 76% eram casados ou viviam em união estável na comunidade do vale do Tocantins, enquanto naquelas do vale do Tapajós, somente 56% referiram este estado civil.

No que diz respeito a possuir uma ocupação que gerasse renda, 88% (273/311) dos investigados declarou exercer uma ocupação remunerada, no entanto, entre os indivíduos do vale do Tocantins, 19% declararam não exercer atividade remunerada versus somente 6% do vale do Tapajós, sendo que, aproximadamente 84% (260/311) declararam possuir uma renda igual ou inferior a três salários mínimos, com 23% versus 9% de indivíduos que não exercem nenhuma atividade remunerada nos vales do Tapajós e Tocantins, respectivamente.

Tabela 1. Perfil sociodemográfico de indivíduos de comunidades das regiões hidrográficas do vale do rio Tocantins e do vale do rio Tapajós no estado do Pará.

VARIÁVEIS	COMUNIDADES		Teste
	Vale do Tocantins (n= 148)	Vale do Tapajós (n= 163)	
Sexo			
Feminino	106 (71,6%)	126 (77,0%)	$X^2_{Yates}= 1,038$
Masculino	42 (28,4%)	37 (23,0%)	$p= 0,31$
Idade			
≤ 45 anos	92 (62,0%)	79 (48,5%)	$X^2_{Yates}=4,712$
> 45 anos	56 (38,0%)	84 (51,5%)	$p= \mathbf{0,03}$
Cor da pele			
Pardos/Negros	124 (83,8%)	131 (80,0%)	$X^2_{Yates}= 0,403$
Branco	24 (16,2%)	32 (20,0%)	$p= 0,52$
Estado civil			
Casado/União estável	113 (76,4%)	92 (56,0%)	$X^2_{Yates}= 12,814$
Solteiro	35 (23,6%)	71 (44,0%)	$p= \mathbf{0,0003}$
Nível de Ensino			
Analfabeto/Fundamental ¹	94 (63,5%)	118 (72,4%)	$X^2_{Yates}= 2,424$
Médio ² e Superior	54 (36,5%)	45 (27,6%)	$p= 0,12$
Atividade laboral			
Remunerada	120 (81,0%)	153 (94,0%)	$X^2_{Yates}= 10,66$
Não remunerada	28 (19,0%)	10 (6,0%)	$p= \mathbf{0,0011}$
Renda familiar			
≤ 3	135 (91,0%)	125 (76,7%)	$X^2_{Yates}= 10,91$
>3	13 (9,0%)	38 (23,3%)	$p= \mathbf{0,001}$
Comorbidade³			
Sim	34 (23,0%)	45 (27,6%)	$X^2_{Yates}= 0,65$
Não	114 (77,0%)	118 (72,4%)	$p= 0,42$
Tabagismo			
Sim	12 (8,1%)	18 (11,0%)	$X^2_{Yates}= 0,47$
Não ou ex- fumante	136 (91,9%)	145 (89,0%)	$p= 0,49$
Etilismo			
Sim	31 (21,0%)	31 (19,0%)	$X^2_{Yates}= 0,08$
Não	117 (79,0%)	132 (81,0%)	$p= 0,78$

Fundamental¹: completo e incompleto; Médio²: completo e incompleto; Comorbidade³: inclui diabetes, hipertensão arterial sistêmica, gastrite, reumatismo, doença renal crônica e cardiovascular.

Quanto à distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR entre os indivíduos das comunidades dos rios Tocantins e Tapajós verificou-se diferenças significativas, com maior prevalência do genótipo TT (13,5%) nos indivíduos da comunidade do Rio Tocantins (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas da mutação C677T no gene MTHFR em indivíduos do vale dos rios Tocantins e Tapajós no Pará.

MTHFR		Rio Tapajós	Rio Tocantins	Total	X ² (p valor)
		N= 163 (%)	N= 148 (%)	N= 311 (%)	
Genótipo	CC	120 (74,0)	102 (69,0)	222 (71,0)	12,01 (0,0025)
	CT	38 (23,0)	26 (17,5)	64 (21,0)	
	TT	05 (3,0)	20 (13,5)	25 (8,0)	
Alelo	C	278 (85,0)	230 (78,0)	508 (82,0)	5,45 (0,0196)
	T	48 (15,0)	66 (22,0)	114 (18,0)	

Em relação à região do rio Tapajós, frequências observadas de 74%, 23% e 3%, para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente, e as frequências alélicas de 85% para o alelo C e de 15% para o T, estão de acordo com o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 0,84$; gl= 1; p= 0,36). Já em relação à comunidade do Tocantins, as frequências genotípicas observadas de 69% para CC, de 17,5% para CT e de 13,5% para TT diferiram significativamente das frequências esperadas, revelando-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 35,97$; gl= 1; p= < 0,0001), cuja distribuição de frequência do alelo C foi de 78% e do T foi de 22% (Tabela 2).

A análise das medidas dos níveis de pressão arterial sistêmica nos 148 indivíduos do vale do rio Tocantins demonstrou que deste total 77% (114/148) estavam dentro da faixa de normotensos (PAs < 130 mmHg e/ou PAd < 85 mmHg) e 23% (34/148) apresentaram alguma alteração quanto aos níveis de pressão arterial sistólica e/ou diastólica (PAs \geq 130 mmHg e/ou PAd \geq 85 mmHg) de acordo com os padrões determinados pela Sociedade Brasileira de Hipertensão (Figura 3). Entre os indivíduos com pressão alterada, 15% (5/34)

relataram fazer uso de medicamento, e entre estes, apenas um apresentou pressão arterial sistêmica dentro dos níveis de normalidade.

Em relação aos 163 indivíduos do vale do rio Tapajós, verificou-se que deste total, 78,5% (128/163) estavam dentro da faixa de normotensos, enquanto que 21,5% (35/163) apresentaram alguma alteração quanto aos níveis de pressão arterial sistólica e/ou diastólica de acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (Figura 3). Constatou-se ainda que 51% (18/35) dos indivíduos com pressão arterial alterada relataram fazer uso de medicação anti-hipertensiva, sendo que destes, apenas quatro apresentaram níveis normais de pressão no momento da aferição. Não foi observada significância estatística em relação às distribuições dos níveis de PA sistólica e/ou diastólica entre os indivíduos das regiões avaliadas ($X^2_{yates} = 0,0011$ e $p = 0,915$).

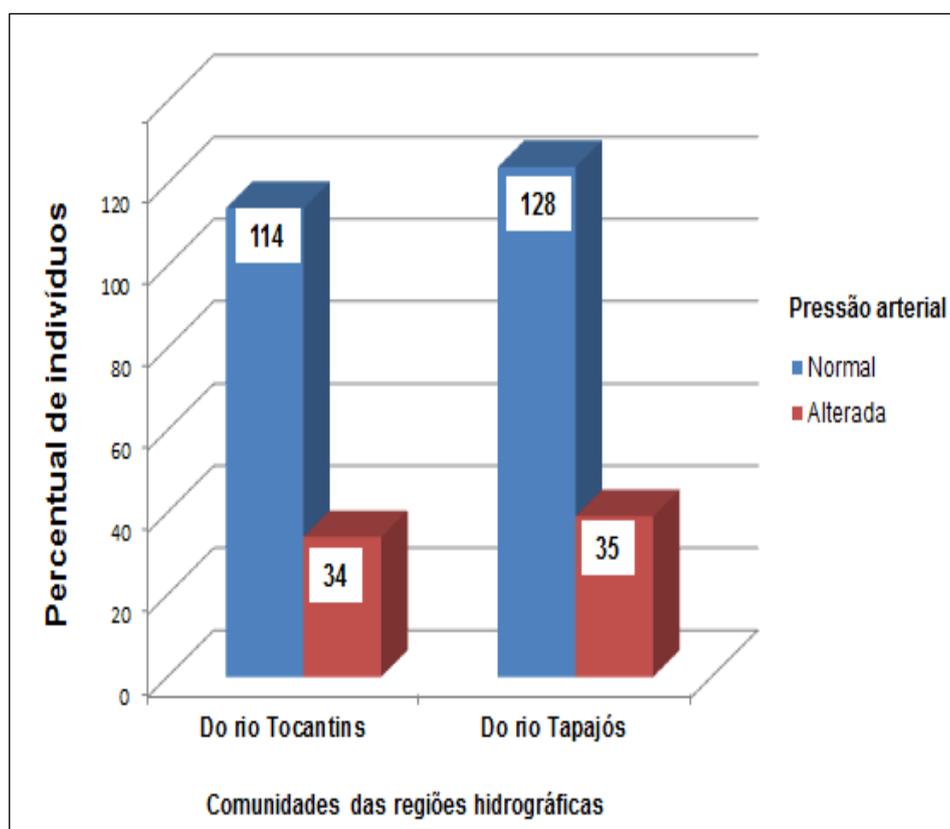


Figura 3. Distribuição das frequências dos indivíduos com pressão arterial sistêmica normal e alterada nas comunidades do vale dos rios Tocantins e Tapajós.

Quando foram comparadas as distribuições genóticas para o SNP C677T no gene MTHFR com os resultados da aferição da pressão sanguínea nos indivíduos das comunidades estudadas, não foram detectados diferenças significativas entre os indivíduos normotensos e hipertensos com os respectivos genótipos, CC, CT e TT na população do vale do rio Tocantins (Teste $G_{Williams} = 5,31$, $gl=1$, $p= 0,07$), conforme verificado na tabela 3.

Por outro lado, diferença estatisticamente significativa esteve presente na população do vale do rio Tapajós (Teste $G_{Yates} = 6,23$, $gl=1$, $p= 0,04$), constatando-se uma maior proporção do genótipo TT entre os indivíduos que manifestaram pressão arterial alterada (Tabela 3), por outro lado, este mesmo genótipo também esteve presente em elevada frequência na população do Tocantins, entretanto, entre os indivíduos com pressão normal, um provável viés amostral, pois esta população encontrasse em desequilíbrio de Hardy-Weinberg quanto a distribuição destes genótipos.

Tabela 3. Distribuição das frequências genóticas do SNP C677T no gene MTHFR em relação à pressão arterial sistêmica dos indivíduos das populações dos rios Tocantins e Tapajós.

GENÓTIPO DO SNP C677T	TOCANTINS		TAPAJÓS	
	PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA			
	NORMAL	ALTERADA	NORMAL	ALTERADA
CC	76 (66,6%)	26 (76%)	92 (72%)	28 (80%)
CT	19 (16,6%)	07 (21%)	34 (26,5%)	04 (11%)
TT	19 (16,6%)	01 (3%)	02 (1,5%)	03 (9%)
TOTAL	114	34	128	35

Ao se avaliar os padrões de pressão arterial sanguínea, normal ou alterada, e a faixa etária nos indivíduos da população do Tocantins e do Tapajós, foram detectadas diferenças significativas, onde a proporção dos indivíduos com pressão arterial alterada era maior entre os indivíduos acima de 45 anos em ambas as comunidades, conforme verificado na tabela 4.

Tabela 4. Distribuição da faixa etária em relação à pressão arterial dos indivíduos dos vales dos rios Tocantins e Tapajós.

PRESSÃO ARTERIAL	TOCANTINS		TAPAJÓS			
	FAIXA ETÁRIA (ANOS)		X ²	FAIXA ETÁRIA (ANOS)		Teste G
	≤ 45	> 45		≤ 45	> 45	
NORMAL	77 (84%)	38 (68%)	p=	73 (92,5%)	55 (65,5%)	p=
ALTERADA	15 (16%)	18 (32%)	0,04	06 (7,5%)	29 (34,5%)	< 0,0001
TOTAL	92	56		79	84	

Em uma análise de regressão logística múltipla como discriminado na tabela 5, testou-se a relação existente entre a pressão arterial sistêmica (variável dependente Y) e as variáveis independentes: genótipo e faixa etária (≤ 45 e > 45 anos) nas duas comunidades investigadas. Estes achados mostraram que a pressão arterial sistêmica é dependente somente da idade avançada (> 45 anos) na população do Tocantins, enquanto que na população do Tapajós, verificou-se que ter idade mais avançada e possuir o genótipo TT, são fatores de risco que aumentam a probabilidade de apresentar hipertensão arterial e outras patologias.

A partir do modelo de regressão logística múltipla que foi aplicado para a população do Tapajós foram calculadas algumas possibilidades para estimar a probabilidade de vir a ter hipertensão frente à ocorrência dos fatores de risco acima mencionados, verificando-se que na presença destes fatores de risco esta probabilidade atinge 11%, enquanto que, à medida que um destes fatores deixa de estar presente, observa-se uma redução nesta probabilidade, de modo que, a probabilidade de ter hipertensão na ocorrência de um destes fatores, ou seja, presente somente o genótipo ou somente a idade avançada, corresponde a 10% e 0,37%, respectivamente. Por outro lado, a probabilidade de ter hipertensão é de 0,35% na ausência de ambos os fatores.

Tabela 5. Determinação de variáveis epidemiológicas e genéticas como possíveis fatores de risco para a hipertensão sanguínea na população do Tocantins e do Tapajós.

População do Vale do rio Tocantins			
Variáveis	O.R.	IC 95%	p-valor
Idade	1,0269	1.0 - 1.05	0,0289
Genótipo	0,3940	0,09 - 1.82	0,2329
População do Vale do rio Tapajós			
Variáveis	O.R.	IC 95%	p-valor
Idade	1.0855	1.05 - 1.12	< 0,0001
Genótipo	31.7240	3.23 - 311,4	0,003

4. DISCUSSÃO

A mutação C677T no gene MTHFR causa hiperhomocisteinemia e reduz os níveis de folato, além de estar associada com várias outras desordens orgânicas. A distribuição geográfica e étnica de seus alelos e genótipos associados têm sido pesquisada no mundo todo (Wang *et al.*, 2016). Estes dados tem revelado uma significativa heterogeneidade na frequência do alelo T e da homozigose TT que existe em todas as populações e até mesmo em grupos raciais.

Devido sua relevância genética e médica, e a escassez de estudos sobre sua prevalência na região Amazônica, investigou-se as frequências genotípicas do SNP C677T em comunidades ribeirinhas localizadas às margens dos rios Tapajós e Tocantins, no estado do Pará. Além disso, este estudo buscou identificar a relação entre este polimorfismo e a hipertensão arterial, uma vez que tem sido considerado um fator de risco genético para vários agravos à saúde (Acácio *et al.*, 2005; Urpia *et al.*, 2009).

No Brasil, entre as suas regiões geográficas constata-se uma elevada heterogeneidade genética, cujas frequências estimadas diferem de acordo com a contribuição étnica das populações, assim como observado para outras populações do globo. De modo que, as frequências dos genótipos C677T variam de 44% (Pará) a 64,9% (Minas Gerais) para o CC, de 28,7% (Pernambuco) a 44% (Pará) para o heterozigoto, CT, e de 2,7% (Minas Gerais)

a 17,5% (Rio Grande do Sul) para o genótipo homozigoto mutante TT, já as frequências alélicas variam de 62% (Rio Grande do Sul) a 77,3% (Pernambuco) para o alelo C e de 19% (Minas Gerais) a 33,9% (Pará) para o alelo T (revisado em Ferreira-Fernandes *et al.*, 2012).

As frequências genotípicas (CC= 74,0%, CT= 23,0% e TT= 3,0%) e alélicas (C= 85,0% e T= 15,0%) encontradas na população do vale do rio Tapajós, são semelhantes aquelas verificadas por Urpia *et al.* (2009) em uma população de adultos de Salvador, cujas frequências genotípicas foram de 63% para o genótipo CC, 31% para o heterozigoto CT e 6% para o TT e frequências alélicas de 78% para o alelo C e 22% para o alelo T, estando também de acordo com o modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação à população do vale do rio Tocantins, as frequências genotípicas de CC (69,0%), CT (17,5%) e TT (13,5%) verificadas neste estudo não parecem, pelo menos virtualmente, ser tão discrepantes daquelas já descritas em diferentes estados brasileiros, apesar de não se adequarem ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Romero-Sánchez *et al.* (2015) também relataram uma prevalência semelhante do genótipo TT (13.2%) na Colômbia, assim como Vieira (2013) em Belém do Pará (11%) e Ferreira-Fernandez (2012) em Parnaíba-Piauí (8,5%). Adicionalmente, em relação à região Norte a frequência do genótipo TT não diferiu (9%) (Zanrosso *et al.*, 2005).

Como foi verificado que a amostra do vale do Tocantins não se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para excluirmos qualquer possibilidade de erro laboratorial, os testes foram repetidos, sempre utilizando amostras controles para a digestão enzimática, e os resultados permaneceram os mesmos, tanto no primeiro quanto nos testes subsequentes. Isto nos leva a acreditar que não se trata de um erro de tipificação do marcador gênico analisado. Por outro lado, estes achados devem inicialmente ser tomados com cautela, pois são dados ainda preliminares envolvendo um pequeno tamanho amostral, que pode interferir no poder dos testes estatísticos, dificultando uma análise de associação mais precisa e de certo modo revela a necessidade de complementar e dar continuidade a este estudo com uma abordagem mais extensiva a nível molecular.

A pressão arterial, um bom indicador do risco para doença cardiovascular, é um parâmetro relativamente fácil de medir em campo, mesmo em condições remotas. No presente estudo, a frequência de hipertensão arterial foi semelhante nas duas localidades analisadas, 21,5% no vale do Tapajós e 23% no vale do Tocantins. De acordo com a “VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010)” estudos de prevalência, regionais e isolados, supõem que em torno de 30 % da população adulta no Brasil apresenta hipertensão arterial sistêmica.

Constatou-se uma relação entre a idade avançada (≥ 45 anos) e a pressão alterada em ambas as populações estudadas, com prevalências de 32% no vale do Tocantins e de 34,5% no vale do Tapajós. Em um levantamento realizado em 15 capitais brasileiras, foi demonstrado que na capital do estado do Pará, Belém, a prevalência de hipertensão foi de 26,3% e 39%, entre indivíduos nas faixas etárias de 40 a 59 anos e acima de 60 anos, respectivamente (Brasil, 2006). No estudo realizado por Fillion *et al.* (2006) com indivíduos adultos que viviam em seis diferentes comunidades ao longo do rio Tapajós, incluindo São Luiz do Tapajós, uma das comunidades avaliadas neste estudo, verificaram que a PA sistólica esteve positivamente associada com a idade, onde a PA sistólica era elevada acima dos 50 anos de idade.

A hipertensão é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardíacas e cerebrovasculares (Burgos *et al.*, 2014). Vários estudos indicam que o SNP C677T no gene da enzima MTHFR está associado a um risco aumentado para doenças cardiovasculares e hipertensão (Gupta *et al.*, 2012; Bayramoglu *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013; Zhao & Jiang, 2013).

Na população do Tapajós constatou-se uma dependência entre a hipertensão arterial e a variante termolábil do SNP C677T, fato também constatado por Wen *et al.* (2015) em uma análise com hipertensos na China e por Ghogomu *et al.* (2016) em camaroneses, onde a frequência do genótipo TT apresentou-se superior nos indivíduos hipertensos em relação àqueles normotensos. Assim, no presente estudo, a taxa do genótipo TT foi significativamente maior nos indivíduos com pressão alterada, do que naqueles com pressão normal, sugerindo que o SNP C677T no gene MTHFR pode ser um fator de risco para hipertensão nesta população. Por outro lado, na

população do Tocantins, houve uma maior proporção do genótipo TT entre os indivíduos normotensos.

Ressalta-se que na população do Tocantins as frequências genóticas se encontravam em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, isto pode ser devido ao grau de endogamia que ocorre nesta população, em consequência de um efeito fundador e do isolamento parcial entre os indivíduos proporcionado pela distribuição destas comunidades entre as diferentes ilhas que formam a região.

Deve ser salientado que dados contraditórios encontrados neste e em diversos estudos da associação entre a pressão arterial e o SNP C677T, podem ser resultantes de diferentes padrões de exposição aos fatores de risco ambientais e de uma combinação aleatória de variantes de suscetibilidade.

As comunidades avaliadas no rio Tapajós e no rio Tocantins possuem características em comum como os aspectos demográficos, de saneamento, saúde, hábitos culturais, além da alimentação predominante ser o pescado. No que diz respeito às variáveis sociodemográficas, estas comunidades diferiram em relação à faixa etária, ao estado civil, a atividade laboral e a renda familiar. Ressalta-se que, devido à natureza remota da localização destas comunidades observou-se que elas apresentaram uma baixa renda familiar, sendo que a maior proporção dos participantes foi de mulheres ribeirinhas, casada ou vivendo em união estável e tendo como fonte de recursos o recebimento de aposentadoria, no entanto, a maior proporção de pessoas com idade acima de 45 anos estava presente no vale do Tapajós.

Então, os principais achados deste estudo revelaram uma associação entre o SNP C677T do gene MTHFR e a idade com a pressão arterial sistêmica, onde indivíduos portadores do alelo mutante T e com idade superior a 45 anos demonstram predisposição para a hipertensão nas comunidades do rio Tapajós.

5. CONCLUSÕES

✓ As frequências genotípicas e fenotípicas da variante C677T no gene MTHFR encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg somente na amostra do vale do rio Tapajós.

✓ Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes nos níveis de pressão arterial sistólica e/ou diastólica entre as regiões de estudo.

✓ Foi observada uma maior proporção de indivíduos com pressão arterial alterada nos indivíduos acima de 45 anos em ambas as populações estudadas.

✓ Foi constatada uma dependência entre a hipertensão arterial e a presença do SNP C677T no gene MTHFR, havendo uma maior frequência do genótipo TT em indivíduos com pressão alterada nos indivíduos do vale do Tapajós.

✓ O perfil sociodemográfico das populações analisadas revelou que a maioria era do sexo feminino, pardas ou negras, com ensino fundamental, que não apresentavam comorbidades associadas e que eram não etilistas e tabagistas.

✓ Na população do vale do Tapajós, a presença do genótipo TT e a faixa etária acima de 45 anos são fatores de risco que aumentam a probabilidade de apresentar hipertensão arterial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acácio, G.L.; Barini, R.; Bertuzzo, C.S.; Couto, E.C.; Anninchino-Bizzancchi, J.M.; Junior, W.P.; Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. **Prenat Diagn.** 25(13):1196-9, 2005.

Andreassi, M.G.; Botto, N.; Cocci, F.; Battaglia, D.; Antonioli, E.; Masetti, S.; Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. **Hum Genet.** 2003; 112(2):171-7.

Arruda, V.R.; Siqueira, L.H.; Gonçalves, M.S.; von Zuben, P.M.; Soares, M.C.P.; Menezes, R.; Annichino-Bizzacchi, J.M.; Costa, F.F.; Prevalence of the mutation C677 →T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics.** 78:332-335, 1998.

Ayres, M; Ayres JR, M; Ayres, D L & Santos A A. **Bioestat 5.0.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá. 364p, 2007.

Bayramoglu A, Urhan Kucuk M, Guler HI, et al. (2013) Is there any genetic predisposition of MMP-9 gene C1562T and MTHFR gene C677T polymorphisms with essential hypertension? *Cytotechnology* [Epub ahead of print]; PMID: 24254300.

Boduroglu, K.; Alanay, Y.; Koldan, B.; Tuncbilek, E.; Methylenetetrahydrofolate Reductase enzyme polymorphism: Maternal risk for Down Syndrome among Turkish women. **Am.J.Med.genet.** 127A: 5-10, 2004.

Borges, L.M.P.; Peres, M.A.; Horta, B.L.; Prevalência de níveis pressóricos elevados em escolares de Cuiabá, Mato Grosso. **rev. Saúde Pública** vol.41 no.4, 2007.

Burgos, P F M, Costa, W, Bombig, M T N, Bianco, H T. Obesidade como fator de risco para a hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol. 21(2):68-74, 2014.

Bydlowski, S.P.; Magnanelli, A.C. Chamone, D.A.F.; Hiper-Homocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**; 71(1):69-76, 1998.

Coşar, A.; Ipçioğlu, O.M.; Özcan, O.; Gültepe, M.; Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. **Turk J Med Sci.** 44:1-9, 2014.

Crott JW, Fenech M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis.* 16(3):213-7, 2001.

Dedoussis G.V.Z.; Panagiotakos D.B.; Pitsavos C.; Chrysohoou C.,; Skoumas J.; Choumerianou D.; An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. **Int J Cardiol.** 100:409-14, 2005.

Durand, P.; Prost, M.; Loreau, N.; Lussier-Cacan, S.; Blache, D.; Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. **Lab Invest.** 81(5):645-72, 1997.

Ferreira-Fernades, H.; Fernandes, H.F.; Neto, A.P.A.; Costa, P.N.; Yoshioka, K.N.; Pinto, G.R.; Prevalência do polimorfismo C677T do gene MTHFR em uma população de idosos. **The Endocrine Society.** 100:409-14, 2012.

Frosst, P.; Blom, H.J; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A; Matthews, R.G.; Boers, G.J.H.; den Heijer, M.; Kluijtmans, L.A.J.; van den Heuvel, L.P. & Rozen, R.; A candidate genetic risk vascular disease a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics.** 10:111-113, 1995.

Gokcen, C.; Kocak, N.; Pekgor, A.; Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Children With Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **International Journal of Medical Sciences.** 8(7):523-528, 2011.

Goyette, P.; Sumner, J.S.; Milos, R.; Duncan, A.M.V.; Rosenblatt, D.S.; Matthews, R.G. & Rozen, R.; Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nature Genetics.** 7:195-200, 1994.

Goyette, P.; Pai, A.; Milos, R.; Frosst, P.; Tran, P.; Chen, Z.; Chan, M.; Rozen, R.; Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian Genome,** 9:652-656, 1998.

Grillo, L.; Acácio, G.; Pinto, W.; Bertuza, C.; mutações no gene da Metilenotetrahidrofolato Redutase e Síndrome de Down. **Caderno de Saúde pública, Rio de Janeiro.** 18 (6): 1795 – 1797, 2002.

Gupta SK, Kotwal J, Kotwal A, et al. Role of homocysteine & MTHFR C677T gene polymorphism as risk factors for coronary artery disease in young Indians. **Indian J Med Res** 135:506–512, 2012.

Gueant, J.L; Gueant-Rodriguez, R.M; Anelo, G.; Genetic determinat of folate and vitamin B12 metabolism: Commom pathway in neural tube defect and Down Syndrome. **Clin Chem. Lab. Med.** 41: 1473-1477, 2003.

Herkenhoff, M.E; Backes, R.G.; Gaulke, R.; Remualdo, V.R.; Frequência genotípica em amostras de MTHFR para o polimorfismos C677T em pacientes da cidade de Curitiba-PR. **J. Bras Patol Med Lab.** 6:435-438, 2012.

James, S.J.; Pogribna, M.; Pogrybini, I.P.; Melnyk, S.; Hine, J.; Gibson, J.B.; Yi, P.; Tafoya, D.L.; Swenson, D.H.; Wilson, V.L.; Gaylor, D.W. Abnormal folate metabolism and mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene may be maternal risk factors for Down Syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70:495-501, 1999.

Jee S.H.; Song K.S.; Shim W.H.; Kim H.K.; Suh I.; Park J.Y.; Major gene evidence after MTHFR-segregation analysis of serum homocysteine in families of patients undergoing coronary arteriography. **Hum Genet**. 111:128-35, 2002.

Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisym J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **Am J Hum Genet**. 43(4):414-21, 1988.

Kang SS. Treatment of hyperhomocysteinemia: physiological basis. **J Nutr**. 126 (Suppl 4):1273-5, 1996.

Kang S, Zhao X, Liu L, et al. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with hemorrhagic stroke: a meta-analysis. **Genet Test Mol Biomarkers**. 17:412–417, 2013.

Kutzbach, C.; Stokstad, E.L.R.; Mammalian Methylenetetrahydrofolate Reductase, Partial Purification, Properties and Inhibition by S-Adenosylmethionine. **Biochimica ET Biophysica ACTA**. 250:459-477, 1971.

Lolio, C.A.; Epidemiologia da hipertensão arterial. **rev. saúde pública**. vol.24 no.5 São Paulo Out. 1990.

Machado, M.C.; Pires, C.G.S.; William, L.M.; Concepções dos hipertensos sobre os fatores de risco para a doença. **Ciênc. saúde coletiva**. vol.17, no.5, 2012.

McColgan, P.; Sharma, P.; The genetics of carotid dissection: meta-analysis of a MTHFR/C677T common molecular variant. **Cerebrovasc Dis**. 25(6):561-5, 2008.

Melo S.S. Efeito da suplementação com ácido fólico sobre as concentrações de homocisteína em diferentes genótipos da metilenotetra-hidrofolato redutase em pacientes diabéticos tipo 2 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA. from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**. 16:1215, 1988.

Muniz, M.T.C.; Siqueira, E.R.F.; Fonseca, R.A.; Almeida, V.; Hotta, J.K.; Santos, J.E.; Cavalcanti, M.S.M.; Sampaio, C.A.M.; Avaliação da relação entre o polimorfismo C677T no gene para MTHFR e a concentração plasmática de homocisteína na doença arterial coronariana. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 50:1059-1065, 2006.

Neves, L.B.; Macedo, D.M.; Lopes, A.C.; Homocisteína. **J Bras Patol Med Lab.** 40(5):311-320, 2004.

O'Leary, V.B.; Parle-Mcdermott, A.; Molly, A.M.; MTRR and MTHFR Polymorphisms: Link to Down Syndrome. **Am. Jounal Med. Genet.** 107:151-155, 2002.

Organização Mundial da Saúde. **Estatísticas da Saúde Mundial 2012.** Geneva: OMS; 2012.

Organização Mundial da Saúde. International Program on Chemical Safety (IPCS). Methylmercury. Environmental health criteria 101. **World Health Organisation, Genebra, Switzerland.** 1990.

Prefeitura Municipal de Limoeiro do Ajuru, Secretaria de Saúde de Igarapé-Miri, Estado do Pará. **Plano Municipal de Saúde do Município de Igarapé-Miri.** Igarapé-Miri, Pará, Brasil: Prefeitura Municipal de Igarapé-Miri, 2012.

Takamura, N.; Kodoh, T.; Ohgi, S.; Mine, M.; Yamashita, S.; Aoyagi, K.; Abnormal folic acis-homocysteine metabolism as maternal risk factor for Down Syndrome in Japan. **Eur.J.nutr.** 1-3, 2004.

Urpia, C.C.; Estudo dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C do gene da metilenotetrahidrofolato redutase e 66A>G do gene da metionina sintetase redutase e a relação com a ocorrência da síndrome de down. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da Fundação Osvaldo Cruz 2009.

Vannucchi, H.; Melo, S.S.; Hyperhomocysteinemia and cardiometabolic risk. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** 53 (5): 540-549, 2009.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **Arq. Bras. Cardiol.** vol.95, No.1, 2010.

Xuan, C.; Li, H.; Zhao, J.X.; Wang, H.W.; Ping, C.P.; Liu, Z.; Zhang, B.B.; He, G.W.; Lun, L.M.; Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: A meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. **Sci Rep.** 4:7311, 2014.

Wen-Xing Li.; Shao-Xing; Dai, J.J.Z.; Jia-Qian L.; Jing-Fei H.; Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. **Nutrients.** 7, 6670-6687, 2015.

Zhao X.; Jiang H.; Quantitative assessment of the association between MTHFR C677T polymorphism and hemorrhagic stroke risk. **Mol Biol Rep.** Jan; 40(1):573-8. 2013.

Zetterberg, H.; Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 2(7):1-8, 2004.

World Health Organization (WHO). International program in Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 101: Methylmercury.** Geneva, Switzerland WHO, 1990.

ANEXO

FORMULÁRIO DE PESQUISA

Município: _____

Comunidade: _____

VARIÁVEIS SOCIOEPIDEMIOLÓGICAS

1. Nome: _____

2. Idade: _____ 3. Sexo: () Masculino () Feminino

4. Raça/Cor: () Branca () Preta () Parda () Amarela () Indígena

5. Escolaridade:

- () Sem escolaridade () Ens. Fundamental Incompleto
() Ens. Médio Completo () Ens. Fundamental Completo
() Ens. Superior Incompleto () Ens. Médio Incompleto
() Ens. Superior Completo

6. Estado Civil: () Casada () Solteira () União Estável () Separada () Viúva

7. Ocupação 8. Renda Familiar: _____

ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS

	NÃO	SIM		NÃO	SIM
Hipertensão arterial?			Doença cardiovascular?		
Diabetes mellitus?			Doença reumática?		
Doença renal?			Hepatite?		
Já realizou endoscopia?			Transfusão Sanguínea?		
Hemodiálise?			Internação Hospitalar?		
Fumante?			Tatuagem?		
Já tratou alguma DST?			Etilista?		

HISTÓRIA ALIMENTAR

EXAME FÍSICO

Queixa principal: _____

TAbd: _____ TAbc: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ G. CA: _____

Sinais vitais: PA: _____ FC: _____ FR: _____ T: _____