



UNIRIO

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Instituto Biomédico

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL EM
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE NO RIO DE JANEIRO**

Bruna Marchesini Silva

Orientador: Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Coorientadora: Dra. Verônica Marques Zembrzuski

Rio de Janeiro

2017

Bruna Marchesini Silva

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL EM
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE NO RIO DE JANEIRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Dr. Pedro Hernan Cabello Acero
Coorientadora: Dra. Verônica Marques Zembrzusi

Rio de Janeiro
2017

Bruna Marchesini Silva

**ESTUDO DE GENES CANDIDATOS À HIPERTENSÃO ARTERIAL EM
INDIVÍDUOS COM OBESIDADE NO RIO DE JANEIRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dra. Giselda Maria Kalil de Cabello (doutora em Biologia Celular e Molecular) IOC –
Fiocruz

Dra. Lucia Elena Alvarado Arnez (doutora em Biologia Celular e Molecular) IOC –
Fiocruz

Dr. Fernando Regla Vargas (doutor em Ciências Biológicas - Genética) IOC –
Fiocruz

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que lutam por um mundo mais justo, obrigada pelo exemplo de vocês. À Madre Teresa de Calcutá, Nelson Mandela, Martin Luther King, Mahatma Gandhi, Dalai Lama, Papa Francisco, Kathryn Bolkovac, Sir Nicholas Winton, Irena Sendler Erin Gruwell, Kimani Maruge Ng'ang'a, Erin Brockovich e todos os outros que, no anonimato, tentam tornar esse mundo um lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pois se pude enxergar mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

À minha irmã, minha green eyes, you're the rock upon which I stand.

Ao João Miguel, meu maior companheiro, encontre-me em Tompinks Square Park.

Aos meus avós, primos, tios e padrasto, obrigada por todo carinho e apoio.

A todos os integrantes do Laboratório de Genética Humana, muito obrigada pela acolhida. Não poderia ter encontrado pessoas melhores. Saibam que todos tiveram participação fundamental na escrita dessa dissertação. As vozes e ideias de vocês ecoam por essas páginas.

Ao meu orientador Pedro Cabello, que acreditou em mim e permitiu que eu fizesse parte, ainda que brevemente, da família LGH.

À minha coorientadora Verônica, agradeço pela orientação, por todo o apoio, confiança e o conhecimento que adquiri ao longo desses dois anos contigo.

Ao Mário, que me ajudou a enfrentar o difícil momento da escrita da dissertação, muito obrigada por todas as suas contribuições.

À Carol, minha parceira da obesidade, I wouldn't have done it without you. Meus mais sinceros agradecimentos pela sua amizade e por todo o trabalho e tempo que me foram dedicados.

Às Fiolindas, obrigada por terem se tornado tão importantes para mim.

A todos os integrantes da ONG GRACO, os verdadeiros heróis são vocês.

Às Agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq, em especial a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

ÍNDICE

Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 Introdução	1
1.1 Etiologia da doença	1
1.2 Consequências da HAS	2
1.3 Epidemiologia	3
1.3.1 No mundo	3
1.3.2 No Brasil	4
1.4 O controle da pressão arterial no organismo	7
1.4.1 O mecanismo neural	8
1.4.2 O sistema endócrino-renal	9
1.4.3 Os mecanismos locais	11
1.5 Fatores de risco para o desenvolvimento da HAS	11
1.6 A obesidade e a HAS	12
1.6.1 Alterações no SNS	13
1.6.2 Alterações no SRAA	13
1.6.3 Alterações nos mecanismos locais de controle da pressão arterial	14
1.7 Genética da obesidade e hipertensão	14
1.8 Fatores Genéticos que causam diretamente a HAS	16
2 Objetivos	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 Material e Métodos	20
3.1 Desenho experimental	20
3.2 Caracterização da amostra	20
3.3 Medidas antropométricas	21
3.3.1 Índice de massa corporal (IMC)	21
3.3.2 Medida da circunferência da cintura e do quadril	21
3.4 Medidas Pressóricas	22
3.5 Coleta de Sangue	22
3.6 Análise Molecular	22
3.6.1 Extração de DNA	22
3.6.2 Estimativa da concentração de DNA	22
3.6.3 Gene <i>ECA</i>	23
3.6.3.1 Reação de PCR	23
3.6.3.2 Visualização em gel de agarose	24
3.6.3.3 Confirmação dos genótipos DD	24

3.6.4 Genes <i>ADRB1</i> e <i>AGTR1</i>	25
3.6.5 Gene <i>GSTM1</i>	27
3.6.5.1 Reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)	27
3.6.5.2 Reação de PCR alelo-específico para confirmação do genótipos nulos	28
3.6.6 Análise de SNPs pela técnica Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC	29
3.6.6.1 Fluxograma do trabalho	31
3.6.6.2 Preparo da Placa de Estoque das Sondas	31
3.6.6.3 Preparo do <i>Mix</i> de Sondas e montagem da placa de sondas	33
3.6.6.4 Preparo do <i>Mix</i> de Amostras e montagem da placa de amostras	34
3.6.6.5 <i>Priming</i> do Chip	34
3.6.6.6 Adição das amostras e sondas ao chip	35
3.6.6.7 Reação de PCR em tempo real	36
3.7 Análise estatística	36
4 Resultados	38
4.1 Descrição da amostra	38
4.2 Análises genéticas	38
4.2.1 Gene <i>ECA</i>	38
4.2.1.1 Amplificação do gene <i>ECA</i>	38
4.2.1.2 Confirmação dos genótipos <i>ECA DD</i>	39
4.2.2 Genes <i>ADRB1</i> e <i>AGTR1</i>	41
4.2.3 Gene <i>GSTM1</i>	42
4.2.4 Análise de SNPs pela técnica Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC	44
4.2.4.1 Polimorfismos associados à HAS	56
4.2.4.2 Polimorfismos associados às variáveis antropométricas e pressóricas	56
5 Discussão	58
5.1 Peso corporal, IMC e a HÁ	59
5.2 CC, CQ e RCQ e a HAS	59
5.3 Gene <i>ECA</i>	60
5.4 Gene <i>GSTM1</i>	61
5.5 Genes <i>ADRB1</i> e <i>AGTR1</i>	62
5.6 Análise de SNPs pela técnica Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC	63
5.6.1 Associação dos genótipos e alelos com a HAS	63
5.6.1.1 <i>NOS2</i>	63
5.6.1.2 <i>IL10</i>	64
5.6.1.3 <i>MIFAS</i>	65
5.6.1.4 <i>IL6</i>	66

5.6.1.5 GC	67
5.6.1.6 CYP24A1	68
5.6.1.7 MBL2	68
5.6.2 Associação entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos	69
5.6.2.1 rs379527 (TNFSF14)	70
5.6.2.2 rs1800871 (IL10)	71
5.6.2.3 rs1554286 (IL10)	71
5.6.2.4 rs755622 (MIFAS)	72
5.6.2.5 rs2069837 (IL6)	72
5.6.2.6 rs2069845 (IL6)	73
5.6.2.7 rs2069832 (IL6)	73
5.6.2.8 rs1800795 (IL6)	74
5.6.2.9 rs1800450 (MBL2)	75
5.6.2.10 rs7096206 (MBL2)	75
5.6.2.11 rs8072199 (NOS2)	75
5.6.2.12 rs731236 (VDR)	76
5.6.2.13 rs2282697 (GC)	77
5.6.2.14 rs2234167 (TNFRSF14)	77
5.6.2.15 rs1861493 (IFNG)	78
5.6.2.16 rs7138803 (FAIM2)	78
5.6.2.17 rs1024611 (MCP1)	79
5.7 Correção para análises múltiplas	80
5.8 A real influência do componente genético na etiologia da HAS	81
6 Conclusões	83
7 Referências Bibliográficas	85
8 Anexo 1 – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)	99
9 Anexo 2 – Tabela de associação dos genótipos e alelos com a HAS para os SNPs que não apresentaram resultados significativos	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores pressóricos e o quadro da hipertensão	2
Figura 2: Mapa da prevalência da HAS ao redor do mundo. Brasil destacado em azul	4
Figura 3: Gráfico da Prevalência da Hipertensão no Brasil em pessoas acima de 18 anos segundo o sexo, os grupos de idade e o nível de instrução	5
Figura 4: Ranking das 10 maiores causas de morte no Brasil – Uma comparação entre as pesquisas de 2000 e 2012	7
Figura 5: Os três principais mecanismos de controle da pressão arterial no organismo. Fonte: Adaptado de CHOPRA <i>et al.</i> , 2011	8
Figura 6: O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	10
Figura 7: Principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão e suas complicações	12
Figura 8: Principais loci recém-identificados em estudos do tipo GWAS que foram associados à hipertensão, à pressão arterial sistólica (PAS), à pressão arterial diastólica (PAD) e à pressão de pulso (PP). A pressão de pulso pode ser definida como a diferença entre a PAS e a PAD	17
Figura 9: Esquema do desenho experimental do estudo	20
Figura 10: Gráfico Multicomponente do PCR em Tempo Real mostrando a fluorescência das sondas VIC e FAM	26
Figura 11: Chip do Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC	30
Figura 12: Fluxograma de atividades para a realização do experimento	31
Figura 13: Modelo da Placa de Estoque das sondas para Chip GT 48x48	33
Figura 14: Esquema do chip GT 48x48	35
Figura 15: Mapa de pipetagem do chip 48x48	36
Figura 16: Visualização em gel de agarose 1,5% do resultado do INDEL do gene <i>ECA</i>	39
Figura 17: Visualização em gel de agarose 1,5% da confirmação dos genótipos DD	40
Figura 18: Confirmação dos pacientes identificados como nulos pelo PCR em Tempo Real em gel de Agarose 1,5%	43
Figura 19: Resultados da técnica Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC, com a discriminação alélica de quatro polimorfismos, além das curvas individuais de cada paciente	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes associados ao desenvolvimento da obesidade e da HAS	15
Tabela 2: Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene <i>ECA</i>	23
Tabela 3: Condições utilizadas na PCR para confirmação dos genótipos DD do gene <i>ECA</i>	25
Tabela 4: Condições de reação de qRT-PCR dos genes <i>ADRB1</i> e <i>AGTR1</i>	27
Tabela 5: Condições utilizadas na reação de qRT-PCR do gene <i>GSTM1</i>	28
Tabela 6: Condições da reação de PCR alelo-específico do gene <i>GSTM1</i>	29
Tabela 7: Quantidade de reagentes usados nos preparo do <i>Mix</i> de Sondas	33
Tabela 8: Quantidade de reagentes usados nos preparo do <i>Mix</i> de Sondas	34
Tabela 9: Análise das variáveis descritivas da amostra de obesos	38
Tabela 10: Comparação das frequências genótípicas e alélicas de <i>ECA</i> entre hipertensos e normotensos	40
Tabela 11: Comparação das frequências genótípicas e alélicas de <i>ADRB1</i> e <i>AGTR1</i> entre hipertensos e normotensos	41
Tabela 12: Comparação das frequências genótípicas de <i>GSTM1</i> entre hipertensos e Normotensos	44
Tabela 13: Associação dos genótipos e alelos com a hipertensão	46
Tabela 14: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos na amostra total	52
Tabela 15: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos no grupo de hipertensos	53
Tabela 16: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos no grupo de normotensos	54
Tabela 17: Associação dos genótipos e alelos com a hipertensão para os SNPs que não apresentaram resultados significativos	103

ABREVIATURAS

25 (OH) D	25-hidroxivitamina D
ADRB1	Receptor β -adrenérgico 1
AGTR1	Receptor de angiotensina I
AVC	Acidente vascular cerebral
CC	Circunferência da cintura
CQ	Circunferência do Quadril
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina I
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FRDE	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
GSTM1	Glutathione S-transferase mu 1
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iIMC	Índice de massa corpóral inverso
IMC	Índice de Massa Corporal
INDEL	<i>Small insertions and deletions</i>
Kg/m ²	Kilograma por metro quadrado
MAF	Menor frequência alélica
mmHg	Milímetros de Mercúrio
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
ONG	Organização não-governamental
OR	<i>Odds Ratio</i>
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

qRT-PCR	PCR em Tempo Real
RCQ	Razão Cintura/ Quadril
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNP	Polimorfismo de Base Única
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

MARCHESINI, Bruna. Estudo de genes candidatos à hipertensão arterial em indivíduos com obesidade no Rio de Janeiro. 2017. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) caracteriza-se por níveis crônicos de pressão arterial (PA) elevada ($\geq 140/90$ mmHg). Essa patologia representa um grave problema de saúde pública mundial e raramente causa sintomas nos estágios iniciais da doença. Ainda assim, ocasiona danos e alterações aos principais órgãos, como o coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, bem como alterações metabólicas. Como consequência, a hipertensão é considerada um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cerebrovasculares, renais e cardiovasculares em todo o mundo. Em 2012, estima-se que essa doença tenha sido responsável por um quarto das 52,8 milhões de mortes registradas. A prevalência mundial de hipertensão em adultos foi de cerca de 22% em 2014. No Brasil, estima-se que a prevalência da hipertensão varia entre 22% e 44% para adultos (32% em média). Ademais, essa doença ficou em 6º lugar no ranking das 10 maiores causas de morte no país. O acúmulo excessivo de tecido adiposo, por exemplo, está associado a alterações no sistema cardiovascular, incluindo um aumento da pressão arterial. A HAS e a obesidade apresentam características multifatoriais determinadas por uma interação complexa entre o *background* genético e o ambiente, onde diversos genes contribuem para a determinação de cada uma dessas doenças. Dessa forma, esse estudo buscou investigar a relação entre polimorfismos - que haviam sido previamente relacionados à hipertensão - e o desenvolvimento da HAS em indivíduos com obesidade. Ademais, procurou-se analisar também a influência destes SNPs em parâmetros antropométricos e pressóricos. Foram analisados 311 indivíduos obesos, sendo 212 pacientes hipertensos e 99 normotensos. Os polimorfismos estudados do projeto foram analisados por PCR em tempo real usando sondas TaqMan, PCR convencional e PCR em Tempo Real Fluidigm 48.48 Dynamic Array™. Nossos principais resultados mostraram que indivíduos obesos hipertensos exibem valores maiores de peso, IMC, circunferência da cintura (CC), circunferência do quadril (CQ) e razão cintura/quadril (RCQ), quando comparados aos normotensos. Em relação às análises moleculares SNPs dos genes *NOS2* (rs8072199), *IL10* (rs1554286, rs1800896 e rs1800871) *MIS-AS* (rs755622), *IL6* (2069837), *GC* (rs2282697), *CYP24A1*(rs6013897) e *MBL2* (rs1800450 e rs7096206) foram associados ao risco de desenvolver hipertensão. Com relação aos parâmetros pressóricos e antropométricos, o polimorfismo rs379527(*TNFSF14*) foi associado a um maior peso corporal e dentro do grupo de hipertensos, a uma maior RCQ; o SNP rs1800871 (*IL10*) foi relacionado a maiores valores de IMC, CC e PAD, assim como o rs1554286 (*IL10*) mostrou-se associado a um IMC mais alto. Ademais, o rs755622 (*MIFAS*) foi associado a menores valores de peso e circunferência da cintura e no grupo de normotensos a um menor peso. Foi observado também que o rs2069837 (*IL6*) está relacionado a valores menores de RCQ e dentro do grupo de hipertensos a menores valores de peso, RCQ e CC. Os SNPs rs1800450 e rs7096206 (ambos do gene *MBL2*) foram associados a maiores valores de CQ e peso, respectivamente. No grupo de indivíduos hipertensos o rs2069845 (*IL6*) foi associado à uma

PAS e PAD menores. O SNP rs8072199 (*NOS2*) foi associado a uma menor PAD, enquanto que o rs731236 (*VDR*) a valores maiores de PAS. Para as análises dentro no grupo de normotensos, os rs2069832 e rs1800795 (ambos do gene *IL6*) apresentaram menores valores de peso corporal, IMC, CC e CQ. O rs7138803 (*FAIM2*) teve maiores valores de CC, enquanto que o rs1024611 (*MCP1*) teve menores valores para essa mesma variável. O rs2282697 (*GC*) teve maiores índices de RCQ, bem como o rs2234167 (*TNFRSF14*) foi relacionado a maiores valores de PAS. Por fim, o rs1861493 (*IFNG*) foi associado a menores valores de PAS. Os resultados encontrados nesse estudo perderam significância estatística após a correção para múltiplas análises. Nós concluímos que apesar das pesquisas e grandes estudos do tipo GWAS, ainda não é possível explicar o real impacto do componente genético na etiologia de hipertensão.

ABSTRACT

MARCHESINI, Bruna. Study of candidate genes for arterial hypertension in obese individuals in Rio de Janeiro. 2017. 136 pages. Dissertation (Master in Molecular and Cell Biology) - Biomedical Institute, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Essential hypertension (EH) is characterized by chronic levels of high blood pressure (BP) ($\geq 140/90$ mmHg). This pathology is considered a serious global public health problem which rarely causes symptoms in its early stages. However, it affects and damages the major organs in the body, such as the heart, brain, kidneys and blood vessels. It also produces complex metabolic changes in the system. Nevertheless, hypertension is considered one of the major risk factors for the development of cerebrovascular, renal and cardiovascular diseases worldwide. Researches reveal that this disease accounted for a quarter of the 52.8 million registered deaths. In 2014, the prevalence of hypertension in adults was about 22%. In Brazil, the prevalence of hypertension ranges from 22% to 44% for adults (32% on average). In addition, this disease had the 6th position in the ranking of the top 10 causes of death in the country. Excessive accumulation of adipose tissue, for example, is associated with changes in the cardiovascular system, including an increase in blood pressure. EH and obesity have multifactorial characteristics determined by a complex interaction between the genetic background and the environment, in which several genes contribute to the determination of each of these diseases. Thus, this study sought to investigate the relationship between certain polymorphisms - which had been previously related to hypertension - and the development of hypertension in individuals with obesity. In addition, we analyzed the influence of these SNPs on anthropometric and pressure parameters. A total of 311 obese individuals have been analyzed, where 212 were hypertensive patients and 99 were normotensive patients. The polymorphisms studied in the project were analyzed by real-time PCR using TaqMan probes, standard PCR and Real-Time PCR Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ technique. Our main results showed that hypertensive obese individuals exhibit higher values of weight, BMI, waist circumference (WC), hip circumference (HP) and WHR (waist/hip ratio), when compared to normotensive individuals. Regarding molecular analyzes, SNPs from NOS2 (rs8072199), IL10 (rs1554286, rs1800896 and rs1800871) MIFAS (rs755622), IL6 (2069837), GC (rs2282697), CYP24A1 (rs6013897) and MBL2 (rs1800450 and Rs7096206) have been associated with the risk of developing hypertension. Regarding pressure and anthropometric parameters, rs379527 polymorphism (TNFSF14) was has been associated with bigger body weight and, within the group of hypertensive individuals, a WHR; SNP rs1800871 (IL10) has been related to higher values of BMI, WC and diastolic blood pressure (DBP), and rs1554286 (IL10) has been associated with higher BMI. In addition, rs755622 (MIFAS) has been connected to lower body weight, WC and, in the normotensive group, with lower weight. It was also observed that rs2069837 (IL6) is related to lower values of WHR and, within the hypertensive group, with lower body weight, WHR and WC. SNPs rs1800450 and rs7096206 (both from MBL2 gene) were related to higher values of HC and weight, respectively. In the group of hypertensive individuals, rs2069845 (IL6) has been associated with lower systolic blood pressure (SBP) and DBP. SNP rs8072199 (NOS2) has been associated with lower DBP, whereas rs731236 (VDR) with higher values of SBP. For analyzes within the normotensive group, rs2069832 and rs1800795 (both from IL6) presented lower body weight, BMI, WC and HC. rs7138803

(FAIM2) had higher values of WC, while rs1024611 (MCP1) had lower values for the same variable. rs2282697 (GC) had higher WHR, whilst rs2234167 (TNFRSF14) has been related to higher SBP values. Finally, rs1861493 (IFNG) has been associated with lower SBP values. The results found in this study lost statistical significance after correction for multiple analyzes. We conclude that despite many researches and GWAS studies, it is still not possible to explain the real impact of the genetic component on the etiology of hypertension.

1) INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), também conhecida como pressão alta, caracteriza-se por níveis crônicos de pressão arterial (PA) elevada ($\geq 140/90$ mmHg). Essa patologia representa um grave problema de saúde pública mundial, podendo apresentar causas primárias ou secundárias. A hipertensão arterial secundária inclui as formas monogênicas de hipertensão e outras doenças que levam ao aumento da PA, como doença renal crônica, estenose da artéria renal e distúrbios endócrinos (LIN *et al.*, 2016). A hipertensão primária (também conhecida como essencial) é uma doença multifatorial, causada pela interação de fatores ambientais e poligênicos, e será o objeto de estudo dessa dissertação.

1.1) Etiologia da doença

A PA é a medida da força que está sendo exercida nas paredes das artérias quando o sangue é bombeado para fora do coração. Quanto maior a pressão, maior o estresse vascular sofrido pelos vasos sanguíneos e maior é o esforço do músculo cardíaco para bombear o sangue. A PA pode ser aferida utilizando-se um esfigmomanômetro e um estetoscópio e é representada por dois valores: a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD). A PAS pode ser considerada a pressão arterial máxima e é correspondente ao valor medido no momento em que o ventrículo esquerdo bombeia o sangue para a aorta. Já a PAD pode ser considerada a pressão arterial mínima e corresponde ao momento em que o ventrículo esquerdo relaxa e volta a encher-se de sangue para retomar o processo de circulação. A pressão arterial normal de um indivíduo adulto (Figura 1) é definida como uma PAS de 120 mmHg e uma PAD de 80 mmHg. Indivíduos com níveis pressóricos $< 140/90$ mmHg são denominados normotensos (BENETOS *et al.*, 1998; WHO, 2013).

Geralmente, indivíduos do sexo masculino apresentam valores maiores de PA e riscos aumentados de doenças cardiovasculares e renais, quando comparados a mulheres pré-menopáusicas com a mesma idade. Contudo, após a menopausa, a PA nas mulheres se eleva à níveis ainda maiores do que os dos homens (RECKELHOFF, 2001). Ademais, o aumento da PA é uma consequência inevitável

do envelhecimento, devido ao contínuo aumento da rigidez arterial ao longo dos anos. Consequentemente, uma alta proporção de indivíduos idosos acaba desenvolvendo hipertensão (PINTO, 2007).

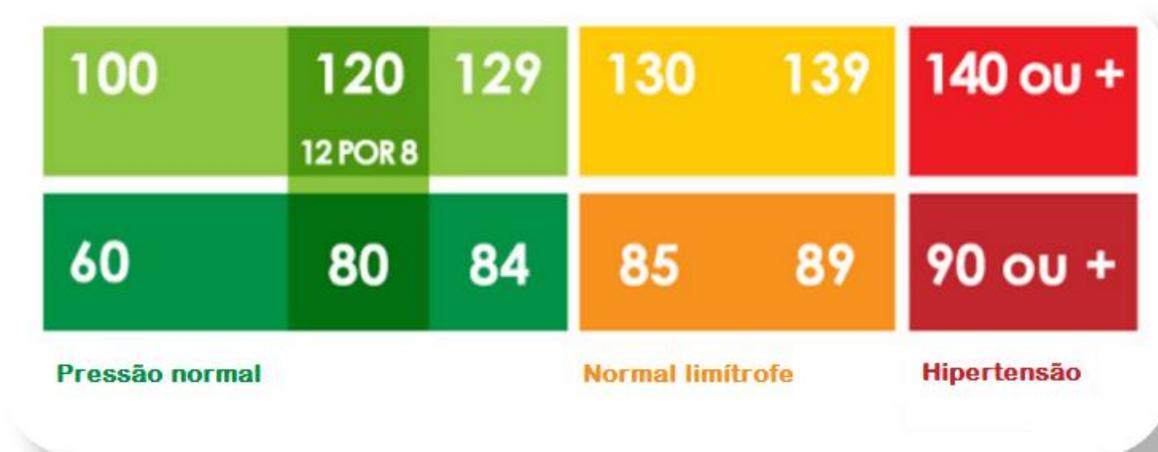


Figura 1: Valores pressóricos e o quadro da hipertensão. Fonte: Adaptado de: www.eusou12por8.com.br (2016)

1.2) Consequências da HAS

A HAS raramente causa sintomas nos estágios iniciais da doença e por isso é considerada um assassino silencioso (“*silent killer*”), ocasionando danos e alterações aos principais órgãos, como o coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, assim como alterações metabólicas. Como consequência, a hipertensão é considerada um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cerebrovasculares, renais e cardiovasculares em todo o mundo (WHO, 2013).

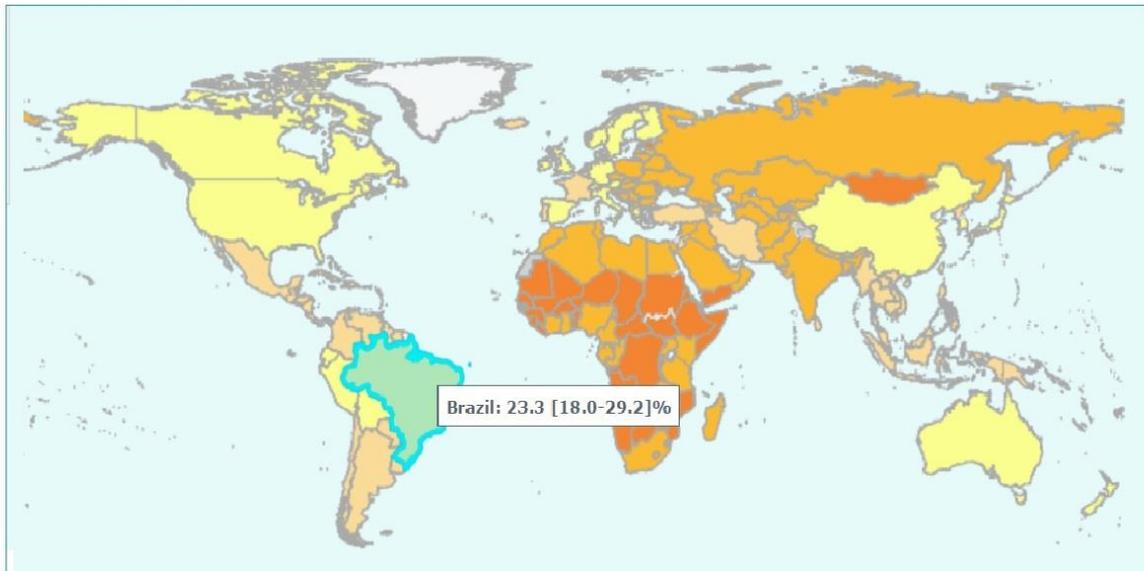
Em 2012, estima-se que essa doença tenha sido responsável por um quarto das 52,8 milhões de mortes registradas globalmente (PADMANABHAN *et al.*, 2015). As complicações causadas por essa patologia representam 9,4 milhões de mortes a cada ano, sendo responsável por pelo menos 45% das mortes por doenças cardíacas e 51% das mortes por acidente vascular cerebral (WHO, 2013). Além disso, a HAS é um dos principais fatores de risco para a demência, a insuficiência renal e para a morte materna e fetal durante a gravidez (CAMPBELL *et al.*, 2014).

1.3) Epidemiologia

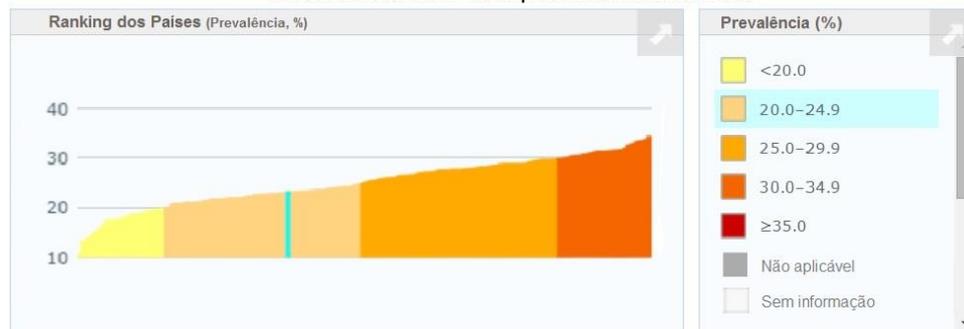
1.3.1) No mundo

A prevalência mundial de hipertensão em adultos com idade igual ou superior a 18 anos foi de cerca de 22% em 2014 (MENDIS, 2014). Contudo, acredita-se que esses valores possam estar subestimados, visto que o tratamento e o controle da HAS são por muitas vezes inadequados devido a deficiências nos sistemas de saúde ao redor do mundo, particularmente no nível de atenção primária. Alguns autores afirmam que cerca de 27% da população mundial seja hipertensa (PADMANABHAN *et al.*, 2015) e que em 2025, mais de 1,5 bilhões de pessoas em todo o mundo terão pressão alta (OLSEN *et al.*, 2016).

Nas regiões contempladas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a prevalência de hipertensão arterial foi mais elevada na África, onde aproximadamente 30% da população é hipertensa (Figura 2). A prevalência mais baixa da doença foi na região das Américas, com percentual de 18%. Entretanto, estima-se que apenas metade dos indivíduos hipertensos sejam diagnosticados, e desses, apenas metade sejam tratados. Dentre os indivíduos que recebem o tratamento, acredita-se que apenas a metade obtém sucesso em manter sua pressão controlada (BASU; MILLETT, 2013).



* Pressão sistólica ≥ 140 e pressão diastólica ≥ 90



© OMS 2015. Todos os direitos reservados.

Figura 2: Mapa da prevalência da HAS ao redor do mundo. Brasil destacado em azul. Fonte: Adaptado de WHO, 2014.

1.3.2) No Brasil

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, a prevalência da hipertensão no Brasil varia entre 22% e 44% para adultos (32% em média), chegando a mais de 50% para indivíduos com 60 a 69 anos e 75% em indivíduos com mais de 70 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Um estudo feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2013, calculou que aproximadamente 31,3 milhões de brasileiros tinham pressão alta (21,4%), sendo

que uma maior proporção de mulheres se autodeclarou hipertensa (24,2%), em relação aos homens (18,3%) (Figura 3).

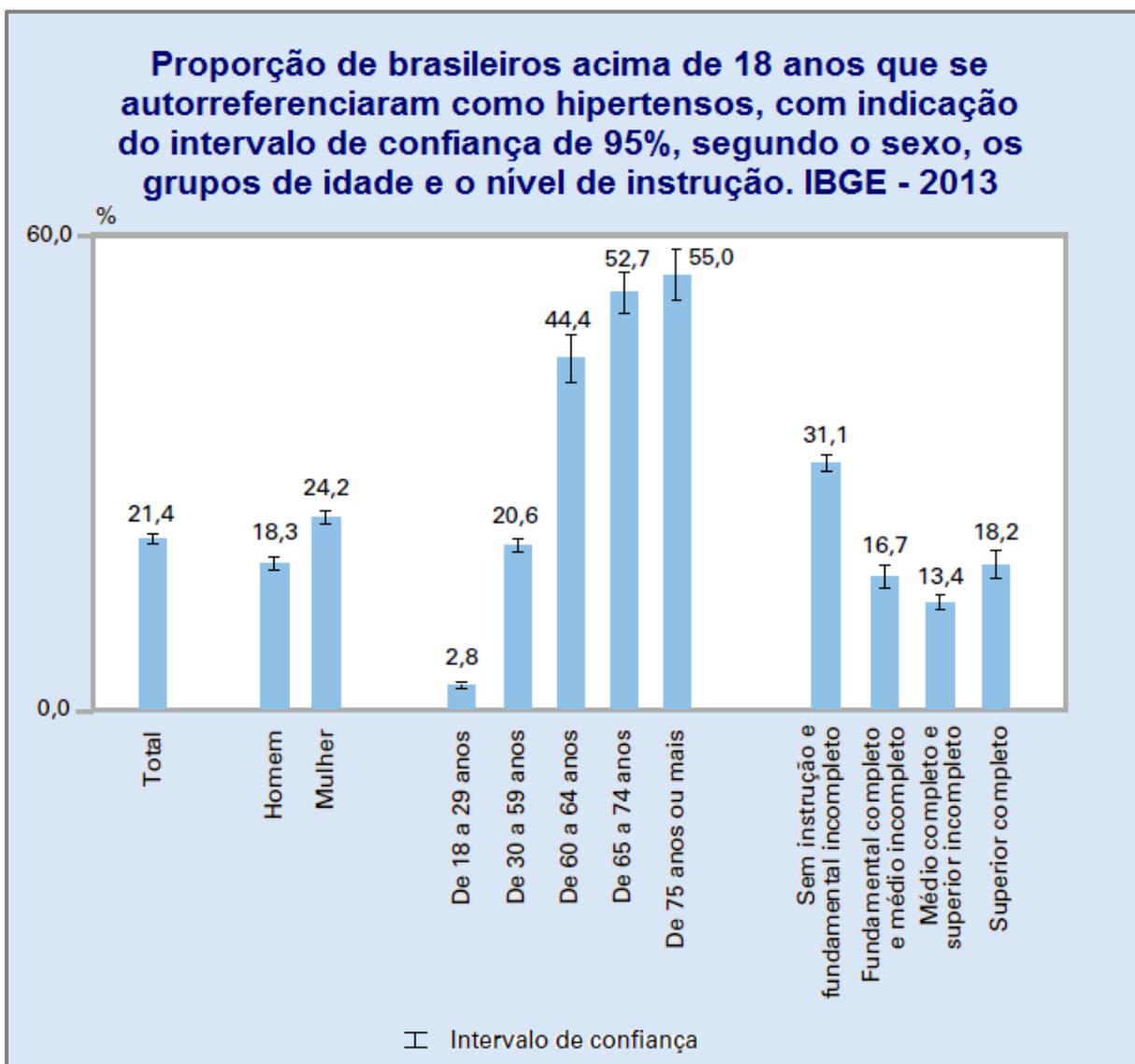


Figura 3: Gráfico da Prevalência da Hipertensão no Brasil em pessoas acima de 18 anos segundo o sexo, os grupos de idade e o nível de instrução. Fonte: Adaptado de IBGE, 2013.

Acredita-se que no Brasil o modelo de prevalência da hipertensão siga o padrão visto mundialmente, onde a doença afeta um número maior de homens do que mulheres. Sugere-se, portanto, que essa diferença apontada na pesquisa feita pelo IBGE em 2013 (onde a hipertensão tem maior prevalência nas mulheres) seja causada por fatores culturais. Um levantamento do Ministério da Saúde feito em 2016 registrou que mais de um terço dos homens não buscaram os serviços de saúde porque acreditam que não precisam deles (HERRMANN *et al.*, 2016). Igualmente,

um estudo feito por Pereira e colaboradores, em 2007, concluiu que os indivíduos do sexo masculino tinham menor conhecimento, tratamento e controle da hipertensão em relação às mulheres, e recomenda que programas de detecção e acompanhamento dessa patologia sejam dirigidos principalmente para os homens (PEREIRA *et al.*, 2007). O maior percentual de mulheres hipertensas visto no levantamento do IBGE pode ser explicado pela falta de conhecimento sobre a doença por parte dos indivíduos do sexo masculino, o que poderia tê-los levado a se autorreferenciar incorretamente.

O número de pessoas que se autorreferenciaram como hipertensos aumentou de acordo com a idade, que é um dos maiores fatores de risco para a doença. Já em relação ao nível de instrução, quanto maior a escolaridade dos indivíduos, menor a prevalência da hipertensão. Estes dados estão de acordo com a tendência mundial vista por Rahimi e colaboradores em 2015.

Em 2012, a OMS estimou que 4,7% de todas as mortes (aproximadamente 62 mil brasileiros) tenham sido causadas pela HAS (Figura 4). Essa doença ficou em 6º lugar no ranking das 10 maiores causas de morte no Brasil, a frente, por exemplo, de acidentes de trânsito (3,7%) (WHO, 2012).



Ranking

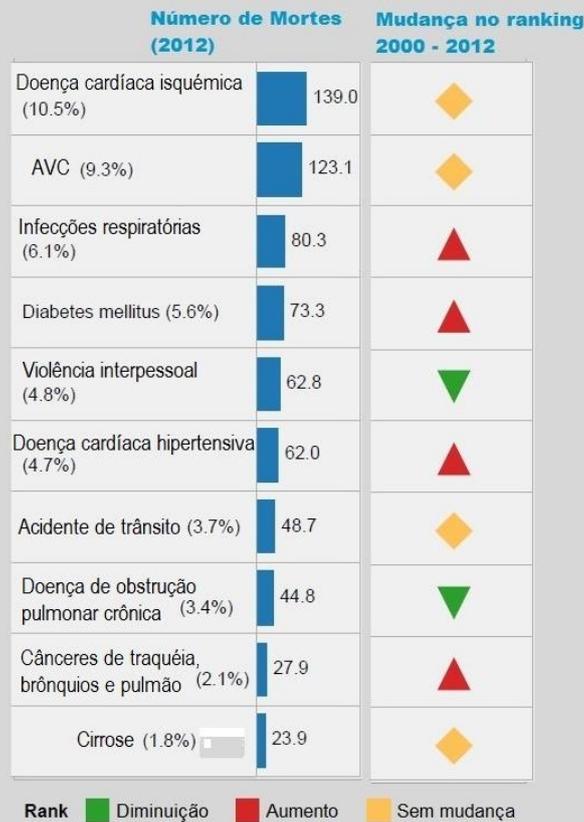


Figura 4: Ranking das 10 maiores causas de morte no Brasil – Uma comparação entre as pesquisas de 2000 e 2012. Fonte: Adaptado de Brazil: WHO Statistical Profile, 2010.

1.4) O controle da pressão arterial no organismo

A regulação da pressão arterial é uma função fisiológica muito complexa, dependente de um *continuum* de ações dos sistemas cardiovascular, neural, renal e endócrino (Figura 5). Dessa forma, um grande número de substâncias e sistemas fisiológicos interagem de maneira complexa e com redundância para garantir níveis adequados de PA nas mais diversas situações. Destacam-se entre eles os mecanismos neurais, locais e endócrino-renais. Os sistemas locais que controlam o fluxo sanguíneo são mediados por quimiorreceptores e incluem a vasoconstrição e dilatação e a alteração do número e do calibre dos vasos sanguíneos que irrigam um tecido. Além do controle local do fluxo sanguíneo, o controle global, mediado pelo

sistema nervoso autônomo, inclui alterações no débito cardíaco. O controle neural da PA é realizado essencialmente através do sistema nervoso simpático (SNS) e do parassimpático (SNP), que atuam no controle imediato da pressão (mecanismos de curto prazo). Entretanto, o mecanismo mais poderoso para manter a homeostase da pressão de longo prazo é o sistema endócrino-renal, fundamentalmente ligado ao controle do volume de sangue (volemia) (CHOPRA *et al.*, 2011).

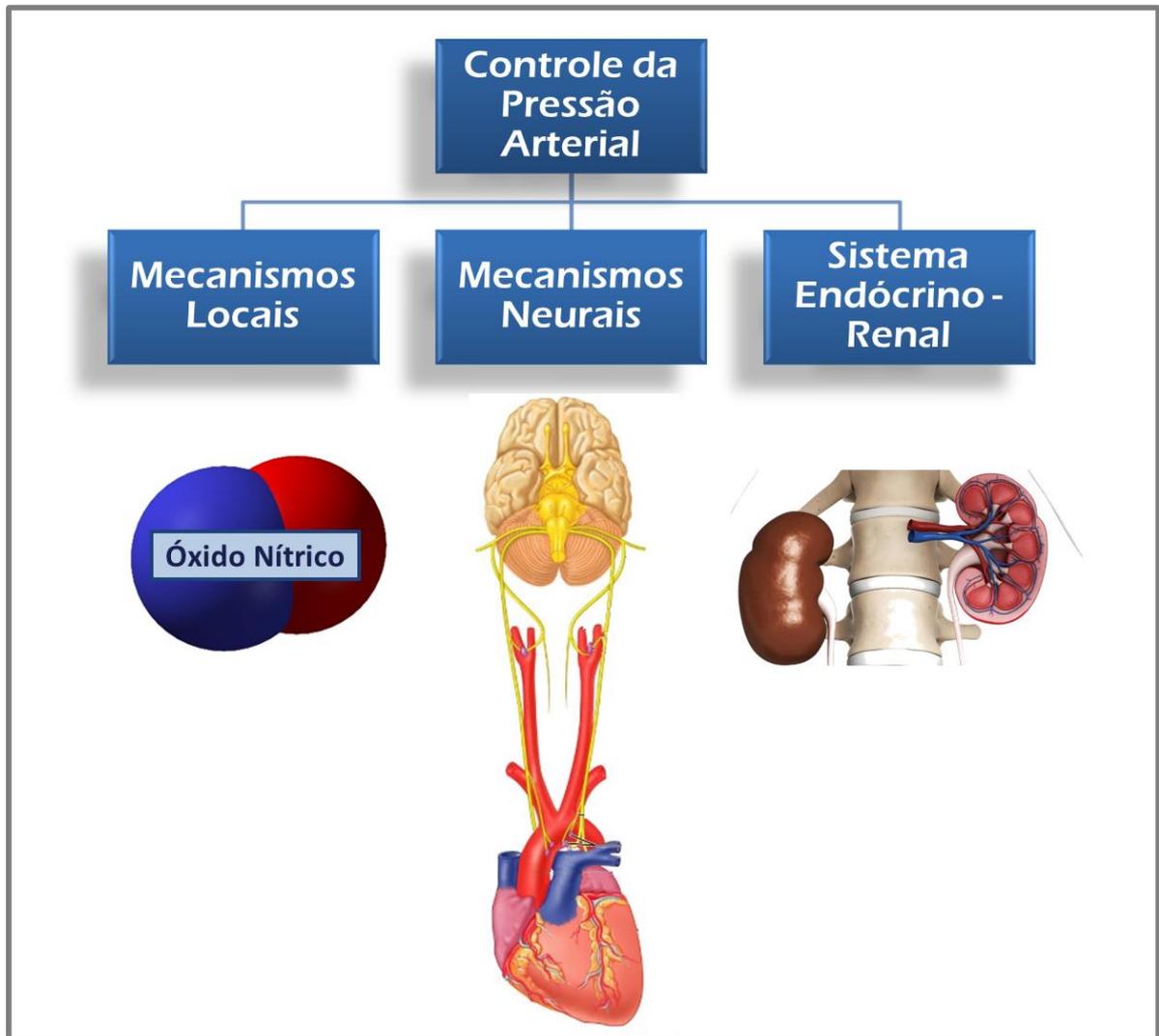


Figura 5: Os três principais mecanismos de controle da pressão arterial no organismo. Fonte: Adaptado de CHOPRA *et al.*, 2011.

1.4.1) O mecanismo neural

O sistema nervoso autônomo, um dos mecanismos de controle da PA, pode ser dividido em SNS e SNP. O SNS é responsável por desencadear o que é comumente conhecido como a resposta de “luta ou fuga”, ao passo que o SNP, coloquialmente chamado de sistema do “descanso e digestão” por atuar em

oposição ao SNS, reverte os efeitos da resposta de luta ou fuga. Esses dois sistemas atuam em conjunto na regulação da PA, onde o SNS, quando acionado, provoca o aumento da PA, e o SNP, que ao ser ativado, causa a sua diminuição (IRIGOYEN *et al.*, 2001).

Nesse mecanismo de controle, quando há um aumento repentino da pressão arterial, os barorreceptores, que são mecanorreceptores localizados nos grandes vasos (aorta e carótida), respondem gerando uma bradicardia (diminuição da frequência cardíaca), que é mediada pelo SNP, e uma inibição da resposta do SNS. Em contrapartida, quando ocorre uma queda abrupta da pressão sanguínea, os receptores cardiopulmonares de baixa pressão respondem causando taquicardia (aumento da frequência cardíaca) através da ativação do SNS, aumentando a liberação do peptídeo natriurético atrial e inibindo a liberação de vasopressina (GUYENET, 2006).

O sistema nervoso central (SNC) é o único sistema capaz de realizar uma regulação momentânea e sustentada da pressão arterial. Verificou-se que jovens adultos hipertensos apresentavam taquicardia, aumento do débito cardíaco e dos níveis plasmáticos de norepinefrina na circulação periférica, gerados pelo SNC. Um aumento na atividade simpática também é observado em pacientes com hipertensão associada à apneia obstrutiva do sono, obesidade, doença renal crônica, pré-diabetes e insuficiência cardíaca (CHOPRA *et al.*, 2011).

1.4.2) Sistema Endócrino-Renal

A ativação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) está condicionada à redução da pressão arterial renal detectada por células justaglomerulares (nos rins) localizadas nas paredes das artérias aferentes, que estimula a secreção de renina pelos rins. A renina é uma enzima que atua convertendo o angiotensinogênio circulante no plasma sanguíneo (proveniente do fígado) em angiotensina I, por clivagem de dois aminoácidos terminais. A angiotensina I, por sua vez, é convertida em angiotensina II pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) presente, principalmente, nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar. Essa enzima, além de converter

angiotensina I em angiotensina II, também degrada a bradicinina, que é um vasodilatador (CAMPOS, 2008).

Os efeitos da angiotensina II, o principal hormônio efetor do SRAA, são mediados por sua interação com os receptores de membrana AT1 e AT2, que pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Os principais efeitos sistêmicos desse hormônio peptídico incluem vasoconstrição, estimulação do SNS e aumento da biossíntese de aldosterona pelo córtex adrenal (FYHRQUIST *et al.*, 1995). Por fim, a aldosterona, um hormônio esteroide, aumenta a absorção de sódio e a secreção de potássio pelas células epiteliais tubulares renais, resultando em um aumento da reabsorção de água, o que gera um aumento no volume de plasma sanguíneo (Figura 6).

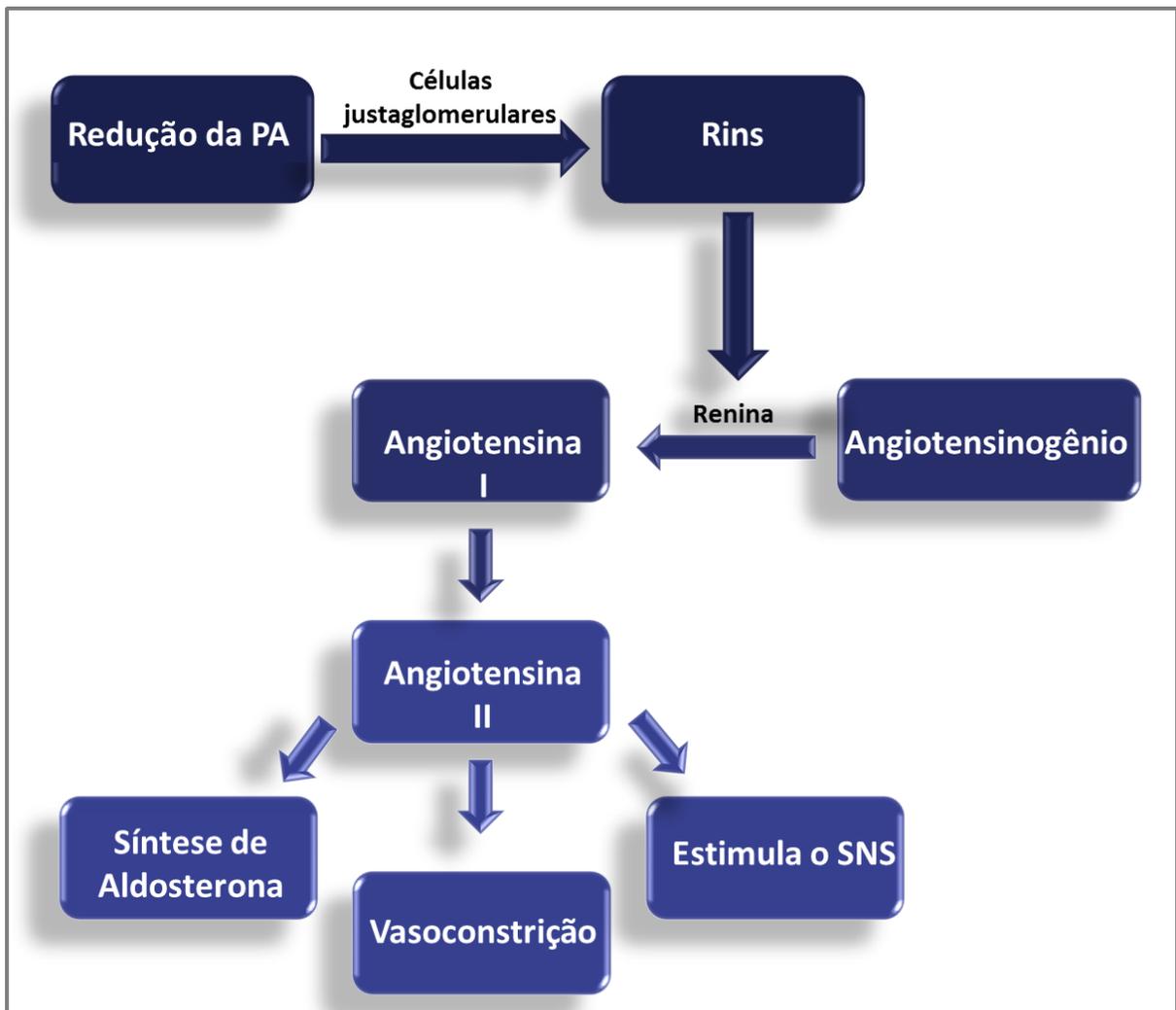


Figura 6: O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Fonte: Adaptado de CHOPRA et al., 2011.

1.4.3) Os Mecanismos Locais

O controle local da pressão arterial é mediado por substâncias produzidas e liberadas pelas células endoteliais que modulam o tônus da musculatura lisa vascular adjacente, podendo ser potentes vasorelaxantes ou vasoconstritores (VERMA; ANDERSON, 2002). As duas principais substâncias produzidas pelo endotélio são o óxido nítrico e a endotelina-1.

O óxido nítrico, também conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) é um gás vasodilatador de semivida curta. Este é liberado pelas células endoteliais em resposta ao estresse causado pela fricção gerada pelo fluxo sanguíneo. Esse gás é sintetizado a partir da arginina pela óxido nítrico sintetase (NOS) e, além de gerar a vasodilatação, possui efeitos anti-proliferativos, antitrombóticos, influencia a contratilidade miocárdica e gera inibição da adesão de leucócitos. Ademais, o óxido nítrico se opõe às ações de potentes fatores de constrição derivados do endotélio, como angiotensina-II e endotelina-1.

A endotelina-1 é um potente peptídeo vasoconstritor produzido pelas células endoteliais e aumenta as ações vasculares de outros peptídeos vasoativos tais como angiotensina-II, norepinefrina e serotonina. Além disso, participa na ativação de leucócitos e plaquetas, o que promove um fenótipo protrombótico e proaterogênico. Vários estudos mostram que os níveis de endotelina-1 podem ser altos em pacientes hipertensos, enquanto outros estudos não relataram diferença nos níveis de endotelina-1 em pacientes com ou sem hipertensão (CHOPRA *et al.*, 2001)

Além dos mecanismos locais de controle da PA, diversos hormônios contribuem, através de inúmeras vias, para a homeostase pressórica. Dentre esses, destacam-se o peptídeo natriurético (gera braquicardia), a vasopressina (também conhecida como hormônio antidiurético, causa aumento da PA) e adipocinas [tais como a leptina e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), secretados pelos adipócitos].

1.5) Fatores de risco para o desenvolvimento de HAS

A hipertensão é uma doença complexa e multifatorial, resultante da interação de diversos fatores genéticos e ambientais (KNIGHT *et al.*, 2009). Sugere-se que até

80% das doenças cardiovasculares possam ser prevenidas baseadas no componente ambiental, através da adoção de um estilo de vida saudável (OLSEN *et al.*, 2016). A ingestão diária de sal, o consumo excessivo de álcool e tabaco, o estresse, uma dieta rica em carboidratos e gorduras, o sedentarismo e a obesidade são alguns dos fatores ambientais que aumentam o risco do desenvolvimento da hipertensão (Figura 7) (RAHIMI *et al.*, 2015).

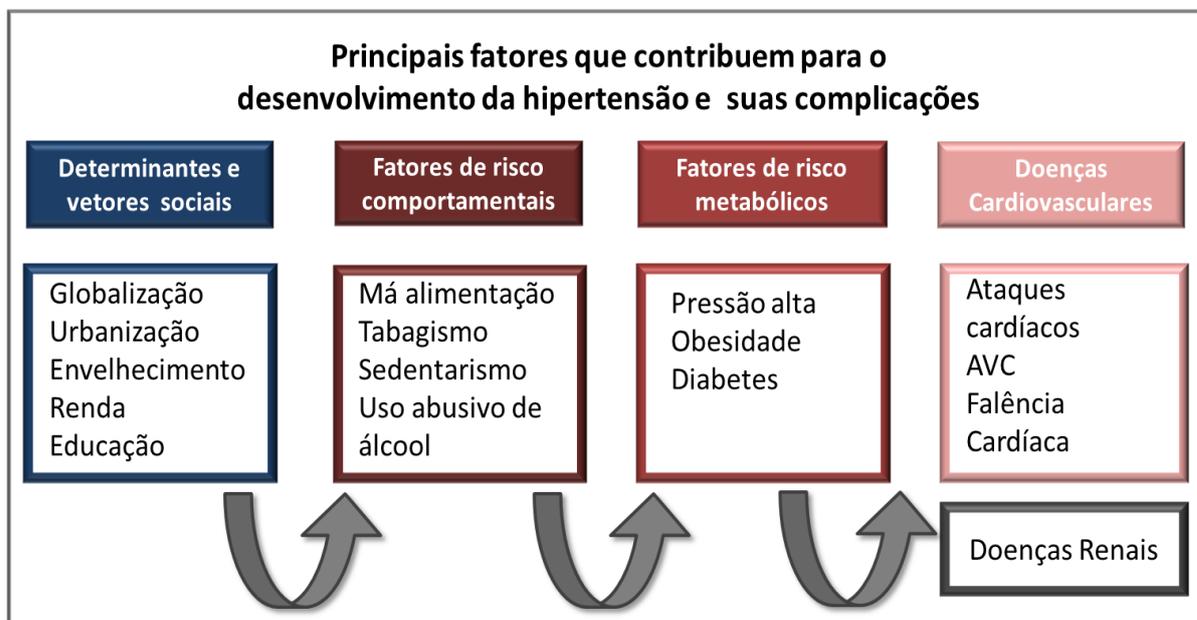


Figura 7: Principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão e suas complicações. Fonte: Adaptado de WHO: A global brief on hypertension: silent killer, 2016.

1.6) A obesidade e a HAS

A obesidade é uma doença complexa, em que diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento, e pode ser definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, a qual pode causar malefícios à saúde. Os indivíduos com índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ são considerados obesos. A obesidade é atualmente considerada como uma epidemia, com mais de 600 milhões de adultos obesos ao redor do mundo. Essa patologia aumenta a probabilidade do desenvolvimento de doenças como diabetes, hipertensão, acidente vascular cerebral, certos tipos de câncer e apneia obstrutiva do sono (MENDIS, 2014).

Diversas anormalidades centrais e periféricas podem explicar o desenvolvimento ou manutenção de PA elevada em indivíduos obesos. Algumas dessas irregularidades incluem a ativação do sistema nervoso simpático e do

sistema renina-angiotensina-aldosterona. Ademais, a obesidade também está associada à disfunção endotelial e anormalidades funcionais renais, que podem ter um papel no desenvolvimento da hipertensão (RAHMOUNI *et al.*, 2005). A compressão do rim pela gordura circundante e as alterações estruturais renais associadas à obesidade desempenham um papel no dano renal associado à obesidade e ao aumento da PA (HALL, 2003).

1.6.1) Alterações no SNS

A hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) é uma característica comum da obesidade em humanos e em modelos animais. A hiperativação do SNS em longo prazo, através de diversas vias, pode aumentar a pressão arterial, causando vasoconstrição periférica e aumentando a reabsorção renal de sódio. A produção excessiva de leptina pelos adipócitos e altos níveis circulantes de ácidos graxos intensificam o funcionamento do SNS que, por sua vez, gera a elevação da PA. A leptina é um hormônio que atua no balanço energético do organismo, através do controle do apetite e do metabolismo. Além disso, a leptina atua no hipotálamo para aumentar a pressão arterial através da ativação SNS (DA SILVA *et al.*, 2013).

Nos últimos 20 anos, constatou-se que o tecido adiposo não é apenas um reservatório passivo de armazenamento de energia, mas é um órgão endócrino que secreta peptídeos bioativos como as adipocinas e a leptina. Dessa forma, indivíduos obesos apresentam maior quantidade de adipócitos em relação a indivíduos eutróficos ($IMC < 24,9 \text{ kg/m}^2$) e, conseqüentemente, maior produção de leptina e de adipocinas. (AIZAWA-ABE *et al.*, 2000). A adiponectina, por exemplo, apresenta propriedade cardioprotetora, pois tem efeito vasodilatador, que aumenta a liberação de óxido nítrico (vasodilatador) e inibe a produção de TNF- α . Além disso, indivíduos obesos apresentam uma diminuição nos níveis de adiponectina, o que leva à uma disfunção endotelial (CHOPRA *et al.*, 2011).

1.6.2) Alterações no SRAA

Numerosos fatores contribuem para a ativação do SRAA na obesidade. Primeiramente, foi visto que o angiotensinogênio produzido pelo tecido adiposo pode

ser liberado na corrente sanguínea. Desta forma, sugere-se que os elevados níveis circulantes de angiotensinogênio vistos nos pacientes com obesidade podem ser atribuídos, em parte, ao aumento da gordura corporal. Além disso, foi descoberto que a aldosterona também desempenha um papel no desenvolvimento de hipertensão associada à obesidade. Observou-se que os níveis plasmáticos de aldosterona estão elevados em alguns hipertensos obesos, especialmente nos pacientes com obesidade visceral. Contudo, os mecanismos pelos quais o excesso de gordura pode aumentar a produção da aldosterona ainda não são conhecidos (RAHMOUNI *et al.*, 2005).

1.6.3) Alterações nos mecanismos locais de controle da pressão arterial

A disfunção endotelial, como por exemplo a diminuição da responsividade ao óxido nítrico, é uma anormalidade comum na obesidade. O dano ao endotélio gerado pelo acúmulo de tecido adiposo é um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares, porque leva a mudanças estruturais, como o espessamento das paredes dos vasos. O aumento da produção vascular de endotelina-1 em pacientes obesos hipertensos é sugerido como um mecanismo potencial para a disfunção endotelial. Ademais, sugere-se que o tecido adiposo ao redor dos vasos sanguíneos pode modular o tônus vascular e a sua reatividade (CARDILLO *et al.*, 2004).

1.7) Genética da obesidade e hipertensão

A HAS e a obesidade apresentam características multifatoriais determinadas por uma interação complexa entre o *background* genético e o ambiente. Diversos genes contribuem para a determinação de cada uma dessas patologias e suas ações são simples, aditivas ou mais complexas, caracterizadas por fenômenos como a epistasia e a pleiotropia. Essa natureza intrincada da obesidade e da hipertensão tornou bastante difícil a tarefa de identificar os genes responsáveis por suas etiologias (KOTSIS *et al.*, 2015).

Entretanto, a obesidade tem sido associada a uma expressão aumentada (pelo tecido adiposo) de peptídeos que desempenham um papel na regulação da

adiposidade e da pressão. Portanto, sugere-se que os genes que codificam tais peptídeos, bem como os genes que codificam peptídeos envolvidos em vias regulatórias relacionadas à obesidade sejam os principais genes candidatos da hipertensão associada à obesidade (PAUSOVA *et al.*, 2002). Diversos estudos do tipo GWAS (*Genome-Wide Association Study*) foram realizados nos últimos anos na tentativa de identificar esses componentes genéticos que predisõem um indivíduo tanto ao desenvolvimento de HAS como ao desenvolvimento da obesidade. Muitas dessas pesquisas obtiveram dados inconsistentes devido ao tamanho das amostras estudadas e heterogeneidade genética. Ainda assim, como pode ser observado na Tabela 1, alguns genes que comprovadamente desempenham um papel no desenvolvimento da obesidade foram também relacionados ao desenvolvimento da HAS.

Tabela 1: Genes associados ao desenvolvimento da obesidade e da HAS.

Nome do Gene	Símbolo	Localização	Referência
Adiponectina	<i>ADIPOQ</i>	3q27.3	KALIL; HAYNES, 2012
Adrenoreceptor beta 1	<i>ADRB1</i>	10q25.3	MASUO; LAMBERT, 2011
Adrenoreceptor beta 2	<i>ADRB2</i>	5q32	PEREIRA <i>et al.</i> , 2003
Adrenoreceptor beta 3	<i>ADRB3</i>	8p11.23	MASUO <i>et al.</i> , 2005
Coativador 1 α do PPARG	<i>PGC1α</i>	4p15.2	XIE <i>et al.</i> , 2007
Endotelina 1	<i>EDN1</i>	6p24.1	KURUKULASURIYA <i>et al.</i> , 2011
Fator de necrose tumoral alfa	<i>TNFα</i>	6p21.33	PAUSOVA ROSMOND <i>et al.</i> , 2000
Gene associado à obesidade e gordura corporal	<i>FTO</i>	16q12.2	XI <i>et al.</i> , 2013

Grelina	<i>GHRL</i>	3p25.3	PÖYKKÖ <i>et al.</i> , 2003
Leptina	<i>LEP</i>	7q32.1	SHINTANI <i>et al.</i> , 2002
Receptor de leptina	<i>LEPR</i>	1p31.3	ROSMOND <i>et al.</i> , 2000
Receptor de Melanocortina - 4	<i>MC4R</i>	18q21.32	MARCADENTI <i>et al.</i> , 2013
Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama	<i>PPARG</i>	3p25.2	MEIRHAEGHE; AMOUYEL, 2004

1.8) Fatores genéticos que causam diretamente HAS

É inegável a influência do componente genético para o controle da pressão arterial, visto que essa doença é cerca de duas vezes mais comum em indivíduos que têm um ou os dois pais hipertensos. Estudos realizados com gêmeos monozigóticos estimam que 30 a 40% da variação da PA deve-se à hereditariedade (GELLER *et al.*, 2015). Além dos genes ligados à obesidade e que atuam também no desenvolvimento da HAS, já foram descobertos diversos outros genes que influenciam diretamente no aparecimento dessa patologia. Muitos desses genes codificam componentes que atuam nas vias de controle da PA. Entretanto, em estudos do tipo GWAS já foram identificados inúmeros outros genes que também apresentam influência no controle da PA, mas através de mecanismos complexos e ainda não elucidados. Alguns desses sistemas, tais como o sistema imunológico, começaram a ter seus mecanismos de influência esclarecidos. Dados recentes sugerem que componentes do sistema imune inato e adaptativo também contribuem para a hipertensão por contribuírem para a aterosclerose. Essa doença inflamatória contribui para o desenvolvimento da HAS, onde foi visto que esforços para bloquear a inflamação resultaram em menores danos ao órgão final e redução da gravidade da elevação da PA (HARRISON *et al.*, 2010).

Atualmente, foram relatados cerca de 300 estudos do tipo GWAS sobre PA e hipertensão. Muitos *loci* de genes que influenciam a pressão sanguínea foram identificados, cada um com um pequeno efeito na pressão arterial, muito menor do que em síndromes mendelianas (Figura 8) (LUFT, 2017). Argumenta-se, contudo, que na patogênese de traços genéticos complexos, como a hipertensão, os fatores ambientais não são simplesmente aditivos aos genéticos. Isso ocorre porque o efeito de uma variação alélica de qualquer gene depende do ambiente no qual o gene é expresso (HAMET *et al.*, 1998).

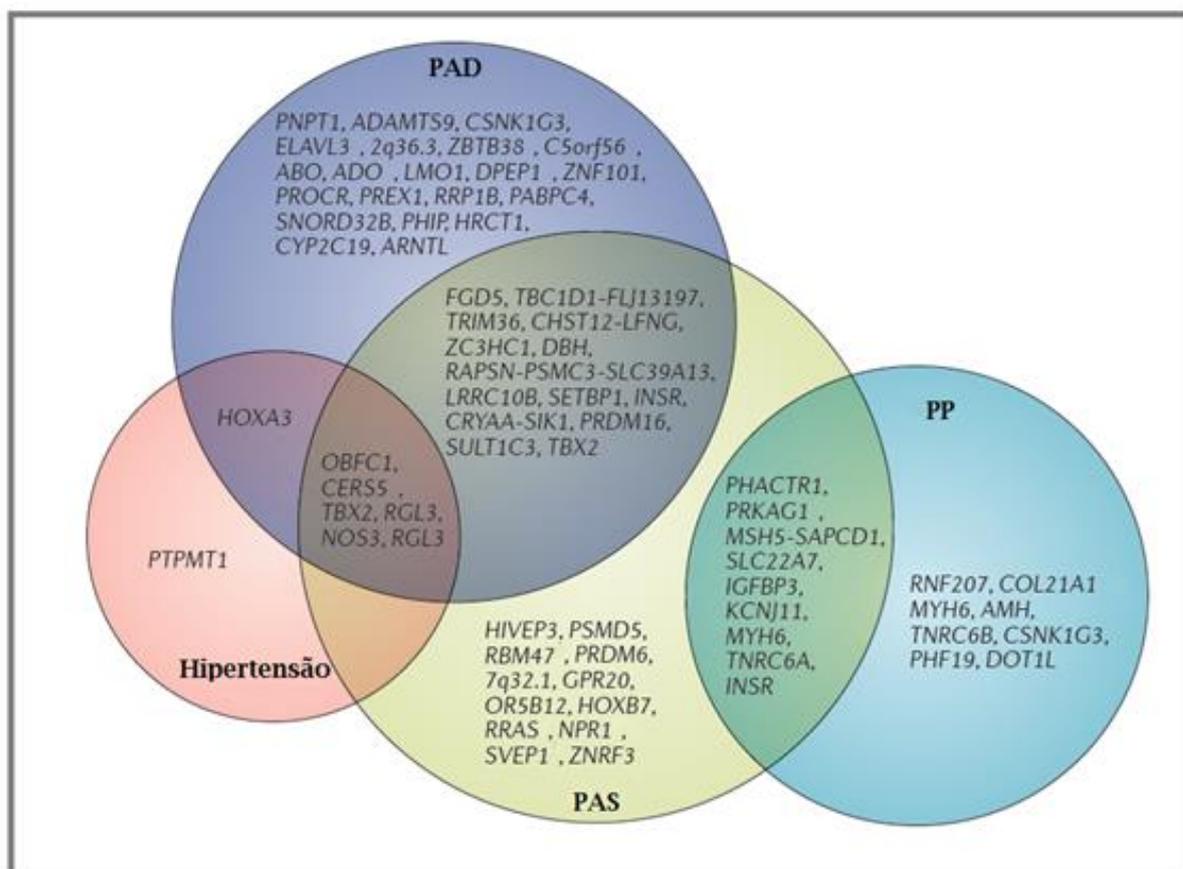


Figura 8: Principais *loci* recém-identificados em estudos do tipo GWAS que foram associados à hipertensão, à pressão arterial sistólica (PAS), à pressão arterial diastólica (PAD) e à pressão de pulso (PP). A pressão de pulso pode ser definida como a diferença entre a PAS e a PAD. Fonte: Adaptado de PALMER & FREEDMAN, 2016.

Considerando as diferentes formas em que os fatores ambientais podem modular o efeito de variações alélicas no DNA, vê-se a necessidade de analisar a influência de SNPs (polimorfismos de base única) no desenvolvimento da hipertensão em pressões ambientais diversas, como, por exemplo, em indivíduos

expostos a ambientes obesogênicos. Tendo em vista que já foram identificados diversos componentes genéticos que predisõem um indivíduo tanto ao desenvolvimento de HAS como ao desenvolvimento da obesidade, esse estudo buscou investigar a relação entre polimorfismos - que haviam sido previamente relacionados à hipertensão - e o desenvolvimento da HAS em indivíduos com obesidade.

2) Objetivos

2.1) Objetivos Gerais

Esse projeto teve como objetivo o estudo de polimorfismos de genes candidatos à HAS em uma amostra de indivíduos com obesidade do Rio de Janeiro, com a finalidade de estabelecer uma possível associação destes SNPs e desenvolvimento da hipertensão. Ademais, procurou-se analisar também a influência destes polimorfismos em parâmetros antropométricos e pressóricos.

2.2) Objetivos Específicos

- ✓ Investigar diferenças nos parâmetros antropométricos e pressóricos entre os indivíduos obesos hipertensos e normotensos.
- ✓ Descrever a distribuição das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos dos genes analisados nesse estudo.
- ✓ Averiguar se as frequências genóticas dos grupos de indivíduos obesos normotensos e hipertensos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados.
- ✓ Investigar a relação destes polimorfismos com a variabilidade dos parâmetros antropométricos, como a circunferência da cintura, circunferência do quadril, razão cintura-quadril e índice de massa corporal.
- ✓ Determinar se há efeitos significantes dos polimorfismos sobre a variabilidade da pressão arterial sistólica e diastólica na amostra.
- ✓ Analisar a associação dos genótipos e alelos com a hipertensão, tanto para modelo dominante quanto para o recessivo.

3) Material e Métodos

3.1) Desenho Experimental

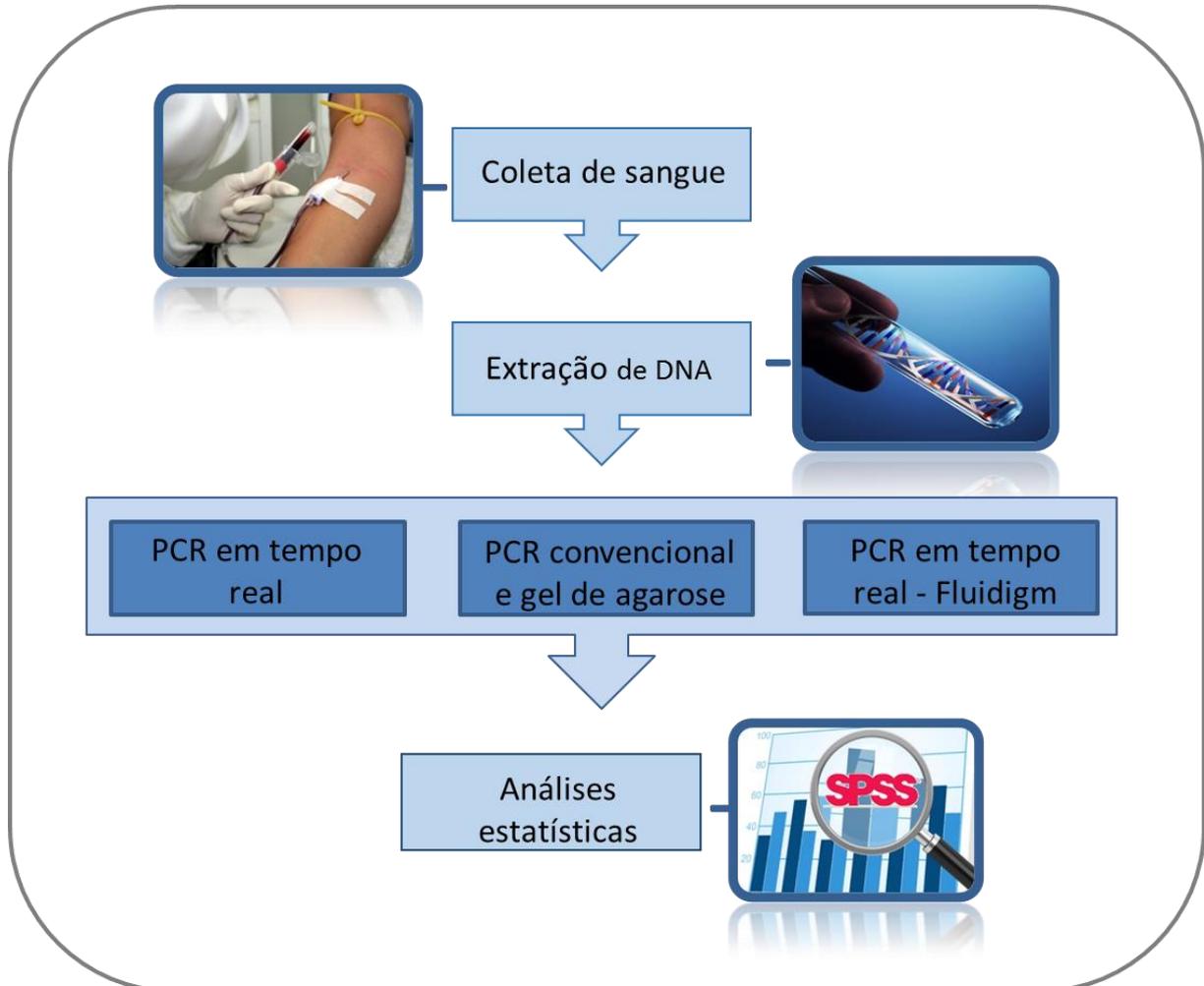


Figura 9: Esquema do desenho experimental do estudo.

3.2) Caracterização da amostra

O critério utilizado para a seleção da amostra foi baseado no Índice de Massa Corporal (IMC), no qual foram selecionados apenas indivíduos obesos $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. A amostra foi constituída por 311 pacientes com obesidade que fazem acompanhamento na ONG conhecida como Grupo de Resgate à Autoestima e Cidadania do Obeso (GRACO). O critério utilizado para caracterizar os pacientes como hipertensos foi apresentarem $\text{PA} \geq 140/90 \text{ mmHg}$. Os valores pressóricos de

indivíduos hipertensos que faziam tratamento com remédios anti-hipertensivos foram desconsiderados para tais análises, visto que não representavam o valor real da PA desses pacientes. Dos 311 pacientes, 99 eram normotensos e 212 foram classificados como hipertensos. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (CAAE: 09225113.0.0000 / nº do parecer: 346.634), tendo todos os pacientes sido informados dos objetivos do estudo. Fizeram parte da amostra apenas os indivíduos que se encaixaram nos critérios acima estabelecidos e concordaram em participar do projeto, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1), de acordo com as normas de Pesquisa em Seres Humanos (resolução 510/2016 do Ministério da Saúde).

3.3) Medidas antropométricas

3.3.1) Índice de Massa Corporal (IMC)

O IMC foi calculado a partir da altura e do peso dos pacientes. Cada indivíduo foi pesado sem os sapatos e vestindo roupas leves. O cálculo do IMC foi feito segundo a fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso}}{(\text{altura})^2} \quad \frac{(kg)}{(m^2)}$$

3.3.2) Medida da circunferência da cintura e do quadril

As avaliações antropométricas foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo “National Institutes of Health” fornecido pelo Guia Prático para obesidade (NHLBI, 2000).

As circunferências foram mensuradas utilizando uma fita métrica graduada em centímetros. Foi pedido ao paciente que se mantivesse em postura ereta, com os braços ao longo do corpo, pés posicionados próximos um ao outro e abdome relaxado. A circunferência da cintura (CC) foi mensurada a partir do ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal. A circunferência do quadril (CQ) foi medida em torno da porção mais larga das nádegas. A relação cintura/quadril (RCQ)

foi obtida a partir da razão entre a CC e a CQ, para avaliar o padrão de distribuição do tecido adiposo.

3.4) Medidas Pressóricas

Todos os indivíduos tiveram sua pressão aferida por meio de um aparelho de pressão digital de pulso, visto que a braçadeira com o manguito do esfigomanômetro aneroide por muitas vezes não se encaixava no braço dos pacientes obesos. Foi pedido a cada indivíduo que se mantivesse sentado e respirando normalmente enquanto a pressão do pulso esquerdo era aferida.

3.5) Coleta de sangue

Dez mL de sangue periférico foram coletados em um tubo contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) (4mL), um tubo de soro (4mL) e um tubo de fluoreto de citrato (2mL). O material dos tubos estéreis contendo EDTA foi transferido para tubos de criopreservação e estocado a -20°C para que posteriormente o DNA fosse extraído.

3.6) Análise Molecular

3.6.1) Extração de DNA

As amostras de DNA foram extraídas a partir de células de sangue periférico utilizando o kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras foram então estocadas em freezer -20°C no Laboratório de Genética Humana (IOC/FIOCRUZ)

3.6.2) Estimativa da concentração de DNA

A concentração das amostras de DNA foi aferida através de espectrofotometria em um NanoDrop 2001 (Thermo Fisher Scientific). No preparo

das amostras foi utilizado 1 µL de alíquota de DNA e tampão TE [Tris 10 mM, HCl EDTA 1 mM; pH 7,4] como branco na calibração do equipamento. A estimativa da concentração da amostra e o grau de pureza (contaminação por proteínas, fenóis e carboidratos) foram calculados pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita, onde foram obtidos valores entre 10 e 40 ng de DNA por µL.

3.6.3) Gene *ECA*

3.6.3.1) Reação de PCR

Para a análise desse INDEL (*Small insertions and deletions*), que consiste na inserção de 287 pares de base no gene da enzima conversora de Angiotensina I (*ECA*), localizado no cromossomo 17, foi utilizada a técnica reação em cadeia da polimerase (PCR convencional). A variante I representa o fragmento com a inserção e a variante D o fragmento com a deleção, o que resulta nos três genótipos: Homozigotos II e DD e heterozigotos DI. A reação de PCR foi feita utilizando o seguinte conjunto de oligonucleotídeos:

Oligonucleotídeo ECA F: 5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'

Oligonucleotídeo ECA R: 5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'

As condições finais da reação estão especificadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições utilizadas na PCR para a amplificação do gene *ECA*

Reagentes	Quantidade
Tampão de Reação Biotools	1X
dNTP	0,2 mM
H ₂ O MiliQ	qsp
Oligonucleotídeo ECA F	0,3pM
Oligonucleotídeo ECA R	0,3pM
DNA Polimerase Taq Biotools	0,02 U
Volume Final	25 µL

Toda reação incluiu um controle negativo, que contém todos os reagentes da reação de PCR, sem o acréscimo de DNA. Este controle é utilizado para garantir que não houve contaminação do *mix* de reação com DNA. As condições de ciclagem utilizadas incluíram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 67°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermo Fisher Scientific*). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20°C.

3.6.3.2) Visualização em gel de Agarose

Os resultados da reação de PCR foram analisados a partir da visualização do produto de PCR em um gel de agarose 1,5%, diluído em tampão TAE 1X. As amostras foram preparadas adicionando-se 12 µL da alíquota da reação de PCR a 2 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%] e 1 µL de GelRed™ diluído previamente em 500 µL de água destilada. A eletroforese foi realizada a 80 V, por 1 hora em cuba horizontal, utilizando como tampão de corrida TAE 1X. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta e para confirmação do tamanho dos amplicons foi utilizado o padrão de tamanho de fragmento expresso em pares de bases 50 bp *ladder* (*Invitrogen*)

3.6.3.3) Confirmação dos genótipos DD

Como visto por Shanmugam e colaboradores (1993), a amplificação do alelo I nessas condições por vezes gera resultados incorretos, visto que a amplificação do alelo I em um heterozigoto pode ser suprimida, fazendo com seja erroneamente identificado como DD. Uma nova reação de PCR foi realizada para confirmar se os indivíduos identificados como DD haviam sido corretamente genotipados. Um novo par de oligonucleotídeos foi então desenhado para que se anelassem a uma sequência presente na inserção. Assim, um genótipo DI (assim como um II) mostraria uma amplificação positiva, enquanto que um genótipo DD não resultaria

em amplificação devido à falta de um local de reconhecimento para os novos oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo ECA DD F: 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3'

Oligonucleotídeo ECA DD R: 5' TCGCCAGCCCTCCCATGCCAATAA 3'

Dessa forma, todos os indivíduos previamente identificados como DD foram submetidos a uma nova reação de PCR, segundo as seguintes condições finais de reação (Tabela 3).

Tabela 3: Condições utilizadas na PCR para confirmação dos genótipos DD do gene *ECA*

Reagentes	Quantidade
Tampão de Reação Biotools MgCl ₂ free	1X
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	2 mM
H ₂ O MiliQ	qsp
Oligonucleotídeo ECA DD F	0,3 pM
Oligonucleotídeo ECA DD R	0,3 pM
DNA Polimerase Taq Biotools	0,02 U
Volume Final	25 µL

Todas as reações incluíram um controle negativo. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização a 67°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermo Fisher Scientific*). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20°C. A visualização dos genótipos foi realizada em gel de agarose 1,5%, seguindo as mesmas especificações do item 3.4.3.2.

3.6.4) Genes *ADRB1* e *AGTR1*

A genotipagem dos polimorfismos rs5186 (*AGTR1*) e rs1801253 (*ADRB1*) foi realizada pelo método de discriminação alélica por PCR em tempo real (qRT-PCR),

no qual foram utilizadas sondas de hidrólise (Taqman®) desenhadas e validadas pela *Life Technology*.

O ensaio via sondas *TaqMan*® é composto pelos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* e pelas sondas VIC e FAM (Figura 10), que são marcadas com um fluoróforo *quencher* (silenciador) e um fluoróforo *reporter* (repórter). Essas sondas são alelo-específicas e, portanto, diferem em sua composição apenas na posição do nucleotídeo a qual se pretende estudar. Dessa forma, uma sonda será hibridizar na sequência de DNA selvagem, enquanto a outra, na sequência que contém a alteração. Quando essas sondas hibridizadas são degradadas pela atividade exonucleásica da enzima *Taq* DNA polimerase, ocorre o afastamento do *reporter* e do *quencher*, de forma que o último não mais absorve a fluorescência do *reporter* e sua emissão pode ser detectada através da excitação com luz. A sonda que não hibridizar continuará intacta com o *reporter* e o *quencher* próximos e a sua fluorescência não será detectada.

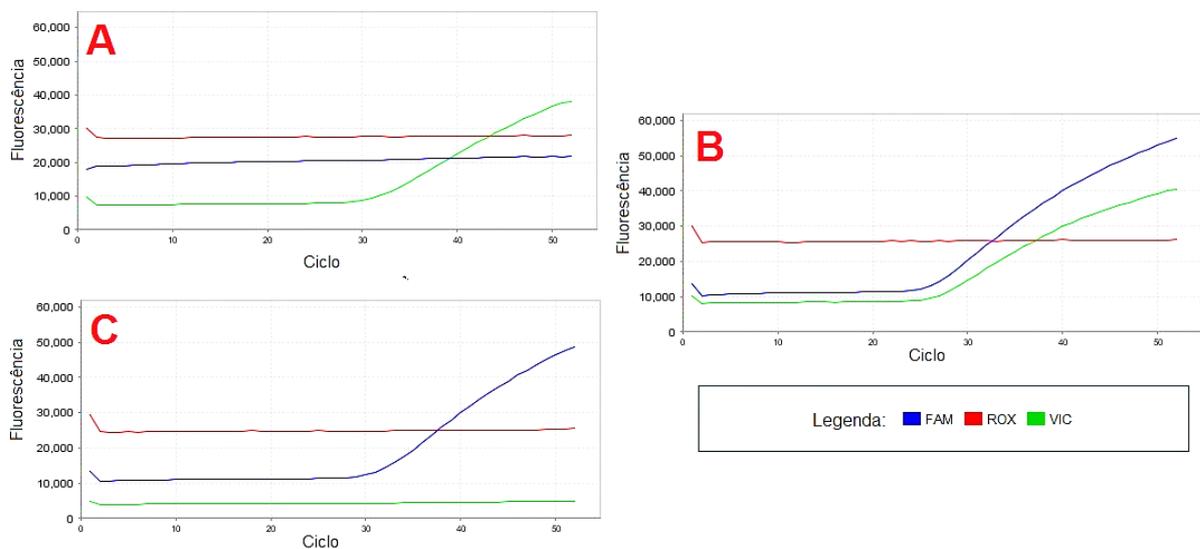


Figura 10: Gráfico Multicomponente do PCR em Tempo Real mostrando a fluorescência das sondas VIC e FAM. Legenda: O eixo y representa a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva em azul mostra o fluoróforo FAM ligado a uma sonda que se hibridiza a um dos alelos, por exemplo ao alelo selvagem, já a curva verde representa o fluoróforo VIC, que se hibridiza ao outro alelo, neste caso o alelo mutado. Por fim, a curva vermelha é o fluoróforo ROX, que atua como a referência passiva. No gráfico A, houve um aumento apenas da fluorescência VIC, representando um indivíduo homocigoto mutado. No gráfico B, ambos os fluoróforos tiveram um aumento de fluorescência, representando uma amostra de heterocigoto. No gráfico C, observa-se um aumento apenas da fluorescência FAM, representando um indivíduo homocigoto selvagem.

Essa técnica foi realizada segundo as condições de reação da tabela 4:

Tabela 4: Condições de reação de qRT-PCR dos genes *ADRB1* e *AGTR1*

Reagentes	Quantidade	Ciclagem
TaqMan® Universal Master Mix 2X	1X	60°C - 30 s
Sonda TaqMan® 40X	0,8X	95°C- 10 min
H₂O MiliQ	-	95°C -15 seg
DNA	10 – 40 ng/μL	60°C -1,5min
Volume Final	10 μL	60°C – 30s

} 50 ciclos

Toda reação incluiu um controle negativo, que contém todos os reagentes da reação de qRT-PCR, sem o acréscimo de DNA. A máquina utilizada para este experimento foi a *StepOne Plus (Life Technology)*.

3.6.5) Gene *GSTM1*

3.6.5.1) Reação de PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A identificação do polimorfismo do gene *GSTM1* (rs1065411) foi obtida através de genotipagem pelo método de PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando ensaios com sondas de hidrólise (*Taqman®*) desenhadas e validadas pela *Life Technology*. Os alelos *GSTM1*A* e *GSTM1*B* produzem uma enzima ativa com funções idênticas, mas diferem na presença de um nucleotídeo na posição 519 (G→C) do éxon 7, que resulta na mudança do aminoácido lisina na posição 172 por asparagina. O gene da glutationa S-transferase *mu 1 (GSTM1)* encontra-se, por muitas vezes deletado, sendo resultado de uma deleção de 16kb. A deleção desse gene é causada pela recombinação dessa parte homóloga de região franqueadoras idênticas, que acarreta na deleção de todo o gene *GSTM1* (LOSI-GUEMBAROVSKI *et al.*, 2002).

Dessa forma, através do qRT-PCR identificou-se indivíduos carreadores de pelo menos um alelo G (*GSTM1*A*), carreadores de pelo menos um alelo C (*GSTM1*B*), heterozigotos para o polimorfismo (*GSTM1*AB*) ou indivíduos nulos

(não apresentam nenhuma das duas cópias do gene, *GSTM1*0*). As condições de reação encontram-se na tabela 5, abaixo:

Tabela 5: Condições utilizadas na reação de qRT-PCR do gene *GSTM1*

Reagentes	Quantidade	Ciclagem
TaqMan® Universal Master Mix 2X	1X	60°C - 1 min
Sonda TaqMan® 40X	0,8X	95°C- 10 min
H₂O MiliQ	-	95°C -15 seg
DNA	10 – 40 ng/μL	60°C -1,5min
Volume Final	10 μL	60°C – 1,5 min

} 60 ciclos

Toda reação incluiu um controle negativo, que contém todos os reagentes da reação de qRT-PCR, sem o acréscimo de DNA. A máquina utilizada para este experimento foi a *StepOne Plus (Life Technology)*.

3.6.5.2) Reação de PCR alelo-específico para confirmação do genótipos nulos

Após as reações de PCR em tempo real, foi preciso confirmar se os indivíduos caracterizados como nulos haviam sido corretamente identificados, visto que amostras em que a reação de qRT-PCR não funcionou corretamente seriam erroneamente classificadas como nulas. Dessa forma, no intuito de confirmar se os indivíduos nulos realmente apresentavam esse genótipo, foi realizada uma reação de PCR alelo-específico. Nessa técnica, é utilizado um oligonucleotídeo reverso comum (*GSTM1* 6) e dois oligonucleotídeos *forward* específicos para cada alelo (*GSTM1* 7A ou 7B). Dessa forma, são preparados 2 *mix* diferentes, cada qual contendo a combinação de oligonucleotídeos para um alelo diferente, resultando na amplificação de uma região de 132 pares de bases. Foi utilizado também um conjunto extra de oligonucleotídeos referentes ao gene da betaglobina, que geravam um amplicon de tamanho diferente (536 pares de base), como controle interno da reação. As condições dessa reação (Tabela 6) e a sequência dos oligonucleotídeos encontram-se abaixo:

Oligonucleotídeo GSTM1 6: 5' GCTTCACGTGTTATGGAGGTTC 3'
Oligonucleotídeo GSTM1 7A: 5' TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC 3'
Oligonucleotídeo GSTM1 7B: 5' TTGGGAAGGCGTCCAAGCGG 3'
Oligonucleotídeo Betaglobina AS: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'
Oligonucleotídeo Betaglobina S: 5' CCACTTCATCCACGTTCCACC 3'

Tabela 6: Condições da reação de PCR alelo-específico do gene *GSTM1*

Reagentes	Quantidade	Ciclagem
Tampão de Reação MgCl ₂ free	1X	
dNTP	0,14 mM	94°C – 2,5 min
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	
H ₂ O MiliQ	qsp	94°C – 45 s
Oligonucleotídeo GSTM1 6	1 pM	57°C – 1 min
Oligonucleotídeo GSTM1 7A / 7B	1 pM	72°C – 2 min
Oligonucleotídeo βglobina AS	1 pM	94°C – 30 s
Oligonucleotídeo βglobina S	1 pM	57°C – 30 s
DNA Polimerase Taq Biotools	0,01 U	72°C – 45s + 3s p/ ciclo
Volume Final	20 µL	72°C – 10 min

Todas as reações incluíram um controle negativo. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Veriti (*Thermo Fisher Scientific*). Após a amplificação, os produtos da PCR foram armazenados a -20° C. A visualização dos genótipos foi realizada em gel de agarose 1,5%, seguindo as mesmas especificações do item 3.4.3.2.

3.6.6) Análise de SNPs pela técnica *Fluidigm 48.48 Dynamic Array*™ *IFC*

Para a análise de uma grande quantidade de SNPs de uma só vez, foi utilizada a técnica de *Fluidigm 48.48 Dynamic Array*™ *IFC*, que consiste na análise de até 48 polimorfismos em 48 indivíduos. Os chips (Figura 11) onde são feitas as reações e análises são conhecidos como *IFCs* de *Dynamic Array*™ - chips nanofluídicos que contêm redes fluídicas que combinam automaticamente conjuntos de amostras com conjuntos de ensaios (sondas). Neste sistema, válvulas dividem as amostras e os reagentes e permitem que sejam sistematicamente combinados em 2.304 ensaios. A gestão de um estudo de expressão genética envolvendo 2.000

amostras contra um conjunto de 48 genes exigiria 1.000 placas de 96 poços em comparação com 42 do *Dynamic Array*™ IFCs. Dessa forma, esta solução para qPCR em tempo real apresenta uma grande eficiência operacional e proporciona densidades de reação muito além do que é possível com placas de microtítulo e reduz significativamente o número de etapas de manuseio de líquidos e o volume por reação.

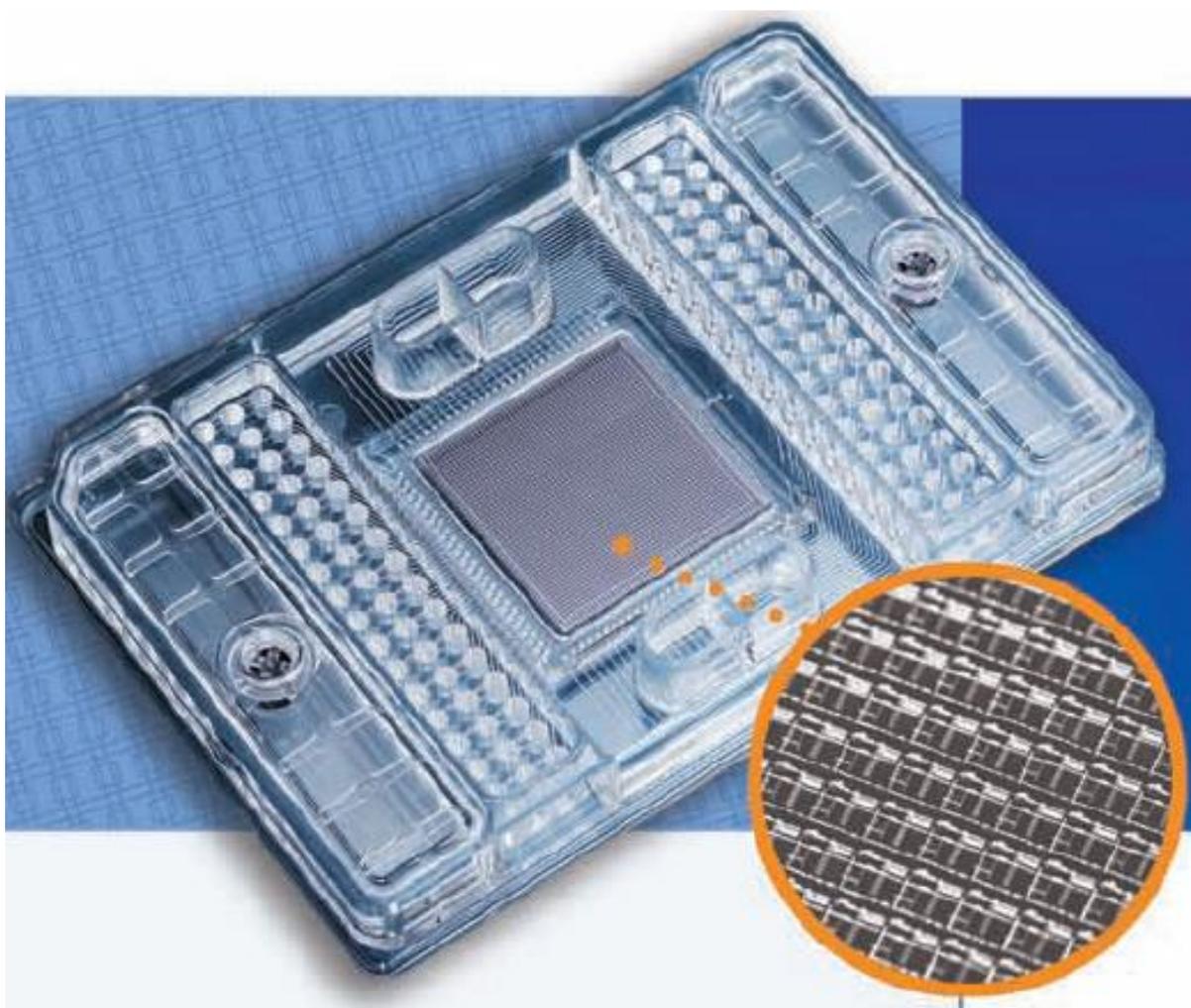


Figura 11: Chip do *Fluidigm 48.48 Dynamic Array*™ IFC.

Fonte: <http://www.dssimage.com/productDesc.asp?prinid=62&prodid=737>

3.6.6.1) Fluxograma de trabalho

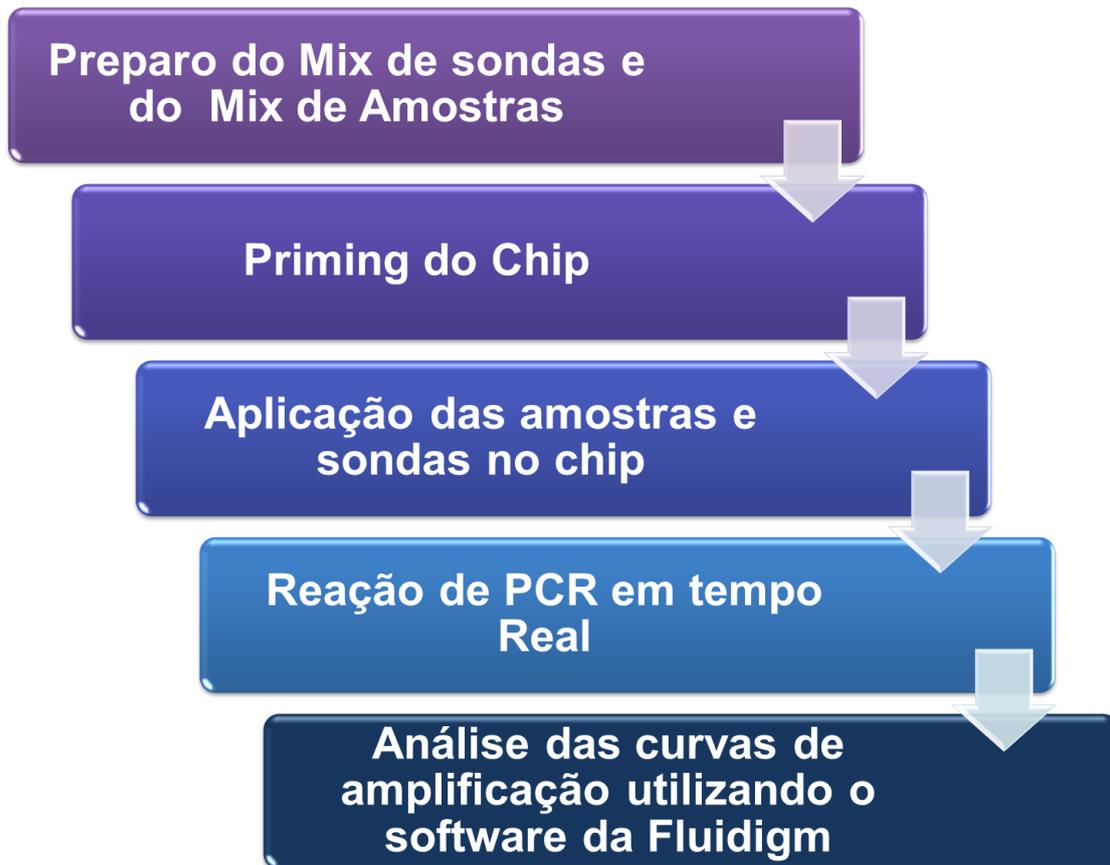


Figura 12: Fluxograma de atividades para a realização do experimento

3.6.6.2) Preparo da Placa de Estoque das Sondas

Antes de começar a técnica foi preparada uma placa de PCR em tempo real contendo 18 μ L das sondas que foram utilizadas no procedimento. As 41 sondas usadas nesse experimento foram selecionadas dentro do banco de sondas do Laboratório de Hanseníase (Fiocruz) e do Laboratório de Genética Humana (Fiocruz) e estão especificadas no Quadro 1.

Quadro 1: Sondas TaqMan® utilizadas na análise

Gene	Polimorfismo	MAF	Alelo Selvagem	Alelo Mutado
<i>TNFSF14</i>	rs379527	25%	C	A
<i>TNFRSF14</i>	rs2234167	13%	G	A
<i>LTA</i>	rs2239704	35%	C	A
<i>NOS2</i>	rs8072199	22%	C	T
<i>VDR</i>	rs2228570	36%	T	C
	rs731236	27%	T	C
	rs4760658	17%	A	G
	rs2254210	29%	G	A
<i>IFNG</i>	rs1861493	21%	A	G
	rs2430561	28%	T	A
	rs2069718	38%	T	C
<i>TLR1</i>	rs5743592	18%	C	T
	rs4833095	39%	C	T
	rs5743618	19%	T	G
	rs5743595	18%	T	C
<i>TAP1</i>	rs735883	37%	C	T
<i>IL10</i>	rs1554286	25%	C	T
	rs1800896	27%	A	G
	rs1800890	20%	T	A
	rs1800871	43%	C	T
<i>PACRG</i>	rs9356058	25%	T	C
<i>MIFAS</i>	Rs755622	26%	G	C
<i>IL6</i>	rs2069845	25%	G	A
	rs2069832	14%	G	A
	rs2069837	12%	A	G
	rs2069840	18%	C	G
	rs1800795	14%	G	C
<i>CCR5</i>	rs1799987	45%	G	A
<i>MCP-1</i>	rs1024611	36%	T	C
<i>CCL5</i>	rs2107538	31%	T	C
<i>FAIM2</i>	rs7138803	26%	G	A
<i>BDNFAS</i>	rs4074134	25%	G	A
<i>RENBP</i>	rs7883568	3%	T	C
<i>GC</i>	rs2282697	9%	G	C
<i>CYP24A1</i>	rs6013897	26%	T	A
<i>CYP2R1</i>	rs10741657	30%	G	A
<i>NADSYN1</i>	rs12785878	35%	G	T
<i>MBL2</i>	rs1800450	12%	G	A
	rs1800451	8%	G	A
	rs7096206	20%	C	G
<i>TNFRSF1B</i>	rs525891	19%	T	A

*MAF= Menor frequência alélica

A posição de cada sonda foi anotada para depois ser inserida no software, como mostrado na Figura 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	9	17	25	33	41		
B	2	10	18	26	34			
C	3	11	19	27	35			
D	4	12	20	28	36			
E	5	13	21	29	37			
F	6	14	22	30	38			
G	7	15	23	31	39			
H	8	16	24	32	40			

Figura 13: Modelo da Placa de Estoque das sondas para Chip GT 48x48

3.6.6.3) Preparo do *Mix* de Sondas e montagem da placa de sondas

Para o preparo do *mix* de sondas foram utilizados os reagentes nas quantidades mostradas na tabela 7.

Tabela 7: Quantidade de reagentes usados nos preparo do *Mix* de Sondas

Reagentes	Quantidade por reação considerando erro de pipetagem	Para chip 48x48 multiplicar por 60
Assay Loading Reagent (2x)	2,5 µL	150 µL
ROX (50x)	0,25 µL	15 µL
H ₂ O (DNA-free)	1,0 µL	60 µL
Volume Final	3,75 µL	225 µL

Após o preparo do *mix*, foram distribuídos 3,75 uL da mistura por poço em uma nova placa de 96 poços. Foram adicionados, também com auxílio da pipeta multicanal, 1,25 uL de cada sonda (concentração inicial de 40X) da placa de sondas ao seu respectivo poço.

3.6.6.4) Preparo do *Mix* de Amostras e montagem da placa de amostras

Para o preparo do *mix* de amostras foram utilizados os reagentes nas quantidades mostradas na tabela 8.

Tabela 8: Quantidade de reagentes usados nos preparo do *Mix* de Sondas

Reagentes	Quantidade por reação considerando erro de pipetagem	Para chip 48x48 multiplicar por 60
Master Mix Taqman Genotyping (2x)	3,0 µL	180 µL
GT Sample Loading Reagent (20x)	0,3 µL	18 µL
AmpliTaq Gold DNA polimerase (5U/ µL)	0,06 µL	3,6 µL
H ₂ O (DNA-free)	0,12 µL	7,2 µL
Volume Final	3,48 µL	208,8 µL

Após o preparo do *mix*, foram distribuídos 3,48 uL da mistura por poço em uma nova placa de 96 poços. Foram adicionados, também com auxílio da pipeta multicanal, 2,52 uL de cada amostra ao seu respectivo poço. Foi colocada água ao invés de DNA ao 48º poço para o controle negativo.

3.6.6.5) *Priming* do Chip

Antes de aplicar as amostras no chip é feito o processo de *priming* do mesmo. Este processo consiste em aplicar o óleo proveniente das seringas do *Fluidigm* no chip, através das 2 válvulas (Figura 14). Esse óleo tem por função lubrificar os micro canais do chip para a passagem das amostras e sondas. Após aplicá-lo no chip, o mesmo é levado para o equipamento *IFC (Integrated Fluidic Circuit) Controler MX* (específico para placa 48x48), onde é realizado o *priming* (lubrificação do chip pelo óleo por pressão).

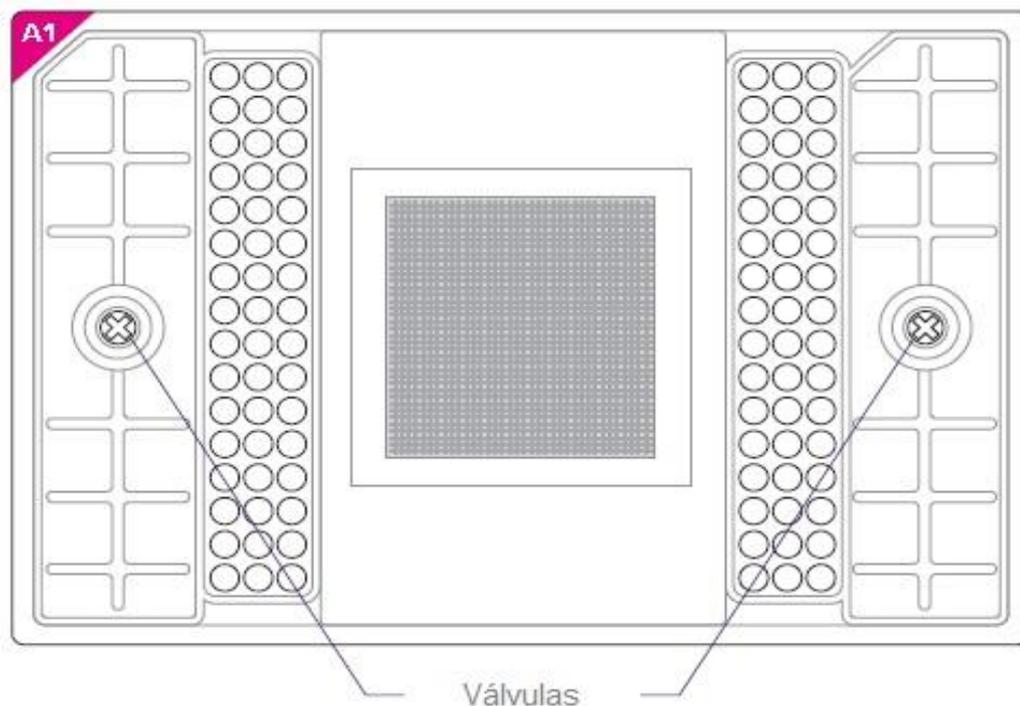


Figura 14: Esquema do chip GT 48x48. Fonte: www.fluidigm.com, com adaptações.

3.6.6.6) Adição das amostras e sondas ao chip

Após o *priming* do chip, foram adicionados, com o auxílio de uma pipeta multicanal, 5 uL do *mix* da placa de amostras em cada poço do lado direito do chip. Após, foram adicionados 4 uL do *mix* da placa de sondas em cada poço do lado esquerdo do chip (Figura 15).

Mapa de Pipetagem do chip 48.48 IFC

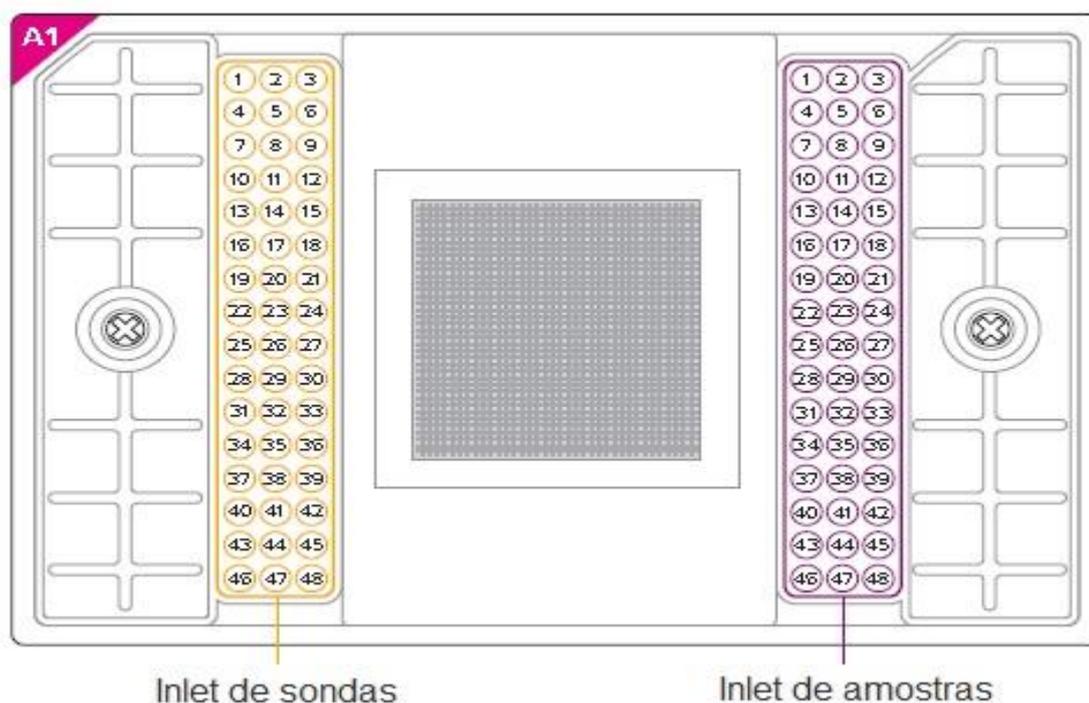


Figura 15: Mapa de pipetagem do chip 48x48, Fonte: www.fluidigm.com, com adaptações.

3.6.6.7) Reação de PCR em tempo real

O chip foi então inserido no termociclador da BioMark onde foi realizada a reação de PCR em tempo real. Ao final da corrida os resultados foram analisados no software “FLUIDIGM SNP Genotyping Analysis”

3.7) Análise Estatística

O tamanho amostral foi estimado utilizando um processo iterativo para calcular o número de indivíduos necessário para testar a diferença de uma variável qualitativa entre dois grupos. Uma amostra conservadora e de conveniência foi escolhida, uma vez que diferentes polimorfismos foram analisados neste estudo. A seguinte fórmula foi utilizada para calcular o tamanho da amostra,

$$n = \frac{2pq(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{d^2} \quad \text{onde } Z_{\alpha} = 1,96 \text{ e } Z_{\beta} = 0,84$$

Onde pq é a variância de uma variável binomial, Z é o valor crítico para definir um intervalo de confiança de 95% de uma distribuição normal e d é a maior

diferença aceita entre os grupos. Foi utilizado o p e q igual a 0,5 e d equivalente a 0,20 (80% de poder estatístico). Esta fórmula resultou então em um valor mínimo aproximado de 84 indivíduos em cada grupo.

A determinação da normalidade dos parâmetros antropométricos e pressóricos da amostra foi realizada através do teste de Shapiro Wilk. As variáveis não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram apresentadas na forma de mediana e percentil 25 e 75. Posteriormente, as diferenças dessas variáveis entre o grupo de obesos normotensos e hipertensos foram testadas através do teste Mann-Whitney.

A obtenção da frequência dos genótipos e alelos foi realizada através de contagem do gene. Posteriormente, a associação dos genótipos e alelos com a hipertensão foi realizada através do teste do Qui-Quadrado, tendo o *Odds Ratio* (OR) calculado. Este teste também foi utilizado para investigar se as frequências genotípicas do grupo de normotensos e hipertensos estavam de acordo com o equilíbrio genético de Hardy-Weinberg. No intuito de aprofundar as análises de associação, as diferenças nas frequências genotípicas entre os grupos foram estudadas tanto para o modelo dominante quanto para o recessivo. Ademais, foi utilizada a regressão logística para ajustar por peso e idade.

A influência dos genótipos na variação dos parâmetros antropométricos e pressóricos entre os grupos caso e controle foi verificada através do teste de Kruskal-Wallis. Em seguida, para averiguar se os polimorfismos influenciavam as variáveis quantitativas, foi efetuado o mesmo teste não-paramétrico dentro de cada grupo.

As análises foram realizadas através do *software* SPSS V22 (IBM, Chicago, IL, USA) e Excel. Todos os p-valor foram ajustados pela correção de Holm-Bonferroni, segundo a fórmula $1-(1-p\text{-valor})^n$, onde n é o número de análises múltiplas realizadas. Apenas valores abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4) Resultados

4.1) Descrição da amostra

As análises foram realizadas em 311 pacientes obesos, sendo 99 normotensos (32%) e 212 hipertensos (68%). Dentro do grupo de normotensos havia 80 mulheres e 19 homens, já no grupo de hipertensos havia 166 mulheres e 46 homens. A mediana, assim como os quartis, dos parâmetros antropométricos e níveis pressóricos desta amostra, estão assinalados na Tabela 9. A PAS e PAD de indivíduos hipertensos que faziam uso de medicação para controle da PA foram desconsideradas, pois os valores aferidos não correspondiam aos verdadeiros valores pressóricos desses indivíduos. A partir desses resultados, pode-se observar que os indivíduos hipertensos apresentaram valores significativamente maiores para peso, IMC, pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica, circunferência abdominal e circunferência de quadril. .

Tabela 9: Análise das variáveis descritivas da amostra de obesos.

Variável	N	Amostra Total	Hipertensos (n=212)	Normotensos (n=99)	p-valor
Peso	311	122,5 (103,8 ; 141)	128 (110,6 ; 146,68)	112 (98,9 ; 134,2)	0,001
IMC	311	45,3 (39,7 ; 51,8)	45,6 (40,75 ; 53,1)	42,5 (37,4 ; 48,5)	< 0,001
PAS	183	130 (115 ; 147)	147 (132,5 ; 158,5)	116 (110 ; 123)	< 0,001
PAD	183	84 (75 ; 94)	94,5 (90 ; 100)	77 (70; 81)	< 0,001
CC	307	132,5 (120 ; 145)	137,5 (123,75 ; 150)	127 (115 ; 139,5)	0,001
CQ	307	139,5 (128 ; 150)	141 (128,75 ; 153)	133 (125 ; 147)	0,004
RCQ	307	0,95 (0,90 ; 1,00)	0,97 (0,92 ; 1,02)	0,95 (0,89 ; 0,99)	0,117

4.2) Análises Genéticas

4.2.1) Gene *ECA*

4.2.1.1) Amplificação do gene *ECA*

O resultado da inserção de 287 pares de bases no íntron 16 do gene da enzima conversora de Angiotensina I (*ECA*) foi visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 16).

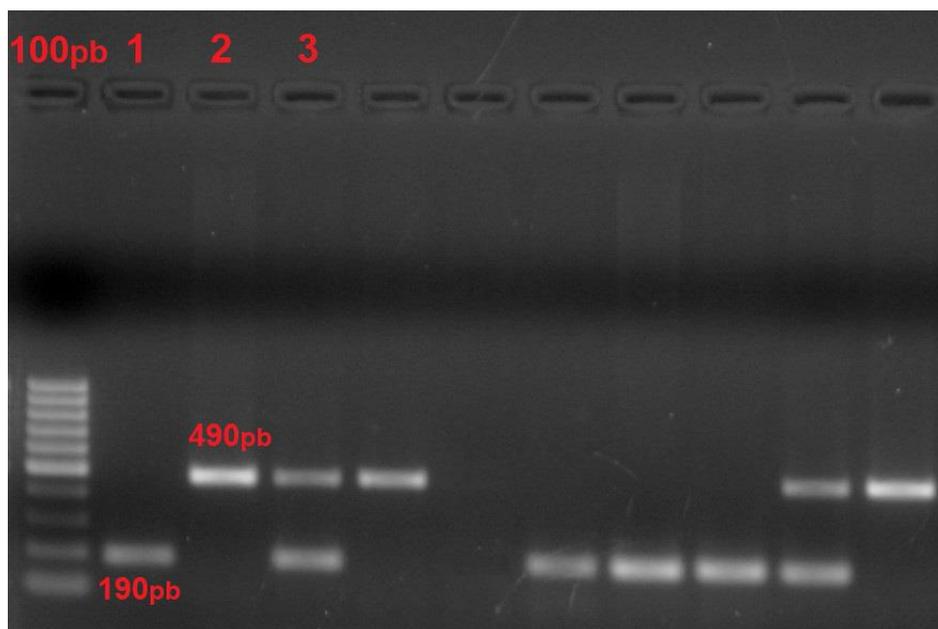


Figura 16: Visualização em gel de agarose 1,5% do resultado do INDEL do gene *ECA*. Legenda: O marcador utilizado foi o de 100 pares de base (pb) e cada paciente foi representado por um slot no gel. Indivíduos que apresentam apenas a banda mais abaixo no gel (190 pares de base) não têm a inserção e possuem, dessa forma, o genótipo DD (indivíduo 1). Da mesma forma, pacientes que apresentam apenas a banda mais acima no gel (490 pares de base) possuem a inserção, tendo, portanto, o genótipo II (indivíduo 2). Por fim, pacientes que apresentam tanto a banda de 490 pb e a banda de 190 pb no gel são heterozigotos, com genótipo DI (indivíduo 3).

4.2.1.2) Confirmação dos genótipos *ECA DD*

O resultado da reação de PCR para confirmação dos genótipos DD foi visualizado em gel de agarose 1,5% (figura 17).

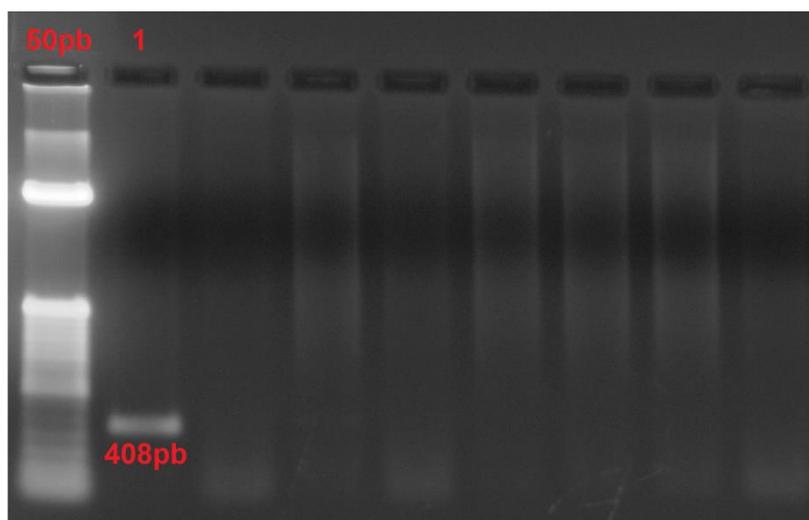


Figura 17: Visualização em gel de agarose 1,5% da confirmação dos genótipos DD. Legenda: Nesse experimento, foi utilizado o marcador de 50pb e cada paciente é representado por um slot no gel. Apenas os indivíduos que haviam apresentado genótipo DD foram genotipados através de uma nova reação de PCR. Os pacientes que haviam sido identificados como DD, mas na verdade eram heterozigotos (DI) aparecem no gel como uma banda de 408 pb (exemplo 1). Os demais indivíduos que realmente possuíam genótipo DD não aparecem no gel, pois, por não apresentarem a inserção, não houve amplificação durante a PCR.

Dos 277 pacientes em que foi possível obter resultados da amplificação, 101 indivíduos apresentaram genótipo DD, enquanto que 135 apresentaram genótipo DI e 41 genótipo II. A distribuição genotípica na amostra obedeceu ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (hipertensos: $\chi_1^2 = 0,626$; $p = 0,428$; normotensos: $\chi_1^2 = 0,248$; $p = 0,618$). Não houve diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos de hipertensos e normotensos, como mostrado na tabela 10.

Tabela 10: Comparação das frequências genotípicas e alélicas de ECA entre hipertensos e normotensos.

		Hipertensos		Normotensos					
		n= 190	n= 87	OR (95% CI)	p-valor	p-valor	p-valor	p-valor	
ECA	INDEL								
	D/D	67 (0,35)	34 (0,39)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	D/I	96 (0,51)	39 (0,45)	1,24 (0,72 - 2,16)	0,428	0,893	0,305	0,767	
	I/I	27 (0,14)	14 (0,16)	0,96 (0,45 - 2,04)	0,933	1	1	1	
	Modelo Dominante								
	D/D	67 (0,35)	34 (0,39)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	D/I + I/I	123 (0,65)	53 (0,61)	0,84 (0,5 - 1,42)	0,531	0,952	0,411	0,880	

		Modelo Recessivo						
	D/D + D/I	163 (0,86)	73 (0,84)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	I/I	27 (0,14)	14 (0,16)	1,17 (0,59 - 2,32)	0,647	0,984	0,634	0,983
Alelos	D	230 (0,61)	107 (0,61)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	I	150 (0,39)	67 (0,39)	0,96 (0,66 - 1,38)	0,833	0,999	0,740	0,995

Legenda:

p -valor \clubsuit : p -valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde $n = 4$.

p -valor $\&$: p -valor da regressão logística ajustada por peso e idade.

p -valor \spadesuit : p -valor da regressão logística ajustada por peso e idade e com a correção de Holm-Bonferroni ($n = 4$).

4.2.2) Genes *ADRB1* e *AGTR1*

Com base nas análises da PCR em tempo real, obteve-se as frequências genóticas e alélicas para os grupos de hipertensos e normotensos (Tabela 11). Além disso, a distribuição genotípica na amostra obedeceu ao equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto para o polimorfismo rs5186 (hipertensos: $\chi_{(2)}^2 = 1,902$; $p = 0,167$; normotensos: $\chi_{(1)}^2 = 0,045$; $p = 0,832$) quanto para o rs1801253 (hipertensos: $\chi_{(1)}^2 = 0,221$; $p = 0,638$; normotensos: $\chi_{(1)}^2 = 0,217$; $p = 0,641$). Ademais, os resultados mostraram que não há diferenças significativas nas frequências genóticas e alélicas entre os grupos para os dois polimorfismos.

Tabela 11: Comparação das frequências genóticas e alélicas de *ADRB1* e *AGTR1* entre hipertensos e normotensos.

		Hipertensos	Normotensos						
				OR (95% CI)	p -valor	p -valor \clubsuit	p -valor $\&$	p -valor \spadesuit	
ADRB1	rs1801253	n= 101	n= 43						
		C/C	53 (0,52)	24 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/G	39 (0,39)	17 (0,4)	1,03 (0,49 - 2,14)	0,928	1	0,445	0,951
		G/G	9 (0,09)	2 (0,05)	1,74 (0,44 - 6,87)	0,429	0,894	0,397	0,868
		Modelo Dominante							
	Genótipos	C/C	53 (0,52)	24 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/G + G/G	48 (0,48)	19 (0,44)	0,87 (0,43 - 1,77)	0,717	0,994	0,947	1,000
		Modelo Recessivo							
		C/C + C/G	92 (0,91)	41 (0,95)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/G	9 (0,09)	2 (0,05)	0,58 (0,15 - 2,24)	0,435	0,898	0,412	0,885
	Alelos	C	145 (0,72)	65 (0,76)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G	57 (0,28)	21 (0,24)	0,83 (0,46 - 1,46)	0,523	0,948	0,689	0,996
AGTR1	rs5186	n= 68	n= 37						
	Genótipos	A/A	44 (0,65)	18 (0,49)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-

	A/C	19 (0,28)	16 (0,43)	0,49 (0,21 - 1,13)	0,097	0,335	0,178	0,543
	C/C	5 (0,07)	3 (0,08)	0,65 (0,16 - 2,58)	0,543	0,956	0,757	0,997
	<i>Modelo Dominante</i>							
	A/A	44 (0,65)	18 (0,49)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/C + C/C	24 (0,35)	19 (0,51)	1,91 (0,86 - 4,24)	0,109	0,370	0,202	0,594
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	A/A + A/C	63 (0,93)	34 (0,92)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	5 (0,07)	3 (0,08)	1,17(0,3 - 4,31)	0,816	0,999	0,968	1,000
<i>Alelos</i>	A	107 (0,79)	52 (0,7)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C	29 (0,21)	22 (0,3)	1,56 (0,82 - 2,94)	0,168	0,521	0,321	0,787

Legenda:

p-valor α : p-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde $n = 4$.

p-valor β : p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade.

p-valor α : p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade e com a correção de Holm-Bonferroni ($n = 4$).

4.2.3) Gene *GSTM1*

Para confirmação dos genótipos nulos foi utilizada a técnica de PCR alelo-específico. O resultado dessa reação foi visualizado em gel de agarose 1,5%, como mostrado na figura 18.

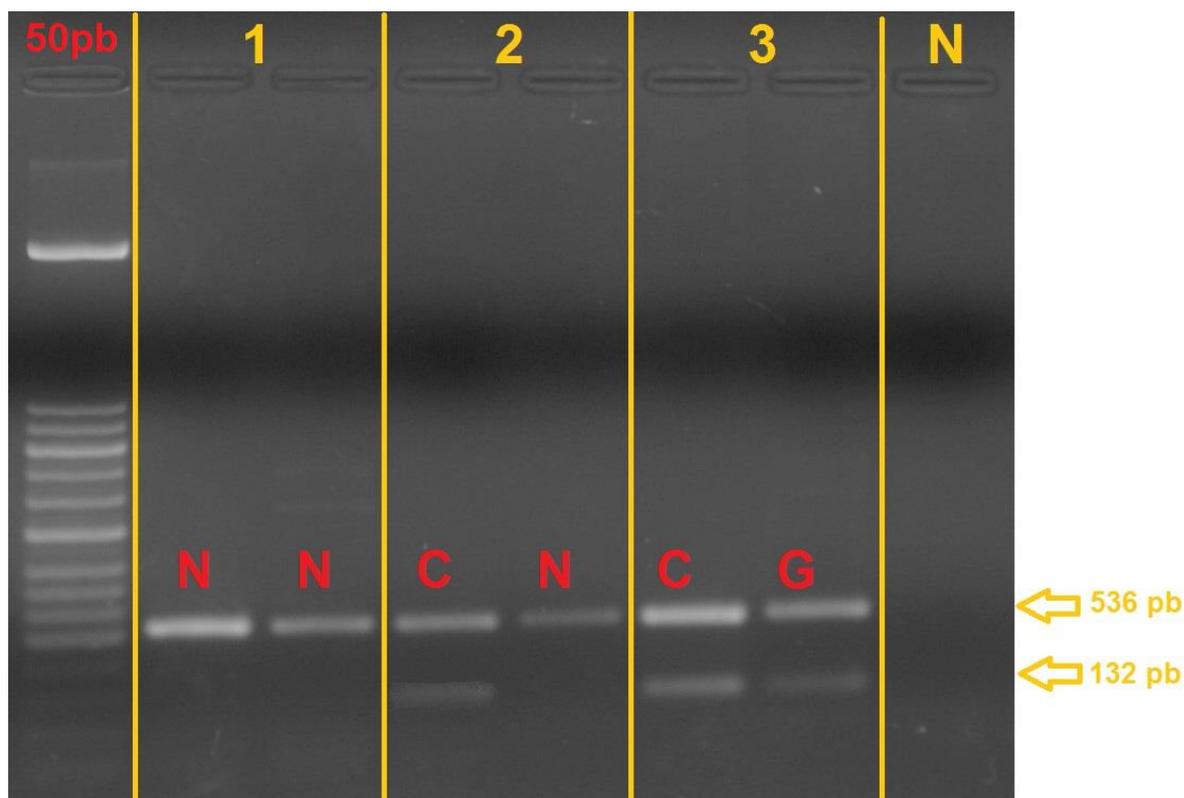


Figura 18: Confirmação dos pacientes identificados como nulos pelo PCR em Tempo Real em gel de Agarose 1,5%. Legenda: O marcador utilizado foi o de 50 pares de base (pb) e cada paciente correspondeu a 2 slots consecutivos no gel. Todos os indivíduos apresentam uma banda acima (536 pb), correspondendo à amplificação do gene da betaglobina. Dessa forma, pode-se verificar que todas as reações de PCR funcionaram nesse experimento. Para cada paciente foi aplicado no primeiro slot o produto amplificado contendo oligonucleotídeos para o alelo C (*GSTM1*B*). Já no segundo slot foi aplicado o produto amplificado contendo os oligonucleotídeos para o alelo G (*GSTM1*A*). Consequentemente, o indivíduo do exemplo 1 apresenta genótipo nulo (*GSTM1*0*), pois não houve amplificação de uma segunda banda de 132 pb (do alelo C ou do alelo G), abaixo da banda da betaglobina. Já o exemplo 2 é de um indivíduo (*GSTM1*B*), onde este possui pelo menos um cromossomo com o alelo funcional C e não apresenta o alelo G. Por fim, o indivíduo 3 é um heterozigoto, apresentando amplificação tanto para o alelo C, como para o alelo G (*GSTM1*AB*).

Dos 279 pacientes em que foi possível realizar a genotipagem, 121 indivíduos apresentaram deleção completa do gene (genótipo *GSTM1*0*), enquanto que 113 apresentaram pelo menos uma cópia funcional do alelo G (*GSTM1*A*), 14 eram heterozigotos *GSTM1*AB* e 31 apresentavam pelo menos uma cópia funcional do alelo C (*GSTM1*B*). Não houve diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos de hipertensos e normotensos, como mostrado na tabela 12.

Tabela 12: Comparação das frequências genóticas de *GSTM1* entre hipertensos e normotensos.

		Hipertensos	Normotensos				
				OR (95% CI)	p-valor	p-valor _α	
	rs5186	n= 192	n= 87				
GSTM1	Genótipos	<i>GSTM1*O</i>	82 (0,42)	39 (0,45)	0,92 (1,08 - 0,78)	0,342	0,813
		<i>GSTM1*A</i>	83 (0,43)	30(0,35)	1,00 (ref.)	-	-
		<i>GSTM1*AB</i>	10 (0,06)	4 (0,04)	0,97 (1,36 - 0,69)	0,4	0,870
		<i>GSTM1*B</i>	17 (0,09)	14 (0,16)	0,74 (0,99 - 0,56)	0,068	0,245

Legenda:

p-valor_α : p-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde n = 4.

4.2.4) Análise de SNPs pela técnica *Fluidigm 48.48 Dynamic Array*™ IFC

O resultado da técnica de *Fluidigm* foi visualizado através do *software SNP Genotyping Analysis* (Figura 19). Foram utilizados sete chips 48.48 IFC para a análise dos 311 indivíduos, tendo ocorrido, no último chip, repetição daquelas amostras que não haviam funcionado. Através do software é possível ver a discriminação alélica de cada um dos polimorfismos, além das curvas individuais de cada paciente. É possível criar um documento no formato PDF com a discriminação alélica dos 41 polimorfismos. Na figura, vê-se a discriminação alélica de quatro polimorfismos, na qual os indivíduos em verde são homozigotos para um alelo, enquanto que os indivíduos em azul são heterozigotos e os indivíduos em vermelho são homozigotos para o outro alelo.

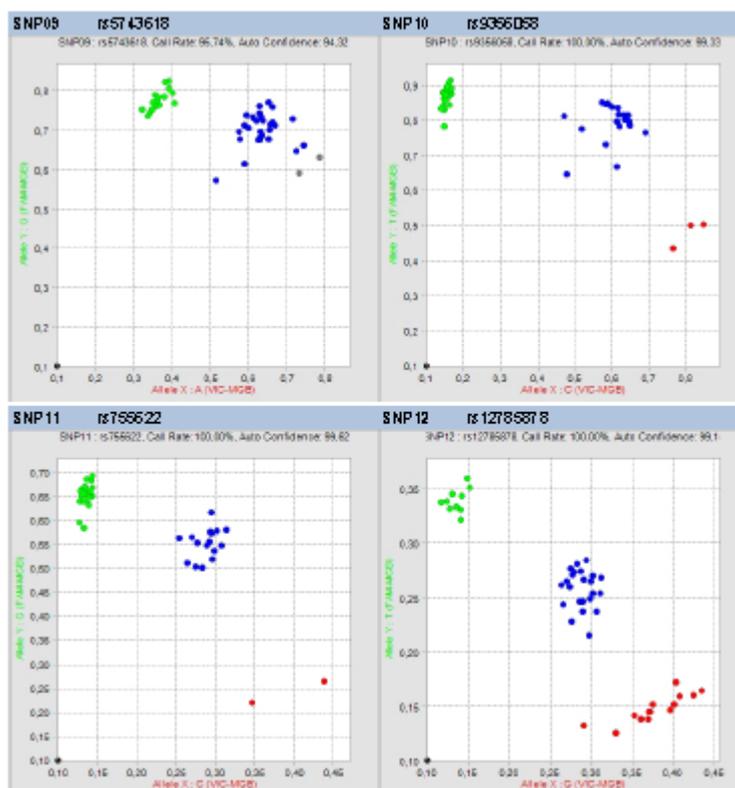


Figura 19: Resultados da técnica *Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC*, com a discriminação alélica de quatro polimorfismos, além das curvas individuais de cada paciente. Legenda: Os pontos verdes representam os indivíduos homocigotos para um dos alelos, os pontos azuis representam os heterocigotos e os pontos vermelhos representam os homocigotos para o outro alelo.

Após a obtenção dos genótipos e alelos dos pacientes, foi analisada a sua associação com a hipertensão tanto para o modelo dominante quanto para o recessivo, assim como foi averiguado se as frequências genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 13).

Nessa análise foi observado que os polimorfismos rs5743618, rs2239704, rs2430561, rs7883568, rs2254210, rs10741657 não obedeciam ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes foram, portanto, excluídos de todas as análises estatísticas. Apenas os SNPs que apresentaram resultados significativos para essas análises (antes da correção por Holm-Bonferroni) estão assinalados na tabela abaixo (tabela 13). A tabela com os resultados dos demais polimorfismos encontram-se no anexo 2 desta dissertação.

Tabela 13: Associação dos genótipos e alelos com a hipertensão

		Hipertensos	Normotensos	OR (95% CI)	p-valor	p-valor α	p-valor β	p-valor \spadesuit	
NOS2	rs8072199	n=181	n= 87						
		C/C	84 (0,46)	51 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/T	85 (0,47)	27 (0,31)	1,89 (1,09 - 3,27)	0,022	0,550	0,043	0,785
		T/T	12 (0,07)	9 (0,1)	0,80 (0,32 - 1,96)	0,628	1,000	0,11	0,984
		<i>Modelo Dominante</i>							
	<i>Genótipos</i>	C/C	84 (0,46)	51 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/T + T/T	97 (0,54)	36 (0,41)	1,62 (0,97 – 2,71)	0,062	0,894	0,185	0,999
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		C/C + C/T	169 (0,93)	78 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/T	12 (0,07)	9 (0,1)	0,6 (0,25 – 1,45)	0,262	0,999	0,033	0,691
	<i>Alelos</i>	C	253 (0,7)	129 (0,74)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T	109 (0,3)	45 (0,26)	1,22 (0,82 - 1,84)	0,316	0,999	0,843	1,000
	IL10	rs1554286	n= 201	n= 97					
		G/G	85 (0,42)	54 (0,55)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A	90 (0,44)	37 (0,38)	1,53 (0,92 - 2,55)	0,096	0,978	0,226	1,000
		A/A	26 (0,14)	6 (0,07)	2,59 (1,05 - 6,37)	0,037	0,733	0,12	0,989
		<i>Modelo Dominante</i>							
<i>Genótipos</i>		G/G	85 (0,42)	54 (0,55)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	116 (0,58)	43 (0,45)	1,7 (1,05 – 2,77)	0,03	0,656	0,117	0,987
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/A	175 (0,86)	91 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	26 (0,14)	6 (0,07)	2,12 (0,89- 5,06)	0,088	0,963	0,2	1,000
<i>Alelos</i>	G	260 (0,5)	145 (0,57)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	

	A	142 (0,5)	49 (0,43)	1,6 (1,09 – 2,35)	0,014	0,389	0,076	0,937
rs1800896		n= 172	n= 83					
	T/T	86 (0,5)	38 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C	72 (0,42)	32 (0,39)	0,99 (0,56 - 1,73)	0,974	1,000	0,588	1,000
	C/C	14 (0,08)	13 (0,16)	0,47 (0,21 - 1,08)	0,077	0,939	0,08	0,946
<i>Modelo Dominante</i>								
Genótipos	T/T	86 (0,5)	38 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C + C/C	86 (0,5)	45 (0,54)	0,84 (0,50 - 1,42)	0,528	1,000	0,865	1,000
<i>Modelo Recessivo</i>								
	T/T + T/C	158 (0,92)	70 (0,84)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	14 (0,08)	13 (0,16)	0,47 (0,21 – 1,04)	0,063	0,897	0,045	0,842
Alelos	T	244 (0,71)	108 (0,65)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	100 (0,29)	58 (0,35)	0,76 (0,51 - 1,12)	0,175	0,999	0,287	1,000
rs1800871		n= 182	n= 91					
	A/A	64 (0,35)	48 (0,53)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G	85 (0,47)	34 (0,37)	1,86 (1,08 - 3,19)	0,023	0,558	0,051	0,840
	G/G	33 (0,18)	9 (0,1)	2,65 (1,19 - 5,88)	0,016	0,431	0,068	0,915
<i>Modelo Dominante</i>								
Genótipos	A/A	64 (0,35)	48 (0,53)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G + G/G	118 (0,65)	43 (0,47)	2,04 (1,23 – 3,40)	0,005	0,169	0,026	0,623
<i>Modelo Recessivo</i>								
	A/A + A/G	149 (0,82)	82 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	33 (0,18)	9 (0,1)	1,94 (0,91 - 4,13)	0,083	0,952	0,157	0,997
Alelos	A	213 (0,59)	130 (0,71)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	151 (0,41)	52 (0,29)	1,76 (1,20 – 2,58)	0,003	0,998	0,023	0,558
MIFAS	rs755622	n= 205	n= 95					
	Genótipos	G/G	118 (0,58)	44 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-

		G/C	68 (0,33)	38 (0,4)	0,66 (0,39 - 1,12)	0,129	0,992	0,234	1,000
		C/C	19 (0,09)	13 (0,14)	0,54 (0,25 - 1,16)	0,116	0,987	0,454	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
		G/G	118 (0,58)	44 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/C + C/C	87 (0,42)	51 (0,54)	0,63 (0,39 - 1,36)	0,069	0,918	0,205	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/C	186 (0,91)	82 (0,86)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/C	19 (0,09)	13 (0,14)	0,63 (0,30 - 1,32)	0,229	0,999	0,659	1,000
	<i>Alelos</i>	G	304 (0,74)	126 (0,66)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C	106 (0,26)	64 (0,34)	0,68 (0,47 - 0,99)	0,046	0,877	0,258	1,000
	rs2069837		n= 68	n= 32					
IL6	<i>Genótipos</i>	A/A	55 (0,81)	23 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G	13 (0,19)	9 (0,28)	0,34 (0,12 - 0,94)	0,037	0,733	0,237	1,000
		G/G	0 (0)	0 (0)		-	-	-	-
	<i>Alelos</i>	A	123 (0,9)	35 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G	13 (0,1)	9 (0,2)	0,40 (0,16 - 0,99)	0,049	0,828	0,237	1,000
	rs2282697		n= 201	n= 98					
GC	<i>Genótipos</i>	G/G	127 (0,63)	72 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-		
		G/C	65 (0,32)	25 (0,26)	1,46 (0,85 - 2,49)	0,166	0,998	0,147	0,996
		C/C	9 (0,04)	1 (0,01)	3,60 (0,76 - 16,88)	0,104	0,979	0,183	0,999
		<i>Modelo Dominante</i>							
		G/G	127 (0,63)	72 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-		
		G/C + C/C	74 (0,37)	26 (0,27)	0,62 (0,36 - 1,05)	0,08	0,946	0,085	0,955
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/C	192 (0,96)	97 (0,99)	1,00 (Ref.)	-	-		
	C/C	9 (0,04)	1 (0,01)	0,31 (0,06 - 1,45)	0,137	0,994	0,223	1,000	
	<i>Alelos</i>	G	319 (0,79)	169 (0,86)	1,00 (Ref.)	-	-		

	C	83 (0,21)	27 (0,14)	1,61 (1,01 -2,56)	0,045	0,842	0,056	0,867	
CYP24A1	rs6013897	n= 159	n= 75						
	T/T	96 (0,6)	38 (0,51)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	T/A	46 (0,29)	32 (0,43)	0,57 (0,31 - 1,01)	0,058	0,876	0,046	0,877	
	A/A	17 (0,11)	5 (0,07)	1,26 (0,46 - 3,43)	0,639	1,000	0,831	1,000	
	<i>Modelo Dominante</i>								
	Genótipos	T/T	96 (0,6)	38 (0,51)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/A + A/A	63 (0,4)	37 (0,49)	0,67 (0,39 – 1,16)	0,159	0,998	0,102	0,977
	<i>Modelo Recessivo</i>								
		T/T + T/A	142 (0,89)	70 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	17 (0,11)	5 (0,07)	1,57 (0,59 – 4,13)	0,357	0,999	0,506	1,000
<i>Alelos</i>	T	238 (0,75)	108 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	A	80 (0,25)	42 (0,28)	0,82 (0,55 – 1,13)	0,5	1,000	0,339	1,000	
MBL2	rs1800450	n=205	n= 97						
	G/G	173 (0,84)	76 (0,78)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	G/A	29 (0,14)	19 (0,2)	0,66 (0,35 - 1,24)	0,205	0,999	0,044	0,793	
	A/A	3 (0,01)	2 (0,02)	0,61 (0,13 - 2,82)	0,533	1,000	0,541	1,000	
	<i>Modelo Dominante</i>								
	Genótipos	G/G	173 (0,84)	76 (0,78)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	32 (0,16)	21 (0,22)	0,66 (0,36 – 1,21)	0,186	0,999	0,038	0,742
	<i>Modelo Recessivo</i>								
		G/G + G/A	202 (0,99)	95 (0,98)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	3 (0,01)	2 (0,02)	0,66 (0,14 – 3,08)	0,591	1,000	0,616	1,000
<i>Alelos</i>	G	375 (0,91)	171 (0,88)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	A	35 (0,09)	23 (0,12)	0,69 (0,39- 1,19)	0,183	0,999	0,052	0,846	
	rs7096206	n= 193	n= 82						
	Genótipos	C/C	148 (0,77)	52 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	

	C/G	42 (0,22)	27 (0,33)	0,54 (0,30 - 0,96)	0,037	0,733	0,084	0,954
	G/G	3 (0,02)	3 (0,04)	0,35 (0,08 - 1,46)	0,151	0,997	0,121	0,989
<i>Modelo Dominante</i>								
	C/C	148 (0,77)	52 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/G + G/G	45 (0,23)	30 (0,37)	0,52 (0,30 – 0,91)	0,023	0,558	0,044	0,793
<i>Modelo Recessivo</i>								
	C/C + C/G	190 (0,98)	79 (0,96)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	3 (0,02)	3 (0,04)	0,41 (0,10 - 1,41)	0,224	0,999	0,159	0,998
<i>Alelos</i>	C	338 (0,88)	131 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	48 (0,12)	33 (0,2)	0,56 (0,34 – 0,91)	0,019	0,490	0,028	0,630

Legenda:

p-valor_α : p-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde n = 35.

p-valor_λ : p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade.

p-valor_♣ : p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade e com a correção de Holm-Bonferroni (n = 35).

A influência dos genótipos na variação dos parâmetros antropométricos e pressóricos dentro da amostra está apresentada na tabela 14. Em seguida, para averiguar se os polimorfismos influenciavam essas variáveis quantitativas, foi efetuada a mesma análise dentro do grupo de pacientes hipertensos (tabela 15) e do grupo de pacientes normotensos (tabela 16).

Tabela 14: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos na amostra total.

VARIÁVEIS	Genótipos						p-valor	p-valor ♦
	rs379527		rs1800871		rs1554286			
	N	AA	N	AC	N	CC		
PESO	163	121,3 (105,4 ; 137,4)	98	121,2 (101,3 ; 140,125)	5	132 (115,2 ; 150,5)	0,038	0,742
	N	GG	N	GA	N	AA		
IMC	42	48,05 (41,975 ; 52,975)	119	46,7 (41,4 ; 53,1)	112	43,05 (38,025 ; 49,775)	0,006	0,19
CC	42	139,5 (117,625 ; 147,25)	118	134,5 (125,875 ; 145,5)	111	128 (118 ; 142)	0,01	0,297
PAD	18	90 (79,75 ; 98,25)	79	86 (77 ; 98)	68	80 (71,25 ; 90,0)	0,017	0,451
	N	GG	N	GA	N	AA		
IMC	139	43,6 (38,4 ; 49,8)	127	46,9 (40,8 ; 52,8)	32	48,55 (42,175 ; 52,275)	0,028	0,63
	N	GG	N	GC	N	CC		
Peso	162	123,55 (105,575 ; 143,525)	106	125,7 (105,225 ; 139,15)	32	108,7 (96,4 ; 123,2)	0,012	0,345
CC	161	136 (123,5 ; 146,25)	104	130,75 (121 ; 144)	31	125 (113 ; 135)	0,017	0,451
	N	AA	N	AG	N	GG		
RCQ	78	0,975 (0,91 ; 1,0225)	22	0,935 (0,86 ; 0,96)	0	-	0,003	0,1
	N	GG	N	GA	N	AA		
CQ	245	139 (128 ; 150)	48	139,5 (123 ; 150,75)	5	173 (146,5 ; 175,5)	0,03	0,656
	N	CC	N	CG	N	GG		
Peso	200	128,8 (105,05 ; 142,025)	69	111,7 (97,65 ; 133,25)	6	133,5 (118,975 ; 170,025)	0,021	0,524

Legenda: *p*-valor♦ : *p*-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde n = 35. O polimorfismo rs2069837 não apresentou indivíduos com o genótipo GG e, portanto, teve seus valores representados por “-“. Os valores representam a mediana e percentil 25; percentil 75.

Tabela 15: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos no grupo de hipertensos.

VARIÁVEIS	Genótipos em Hipertensos						<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor♦
	rs379527		rs2069845		rs2069837			
	N	AA	N	AC	N	CC		
RCQ	106	0,94 (0,89 ; 1,0)	67	0,97 (0,93 ; 1,02)	3	1,03 (1,01 ; -)	0,006	0,190
	N	GG	N	GA	N	AA		
PAS	22	153,5 (138 ; 170)	26	140 (130,75 ; 147)	38	149 (139,5 ; 162,25)	0,004	0,131
PAD	22	100 (91,5 ; 111,75)	26	90 (86 ; 94,25)	38	98 (90 ; 100,25)	0,011	0,321
	N	AA	N	AG	N	GG		
Peso	55	134,5 (113,5 ; 151)	13	121,1 (98,85 ; 127,15)	0	-	0,041	0,769
CC	55	144 (126,5 - 125)	13	133 (114,5 ; 139,5)	0	-	0,022	0,541
RCQ	55	0,98 (0,91 ; 1,03)	13	0,93 (0,86 ; 0,965)	0	-	0,020	0,507
	N	CC	N	CT	N	TT		
PAD	32	96,5 (90 ; 103,75)	39	90 (85 ; 100)	4	100,5 (93,25 ; 113,75)	0,035	0,713
	N	AA	N	AG	N	GG		
PAS	37	144 (131 ; 150)	28	146,5 (130,5 ; 160,75)	10	156 (148,75 ; 164)	0,033	0,691

Legenda: *p*-valor♦ : *p*-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde n = 35. O polimorfismo rs2069837 não apresentou indivíduos com o genótipo GG e, portanto, teve seus valores representados por “-“. Os valores representam a mediana e percentil 25; percentil 75.

Tabela 16: Diferença entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos no grupo de normotensos.

VARIÁVEIS	Genótipos em Normotensos						p-valor	p-valor ♦
	rs2282697		rs2234167		rs1861493			
	N	GG	N	GC	N	CC		
RCQ	70	0,94 (0,88 ; 0,98)	25	0,97 (0,94 - 1,005)	1	1,18	0,013	0,367
	rs2234167		rs1861493		rs755622			
	N	GG	N	GA	N	AA		
PAS	61	114 (108,5 ; 122)	20	121 (110,25 ; 130)	0	-	0,042	0,777
	N	AA	N	AG	N	GG		
PAS	27	122 (112 ; 129)	11	110 (104 ; 111)	3	123 (121, -)	0,007	0,218
	rs755622		rs2069832		rs1800795			
	N	GG	N	GC	N	CC		
Peso	44	110,850 (96,775 ; 136,6)	38	123,05 (104,625 ; 135,575)	13	98,9 (90,2 ; 111)	0,011	0,321
	N	GG	N	AG	N	AA		
Peso	58	112,6 (98,975 ; 130,1)	29	117,2 (103,6 ; 137,05)	5	93,2 (80,85; 103,35)	0,037	0,733
IMC	58	42,2 (37,475 ; 46,9)	29	43,7 (37,8 ; 51,35)	5	36,1 (31,7 ; 38)	0,027	0,616
CC	56	126 (115,5 ; 137,75)	29	130 (116,5 ; 144,25)	5	112 (102,75 ; 123,75)	0,047	0,815
CQ	56	134 (124,125 ; 146,125)	29	132,5 (125,5 ; 148,5)	5	121(115 ; 125)	0,023	0,557
	N	GG	N	GC	N	CC		
Peso	58	110,85 (97,05 ; 127,325)	32	124,05(104,775 ; 140,275)	6	98 (92,075 ; 107,775)	0,028	0,630
IMC	58	41,8 (36,15 ; 46,55)	32	45,95 (39,2 ; 52,975)	6	37,2 (35,225 ; 39,325)	0,012	0,345
CC	56	125,75 (113,5 ; 137)	32	134 (119,75 ; 144,625)	6	118,25 (110,125 ; 126,75)	0,046	0,808

CQ	56	133 (123,125 ; 142,750)	32	139 (126,5 ; 150)	6	125 (121 ; 132,25)	0,046	0,808
rs7138803								
	N	GG	N	GA	N	AA		
CC	50	124 (111,5 ; 134)	30	137 (121,5 ; 146)	10	128 (117,625 ; 139,375)	0,039	0,752
rs1024611								
	N	AA	N	AG	N	GG		
CC	45	129 (122 ; 141,5)	36	125,25 (115,5 ; 137,75)	6	111,5 (102,15 ; 130,5)	0,049	0,828

Legenda: *p*-valor♦ : *p*-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde $n = 35$.

O polimorfismo rs2234167 não apresentou indivíduos com o genótipo AA e, portanto, teve seus valores representados por "-".

Os valores representam a mediana e percentil 25; percentil 75.

4.2.4.1) Polimorfismos associados à HAS

Nesse estudo, os SNPs dos genes *NOS2*, *IL10*, *MIFAS*, *IL6*, *GC*, *CYP24A1* e *MBL2* foram associados ao risco de desenvolver hipertensão. O genótipo heterozigoto CT do polimorfismo rs8072199 (*NOS2*) foi associado ao desenvolvimento da HAS ($p=0,043$), idem no modelo recessivo ($p=0,033$).

No gene *IL10* foram encontrados três polimorfismos associados à HAS. Para o SNP rs1554286, o alelo A ($p=0,014$) e o genótipo AA ($p=0,037$) em modelo dominante ($p=0,03$) foram associados a essa doença. Ademais, o modelo recessivo do SNP sr1800896 foi relacionado à HAS ($p=0,045$). Por fim, os genótipos AG ($p=0,023$) e GG ($p=0,016$) do SNP rs1800871 foram associados a essa patologia em modelo dominante ($p= 0,026$). Além disso, o alelo G desse mesmo polimorfismo apresentou associação com a hipertensão ($p= 0,023$).

O alelo C ($p=0,046$) do polimorfismo rs755622 (*MIFAS*) foi associado à HAS, assim como o alelo G e o genótipo AG do polimorfismo rs2069837 (*IL6*). É importante ressaltar que não foram encontrados indivíduos homozigotos mutados (GG) para o polimorfismo rs755622. Já para o gene *GC* (rs2282679), o alelo C ($p=0,045$) apresentou associação com a HAS, bem como o genótipo TA ($p=0,046$) do polimorfismo rs6013897 (*CYP24A1*). No gene *MBL2*, o genótipo heterozigoto GA ($p=0,044$) do polimorfismo rs1800450 foi associado à HAS em modelo dominante ($p=0,038$). Nesse mesmo gene, o genótipo heterozigoto CG ($p=0,037$) do SNP rs7096206 foi associado à HAS em modelo dominante ($p= 0,044$). Por fim, o alelo G desse mesmo polimorfismo também foi associado à doença ($p= 0,028$).

4.2.4.2) Polimorfismos associados às variáveis antropométricas e pressóricas

Nosso estudo associou o genótipo CC do polimorfismo rs379527 (*TNFSF14*) a um maior peso corporal ($p=0,038$). O genótipo AA do SNP rs1800871 (*IL10*) foi relacionado a maiores valores de IMC ($p=0,006$), CC ($p=0,01$) e PAD ($p=0,017$), assim como o genótipo AA do rs1554286 (*IL10*) mostrou-se associado a um IMC mais alto ($p=0,028$). Ademais, o genótipo CC do rs755622 (*MIFAS*) foi associado a menores valores de peso ($p=0,012$) e circunferência da cintura ($p=0,017$). Foi

observado também que o alelo G do rs2069837 (*IL6*) resulta em valores menores de RCQ ($p=0,003$). Os genótipos AA do rs1800450 e GG do rs7096206 (ambos do gene *MBL2*) foram associados a maiores valores de CQ ($p=0,03$) e peso ($p=0,021$), respectivamente.

No grupo de indivíduos hipertensos, o genótipo CC do polimorfismo rs379527(*TNFSF14*) foi associado a um maior RCQ ($p=0,006$). No gene *IL6*, o genótipo heterozigoto GA (rs2069845) foi associado à PAS ($p=0,004$) e PAD ($p=0,011$) menores, assim como o genótipo AG (rs2069837 do mesmo gene) a menores valores de peso ($p=0,041$), RCQ ($p=0,022$) e CC ($p=0,02$). O SNP rs8072199 (*NOS2*) teve o genótipo CT associado a uma menor PAD ($p=0,035$), enquanto que o rs731236 (*VDR*) teve o genótipo GG relacionado a valores maiores de PAS ($p=0,033$).

Para as análises dentro no grupo de normotensos, o genótipo AA (rs2069832) do gene *IL6* apresentou menores valores de peso corporal ($p=0,037$), IMC ($p=0,027$), CC ($p=0,047$) e CQ ($p=0,023$). Da mesma forma, o genótipo CC (rs1800795) do mesmo gene teve menores valores de peso corporal ($p=0,028$), IMC ($p=0,012$), CC ($p=0,046$) e CQ ($p=0,046$). O genótipo GA (rs7138803) do gene *FAIM2* apresentou maiores valores de circunferência de cintura ($p=0,039$), enquanto que o genótipo GG (rs1024611) do gene *MCP1* teve menores valores para essa mesma variável ($p=0,049$). No gene *GC* (rs2282697), o genótipo CC teve maiores índices de RCQ ($p=0,013$). Ademais, o gene do receptor HVEM (rs2234167) teve o alelo A relacionado a maiores valores de PAS ($p=0,042$). Por fim, o genótipo AG (rs1861493) do gene *IFNG* foi associado a menores valores de PAS ($p=0,007$), assim como o genótipo CC (rs755622) do gene *MIFAS* foi relacionado a um menor peso corporal ($p=0,011$).

5) Discussão

Concomitante ao processo de industrialização mundial a partir do século XIX, houve também uma 3ª transição epidemiológica em relação aos padrões de mortalidade, fertilidade, expectativa de vida e principais causas de morte. Nesta terceira fase, teoriza-se que as pandemias de doenças infecciosas foram substituídas como as principais causas de morte por doenças degenerativas e os agentes infecciosos foram ultrapassados como o principal contribuinte para a morbidade e mortalidade por causas antropogênicas (MCKEOWN, 2009).

Nesse contexto, pode-se averiguar que a HAS, após os processos de revolução industrial, passou a apresentar papel muito mais expressivo no panorama das principais causas de morte. Isso se deve ao fato de que muitos fatores ambientais gerados pela industrialização e urbanização, tais como obesidade, ingestão elevada de sal, consumo excessivo de álcool, estresse social e envelhecimento são reconhecidos como fatores contributivos importantes para aumento da PA (LÓPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2013). Da mesma forma, a redução no gasto de energia devido à adoção de um estilo de vida mais sedentário e o aumento da ingestão calórica têm contribuído para geração de um ambiente obesogênico (UNGER, 2003; SWINBURN *et al.*, 2011), o que vem tornando a obesidade uma epidemia mundial (WHO, 2014).

Em relação aos países em desenvolvimento - como o Brasil - mudanças como o aumento do acesso a dietas ocidentalizadas e a descontinuação dos hábitos alimentares tradicionais podem fundamentar o aumento dramático da prevalência da HAS e obesidade observado nos últimos anos (LÓPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2013). Ademais, a forma caótica em que o processo de urbanização se desdobra nos países em desenvolvimento pode contribuir para o aumento dos casos de hipertensão e obesidade. Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência da HAS é maior nas áreas urbanas quando comparada com as áreas rurais de um mesmo país. Ademais, foi observado que áreas que foram urbanizadas por períodos mais longos parecem ter maior prevalência de obesidade e diabetes, além de maiores níveis de estresse, o que contribui para o aumento da prevalência da hipertensão (TIBAZARWA; DAMASCENO, 2014).

5.1) Peso corporal, IMC e a HAS

Existe uma clara associação do aumento de peso corporal e o desenvolvimento da HAS. De fato, a hipertensão relacionada à obesidade representa um fenótipo distinto, tendo em vista sua complexa fisiopatologia, que envolve a disfunção do tecido adiposo, alterações das adipocinas, resistência à insulina, disfunção do sistema imunológico, atividade inadequada dos sistemas nervoso simpático e SRAA e função renal e vascular anormal. A chave fisiopatológica desta forma de hipertensão é o acúmulo excessivo de gordura e, portanto, a redução de peso é recomendada como a terapia de primeira linha para o tratamento da HAS relacionada à obesidade (GILARDINI *et al.*, 2016). A diminuição do peso corporal tem se mostrado ser a abordagem de tratamento não-farmacológico mais eficaz. Em pacientes que fazem uso de medicação anti-hipertensiva, foi demonstrado que uma perda modesta de peso diminui ou mesmo interrompe a necessidade da medicação. O efeito de diminuição da pressão arterial gerado pela perda de peso é resultado provavelmente de uma melhora na sensibilidade à insulina e uma diminuição na atividade do sistema nervoso simpático (MERTENS; GAAL, 2000).

Em nosso estudo, ficou clara a influência do peso para o desenvolvimento da HAS, em que a mediana do peso dos indivíduos hipertensos (128 kg) diferiu significativamente da mediana de indivíduos normotensos (112 kg). Da mesma forma, o IMC apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (45,6 e 42,5, respectivamente). Em relação a essa medida antropométrica, diversos estudos epidemiológicos também demonstraram uma associação entre o índice de massa corporal e a PA em pacientes com peso normal (eutróficos) e com sobrepeso (MERTENS; GAAL, 2000).

5.2) CC, CQ e RCQ e a HAS

A circunferência da cintura (CC) foi proposta como um indicador da massa adiposa abdominal. Verificou-se que uma circunferência da cintura acima de 88 cm nas mulheres e acima de 102 cm nos homens apresenta correlação com os níveis pressóricos (MERTENS; GAAL, 2000). Um estudo feito por Kanai e colaboradores,

em 1996, constatou que a alteração da pressão arterial média após a redução de peso estava correlacionada com alterações na área de gordura visceral, e não com alterações no peso corporal ou IMC. Isto sugere que a diminuição da gordura intra-abdominal reduz a PA em pacientes obesos hipertensos (KANAI *et al.*, 1996). Desta forma, o aumento da adiposidade visceral está mais fortemente associado à hipertensão do que o aumento da adiposidade total ou subcutânea (CHANDRA *et al.*, 2014).

Tendo em vista essas descobertas, a OMS sugeriu que a CC poderia ser usada como uma alternativa ao IMC ao examinar a associação entre o *status* de peso e o risco de doenças, pois é sensível ao tamanho corporal, assim como à porcentagem de gordura e distribuição da mesma (WHO, 2011). Os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com a literatura, pois foi vista uma diferença significativa entre a circunferência da cintura no grupo de indivíduos hipertensos (137,5 cm) quando comparado aos indivíduos normotensos (127cm). Da mesma forma, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a circunferência do quadril.

A relação cintura/quadril (RCQ), também muito descrita na literatura, é igualmente uma variável utilizada para correlacionar a adiposidade visceral ao desenvolvimento de doenças (MERTENS; GAAL, 2000). Contudo, em nosso estudo não foi encontrada uma associação positiva entre essa variável e o desenvolvimento da HAS.

5.3) Gene ECA

A enzima conversora da angiotensina (ECA) é um componente chave do SRAA que contribui para a regulação da PA. Um dos polimorfismos mais significativos no gene que codifica essa enzima é a inserção / deleção (I / D) de 287 pb no íntron 16, que determina os níveis da enzima conversora da angiotensina no plasma e tecidos (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2014).

Foi observado que os níveis de ECA plasmáticos são os mais elevados em indivíduos com o genótipo DD, intermediários em indivíduos com o genótipo DI e os mais baixos em indivíduos com o genótipo II. Ademais, os linfócitos T e ECA cardíaca estão aumentados em indivíduos com o genótipo DD (MIZUIRI 2001).

Contudo, apesar das evidências de que esse polimorfismo influencia as quantidades de enzima circulantes no plasma, sua associação com o desenvolvimento da HAS ainda é muito debatida pelos cientistas. Diversos estudos foram feitos demonstrando uma associação positiva do genótipo DD e a hipertensão (KRISHNAN *et al.*, 2016; PARAMASIVAM *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016). Contudo, não foi encontrada associação desse polimorfismo com a predisposição às doenças cardiovasculares (DCV), tal qual imaginado anteriormente, visto que a HAS predispõe ao desenvolvimento de DCV (WANG *et al.*, 2013; BONFIM-SILVA FIGUERO *et al.*, 2016; BRIONGOS-FIGUERO *et al.*, 2016)

Em nosso estudo não foi encontrada uma associação significativa entre o genótipo DD ou o alelo D e a predisposição à HAS. Essa ausência de correlação positiva já foi encontrada em outros estudos (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992; ALMADA, 2010; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2010; FREIRE, 2016) e fomenta o debate sobre a real contribuição do genótipo DD para a fisiopatologia da HAS.

5.4) Gene *GSTM1*

Esse gene codifica uma enzima que pertence à superfamília GST, composta de oito subtipos principais em humanos, denominados GSTA, GSTM, GSTK, GSTO, GSTP, GSTS, GSTT e GSTZ. Essas enzimas atuam na desintoxicação de fase II do organismo, catalisando a conjugação de glutathione a uma ampla variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos (TOWNSEND; TEW, 2003). Os polimorfismos mais estudados das enzimas GST são aqueles que ocorrem nos loci *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*; os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* são caracterizados por uma deleção completa do gene, conhecido como genótipo nulo. Esses genótipos nulos levariam à ausência total de atividade enzimática GST e poderiam potencialmente predispor o organismo ao estresse oxidativo (ESLAMI; SAHEBKAR, 2014).

O genótipo de deleção *GSTM1* está associado a níveis aumentados de marcadores de inflamação e peroxidação lipídica em humanos. Contudo, apesar do papel proeminente do estresse oxidativo no desenvolvimento de DCVs, as variantes de genes *GSTM* não foram consistentemente associadas às patologias cardiovasculares em humanos (DELLES *et al.*, 2008).

A despeito do genótipo nulo ter sido associado em muitos estudos ao desenvolvimento da HAS (CAPOLUONGO *et al.*, 2009; CRUZ-GONZALEZ *et al.*, 2009; PETROVIĆ; PETERLIN, 2014), não foram encontrados resultados significativos para essa associação em nosso estudo. Não obstante, o resultado negativo encontrado nessa análise é consonante com os achados de diversos outros pesquisadores, que igualmente não encontraram associação do genótipo nulo com a HAS (MARINHO *et al.*, 2007; ONIKI *et al.*, 2008; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2010; POLIMANTI *et al.*, 2011; KOSAR *et al.*, 2012).

5.5) Genes *ADRB1* e *AGTR1*

O receptor adrenérgico beta 1 (*ADRB1*) é um membro do grupo de receptores acoplados à proteína G. Ele está localizado principalmente no sistema nervoso central, coração e artérias coronarianas e medeia os efeitos fisiológicos do hormônio epinefrina e do neurotransmissor noraepinefrina (TEPLIAKOV *et al.*, 2009). O polimorfismo Arg389Gly está localizado na região carboxi-terminal intracelular desse receptor, que é uma região altamente conservada entre as espécies e de importância para a ligação à proteína G. Foi observado que essa variante afeta a capacidade do receptor de se ligar à molécula G e que os receptores adrenérgicos beta 1 portadores do alelo Arg tinham atividade aumentada em resposta à epinefrina e norepinefrina, quando comparados aos receptores portadores do alelo Gly. Dessa forma, a variante Arg389Gly tem sido associada com morbidade cardiovascular e aumento da pressão arterial sistólica (BENGTSSON *et al.*, 2001; TIKHONOFF *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013)

No entanto, existe alguma incerteza quanto ao efeito patogênico dessa variante, uma vez que outros estudos, assim como este, não conseguiram demonstrar associação com a hipertensão (RANADE *et al.*, 2002; GJESING *et al.*, 2007).

O gene *AGTR1* codifica o receptor de angiotensina II (potente vasoconstritor) e seu polimorfismo mais bem estudado desse gene é o rs5186 (também denominado a variante A1166C), localizado na região 3'UTR. Embora este SNP não se encontre dentro de uma região de codificação ou de *splicing*, tem-se a hipótese de que o mesmo pode afetar a estabilidade e transcrição do RNA mensageiro ou,

alternativamente, estar em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo que apresente influência regulatória significativa (MOTTTL *et al.*, 2008).

Estudos sobre a relação desse polimorfismo e a HAS produziram resultados conflitantes. Diversas pesquisas encontraram associação positiva entre a variante A1166C e a hipertensão (BONNARDEAUX *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 2001; PALATINI *et al.*, 2009). Em nosso estudo, não encontramos efeito genotípico ou alélico deste polimorfismo na PA. Os resultados dessa pesquisa corroboram os estudos de Henskens e colegas em 2003 e de Gardier e colaboradores em 2004 ao não encontrar associação entre o polimorfismo e a HAS.

5.6) Análise de SNPs pela técnica *Fluidigm 48.48 Dynamic Array*™ IFC

5.6.1) Associação dos genótipos e alelos com a HAS

5.6.1.1) NOS2

O primeiro polimorfismo a apresentar uma associação com a HAS foi o SNP rs8072199, localizado no gene que codifica a enzima óxido nítrico sintetase 2 (*NOS2* ou *iNOS*). O óxido nítrico (ON) apresenta função de regulação da pressão sanguínea por ser um gás vasodilatador, e também atua como neurotransmissor no cérebro e no sistema nervoso periférico, sendo este produzido por três variantes da óxido nítrico sintetase (*NOS1*, *NOS2* e *NOS3*). Diversos estudos epidemiológicos têm investigado a influência de variantes gênicas dos genes *NOS* com fenótipos de DCVs (LEVINSSON *et al.*, 2014). Alguns polimorfismos do gene *NOS2* já foram associados ao desenvolvimento de doença arterial coronariana, à gravidade da insuficiência cardíaca (TEPLIAKOV *et al.*, 2009), AVC isquêmico (YAN *et al.*, 2011) e hipertensão (OLIVEIRA-PAULA *et al.*, 2013; LEVINSSON *et al.*, 2014; NIKKARI *et al.*, 2015).

Na literatura não foram encontradas associações entre o polimorfismo rs8072199 e a HAS. Contudo, nosso estudo sugere que o genótipo heterozigoto dessa variante intrônica esteja relacionado a hipertensão em modelo recessivo.

5.6.1.2) IL10

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina de tipo II e membro de uma família de citocinas que incluem a IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, e IL-29. Todas estas citocinas possuem uma organização genômica semelhante, ligam-se a receptores com estruturas análogas e ativam a janus kinase, que é um transdutor de sinal e ativador de vias de sinalização de transcrição. A IL-10 é a citocina que apresenta a atividade anti-imunológica e anti-inflamatória de amplo espectro mais potente de todos os membros da família (MOSSER; ZHANG, 2008). Essa citocina, produzida principalmente por monócitos, regula a produção de uma gama de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e moléculas de HLA classe II. Também aumenta a sobrevivência das células B, a proliferação e a produção de anticorpos e pode bloquear a atividade de NF-kappa B (PARK *et al.*, 2013). Por fim, a IL-10 regula positivamente um inibidor de tecido da metaloproteinase-1 da matriz e, portanto, estabiliza a placa aterosclerótica madura. Este efeito pode prevenir o desenvolvimento de algumas DCVs, como o AVC e infarto do miocárdio (TIMASHEVA *et al.*, 2008).

O gene *IL10* é altamente polimórfico, especialmente na região promotora, na qual foi observado que o polimorfismo (-1082 G/A, rs1800896) tem um efeito funcional sobre a quantidade de secreção de IL-10. A substituição G/A tem sido relacionada à alta/baixa produção de IL-10, respectivamente. Ademais, tendo em vista a relação entre o sistema imunológico e a HAS através da aterosclerose, diversos estudos já observaram associações entre SNPs do gene *IL10* e o AVC isquêmico (XIE *et al.*, 2013; PARK, *et al.*, 2013), doença arterial coronariana (BEN-HADJ-KHALIFA *et al.*, 2010) e hipertensão (ELSAID *et al.*, 2014).

Nesse estudo, o polimorfismo rs1554286 apresentou associação com o desenvolvimento da HAS. Os resultados sugerem que o alelo A é um fator de risco para o desenvolvimento dessa patologia.

Do mesmo modo, o modelo recessivo do SNP sr1800896 foi relacionado à HAS. Outros estudos também encontraram uma associação entre esse polimorfismo e o risco de AVC, em que indivíduos hipertensos e diabéticos portadores de alelo T tinham maiores riscos para a doença arterial coronariana (MUNSHI *et al.*, 2010), doença coronária assintomática (isquemia miocárdica silenciosa) (CRUZ *et al.*, 2013)

e hipertensão. No caso da HAS, o alelo C foi avaliado como fator de risco (ELSAID *et al.*, 2014).

Por fim, pode-se inferir que alelo G do SNP rs1800871 atua como fator de risco para a HAS, tendo a frequência alélica e os genótipos heterozigoto (AG) e homozigoto mutado (GG) sido associados ao desenvolvimento da HAS.

Finalmente, quando os p-valor de todos os polimorfismos do gene *IL10* foram ajustados pela correção de Holm-Bonferroni para análises múltiplas, deixaram de apresentar valores significativos.

5.6.1.3) MIFAS

O fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pleiotrópica da imunidade inata e representa um componente crucial das respostas antimicrobianas e de estresse (HERDER *et al.*, 2008). Essa citocina liga-se às células por interação com o domínio extracelular de CD74 e inicia a ativação ERK-1/2. O MIF é expresso em diversos tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, células do músculo liso vascular e cardiomiócitos (JI *et al.*, 2015). As concentrações de MIF são elevadas em indivíduos com obesidade, diabetes tipo 2 e baixa tolerância à glicose. Desta forma, pode-se observar que essa citocina está aumentada nas principais determinantes do risco metabólico para DCVs. Foi observada também uma ligação direta entre MIF e doença cardiovascular, visto que esse fator inibitório é fortemente expresso em lesões ateroscleróticas em humanos, e pode atuar controlando o recrutamento de leucócitos na aterogênese. Portanto, o MIF pode ser um novo biomarcador para o risco de doença cardiovascular (LUO *et al.*, 2016).

Foi relatado que o polimorfismo do gene *MIFAS* rs755622 (-173 G>C), localizado no promotor, estava relacionado com aumento da expressão gênica e dos níveis plasmáticos de MIF. Observou-se que essa citocina apresenta níveis mais elevados em portadores do alelo C. Ademais, verificou-se, em um estudo com a população Chinesa, que o genótipo CC e o alelo C desse SNP estão associados à doença arterial coronariana. Dessa forma, foi sugerido que a expressão de MIF governada pelas variantes genéticas no promotor do gene pode estimular o desenvolvimento de DCVs (LAM *et al.*, 2013; JI *et al.*, 2015). Essas observações

estão em desacordo com os resultados encontrados nesse estudo, que sugerem que o alelo C pode atuar como protetor para o desenvolvimento da HAS e não como fator de risco. Contudo, depois da correção de Holm-Bonferroni, esse resultado não se manteve.

5.6.1.4) IL6

A interleucina-6 (IL-6), assim como a IL-10, é uma citocina pró-inflamatória que desempenha papel central na inflamação crônica, resistência à insulina e aterogênese. Ao contrário de outras citocinas, a IL-6 é incomum, na medida em que os seus principais efeitos ocorrem em locais distintos da sua origem e são consequentes das suas concentrações plasmáticas. Por esta razão, ela é chamada de citocina endócrina (FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2011). A IL-6 é expressa em muitos tecidos, incluindo o tecido adiposo, músculo esquelético e hipotálamo, que estão envolvidos na regulação do balanço energético do corpo. Um dos principais locais para a secreção de IL-6 é a gordura visceral, o que poderia explicar a relação entre gordura visceral, inflamação sistêmica, estresse e doença coronariana em indivíduos obesos abdominalmente (CHEUNG *et al.*, 2011).

Os níveis de IL-6 plasmáticos estão associados à PAS e à PAD. Além disso, a IL-6 pode aumentar a hipertrofia miocitária e a remodelação ventricular esquerda (KAYA *et al.*, 2010). Estudos sugerem que variantes genéticas no gene que codifica a IL-6 podem influenciar a regulação da transcrição e, conseqüentemente, os níveis plasmáticos da citocina, contribuindo para o risco da HAS (KUBASZEK *et al.*, 2003). Há evidências também de que SNPs nesse gene possam contribuir e modular a severidade de AVCs (MANSO *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, não foram encontrados indivíduos homozigotos mutados (GG) para o polimorfismo rs2069837. Entretanto, houve uma clara associação do alelo G como fator de proteção para o desenvolvimento da HAS, no qual é possível observar que o genótipo heterozigoto (AG) apresenta menor risco de apresentar hipertensão, em relação ao genótipo AA. Entretanto, quando os p-valor foram ajustados pela correção para análises múltiplas, deixaram de apresentar valores significativos.

5.6.1.5) GC

A função clássica da vitamina D é aumentar a absorção intestinal de cálcio para a mineralização adequada dos ossos. A forma ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D, atua como um hormônio esteroide através da ligação ao receptor de vitamina D (VDR), que está presente em diversas células em todo o corpo, incluindo cardiomiócitos, músculo liso vascular e endotélio. Evidências recentes demonstraram que indivíduos com deficiência de vitamina D são mais propensos a apresentar DCVs (JUDD; TANGPRICHA, 2009). Outras consequências de concentrações inadequadas de vitamina D incluem diabetes tipo 1 e tipo 2, aumento do risco de quedas e câncer de mama, cólon e próstata. Ademais, sugere-se que a suplementação com vitamina D pode reduzir substancialmente a mortalidade (WANG *et al.*, 2010).

Foi observado que a baixa concentração plasmática de 25-hidroxitamina D (25 [OH] D) está associada à alta da PA e ao risco de hipertensão. Dessa forma, o aumento das concentrações plasmáticas de 25 (OH) D pode reduzir o risco de hipertensão, visto que essa molécula suprime a expressão do gene da renina, por um mecanismo dependente do receptor da vitamina D, reduzindo assim a pressão sanguínea (VIMALESWARAN *et al.*, 2014).

Diversas variantes genéticas que afetam as concentrações circulantes de 25 (OH) D já foram identificadas. O gene GC codifica a proteína de ligação à vitamina D, que é sintetizada no fígado e liga e transporta a vitamina D e os seus metabólitos (incluindo 25-hidroxitamina D e 1,25-dihidroxitamina D). Estudos recentes demonstraram que as variantes de GC estão fortemente relacionadas a concentrações reduzidas da proteína de ligação à vitamina D e, conseqüentemente, com baixas concentrações de 25 (OH) D circulantes. Foi observado que o alelo C do SNP rs2282679 do gene GC está fortemente relacionado a concentrações reduzidas dessa proteína (WANG *et al.*, 2010). Dessa forma, pode-se sugerir que esse polimorfismo afeta as concentrações de 25 (OH) D circulantes por diminuir a concentração da proteína de ligação à vitamina D, o que contribui para o desenvolvimento da HAS (VIMALESWARAN *et al.*, 2014).

Em nosso estudo também foi observada uma associação do alelo C com a HAS, na qual o mesmo seria um fator de risco para essa patologia. Entretanto, após a correção para análises múltiplas, essa associação não se manteve.

5.6.1.6) CYP24A1

O gene *CYP24A1* codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. Essas proteínas catalisam diversas reações envolvidas no metabolismo de drogas e síntese de colesterol, esteroides e outros lipídios. O produto do gene *CYP24A1* é a principal enzima responsável pela degradação da 1,25-dihidroxitamina D e 25 (OH) D. Dessa forma, esta enzima desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase do cálcio e da vitamina D.

Existem evidências da associação entre os níveis circulantes de vitamina D e o risco de desenvolvimento da HAS. Ademais nota-se que a enzima catabólica 24-hidroxilase (gene *CYP24A1*) regula as concentrações de 1,25 (OH) 2D e suas variantes genéticas foram associadas à calcificação arterial coronariana (SHEN *et al.*, 2010). O SNP rs6013897 desse gene foi fortemente associado tanto com a PAS como com a PAD (KUNUTSOR *et al.*, 2014), além de ao desenvolvimento de câncer (JORDE *et al.*, 2012). Em nosso estudo, o genótipo heterozigoto TA foi associado à HAS. Todavia, esse resultado não se manteve significativo após a correção para múltiplos testes.

5.6.1.7) MBL2

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína plasmática sintetizada no fígado e liberada como componente da resposta de fase aguda do sistema imunológico, sendo considerada um componente importante do sistema imune inato. Essa lectina sérica liga-se a uma matriz de estruturas repetitivas específicas em superfícies microbianas e, subsequentemente, exerce um efeito antibacteriano pela chamada via da MBL, ou promovendo a fagocitose (MEGIA *et al.*, 2004). Os níveis de MBL, codificada pelo gene *MBL2*, são determinados geneticamente e baixos níveis desta proteína têm sido correlacionados com infecções recorrentes. A deficiência de MBL afeta cerca 10% da população mundial, o que a torna a

imunodeficiência mais frequente já descrita. Infecções recorrentes, aborto espontâneo recorrente e um maior risco de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e diabetes mellitus tipo 1 têm sido relacionados com a deficiência de dessa lectina (PIRULLI *et al.*, 2001).

Ademais, essa proteína foi associada ao aparecimento de aterosclerose (MADSEN *et al.*, 1998) e à formação da placa carotídea (HEGELE *et al.*, 2000), sugerindo que a deficiência de MBL favorece uma infecção/estado inflamatório, que por sua vez ativa citocinas pró-inflamatórias, gerando uma aterogênese acelerada (RUGONFALVI-KISS *et al.*, 2002).

O genótipo heterozigoto do polimorfismo rs1800450 (Gly54Asp) do gene *MBL2* foi associado à HAS em nosso estudo. Foi observado que essa variante (genótipo heterozigoto) causa uma redução do nível sérico de MBL de 5-10 vezes, o que favorece a aterogênese (MADSEN *et al.*, 1995). Os resultados desse estudo sugerem que esse polimorfismo é correlacionado a HAS em modelo dominante. Por fim, quando os p-valor foram ajustados pela correção de Holm-Bonferroni para análises múltiplas, deixaram de apresentar valores significativos.

Além disso, foi observado que uma substituição de C para G na posição -221 (rs7096206) na região promotora do gene *MBL2* também está associada a baixos níveis séricos de MBL (GARRED *et al.*, 2003). As observações sugerem que os homozigotos para o alelo G apresentam um risco acentuadamente maior de doenças autoimunes como o lúpus, em comparação com indivíduos que têm pelo menos um alelo C (JAKAB *et al.*, 2007). Por outro lado, foi encontrado em nosso estudo um indicativo de que o alelo G (rs7096206) apresenta efeito protetor no desenvolvimento da HAS. Ademais, os resultados sugerem que esse polimorfismo é correlacionado à HAS em modelo dominante, tendo o genótipo heterozigoto (GC) menores riscos de desenvolver hipertensão, quando comparado do genótipo CC. Todavia, esses resultados não se mantiveram significativos após a correção de Holm-Bonferroni.

5.6.2) Associação entre as variáveis antropométricas e pressóricas em relação aos polimorfismos

5.6.2.1) rs379527 (*TNFSF14*)

O polimorfismo rs379527 está localizado na região 5'UTR do gene *TNFSF14*, que codifica a proteína LIGHT. Essa proteína é um membro da superfamília de TNF (TNFSF) que se liga ao receptor de membrana TNFRSF14 e funciona como um fator estimulador para a ativação de células linfoides. A LIGHT demonstrou estimular a proliferação de células T e desencadear a apoptose de células tumorais. Verificou-se também que ela promove a aterogênese, induzindo citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz em células de macrófagos (KIM *et al.*, 2011).

Mais recentemente, tem sido estudado o envolvimento da LIGHT e seu receptor na obesidade humana e distúrbios metabólicos, uma vez que foi descoberto que a mesma atua como um inibidor da diferenciação de pré-adipócitos. Foi observado que os níveis séricos da LIGHT são baixos e perto do limite de detecção em indivíduos saudáveis, mas estão aumentados em indivíduos obesos (TILLER, 2008). Kim e colegas demonstraram, em 2011, que essa proteína contribui para a inflamação do tecido adiposo, aumentando a acumulação e ativação de células T/macrófagos, criando assim um ciclo inflamatório vicioso (KIM *et al.*, 2011). Por fim, os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 são caracterizados por aumento dos níveis de LIGHT no plasma, onde foi visto que a mesma pode contribuir para a progressão do diabetes, atenuando a secreção de insulina e contribuindo para a inflamação vascular (HALVORSEN *et al.*, 2016).

No SNP rs379527, apesar do alelo C ser o ancestral, o mesmo apresenta frequência mais baixa quando comparado ao alelo mutado A. Nosso estudo observou uma relação entre esse polimorfismo e o peso corporal, onde indivíduos homocigotos selvagens (CC) apresentaram valores significativamente maiores de peso corporal quando comparados a indivíduos heterocigotos e homocigotos mutados (AA). Esses resultados corroboram os dados da literatura, visto que já foram encontradas associações entre a proteína codificada por esse gene e a obesidade.

Quando esse polimorfismo foi analisado somente dentro do grupo de indivíduos hipertensos, foi encontrada uma associação desse SNP com a RCQ. Indivíduos com genótipo CC apresentaram valores maiores de RCQ do que os indivíduos AA. Tendo em vista que a RCQ é a razão entre a circunferência da

cintura e a do quadril e que a mediana da RCQ para o genótipo CC é um valor acima de 1, pode-se sugerir que esse polimorfismo é mais frequente em obesos hipertensos com maior quantidade de gordura visceral. Contudo, quando os resultados para esse polimorfismo foram corrigidos para múltiplas análises, deixaram de ser significativos.

5.6.2.2) rs1800871 (*IL10*)

O polimorfismo rs1800871, também conhecido como -819 C>T, está localizado na região promotora do gene que codifica a interleucina 10. Em nosso estudo, foi evidenciada uma relação positiva entre esse SNP e a HAS (item 5.6.1.2). Observou-se também uma relação entre esse polimorfismo e as variáveis IMC, circunferência da cintura e PAD. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, onde foi constatado que os níveis de IL-10 circulantes estão associados à obesidade, visto que essa citocina é secretada pelo tecido adiposo branco (JUGE-AUBRY *et al.*, 2005). Um estudo feito por Bassols e colaboradores em 2010 observou que, ao retirar os indivíduos com obesidade mórbida da amostra, os portadores do alelo A tinham IMC e circunferência da cintura significativamente maiores (BASSOLS *et al.*, 2010). Esses dados estão em consonância com os encontrados em nossa pesquisa, onde os portadores do genótipo GG apresentam valores de IMC, circunferência da cintura e PAD significativamente maiores do que os indivíduos com genótipo AA. Ademais, observamos também que o alelo G é um fator de risco para a HAS, o que pode ser explicado pelo fato do mesmo influenciar as medidas antropométricas de IMC, CC e PAD, que, por si só, são fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão.

5.6.2.3) rs1554286 (*IL10*)

O polimorfismo rs1554286, também localizado no gene *IL10*, foi associado ao risco de desenvolver a HAS em nosso estudo (item 5.6.1.2), onde alelo A seria um fator de risco para o desenvolvimento da patologia. Encontramos também uma associação desse SNP e o IMC, na qual indivíduos com genótipo AA apresentavam valores de IMC significativamente mais altos do que os indivíduos GG. Essa

associação com o IMC corrobora, portanto, a hipótese de que o alelo A é um fator de risco para a HAS, visto que quanto maior peso de um indivíduo (aqui evidenciado pelo IMC), maior é a sua probabilidade de desenvolver hipertensão. Porém essa associação não se manteve após as correções estatísticas.

5.6.2.4) rs755622 (*MIFAS*)

O polimorfismo do gene *MIFAS* (rs755622) apresentou associação com o desenvolvimento da HAS em nosso estudo (item 5.6.1.3), sugerindo que, em contraste com o que é encontrado na literatura, o alelo C pode atuar como protetor para o desenvolvimento da hipertensão. Ademais, esse SNP também apresentou associação com as variáveis antropométricas do peso e circunferência da cintura na amostra total. Observou-se que indivíduos com o genótipo CC apresentaram mediana de massa corporal e da circunferência da cintura significativamente menores quando comparadas com os genótipos GC e GG. Ademais, quando analisado dentro da amostra de indivíduos normotensos, o genótipo CC também foi associado a menores valores de peso corporal. Dessa forma, conclui-se novamente que o alelo C apresenta-se como protetor para o desenvolvimento da HAS, pois contribui para um menor peso e circunferência da cintura, que são claramente fatores de risco para essa doença. Todavia, esses resultados não se mantiveram significativos após a correção por Holm-Bonferroni.

5.6.2.5) rs2069837 (*IL6*)

O SNP rs2069837 também foi associado ao risco de desenvolver a HAS em nosso estudo (item 5.6.1.4). Ademais, não foram encontrados indivíduos homozigotos mutados (GG) nessa amostra, devido à baixa frequência do alelo. Ainda sim, foi observada uma associação do alelo G como fator de proteção para o desenvolvimento da HAS. A associação desse polimorfismo com a variável RCQ corrobora essa ideia, visto que o genótipo AG apresenta valores menores de razão cintura/quadril quando comparado ao genótipo AA. Dessa forma, sugere-se que o menor percentual de gordura visceral (nesse caso, evidenciado pela medida RCQ)

encontrado nos indivíduos heterozigotos está relacionado ao menor risco de desenvolvimento da HAS.

Quando analisado dentro do grupo de indivíduos hipertensos, esse polimorfismo apresentou associação com o peso corporal, a RCQ e a CC. Novamente foi notado que o genótipo AG apresentou menores valores para essas três variáveis. Contudo, após a correção estatística, os resultados para esse SNP não se mantiveram significativos.

5.6.2.6) rs2069845 (*IL6*)

O polimorfismo rs2069845 está presente na região promotora do gene que codifica a interleucina 6 (*IL6*) e consiste na troca de G>A. Estudos prévios associaram esse SNP aos níveis circulantes de IL-6 e a um maior risco de desenvolvimento de DCVs (LIU *et al.*, 2006). KAYA e colaboradores encontraram uma relação entre os níveis de IL-6 plasmáticos e a PAS e a PAD (KAYA *et al.*, 2010). Confirmando os dados da literatura, encontramos em nosso estudo uma associação entre o rs2069845 e a pressão sistólica e diastólica dentro do grupo de hipertensos. Foi observado que os indivíduos heterozigotos (GA) apresentavam valores significativamente menores de PAS e PAD quando comparados aos homozigotos mutado e selvagem. Entretanto, quando os p-valor foram ajustados pela correção de Holm-Bonferroni para análises múltiplas, deixaram de apresentar valores significativos.

5.6.2.7) rs2069832 (*IL6*)

O polimorfismo rs2069832 está presente no íntron 2 do gene que codifica a interleucina 6 (*IL6*). Em nosso estudo, esse SNP foi associado, dentro do grupo de obesos normotensos, ao peso, IMC, CC e CQ, variáveis essas que estão intrinsecamente relacionadas à obesidade. Wolford e colaboradores observaram que variantes genéticas no gene *IL6* podem desempenhar um papel na susceptibilidade à obesidade, visto que podem influenciar os níveis plasmáticos de IL-6. Foi observado que os níveis dessa citocina estão elevados na obesidade e

correlacionam-se com o índice de massa corporal (IMC) e predizem o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (WOLFORD *et al.*, 2003).

Verificou-se que dentro do grupo de indivíduos normotensos o genótipo AA apresenta valores menores de peso, IMC, CC e CQ. Esse resultado está em consonância com a literatura, onde um haplótipo de SNPs do gene *IL6* contendo o alelo A desse polimorfismo foi associado a um IMC menor (SLATTERY *et al.*, 2008). Entretanto, nosso resultado não foi significativo após a correção por Holm-Bonferroni.

5.6.2.8) rs1800795 (*IL6*)

Localizado na região promotora do gene *IL6*, o polimorfismo rs1800795, também conhecido como C-174G, influencia a taxa de transcrição desse gene. Foi observado que níveis aumentados de IL-6 aumentam o risco do impacto da obesidade no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (MÖHLIG *et al.*, 2004) e que indivíduos obesos apresentam níveis mais elevados de IL-6 circulante quando comparados a indivíduos eutróficos.(ROYTBLAT *et al.*, 2000). Em nosso estudo, quando analisados dentro da amostra de indivíduos normotensos, o genótipo CC apresenta valores mais baixos de peso, IMC, circunferência da cintura e CQ, em relação ao genótipo heterozigoto e homozigotos GG..

Contudo, a relação dos alelos C e G desse polimorfismo com a obesidade ainda é muito debatida na literatura. Alguns estudos mostram o alelo C como fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (MÖHLIG *et al.*, 2004), obesidade (KUBASZEK *et al.*, 2003) e distúrbios metabólicos relacionados à obesidade (GOYENECHEA *et al.*, 2007). Em contrapartida, outros pesquisadores relacionaram o alelo C a menores níveis circulantes de IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998). Ademais, Dedoussis e colaboradores também observaram uma associação entre o genótipo GG e parâmetros associados à obesidade, onde o mesmo atuaria como fator de risco para obesidade (DEDOUSSIS *et al.*, 2004). Os resultados encontrados em nossa pesquisa corroboram, portanto, os encontrados por esse pesquisador. Por fim, quando os p-valor foram ajustados para análises múltiplas, deixaram de ser significativos.

5.6.2.9) rs1800450 (*MBL2*)

O genótipo heterozigoto do polimorfismo rs1800450 (Gly54Asp) do gene *MBL2* foi associado à HAS em nosso estudo (item 5.6.1.7). Observamos também que essa variante está associada à circunferência do quadril, onde indivíduos com genótipo AA apresentam valores de CQ significativamente maiores do que os heterozigotos e homozigotos selvagens. Pesquisas recentes descobriram que indivíduos portadores do alelo A apresentam concentrações de MBL circulantes mais baixas do que homozigotos GG, e que a deficiência de MBL favorece o desenvolvimento de infecções e o processo de aterogênese (NAVRATILOVA *et al.*, 2012). Entretanto, as vias pelas quais a baixa produção de MBL afeta a circunferência do quadril ainda não são claras.

5.6.2.10) rs7096206 (*MBL2*)

Em nosso estudo, o SNP rs7096206, também do gene *MBL2*, foi associado à HAS, onde o alelo G apresentaria efeito protetor (item 5.6.1.7). Esse resultado está em desacordo com os dados encontrados na literatura, na qual foi observada que essa substituição de C para G está associada a baixos níveis séricos de MBL (GARRED *et al.*, 2003). Ademais, homozigotos para o alelo G apresentam maior risco para doenças autoimunes e inflamatórias (JAKAB *et al.*, 2007).

Encontramos também uma associação desse polimorfismo com o peso corporal, na qual indivíduos com genótipo GG apresentavam valores de peso significativamente maiores do que os indivíduos CC. Esse resultado está em conformidade com a literatura, visto que a deficiência de MBL favorece um estado inflamatório, que por sua vez contribui para o desenvolvimento da obesidade (DANDONA *et al.*, 2004).

5.6.2.11) rs8072199 (*NOS2*)

Foram encontrados resultados positivos entre esse polimorfismo (*NOS2*) e a HAS nesse estudo (item 5.6.1.1), nos quais foi observado que o genótipo heterozigoto (CT) está associado ao desenvolvimento da HAS. Quando analisado

dentro do grupo de hipertensos, foi observado que o genótipo heterozigoto apresenta menores valores de PAD quando comparados aos homozigotos mutado e selvagem. Entretanto, esse resultado não se manteve significativo após a correção.

5.6.2.12) rs731236 (VDR)

O receptor da vitamina D (VDR) é um receptor de hormônio intracelular que se liga especificamente a 1,25 (OH) 2D3 e medeia os seus efeitos, tais como regulação da densidade óssea, secreção de insulina, sistema imunológico, ciclo de crescimento do cabelo e lipólise. Foi confirmado que o VDR desempenha um papel importante no metabolismo energético e que potencialmente modula a adipogênese e a diferenciação de pré-adipócitos (FAN *et al.*, 2015).

O gene que codifica esse receptor (VDR) apresenta mais de 470 SNPs (SYGITOWICZ *et al.*, 2014), e algumas dessas variantes já foram associadas ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, comprometimento da secreção de insulina (SENTINELLI *et al.*, 2016), ao desenvolvimento de síndrome metabólica (ZHAO *et al.*, 2014) e obesidade (FAN *et al.*, 2015). Ademais, foi observada uma relação entre a deficiência de vitamina D no plasma e a ocorrência de fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão, hiperlipidemia e eventos cardiovasculares, incluindo doença coronariana, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (SYGITOWICZ *et al.*, 2014). Ademais, os polimorfismos *BsmI* e *FokI* do gene VDR foram associados à HAS (WNAG *et al.*, 2013), assim como o *BsmI* foi associado à PA (MURAY *et al.*, 2003).

Por fim, o SNP rs731236 (também conhecido como *TaqI*), não altera a sequência de aminoácidos da proteína codificada, mas já foi associado tanto à obesidade (FAN *et al.*, 2015) quanto ao desenvolvimento de doença arterial coronariana (FERRAREZI *et al.*, 2013) e parece desempenhar um papel na regulação da expressão gênica. Em nosso estudo, esse polimorfismo foi pela primeira vez associado à PAS, e foi visto que indivíduos com genótipo homozigoto mutado (GG) apresentavam, dentro do grupo de hipertensos, maiores valores de PAS quando comparados ao genótipo AA. No entanto, esse resultado não permaneceu significativo após a correção para análises múltiplas.

5.6.2.13) rs2282697 (GC)

O polimorfismo rs2282697, localizado no gene *GC*, que codifica a proteína de ligação à vitamina D, foi associado à HAS em nosso estudo (item 5.6.1.5, alelo C poderia atuar como fator de risco para hipertensão). Quando este SNP foi analisado somente dentro do grupo de indivíduos normotensos, foi encontrada uma associação do mesmo com a razão cintura/quadril. Nessa análise, indivíduos com genótipo CC apresentaram maiores valores de RCQ. Entretanto, após a correção para análises múltiplas, essa associação não se manteve.

5.6.2.14) rs2234167 (TNFRSF14)

O mediador de entrada do vírus da herpes (HVEM) é um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRSF14), que serve como um receptor para o vírus da herpes e para citocinas, tais como linfotóxina-a e a LIGHT (TNFSF14). O HVEM é codificado por um único gene (*TNFRSF14*), que se localiza na mesma região que vários outros membros da superfamília dos receptores TNF- α . Esse receptor também induz a via do fator nuclear κ B, que é um ponto de controle principal para a expressão de genes que regulam a inflamação. O HVEM é expresso em diversos tecidos humanos e linhagens celulares e apresenta expressão constitutiva e relativamente elevada em células T de sangue periférico, células B e monócitos (BASSOLS *et al.*, 2010).

Em nosso estudo encontramos uma associação, dentro do grupo de indivíduos obesos normotensos, entre o polimorfismo rs2234167 desse gene e a PAS. Não foram encontrados indivíduos homocigotos mutados (AA) devido à baixa frequência desse alelo. Contudo, foi possível perceber que indivíduos heterocigotos (e, portanto, portadores do alelo A) apresentaram valores de PAS mais elevados do que indivíduos com genótipo GG. Esses resultados estão em concordância com os dados encontrados por Bassols e colaboradores, onde foi observado que sujeitos portadores do alelo A tinham seu peso, IMC e PAD significativamente aumentados. Além disso, esse polimorfismo foi associado a níveis mais elevados de LIGHT (BASSOLS *et al.*, 2010), que, no presente estudo foi associado ao peso corporal. Dessa forma, pode-se sugerir que o alelo mutante A está associado com o processo

inflamatório e a possibilidade de desenvolver obesidade. Entretanto, esse resultado não se manteve estatisticamente significativo após a correção para análises múltiplas.

5.6.2.15) rs1861493 (*IFNG*)

Esse polimorfismo está localizado no gene *IFNG*, que codifica uma citocina solúvel membro da classe de *interferons* tipo II. Essa proteína (IFN- γ) é secretada pelas células dos sistemas imune inato e adaptativo e atua ligando-se ao receptor de interferon gama que, por sua vez, age desencadeando uma resposta celular a infecções virais e microbianas. As mutações neste gene estão associadas a uma susceptibilidade aumentada a infecções virais, bacterianas e parasitárias e a várias doenças autoimunes (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A importância do IFN- γ na aterogênese foi demonstrada em experiências com ratos knock-out, em que foi sugerido que essa citocina promove e modifica a aterosclerose através dos seus efeitos locais na parede arterial, bem como pelos seus efeitos sobre lipoproteínas plasmáticas (GUPTA *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1999). Outra forma que essa citocina pode contribuir para o desenvolvimento de DVCs é induzindo diretamente a expressão do gene da óxido nítrico sintetase induzível (*NO2*)(KOIDE *et al.*, 1994).

Em nosso estudo, o genótipo heterozigoto (AG) do polimorfismo rs1861493 do gene *IFNG* foi associado a menores valores de pressão diastólica dentro do grupo de indivíduos normotensos. Contudo, após a correção para múltiplas análises, esse resultado deixou de ser significativo.

5.6.2.16) rs7138803 (*FAIM2*)

O polimorfismo de nucleotídeo único rs7138803 (G>A), localizado próximo ao gene *FAIM2* foi descrito pela primeira vez como sendo associado com maior IMC em portadores do alelo A. Sabe-se que esse gene codifica uma proteína anti-apoptótica, altamente expressa no cérebro que antagoniza a via Fas. Desse modo, *FAIM2* é um gene anti-apoptótico que fornece proteção contra a morte celular mediada por Fas, que é um receptor de superfície celular expresso numa variedade de tecidos. Vários

estudos associaram concentrações de Fas e hipertensão e risco cardiovascular (TANG *et al.*, 2014). Esse polimorfismo já foi associado ao consumo de energia (SOTOS-PRIETO *et al.*, 2010), risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (ZHAO *et al.*, 2014) e pressão diastólica (CORELLA *et al.*, 2014).

Grande parte das pesquisas feitas com esse polimorfismo associou o alelo A ao risco de desenvolver obesidade, maior IMC, maior porcentagem de massa adiposa, maior circunferência da cintura e relação cintura-quadril (WU *et al.*, 2010 ; TANG *et al.*, 2014 ; ZHANG *et al.*, 2014). Esses resultados estão de acordo com o encontrado em nosso estudo, onde esse polimorfismo foi associado a maiores valores de circunferência da cintura no grupo de pacientes normotensos. Contudo, foi o genótipo heterozigoto (GA) quem apresentou os maiores valores de CC. Por fim, esse resultado perdeu sua significância estatística após a correção para múltiplas análises.

5.6.2.17) rs1024611 (MCP1)

O polimorfismo rs1024611 está localizado na região reguladora do gene *MCP1*, que codifica uma quimiocina de mesmo nome produzida predominantemente por macrófagos e células endoteliais. A MCP-1 é um potente fator quimiotático para monócitos, sendo a principal responsável pela atração de monócitos para qualquer tecido específico, para diferenciação em macrófagos (MADESHIYA *et al.*, 2015). Essa proteína está envolvida na formação, progressão e desestabilização de placas ateromatosas e desempenha um papel essencial no remodelamento pós-infarto (ANGELES-MARTÍNEZ *et al.*, 2015). Estudos sugerem que o nível sérico circulante de MCP-1 é significativamente elevado na obesidade. Também foi estabelecido que os macrófagos se acumulam no tecido adiposo durante a obesidade e são responsáveis pela ativação de vias inflamatórias e complicações metabólicas. Ademais, a MCP-1 diminui a absorção de glicose estimulada pela insulina, sugerindo que essa quimiocina pode contribuir diretamente para a resistência do tecido adiposo à insulina (MADESHIYA *et al.*, 2015). O polimorfismo bialélico A>G, encontrado na posição -2518 (rs1024611) foi associado aos níveis de expressão de MCP-1 em resposta a uma reação inflamatória (SZALAI *et al.*, 2001), onde

monócitos de indivíduos portadores do alelo G produzem mais MCP-1 do que monócitos de indivíduos homozigotos AA (ANGELES-MARTÍNEZ *et al.*, 2015).

O alelo G desse polimorfismo já foi associado a maiores riscos de desenvolver diabetes tipo 2 (RAINA *et al.*, 2015), doença arterial coronariana (SZALAI *et al.*, 2001; ANGELES-MARTÍNEZ *et al.*, 2015), doença isquêmica do coração (ALONSO-VILLAVARDE *et al.*, 2004) e obesidade (MADESHIYA *et al.*, 2015). No presente estudo, esse polimorfismo foi associado à circunferência da cintura, no qual indivíduos homozigotos para o alelo G apresentaram valores menores de CC. Esse resultado está em desacordo com os dados encontrados na literatura, onde o alelo G é geralmente fator de risco. Ademais, Madeshiya e colaboradores observaram que o alelo G estava associado a maiores valores de RCQ (e, portanto, de CC) na população indiana (MADESHIYA *et al.*, 2015). Contudo, o resultado do nosso estudo não se manteve significativo após a correção por Holm-Bonferroni.

5.7) Correção para análises múltiplas

A correção de erro experimental é utilizada quando um grande número de testes independentes são realizados empregando procedimentos estatísticos básicos, como testes T de Student ou o coeficiente de correlação de Pearson. A correção para múltiplas análises foi proposta para contornar o problema de que, à medida que o número de testes aumenta, a probabilidade de um erro do tipo I (encontrar uma diferença significativa quando a mesma não existe) se eleva. O uso rotineiro desses testes tem sido criticado, pois essa correção reduz a chance de um erro de tipo I (falso positivo), às custas de um aumento de erro de tipo II (falso negativo, rejeitar uma hipótese quando a mesma é verdadeira) (ARMSTRONG, 2014).

Apesar do uso generalizado de correções para análises múltiplas, há, no campo científico, uma contínua controvérsia sobre seu uso. Alguns pesquisadores acreditam que nenhuma correção deve ser feita (ROTHMAN, 1999). Já outros consideram que a correção deve ser obrigatória (MOYÉ, 1998) e que a interpretação de um único teste depende do número de outros testes realizados.

Nesse estudo, todas as associações encontradas perderam seus valores significativos após a correção por Holm-Bonferroni, onde provavelmente houve um número aumentado de erro do tipo II devido a essa correção. Ademais, alguns pesquisadores acreditam que os elementos que provam ou não uma associação estão contidos nesse conjunto de dados específicos e, por conseguinte, a conclusão a ser tirada não deve ser alterada com base no número de outros testes efetuados (ARMSTRONG, 2014).

5.8) A real influência do componente genético na etiologia da HAS

Apesar das estimativas de que 30 a 40% do risco de hipertensão de um indivíduo provêm de fatores genéticos (GELLER, 2015) e de que a herdabilidade da PA varia entre 30% a 50%, o efeito coletivo de todos os loci já associados à HAS explicam aproximadamente apenas 2% da sua herdabilidade (PADMANABHAN *et al.*, 2015).

Alguns pesquisadores argumentam que essa dificuldade em associar os loci encontrados às estimativas de herdabilidade deriva do uso de parâmetros incorretos para determinar se um indivíduo é ou não hipertenso. Eles afirmam que a avaliação do risco clínico deveria basear-se num limiar predefinido em que o risco de eventos cardiovasculares em excesso é abolido. Desta forma, o fenótipo quantitativo da pressão arterial seria convertido em um traço binário (hipertensão ou não-hipertensão) e as estratégias de gestão seriam direcionadas para a redução da PA abaixo deste limiar (HASTIE *et al.*, 2010).

Já foi observado que uma PA > 115/75 mm Hg está associada ao aumento do risco de doença cardiovascular e AVC (WEBER *et al.*, 2016). O grupo de pesquisa SPRINT, por exemplo, forneceu fortes evidências de que a determinação da PA <120 mm proporciona uma proteção significativamente maior contra eventos cardiovasculares e mortes do que a meta tradicionalmente aceita de PA <140 mm Hg (SPRINT RESEARCH GROUP, 2015).

Por fim, não deve ser descartada a influência de diversos fatores importantes na detectabilidade de alelos associados à susceptibilidade à hipertensão pelo mapeamento de SNPs. Esses fatores incluem a diversidade de lócus e alelos relacionados à HAS, a relação mais fraca entre os genótipos e fenótipos (quando

comparada às doenças Mendelianas), a precisão das técnicas de genotipagem, a extensão e heterogeneidade genética e a influência e papel extensivos dos fatores não-genéticos (DORIS, 2002).

6) Conclusões

✓ Neste estudo foram avaliados indivíduos obesos normotensos (PA < 140/90 mmHg) e hipertensos (PA ≥ 140/90 mmHg), onde foi evidenciado que o aumento da adiposidade corporal está associado a maiores valores de pressão arterial sistólica, diastólica e risco de desenvolver hipertensão.

✓ Não foram encontradas associações entre os polimorfismos do gene *ECA*, *GSTM1*, *ADRB1* e *AGTR1* e a HAS.

✓ Os SNPs dos genes *NOS2*, *IL10*, *MIFAS*, *IL6*, *GC*, *CYP24A1* e *MBL2* foram associados ao risco de desenvolver hipertensão. Os alelos A (rs1554286) e G (rs1800871) do gene *IL10*, assim como C (rs2282679) do gene *GC* foram fatores de risco para HAS. Por outro lado, os alelos C (rs755622) do gene *MIFAS*, G (rs2069837) do gene *IL6* e G (rs7096206) do gene *MBL2* foram associados à proteção para a hipertensão. Contudo, esses resultados perderam significância estatística após a correção para múltiplas análises.

✓ Com relação aos parâmetros pressóricos e antropométricos na amostra total, o genótipo CC do polimorfismo rs379527(*TNFSF14*) foi associado a um maior peso corporal; o genótipo AA do SNP rs1800871 (*IL10*) foi relacionado a maiores valores de IMC, CC e PAD, assim como o genótipo AA do rs1554286 (*IL10*) mostrou-se associado a um IMC mais alto. Ademais, o genótipo CC do rs755622 (*MIFAS*) foi associado a menores valores de peso e circunferência da cintura. Foi observado também que o alelo G do rs2069837 (*IL6*) resulta em valores menores de RCQ. Os genótipos AA do rs1800450 e GG do rs7096206 (ambos do gene *MBL2*) foram associados a maiores valores de CQ e peso, respectivamente.

✓ No grupo de indivíduos hipertensos, o genótipo CC do polimorfismo rs379527(*TNFSF14*) foi associado a uma maior RCQ. No gene *IL6*, o genótipo heterozigoto GA (rs2069845) foi associado à PAS e PAD menores, assim como o genótipo AG (rs2069837) a menores valores de peso, RCQ e CC. O SNP rs8072199

(*NOS2*) teve o genótipo CT associado a uma menor PAD, enquanto que o rs731236 (*VDR*) teve o genótipo GG relacionado a valores maiores de PAS.

✓ Para as análises dentro no grupo de normotensos, os genótipos AA (rs2069832) e CC (rs1800795) do gene *IL6* apresentaram menores valores de peso corporal, IMC, CC e CQ. O genótipo GA (rs7138803) do gene *FAIM2* apresentou maiores valores de circunferência de cintura, enquanto que o genótipo GG (rs1024611) do gene *MCP1* teve menores valores para essa mesma variável. No gene GC (rs2282697), o genótipo CC teve maiores índices de RCQ. Ademais, o gene do receptor HVEM (rs2234167) teve o alelo A relacionado a maiores valores de PAS. Por fim, o genótipo AG (rs1861493) do gene *IFNG* foi associado a menores valores de PAS, assim como o genótipo CC (rs755622) do gene *MIFAS* foi relacionado a um menor peso corporal.

✓ Os resultados encontrados nesse estudo perderam significância estatística após a correção para múltiplas análises. De fato, a necessidade do uso desse tipo de correção ainda é muito debatida entre os pesquisadores.

✓ Apesar das pesquisas e grandes estudos do tipo GWAS, ainda não é possível explicar o real impacto do componente genético na etiologia de hipertensão.

7) Referências Bibliográficas

ALMADA, B. V. P., et al. Associação da hipertensão arterial com polimorfismo da enzima conversora da angiotensina em indivíduos idosos. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, n. 4, p. 320-2, 2010.

ALONSO-VILLAVERDE, C., et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. **Circulation**, v.110, n.15, p. 2204-2209. 2004.

ANGELES-MARTÍNEZ, J., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene (MCP-1) polymorphisms are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study. **Immunology letters**, v.167, n.2, p.125-130. 2015.

ARMSTRONG, R. A. When to use the Bonferroni correction. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v.34, n.5, p. 502-508. 2014.

BASSOLS, J., et al. Characterization of herpes virus entry mediator as a factor linked to obesity. **Obesity**, v.18, n.2, p. 239-246. 2010.

BASSOLS, J., et al. Environmental and Genetic Factors Influence the Relationship Between Circulating IL-10 and Obesity Phenotypes. **Obesity**, v.18, n.3, p. 611-618. 2010.

BASU, S.; MILLETT, C. Social epidemiology of hypertension in middle-income countries determinants of prevalence, diagnosis, treatment, and control in the WHO SAGE study. **Hypertension**, v. 62, n. 1, p. 18-26, 2013.

BEN-HADJ-KHALIFA, S., et al. Functional interleukin-10 promoter variants in coronary artery disease patients in Tunisia. **European cytokine network**, v. 21, n. 2, p. 136-141, 2010.

BENETOS, A., et al. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 560-564, 1998.

BENGTSSON, K.et al. Polymorphism in the β 1-adrenergic receptor gene and hypertension. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 187-190, 2001.

BONFIM-SILVA, R., et al. Case–control association study of polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genes and coronary artery disease and systemic artery hypertension in African-Brazilians and Caucasian-Brazilians. **Journal of genetics**, v. 95, n. 1, p. 63-69, 2016.

BONNARDEAUX, A., et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. **Hypertension**, v.24, n.1, p. 63-69. 1994.

BRIONGOS-FIGUERO, L. S., et al. Relationship among angiotensin-converting enzyme polymorphism, cardiovascular risk, and osteoporotic fractures. **European Journal of Rheumatology**, v. 3, n. 1, p. 10, 2016.

CAMPBELL, N. R.C.; LACKLAND, D. T.; NIEBYLSKI, M. L. High blood pressure: why prevention and control are urgent and important—a 2014 fact sheet from the World Hypertension League and the International Society of Hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 16, n. 8, p. 551-553, 2014.

CAMPOS, A. M. Efeitos da Pró-renina humana em Cardiomiócitos de ratos neonatos e seu processamento pela Catepsina B humana em Células GH4C1. 2008. 155 f. **Tese (Doutorado em Patologia Molecular)** - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CAPOLUONGO, E., et al. GSTM1-null polymorphism as possible risk marker for hypertension: results from the aging and longevity study in the Sirente Geographic Area (ilSIRENTE study). **Clinica Chimica Acta**, v. 399, n. 1, p. 92-96, 2009.

CHANDRA, A., et al. The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 10, p. 997-1002, 2014.

CHEUNG, B. MY., et al. Relationship of plasma interleukin-6 and its genetic variants with hypertension in Hong Kong Chinese. **American journal of hypertension**, v.24, n.12, p. 1331-1337. 2011.

CHOPRA, S., et al. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 15, n. 8, p. 281, 2011.

CORELLA, D., et al. Novel association of the obesity risk-allele near Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2 (FAIM2) gene with heart rate and study of its effects on myocardial infarction in diabetic participants of the PREDIMED trial. **Cardiovascular diabetology**, v.13, n.1, p 5. 2014.

CRUZ, M., et al. The TGF-B1 and IL-10 gene polymorphisms are associated with risk of developing silent myocardial ischemia in the diabetic patients. **Immunology letters**, v. 156, n. 1, p. 18-22, 2013.

CRUZ-GONZALEZ, I. et al. An association between resistant hypertension and the null GSTM1 genotype. **Journal of human hypertension**, v. 23, n. 8, p. 556-558, 2009.

DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; HALL, J. E. Role of Leptin and CNS Melanocortins in Obesity Hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 22, n. 2, p. 135, 2013.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A.. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in immunology**, v.25, n.1, p. 4-7. 2004.

DEDOUSSIS, G. V. Z., et al. The IL-6 Gene G-174C Polymorphism Related to Health Indices in Greek Primary School Children. **Obesity research**, v. 12, n. 7, p. 1037-1041, 2004.

DELLES, C., et al. Glutathione S-transferase variants and hypertension. **Journal of hypertension**, v. 26, n. 7, p. 1343-1352, 2008.

DORIS, P. A. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. **Hypertension**, v.39, n.2, p. 323-331. 2002.

ESLAMI, S; SAHEBKAR, A. Glutathione-S-transferase M1 and T1 null genotypes are associated with hypertension risk: a systematic review and meta-analysis of 12 studies. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 6, p. 1-9, 2014.

ELSAID, A., et al. Association of polymorphisms G (-174) C in IL-6 gene and G (-1082) A in IL-10 gene with traditional cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease. v.51, n.4, p.959-975. 2014.

FAN, H-R., et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphism (TaqI) and obesity in Chinese population. **Journal of genetics**, v.94, n.3, p. 473-478. 2015.

FERNANDEZ-REAL, J-M., et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.3, p. 1154-1159. 2001.

FERRAREZI, D. A. F., et al. Allelic variations of the vitamin D receptor (VDR) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: the DIABHYCAR prospective study. **Diabetes & metabolism**, v.39, n.3, p. 263-270. 2013.

FISHMAN, D., et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369, 1998.

FREIRE, I. V. Interação entre polimorfismo i/d do gene da eca, fatores comportamentais e hipertensão arterial em idosos. 2016. 71 f. **Dissertação (Mestrado em Vigilância à Saúde)** - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2016.

FYHRQUIST, F; METSÄRINNE, K.; TIKKANEN, I. Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. **Journal of human hypertension**, v. 9, p. S19-24, 1995.

GARDIER, S., et al. A1166C polymorphism of angiotensin II type 1 receptor, blood pressure and arterial stiffness in hypertension. **Journal of hypertension**, v. 22, n.11, p. 2135-2142. 2004.

GARRED, P., et al. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. **Molecular immunology**, v.40, n.2, p. 73-84. 2003.

GELLER, D. S. New Developments in the Genetics of Hypertension: What Should Clinicians Know? **Current cardiology reports**, v.17, n.12, p.1-8, 2015.

GILARDINI, L., et al. Effect of a Modest Weight Loss in Normalizing Blood Pressure in Obese Subjects on Antihypertensive Drugs. **Obesity Facts**, v. 9, n. 4, p. 251-258, 2016.

GJESING, A. P., et al. Studies of associations between the Arg389Gly polymorphism of the β 1-adrenergic receptor gene (ADRB1) and hypertension and obesity in 7677 Danish white subjects. **Diabetic medicine**, v. 24, n. 4, p. 392-397, 2007.

GOYENECHEA, E.; PARRA, D.; MARTÍNEZ, J. A. Impact of interleukin 6–174G> C polymorphism on obesity-related metabolic disorders in people with excess in body weight. **Metabolism**, v. 56, n. 12, p. 1643-1648, 2007.

GUPTA, Sanjay, et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.11, p. 2752. 1997.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 625-633, 2003.

HALVORSEN, B., et al. LIGHT/TNFSF14 is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and promotes islet cell dysfunction and endothelial cell inflammation in vitro. **Diabetologia**, v.59, n.10, p. 2134-2144. 2016.

HAMET, P., et al. Hypertension: genes and environment. **Journal of hypertension**, v.16, n. 4, p. 397-418,1998.

HARRISON, D. G., et al. Role of the adaptive immune system in hypertension. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 203-207, 2010.

HASTIE, C. E.; PADMANABHAN, S.; DOMINICZAK, A. F. Genome-wide association studies of hypertension: light at the end of the tunnel. **International journal of hypertension**, 2010.

HEGELE, R. A., et al. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. **Journal of Investigative Medicine**, v.48, n.3, p.198-202. 2000.

HENSKENS, L. H., et al. Effects of ACE I/D and AT1R-A1166C polymorphisms on blood pressure in a healthy normotensive primary care population: first results of the Hippocrates study. **Journal of hypertension**, v. 21, n.1, p. 81-86. 2003.

HERDER, C., et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. **Atherosclerosis**, v.200, n.2, p. 380-388. 2008.

HERRMANN, A., et al. Guia de Saúde do Homem para Agente Comunitário de Saúde (ACS). **Ministério da Saúde**, 2016.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001

JAKAB, L., et al. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. **Clinical Immunology**, v.125, n.3, p. 230-236. 2007.

JEUNEMAITRE, X., et al. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. **Nature genetics**, v. 1, n. 1, p. 72-75, 1992.

Jl, K., et al. Macrophage migration inhibitory factor polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory coronary heart disease. **BioMed research international**, Article ID 315174, 6 p. 2015.

JIANG, Z., et al. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. **Chinese medical journal**, v.114, n.12, p. 1249-1251. 2001.

JORDE, R., et al. Polymorphisms related to the serum 25-hydroxyvitamin D level and risk of myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromsø Study. **PloS one**, v.7, n.5 e.37295. 2012.

JUDD, S. E.; TANGPRICHA, V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. **The American journal of the medical sciences**, v.338, n.1, p. 40. 2009.

JUGE-AUBRY, C. E., et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. **Cytokine**, v.29, n.6, p. 270-274. 2005.

KAYA, C., et al. Relationship between interleukin-6 levels and ambulatory blood pressure in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v.94, n.4, p. 1437-1443. 2010.

KALIL, G. Z. ; HAYNES, W. G. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. **Hypertension Research**, v. 35, n. 1, p. 4-16, 2012.

KANAI, H. et al. Decrease in intra-abdominal visceral fat may reduce blood pressure in obese hypertensive women. **Hypertension**, v. 27, n. 1, p. 125-129, 1996.

KIM, H-M, et al. LIGHT/TNFSF14 enhances adipose tissue inflammatory responses through its interaction with HVEM. **FEBS letters**, v.585, n.3, p. 579-584. 2011.

KNIGHT, B. S., et al. Developmental regulation of cardiovascular function is dependent on both genotype and environment. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n.6, p. 2234-2241, 2009.

KOIDE, M., et al. Expression of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.23, n.1 Supl p. 145. 1994.

KOSAR, H., et al. Investigate the role of glutathione S transferase (GST) polymorphism in development of hypertension in UAE population. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 2012, n. 8, p. 479-482, 2012.

KOTSIS, V., et al. New developments in the pathogenesis of obesity-induced hypertension. **Journal of hypertension**, v. 33, n. 8, p. 1499-1508, 2015.

KRISHNAN, R., et al. Association of angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with essential hypertension in south Indian population. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 2, p. 159-163, 2016.

KUBASZEK, A., et al. The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. **Diabetes**, v.52, n.2, p.558-561. 2003.

KUBASZEK, A., et al. Promoter polymorphisms of the TNF- α (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1872-1876, 2003.

KUNUTSOR, S. K., et al. Vitamin D and high blood pressure: causal association or epiphenomenon?. **European journal of epidemiology**, v.29, n.1, p.1-14. 2014.

KURUKULASURIYA, L. R., et al. Hypertension in obesity. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 903-917, 2011.

LAN, M., et al. Association between MIF gene polymorphisms and carotid artery atherosclerosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 435, n. 2, p. 319-322, 2013.

LEVINSSON, A., et al. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study. **Nitric Oxide**, v.39, p. 1-7. 2014.

LIN, H. Y., LEE, Y. T., CHAN, Y. W., & TSE, G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans (Review). **Biomedical reports**, v. 5, p. 653-659, 2016.

LIU, Y., et al. IL-6 haplotypes, inflammation, and risk for cardiovascular disease in a multiethnic dialysis cohort. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.17, n.3, p. 863-870. 2006.

LÓPEZ-JARAMILLO, P.; CAMACHO, P. A.; FORERO-NARANJO, L. The role of environment and epigenetics in hypertension. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**. v.11, p. 1455-1457. 2013.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R. et al. Glutathione S-transferase Mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population. **Genetics and molecular biology**, v. 25, n. 4, p. 357-360, 2002.

LUFT, F. C. What have we learned from the genetics of hypertension? **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 195-206, 2017.

LUO, J., et al. MIF Gene Polymorphism rs755622 Is Associated With Coronary Artery Disease and Severity of Coronary Lesions in a Chinese Kazakh Population: A Case–Control Study. **Medicine**, v.95, n.4, e.2617. 2016.

MADESHIYA, A. K., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism and its serum level have an impact on anthropometric and biochemical risk factors of metabolic syndrome in Indian population. **International journal of immunogenetics**, v.42, n.2, p. 78-86. 2015.

MADSEN, H. O., et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **The Journal of Immunology**, v.155, n.6, p.3013-3020. 1995.

MADSEN, H. O., et al. Association of mannanose-binding lectin deficiency with severe atherosclerosis. **The Lancet**, v.352, n.9132, p. 959-960. 1998.

MANSO, H., et al. Variants in the Inflammatory IL6 and MPO Genes Modulate Stroke Susceptibility Through Main Effects and Gene—Gene Interactions. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.31, n.8, p.1751-1759. 2011.

MARCADENTI, A., et al. Effects of FTO RS9939906 and MC4R RS17782313 on obesity, type 2 diabetes mellitus and blood pressure in patients with hypertension. **Cardiovascular diabetology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

MARINHO, C., et al. GST M1/T1 and MTHFR polymorphisms as risk factors for hypertension. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 2, p. 344-350, 2007.

MASUO, K., et al. β 2- and β 3-adrenergic receptor polymorphisms are related to the onset of weight gain and blood pressure elevation over 5 years. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3429-3434, 2005.

MASUO, K; LAMBERT, G. W. Relationships of adrenoceptor polymorphisms with obesity. **Journal of obesity**, v. 2011, 2011.

MCKEOWN, R. E. The epidemiologic transition: changing patterns of mortality and population dynamics. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v.3, n.1, p. 19S - 26S. 2009.

MEGIA, A., et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.10, p. 5081-5087. 2004.

MEIRHAEGHE, A.; AMOUYEL, P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. **Molecular genetics and metabolism**, v. 83, n. 1, p. 93-102, 2004.

MENDIS, S. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. World Health Organization, 2014.

MERTENS, I. L.; GAAL, L. F. Overweight, obesity, and blood pressure: the effects of modest weight reduction. **Obesity**, v. 8, n. 3, p. 270-278, 2000.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Evidence for an association between haptoglobin and MnSOD(Val 9 Ala) gene polymorphisms in essential hypertension based on a Brazilian case-control study. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2166-2175, 2010.

MIZUIRI, S., et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. **Kidney international**, v. 60, n. 3, p. 1124-1130, 2001.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, v. 226, n. 1, p. 205-218, 2008.

MOTTL, A. K.; SHOHAM, D. A.; NORTH, K. E. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and susceptibility to hypertension: a HuGE review. **Genetics in Medicine**, v.10, n.8, p. 560-574. 2008.

MOYÉ, L. A. P-value interpretation and alpha allocation in clinical trials. **Annals of epidemiology**, v.8, n.6, p 351-357. 1998.

MÖHLIG, M., et al. Body mass index and C-174G interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 4, p. 1885-1890, 2004.

MUNSHI, A., et al. Interleukin-10-1082 promoter polymorphism and ischemic stroke risk in a South Indian population. **Cytokine**, v. 52, n. 3, p. 221-224, 2010.

MURAY, S., et al. Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. **Journal of hypertension**, v.21, n.11, p. 2069-2075. 2003.

NAVRATILOVA, Z., et al. MBL2 gene variation affecting serum MBL is associated with prosthetic joint infection in Czech patients after total joint arthroplasty. **Tissue antigens**, v.80, n.5, p. 444-451. 2012.

NIKKARI, S. T.; MÄÄTTÄ, K. M.; KUNNAS, T. A. Functional Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Variants Associate With Hypertension: A Case–Control Study in a Finnish Population—The TAMRISK Study. **Medicine**, v. 94, n.46, e1958. 2015.

OLIVEIRA-PAULA, G. H., et al. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. **Gene**, v.515, n.2, p. 391-395. 2013.

OLSEN, M. H., et al. A call to action and a lifecourse strategy to address the global burden of raised blood pressure on current and future generations: the Lancet Commission on hypertension. **The Lancet**, 2016.

ONIKI, K., et al. Association between glutathione S-transferase A1, M1 and T1 polymorphisms and hypertension. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 18, n. 3, p. 275-277, 2008.

PADMANABHAN, S.; CAULFIELD, M.; DOMINICZAK, A. F. Genetic and molecular aspects of hypertension. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 937-959, 2015.

PALATINI, P., et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and metabolic syndrome. **American journal of hypertension**, v. 22, n.2, p.208. 2009

PALMER, N. D.; FREEDMAN, B. I. Genetics: Genetic factors in the regulation of blood pressure. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n.12, p. 716-717, 2016.

PARAMASIVAM, R., et al. Association of ACE DD genotype with Hypertension among the tribal populations of South India. **International Letters of Natural Sciences**, v. 52, p. 1-8. 2016.

PARK, H., et al. Association between IL10, IL10RA, and IL10RB SNPs and ischemic stroke with hypertension in Korean population. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 2, p. 1785-1790, 2013.

PAUSOVA, Z., et al. Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 14-19, 2000.

PAUSOVA, Z., et al. A genealogical study of essential hypertension with and without obesity in French Canadians. **Obesity research**, v. 10, n. 6, p. 463-470, 2002.

PEREIRA, A. C., et al. β 2 adrenoceptor functional gene variants, obesity, and blood pressure level interactions in the general population. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 685-692, 2003.

PEREIRA, M. R., et al. Prevalência, conhecimento, tratamento e controle de hipertensão arterial sistêmica na população adulta urbana de Tubarão, Santa Catarina, Brasil, em 2003. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2363-74, 2007.

PETROVIČ, D.; PETERLIN, B. GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. **Clinical biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 574-577, 2014.

PINTO, E. Blood pressure and ageing. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 976, p. 109-114, 2007.

PIRULLI, D., et al. Polymorphisms in the promoter region and at codon 54 of the MBL2 gene are not associated with IgA nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, n.4, p. 759-764. 2001

POLIMANTI, R., et al. Glutathione S-transferase variants as risk factor for essential hypertension in Italian patients. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 357, n. 1-2, p. 227-233, 2011.

PÖYKKÖ, S., et al. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 455-458, 2003.

RAINA, P.; MATHAROO, K.; BHANWER, A. J. S. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) g.-2518 A> G polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes (T2D) and end stage renal disease (ESRD) in the North-West Indian population of Punjab. **Annals of human biology**, v.42, n.3, p. 278-284. 2015.

RANADE, K., et al. A polymorphism in the β 1 adrenergic receptor is associated with resting heart rate. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 4, p. 935-942, 2002.

RAHIMI, K.; EMDIN, C. A.; MACMAHON, S. The epidemiology of blood pressure and its worldwide management. **Circulation research**, v. 116, n. 6, p. 925-936, 2015.

RECKELHOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1199-1208, 2001.

RIGAT, B., et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCEP1) (dipeptidyl carboxypeptidase1). **Nucleic acids research**, v. 20, n. 6, p. 1433, 1992.

ROSMOND, R., et al. Hypertension in Obesity and the Leptin Receptor Gene Locus 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3126-3131, 2000.

ROTHMAN, K. J. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology*, v.1, n.1, p 43-46. 1990.

ROYTBLAT, L., et al. Raised Interleukin-6 Levels in Obese Patients. **Obesity research**, v. 8, n. 9, p. 673-675, 2000.

RUGONFALVI-KISS, S., et al. Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. **Circulation**, v.106, n.9, p.1071-1076. 2002.

SENTINELLI, F., et al. The vitamin D receptor (VDR) gene rs11568820 variant is associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion in Italian adult subjects, and associates with increased cardio-metabolic risk in children. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.26, n.5, p. 407-413. 2016.

SHANMUGANATHAN, R.; KUMARESAN, R.; GIRI, P. Prevalence of angiotensin converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism in South Indian population with hypertension and chronic kidney disease. **Journal of postgraduate medicine**, v. 61, n. 4, p. 230-234, 2014.

SHANMUGAM, V.; SELL, K.W.; S., B. K. Mistyping ACE heterozygotes. **Genome Research**, v. 3, n. 2, p. 120-121, 1993.

SHEN, H., et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP24A1 with coronary artery calcification. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.30, n.12, p. 2648-2654. 2010.

SHINTANI, M., et al. Leptin gene polymorphism is associated with hypertension independent of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2909-2912, 2002.

SINGH, M. et al. Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism increases the susceptibility to hypertension and additive diseases: A study on North Indian patients. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 305-311, 2016.

SLATTERY, M. L. et al. Modifying Effects of IL-6 Polymorphisms on Body Size–Associated Breast Cancer Risk. **Obesity**, v. 16, n. 2, p. 339-347, 2008.

SMITH, J. K., et al. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. **Jama**, v.281, n.18, p. 1722-1727. 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 1, p. 1-51, Suplemento 1, 2010

SOTOS-PRIETO, M., et al. Ms439 association of rs7138803 in FAIM2 gene and rs7561317 in TMEM18 gene with anthropometric variables in a high cardiovascular-risk mediterranean population. **Atherosclerosis Supplements**, v.11, n.2, p. 198. 2010.

SPRINT RESEARCH GROUP. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control. **N Engl J Med**, v.373, p. 2103-2116. 2015.

SYGITOWICZ, G.; PERA, L.; SITKIEWICZ, D.. Vitamin D receptor (VDR) polymorphism and the risk of cardiovascular events. **Kardiol Pol**, v.72, n.1, p. 64-66. 2014.

SZALAI, C., et al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp (a) and MCP-1- 2518 G/G genotype in CAD patients. **Atherosclerosis**, v.158, n.1, p. 233-239. 2001.

TANG, L., et al. Meta-analyses between 18 candidate genetic markers and overweight/obesity. **Diagnostic pathology**, v.9, n.1, p. 56. 2014.

TEIXEIRA, L, K., et al. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 137-144. 2005.

TEPLIAKOV, A. T., et al. Impact of Gly389Arg beta1-adrenoceptor polymorphism on the risk of chronic heart failure, the nature of its course, and on the efficiency of its treatment with carvedilol. **Terapevticheskii arkhiv**, v.82, n.12, p. 22-28. 2009.

TEPLIAKOV, A. T., et al. Polymorphism of eNOS and iNOS genes and chronic heart failure in patients with Ischemic heart disease. **Kardiologia**, v.50, n.4, p. 23-30. 2009.

TILLER, G. New proteins with inhibitory effects on adipocyte differentiation: effects of TWEAK (TNFSF12) and LIGHT (TNFSF14) on the differentiation, metabolism and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. 2008. **Tese de Doutorado**. Universidade técnica de Munique. Munique. 2008.

TIMASHEVA, Y. R., et al. Association of interleukin-6, interleukin-12, and interleukin-10 gene polymorphisms with essential hypertension in Tatars from Russia. **Biochemical genetics**, v. 46, n. 1-2, p. 64-74, 2008.

TIBAZARWA, Kemi B.; DAMASCENO, Albertino A. Hypertension in developing countries. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, n. 5, p. 527-533, 2014.

TIKHONOFF, V. et al. Blood pressure and metabolic phenotypes in relation to the ADRB1 Arg389Gly and ADRA2B I/D polymorphisms in a White population. **Journal of human hypertension**, v. 22, n. 12, p. 864, 2008.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369, 2003.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al. The practical guide: identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. **Bethesda, MD, National Institutes of Health (NIH publ. no. 004084)**, 2000.

VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 5, p. 546-549, 2002.

VIMALESWARAN, K. S., et al. Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v.2, n.9, p.719-729. 2014.

WANG, H., et al. β 1-adrenoceptor gene Arg389Gly polymorphism and essential hypertension risk in general population: a meta-analysis. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 6, p. 4055-4063, 2013.

WANG, L., et al. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of hypertension in men. **European journal of nutrition**, v.52, n.7, p. 1771-1779. 2013.

WANG, T. J., et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. **The Lancet**, v.376, n.9736, p. 180-188. 2010.

WANG, Z., et al. Significant association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and risk of recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. **Metabolism**, v. 62, n. 9, p. 1227-1238, 2013.

WEBER, M. A., et al. Is It Time to Reappraise Blood Pressure Thresholds and Targets?. **Hypertension**, v.68, n.2, p. 266-268. 2016.

WOLFORD, J. K., et al. Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. **Molecular genetics and metabolism**, v.80, n.3,p. 338-343. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Waist circumference and waist-hip ratio. **Report of a WHO Expert Consultation Geneva: World Health Organization**, p. 8-11, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Brazil: Statistical Profile. **World**, 2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. **World**. 2016.

WU, L., et al. Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with BMI and risk of obesity in Chinese children. **Diabetes**, v.59, n.12, p. 3085-3089. 2010.

XI, B., et al. Associations of obesity susceptibility loci with hypertension in Chinese children. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 7, p. 926-930, 2013.

XIE, G., et al. The impact of severity of hypertension on association of PGC-1 α Gene with blood pressure and risk of hypertension. **BMC cardiovascular disorders**, v. 7, n. 1, p. 1, 2007.

XIE, G., et al. Relationship of serum interleukin-10 and its genetic variations with ischemic stroke in a Chinese general population. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74126, 2013.

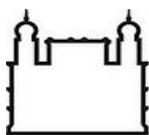
YAN, J., et al. Polymorphisms of genes in nitric oxide-forming pathway associated with ischemic stroke in Chinese Han population. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.32, n.11, p 1357-1363. 2011.

ZHANG, M., et al. Impact of obesity-related gene polymorphism on risk of obesity and metabolic disorder in childhood. **Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]**, v.48, n.9, p. 776-783. 2014.

ZHAO, X., et al. An obesity genetic risk score is associated with metabolic syndrome in Chinese children. *Gene*, v.535, n.2, p. 299-302. 2014.

ZHAO, Y., et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome: a case–control design of population-based cross-sectional study in North China. **Lipids in health and disease**, v.13, n.1,p. 129. 2014.

ANEXO 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

POLIMORFISMOS MOLECULARES EM GENES ASSOCIADOS À OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Apresentação do estudo

O estudo de Polimorfismos Moleculares em Genes Associados à Obesidade e Síndrome Metabólica é uma pesquisa genética e bioquímica sobre doenças crônicas que tem acometido um grande número de brasileiros nos últimos anos, principalmente a população adulta. Entre estas patologias podemos citar a obesidade e a síndrome metabólica (SM), que são fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças mais severas como as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II e obesidade mórbida.

Objetivos do estudo

O estudo investigará fatores que podem levar ao desenvolvimento dessas doenças, ou o seu agravamento, visando compreender melhor as formas de prevenção e tratamento. Os fatores investigados incluem aspectos relacionados aos hábitos de vida, histórico familiar, trabalho, lazer e saúde em geral, incluindo os fatores genéticos. Sendo proposto um estudo de polimorfismos de genes relacionados com a regulação da fome, com o balanço energético, com metabolismo de lipídios e com a diferenciação de adipócitos, tendo a finalidade de analisar uma possível associação destes polimorfismos com o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica (SM). A análise de genes candidatos poderão ajudar a aumentar o conhecimento sobre as bases dos mecanismos energéticos, a compreensão dos fatores genéticos que predisõem ao desenvolvimento destas patologias, além das doenças mais graves correlacionadas (citadas anteriormente). O estudo também se propõe a estabelecer a prevalência e a definir os perfis de risco para o desenvolvimento destas morbidades.

Instituições envolvidas no estudo

O projeto será desenvolvido por três Centros de Investigações clínica e de pesquisa pertencentes à instituição pública Fundação Oswaldo Cruz, localizada no Rio de Janeiro. O estudo está sob a responsabilidade do Instituto Oswaldo Cruz, sob a coordenação do Laboratório de Genética Humana.

Participação do estudo

Os participantes que preencherem os critérios diagnósticos de síndrome metabólica, obesidade mórbida ou voluntários sadios, ou seja, não apresentem nenhuma dessas patologias, serão cadastrados e uma ficha clínica será ou preenchida após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida, uma amostras de 7 mL de sangue total serão coletadas e utilizadas para análises genéticas e bioquímicas, podendo ser solicitada uma segunda coleta, caso o material não seja suficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação, hemólise, degradação), sem que isto acarrete nenhum prejuízo ou risco para a saúde do paciente, exceto aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue. O material biológico coletado (sangue) será encaminhado para o Laboratório de Genética Humana, do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Armazenamento de material biológico e dados clínicos

As amostras de sangue encaminhadas serão armazenadas como ácido desoxirribonucleico (DNA) e soro, que serão estocadas para a pesquisa por um prazo mínimo de cinco (5) anos. Cada amostra de material biológico fará parte de um banco de dados identificados por códigos específicos que garantirão o sigilo e a confidencialidade das informações. Estas amostras e as respectivas fichas de dados clínicos farão parte de um banco de DNA, de soro e de um banco de dados com informações clínicas e epidemiológicas, sob a responsabilidade do Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ e de acordo com os requisitos da Resolução CNS 441 de 12 de Maio de 2011. Serão respeitadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde 196/96, especialmente relevantes a menores e aos estudos de caráter genético.

Seu direito como participante

Sua participação no projeto é inteiramente voluntária, sendo importante a participação em todas as etapas do estudo. Entretanto, se quiser, poderá deixar de responder a qualquer pergunta durante a entrevista, recusar-se a medir-se ou retirar sangue e solicitar a substituição do/a entrevistador. Os indivíduos que se opuserem a ingressar no projeto, ou que quiserem se retirar do mesmo, não sofrerão nenhum tipo de penalidade referente ao seu atendimento clínico, acesso a tratamentos disponíveis, ou acesso a qualquer outro tipo de atividade assistencial e/ou de pesquisa que por ventura possam existir no futuro.

Não haverá qualquer pagamento pela participação, o meio de transporte e/ou alimentação; e todos os procedimentos serão inteiramente gratuitos. Os resultados, normais ou alterados, serão entregues a cada família participante e serão utilizados com fins científicos, podendo ser publicados em revistas científicas. Na eventualidade de um resultado que indique um perfil de risco elevado para as patologias estudadas, o médico responsável será informado para que uma abordagem terapêutica disponível seja adotada. Todos os resultados disponíveis somente serão veiculados a partir da autorização dos participantes no termo de consentimento, como também se manterá o anonimato destes de acordo com as normas de Pesquisa em Seres Humanos (resolução 196/96 do Ministério da Saúde).

Reafirmamos que todas as informações obtidas serão confidenciais, identificadas por números, garantindo o anonimato. Elas serão utilizadas exclusivamente para fins científicos e

serão armazenados com segurança, tendo acesso apenas os pesquisadores envolvidos no projeto.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe será entregue e sua assinatura a seguir significa que o/a Sr/a leu e compreendeu todas as informações e concorda em participar da pesquisa.

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

As informações contidas neste TCLE visam firmar acordo por escrito, mediante o qual o sujeito objeto de pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

Nome do participante _____	Data de nascimento ____/____/____
Documento de identidade _____	CEP _____
Endereço: _____	
Telefone para contato _____	

Declaro, por meio deste termo, que concordei em participar do projeto de pesquisa - **Polimorfismos moleculares em genes associados à obesidade e síndrome metabólica** - que será desenvolvido no Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Fui informado (a) que a pesquisa é coordenada pela **Dra. Giselda Maria Kalil de Cabello**, a quem poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através dos telefones **(21) 3865-8213/3865-8214/3865-8192** ou e-mail gkalil@ioc.fiocruz.br. Estou ciente de que será necessária a retirada de uma amostra de sangue, que será colhida por profissionais na unidade de saúde da instituição e autorizo que a mesma seja coletada. Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer tipo de pagamento e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. O médico responsável pelo meu acompanhamento me deu todas as orientações sobre esta pesquisa e entendi que se trata de uma pesquisa para estudar uma possível associação de genes com o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica. Fui informado que uma ficha clínica será preenchida após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Também fui informado que serão coletados 7mL de sangue no antebraço, com agulha e seringa descartáveis e estéreis, antecedido por higienização local (O local da punção pode ficar dolorido por alguns minutos – é aconselhável exercer uma certa pressão neste local por aproximadamente 3 minutos após a coleta); que o sangue será utilizado para extração de DNA para avaliar a presença de variações genéticas e que os dados gerados pela análise genética não serão divulgados nominalmente e sim sob a forma de frequência, garantindo o anonimato. Esse material ficará armazenado em um banco de dados e somente será utilizado para futuros projetos mediante nova submissão e aprovação do Comitê de Ética da Instituição, bem como a concordância por escrito. Me foi informado e garantido que a assistência médica não será modificada em função da aceitação ou não em participar desta pesquisa e que posso desistir em qualquer momento da minha participação sem que isto interfira em tratamento futuro. Na eventualidade de um resultado que indique um perfil de risco elevado para as patologias estudadas, o médico responsável será informado para que uma abordagem terapêutica disponível seja adotada.

Estou ciente de poder fazer quaisquer perguntas a qualquer momento e que a coleta não acarretará nenhum prejuízo ou risco para minha saúde, exceto aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue. Sei que esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz IOC), a saber: Avenida Brasil 4036 – Sala 705 (Prédio da Expansão) – Manginhos – RJ – CEP: 21040-360 – Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 – E-mail: etica@fiocruz.br e cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

Declaro que li entendi o que me foi explicado e concordo em participar deste projeto.
Rio de Janeiro, _____/_____/_____

Nome do Sujeito da Pesquisa:

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Nome do/a Entrevistador/a:

Assinatura do/a entrevistador/a

ANEXO 2

Tabela 17: Associação dos genótipos e alelos com a hipertensão para os SNPs que não apresentaram resultados significativos.

		Hipertensos	Normotensos	OR (95% CI)	p-valor	p-valor [⊗]	p-valor [⌘]	p-valor [♠]	
TNFSF4	rs379527	n= 176	n= 90						
	Genótipos								
	A/A	106 (0,6)	57 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	A/C	67 (0,38)	31 (0,34)	1,15 (0,68 - 1,96)	0,588	1,000	0,71	1,000	
	C/C	3 (0,02)	2 (0,02)	0,75 (0,16 - 3,49)	0,72	1,000	0,253	1,000	
	<i>Modelo Dominante</i>								
	A/A	106 (0,6)	57 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	A/C + C/C	70 (0,4)	33 (0,37)	0,88 (0,52 - 1,47)	0,629	1,000	0,298	1,000	
	<i>Modelo Recessivo</i>								
	A/A + A/C	173 (0,98)	88 (0,98)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	C/C	3 (0,02)	2 (0,02)	1,40 (0,30 - 6,39)	0,663	1,000	0,617	1,000	
	Alelos								
	A	279	145	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	C	73	35	0,92 (0,59 - 1,44)	0,741	1,000	0,402	1,000	
rs2234167	n= 179	n= 87							
Genótipos									
G/G	149 (0,83)	66 (0,76)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-		
G/A	30 (0,17)	21 (0,23)	0,63 (0,34 - 1,17)	0,143	0,995	0,129	0,992		
A/A	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-		
Alelos									
G	328	153	1,00 (Ref.)	-	-	-	-		
A	30	21	1,50 (0,84 - 2,69)	0,163	0,998	0,129	0,992		
NOS2	rs8072199	n=181	n= 87						
	Genótipos								

	C/C	84 (0,46)	51 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	C/T	85 (0,47)	27 (0,31)	1,89 (1,09 - 3,27)	0,022	0,550	0,043	0,785	
	T/T	12 (0,07)	9 (0,1)	0,80 (0,32 - 1,96)	0,628	1,000	0,11	0,984	
	<i>Modelo Dominante</i>								
	C/C	84 (0,46)	51 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	C/T + T/T	97 (0,54)	36 (0,41)	0,61 (0,36 - 1,02)	0,062	0,894	0,185	0,999	
	<i>Modelo Recessivo</i>								
	C/C + C/T	169 (0,93)	78 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	T/T	12 (0,07)	9 (0,1)	1,64 (0,68 - 3,90)	0,262	0,999	0,033	0,691	
<i>Alelos</i>	C	253 (0,7)	129 (0,74)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	T	109 (0,3)	45 (0,26)	0,81 (0,54 - 1,21)	0,316	0,999	0,843	1,000	
rs2228570		n= 208	n= 95						
VDR	G/G	111 (0,53)	49 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	
	G/A	76 (0,37)	40 (0,42)	0,83 (0,50 - 1,38)	0,493	1,000	0,463	1,000	
	A/A	21 (0,1)	6 (0,06)	1,46 (0,58 - 3,66)	0,409	0,999	0,818	1,000	
	<i>Modelo Dominante</i>								
	<i>Genótipos</i>	G/G	111 (0,53)	49 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	97 (0,47)	46 (0,48)	1,07 (0,66 - 1,73)	0,77	1,000	0,968	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>								
		G/G + G/A	187 (0,9)	89 (0,94)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	21 (0,1)	6 (0,06)	0,63 (0,26 - 1,53)	0,312	0,999	0,42	1,000
	<i>Alelos</i>	G	298 (0,72)	138 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A	118 (0,28)	52 (0,27)	0,95 (0,65 - 1,39)	0,812	1,000	0,704	1,000	
rs731236		n= 182	n= 93						
<i>Genótipos</i>	A/A	92 (0,51)	50 (0,54)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-	

	A/G	67 (0,37)	31 (0,33)	1,16 (0,68 - 2,01)	0,569	1,000	0,565	1,000
	G/G	23 (0,13)	12 (0,13)	1,02 (0,18 - 2,18)	0,997	1,000	0,933	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
	A/A	92 (0,51)	50 (0,54)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G + G/G	90 (0,49)	43 (0,46)	0,88 (0,53 - 1,44)	0,614	1,000	0,621	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	A/A + A/G	159 (0,87)	81 (0,87)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	23 (0,13)	12 (0,13)	1,04 (0,50 - 2,15)	0,912	1,000	0,932	1,000
<i>Alelos</i>	A	251 (0,69)	131 (0,7)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	113 (0,31)	55 (0,3)	0,93 (0,63 - 1,37)	0,731	1,000	0,756	1,000
rs4760658		n= 205	n= 96					
	T/T	115 (0,56)	50 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C	77 (0,38)	37 (0,39)	0,90 (0,54 - 1,50)	0,695	1,000	0,774	1,000
	C/C	13 (0,06)	9 (0,09)	0,62 (0,25 - 1,49)	0,286	0,999	0,218	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
<i>Genótipos</i>	T/T	115 (0,56)	50 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C + C/C	90 (0,44)	46 (0,48)	1,17 (0,72 - 1,90)	0,511	1,000	0,516	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	T/T + T/C	192 (0,94)	87 (0,91)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	13 (0,06)	9 (0,09)	1,54 (0,66 - 3,62)	0,313	0,999	0,231	1,000
<i>Alelos</i>	T	307 (0,75)	137 (0,71)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C	103 (0,25)	55 (0,29)	1,19 (0,81 - 1,75)	0,351	1,000	0,312	1,000
rs1861493		n= 96	n= 46					
IFNG	<i>Genótipos</i>	A/A	72 (0,75)	31 (0,67)	1,00 (Ref.)	-	-	-
		A/G	20 (0,21)	12 (0,26)	0,71 (0,31 - 1,59)	0,41	0,999	0,692

		G/G	4 (0,04)	3 (0,07)	0,55 (0,14 - 2,21)	0,407	0,999	0,737	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
		A/A	72 (0,75)	31 (0,67)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G + G/G	24 (0,25)	15 (0,33)	1,45 (0,68 - 3,09)	0,327	0,999	0,637	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		A/G + G/G	92 (0,96)	43 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/G	4 (0,04)	3 (0,07)	1,65 (0,42 - 6,46)	0,469	1,000	0,778	1,000
	<i>Alelos</i>	A	164 (0,85)	74 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G	28 (0,15)	18 (0,2)	1,43 (0,75 - 2,71)	0,269	0,999	0,63	1,000
	rs2069718		n= 207	n= 97					
		A/A	56 (0,27)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G	96 (0,46)	43 (0,44)	1,35 (0,78 - 2,35)	0,28	0,999	0,327	1,000
		G/G	55 (0,27)	20 (0,21)	1,65 (0,85 - 3,18)	0,132	0,993	0,183	0,999
		<i>Modelo Dominante</i>							
	<i>Genótipos</i>	A/A	56 (0,27)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G + G/G	151 (0,73)	63 (0,65)	0,68 (0,42 - 1,14)	0,15	0,997	0,202	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		A/A + A/G	152 (0,73)	77 (0,79)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/G	55 (0,27)	20 (0,21)	0,72 (0,41 - 1,28)	0,273	0,999	0,336	1,000
	<i>Alelos</i>	A	208 (0,5)	111 (0,57)	1,00 (Ref.)	-	-	rs1554286	-
		G	206 (0,5)	83 (0,43)	0,75 (0,53 - 1,06)	0,109	0,982	0,175	0,999
	rs5743592		n= 129	n= 60					
TLR1		A/A	92 (0,71)	36 (0,6)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	<i>Genótipos</i>	A/G	34 (0,26)	22 (0,37)	0,60 (0,31 - 1,15)	0,129	0,992	0,724	1,000
		G/G	3 (0,02)	2 (0,03)	0,55 (0,11 - 2,58)	0,451	0,999	0,578	1,000

		<i>Modelo Dominante</i>						
	A/A	92 (0,71)	36 (0,6)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G + G/G	37 (0,29)	24 (0,4)	1,65 (0,879 - 3,11)	0,118	0,988	0,544	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>						
	A/A + A/G	126 (0,98)	58 (0,97)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	3 (0,02)	2 (0,03)	1,54 (0,33 - 7,12)	0,577	1,000	0,775	1,000
<i>Alelos</i>	A	218 (0,84)	94 (0,78)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	40 (0,16)	26 (0,22)	1,51 (0,87 - 2,60)	0,134	0,993	0,532	1,000
rs4833095		n= 197	n = 94					
	C/C	76 (0,39)	37 (0,39)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/T	84 (0,43)	44 (0,47)	0,93 (0,54 - 1,58)	0,791	1,000	0,734	1,000
	T/T	37 (0,19)	13 (0,14)	1,36 (0,65 - 2,81)	0,404	0,999	0,778	1,000
<i>Genótipos</i>		<i>Modelo Dominante</i>						
	C/C	76 (0,39)	37 (0,39)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/T + T/T	121 (0,61)	57 (0,61)	0,96 (0,58 - 1,58)	0,89	1,000	0,875	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>						
	C/C + C/T	160 (0,81)	81 (0,86)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/T	37 (0,19)	13 (0,14)	0,70 (0,36 - 1,38)	0,312	0,999	0,652	1,000
<i>Alelos</i>	C	236 (0,6)	118 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T	158 (0,4)	70 (0,37)	0,88 (0,62 - 1,26)	0,511	1,000	0,899	1,000
rs5743595		n= 180	n= 86					
<i>Genótipos</i>	A/A	135 (0,75)	56 (0,65)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G	41 (0,23)	27 (0,31)	0,62 (0,35 - 1,11)	0,11	0,984	0,567	1,000
	G/G	4 (0,02)	3 (0,03)	0,53 (0,13 - 2,06)	0,365	0,999	0,892	1,000

		<i>Modelo Dominante</i>							
		A/A	135 (0,75)	56 (0,65)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G + G/G	45 (0,25)	30 (0,35)	1,60 (0,92 - 2,78)	0,09	0,963	0,568	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		A/A + A/G	176 (0,98)	83 (0,97)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/G	4 (0,02)	3 (0,03)	1,64 (0,43 - 6,27)	0,467	1,000	0,946	1,000
	<i>Alelos</i>	A	311 (0,86)	139 (0,81)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G	49 (0,14)	33 (0,19)	1,51 (0,93 - 2,44)	0,091	0,965	0,606	1,000
	rs735883		n= 205	n= 97					
		G/G	102 (0,5)	47 (0,48)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A	70 (0,34)	35 (0,36)	0,92 (0,54 - 1,55)	0,757	1,000	0,952	1,000
		A/A	33 (0,16)	15 (0,15)	1,00 (0,50 - 1,98)	0,996	1,000	0,815	1,000
TAP1	<i>Genótipos</i>	<i>Modelo Dominante</i>							
		G/G	102 (0,5)	47 (0,48)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	103 (0,5)	50 (0,52)	1,05 (0,65 - 1,70)	0,833	1,000	0,954	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/A	172 (0,84)	82 (0,85)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	33 (0,16)	15 (0,15)	0,96 (0,50 - 1,85)	0,92	1,000	0,791	1,000
	<i>Alelos</i>	G	274 (0,67)	129 (0,66)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A	136 (0,33)	65 (0,34)	1,01 (0,70 - 1,45)	0,924	1,000	0,865	1,000
	rs1554286		n= 207	n= 97					
IL10	<i>Genótipos</i>	G/G	56 (0,27)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A	96 (0,46)	43 (0,44)	1,53 (0,92 - 2,55)	0,096	0,978	0,226	1,000
		A/A	55 (0,27)	20 (0,21)	2,59 (1,05 - 6,37)	0,037	0,733	0,12	0,989

		<i>Modelo Dominante</i>						
	G/G	56 (0,27)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/A + A/A	151 (0,73)	63 (0,65)	0,58 (0,36 - 0,95)	0,03	0,656	0,117	0,987
		<i>Modelo Recessivo</i>						
	G/G + G/A	152 (0,73)	77 (0,79)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/A	55 (0,27)	20 (0,21)	0,47 (0,19- 1,21)	0,088	0,963	0,2	1,000
<i>Alelos</i>	G	208 (0,5)	111 (0,57)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A	206 (0,5)	83 (0,43)	0,62 (0,42 - 0,90)	0,014	0,389	0,076	0,937
rs1800896		n= 172	n= 83					
	T/T	86 (0,5)	38 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C	72 (0,42)	32 (0,39)	0,99 (0,56 - 1,73)	0,974	1,000	0,588	1,000
	C/C	14 (0,08)	13 (0,16)	0,47 (0,21 - 1,08)	0,077	0,939	0,08	0,946
<i>Genótipos</i>		<i>Modelo Dominante</i>						
	T/T	86 (0,5)	38 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C + C/C	86 (0,5)	45 (0,54)	1,18 (0,70 - 1,98)	0,528	1,000	0,865	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>						
	T/T + T/C	158 (0,92)	70 (0,84)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	14 (0,08)	13 (0,16)	2,09 (0,95 - 4,56)	0,063	0,897	0,045	0,842
<i>Alelos</i>	T	244 (0,71)	108 (0,65)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	100 (0,29)	58 (0,35)	1,31 (0,88 - 1,94)	0,175	0,999	0,287	1,000
rs1800890		n= 190	n= 93					
	T/T	121 (0,64)	52 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
<i>Genótipos</i>	T/A	58 (0,31)	32 (0,34)	0,77 (0,45 - 1,32)	0,356	0,999	0,191	0,999
	A/A	11 (0,06)	9 (0,1)	0,52 (0,21 - 1,28)	0,157	0,997	0,374	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>						

	T/T	121 (0,64)	52 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/A + A/A	69 (0,36)	41 (0,44)	1,38 (0,83 - 2,27)	0,205	0,999	0,218	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	T/T + T/A	179 (0,94)	84 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/A	11 (0,06)	9 (0,1)	1,75 (0,72 - 4,22)	0,209	0,999	0,248	1,000
<i>Alelos</i>	S	300 (0,79)	136 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	M	80 (0,21)	50 (0,27)	1,38 (0,92 - 2,06)	0,117	0,987	0,151	0,997
rs1800871		n= 182	n= 91					
	A/A	64 (0,35)	48 (0,53)	1,00 (Ref.)	-	-		
	A/G	85 (0,47)	34 (0,37)	1,86 (1,08 - 3,19)	0,023	0,558	0,051	0,840
	G/G	33 (0,18)	9 (0,1)	2,65 (1,19 - 5,88)	0,016	0,431	0,068	0,915
	<i>Modelo Dominante</i>							
<i>Genótipos</i>	A/A	64 (0,35)	48 (0,53)	1,00 (Ref.)	-	-		
	A/G + G/G	118 (0,65)	43 (0,47)	0,48 (0,29 - 0,81)	0,005	0,169	0,026	0,623
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	A/A + A/G	149 (0,82)	82 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-		
	G/G	33 (0,18)	9 (0,1)	0,51 (0,24 - 1,09)	0,083	0,952	0,157	0,997
<i>Alelos</i>	A	213 (0,59)	130 (0,71)	1,00 (Ref.)	-	-		
	G	151 (0,41)	52 (0,29)	0,56 (0,38 - 0,82)	0,003	0,998	0,023	0,558
rs9356058		n= 206	n= 96					
PACRG*	T/T	110 (0,53)	56 (0,58)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/C	82 (0,4)	33 (0,34)	1,25 (0,75 - 2,09)	0,376	0,999	0,203	1,000
	C/C	17 (0,08)	7 (0,07)	1,19 (0,48 - 2,91)	0,698	1,000	0,414	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
	T/T	110 (0,53)	56 (0,58)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-

		T/C + C/C	99 (0,48)	40 (0,42)	0,79 (0,49 - 1,29)	0,355	0,999	0,167	0,998
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		T/T + T/C	192 (0,93)	89 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/C	17 (0,08)	7 (0,07)	0,92 (0,38 - 2,19)	0,853	1,000	0,589	1,000
	<i>Alelos</i>	T	302 (0,72)	145 (0,76)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C	116 (0,28)	47 (0,24)	0,84 (0,57 - 1,25)	0,405	0,999	0,194	0,999
	rs755622		n= 205	n= 95					
		G/G	118 (0,58)	44 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-		
		G/C	68 (0,33)	38 (0,4)	0,66 (0,39 - 1,12)	0,129	0,992	0,234	1,000
		C/C	19 (0,09)	13 (0,14)	0,54 (0,25 - 1,16)	0,116	0,987	0,454	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
	<i>Genótipos</i>	G/G	118 (0,58)	44 (0,46)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/C + C/C	87 (0,42)	51 (0,54)	1,56 (0,96 - 2,54)	0,069	0,918	0,205	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/C	186 (0,91)	82 (0,86)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/C	19 (0,09)	13 (0,14)	1,56 (0,75 - 3,24)	0,229	0,999	0,659	1,000
	<i>Alelos</i>	G	304 (0,74)	126 (0,66)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C	106 (0,26)	64 (0,34)	1,45 (1,0 - 2,11)	0,046	0,877	0,258	1,000
	rs2069845		n= 201	n= 91					
		A/A	89 (0,44)	36 (0,4)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G	76 (0,38)	36 (0,4)	0,85 (0,49 - 1,47)	0,574	1,000	0,309	1,000
	<i>Genótipos</i>	G/G	36 (0,18)	19 (0,21)	0,76 (0,39 - 1,48)	0,415	0,999	0,422	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
		A/A	89 (0,44)	36 (0,4)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G + G/G	112 (0,56)	55 (0,6)	1,20 (0,73 - 1,99)	0,454	0,999	0,298	1,000

		<i>Modelo Recessivo</i>						
	A/A + A/G	165 (0,82)	72 (0,79)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	36 (0,18)	19 (0,21)	1,21 (0,66 - 2,24)	0,523	1,000	0,445	1,000
<i>Alelos</i>	A	254 (0,63)	108 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	148 (0,37)	74 (0,41)	1,17 (0,82- 1,68)	0,371	0,999	0,276	1,000
rs2069832		n= 193	n= 92					
	G/G	126 (0,65)	58 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/A	61 (0,32)	29 (0,32)	0,96 (0,56 - 1,64)	0,893	1,000	0,64	1,000
	A/A	6 (0,03)	5 (0,05)	0,54 (0,17 - 1,69)	0,296	0,999	0,293	1,000
<i>Genótipos</i>	<i>Modelo Dominante</i>							
	G/G	126 (0,65)	58 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/A + A/A	67 (0,35)	34 (0,37)	1,10 (0,66- 1,84)	0,701	1,000	0,464	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	G/G + G/A	187 (0,97)	87 (0,95)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/A	6 (0,03)	5 (0,05)	1,81 (0,59 -5,55)	0,297	0,999	0,321	1,000
<i>Alelos</i>	G	313 (0,81)	145 (0,79)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A	73 (0,19)	39 (0,21)	1,15 (0,75 - 1,78)	0,505	1,000	0,333	1,000
rs2069837		n= 68	n= 32					
<i>Genótipos</i>	A/A	55 (0,81)	23 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/G	13 (0,19)	9 (0,28)	0,34 (0,12 - 0,94)	0,037	0,733	0,237	1,000
	G/G	0 (0)	0 (0)		-	-	-	-
<i>Alelos</i>	A	123 (0,9)	35 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	13 (0,1)	9 (0,2)	2,44 (1,0 - 5,79)	0,049	0,828	0,237	1,000
rs2069840		n= 190	n= 89					
	<i>Genótipos</i>							

	C/C	102 (0,54)	46 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/G	72 (0,38)	36 (0,4)	0,90 (0,53 - 1,52)	0,697	1,000	0,923	1,000
	G/G	16 (0,08)	7 (0,08)	0,99 (0,40 - 2,47)	0,996	1,000	0,75	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
	G/G	102 (0,54)	46 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/C + C/C	88 (0,46)	43 (0,48)	1,08 (0,65 - 1,78)	0,753	1,000	0,984	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	G/G + G/C	174 (0,92)	82 (0,92)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	16 (0,08)	7 (0,08)	0,96 (0,39 - 2,31)	0,928	1,000	0,725	1,000
<i>Alelos</i>	G	276 (0,73)	128 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C	104 (0,27)	50 (0,28)	1,03 (0,70 - 1,54)	0,845	1,000	0,867	1,000
rs1800795		n= 203	n= 96					
	G/G	125 (0,62)	58 (0,6)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/C	68 (0,33)	32 (0,33)	0,98 (0,58 - 1,64)	0,949	1,000	0,509	1,000
	C/C	10 (0,05)	6 (0,06)	0,75 (0,27 - 2,04)	0,577	1,000	0,51	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
<i>Genótipos</i>	G/G	125 (0,62)	58 (0,6)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/C + C/C	78 (0,38)	38 (0,4)	1,05 (0,64 - 1,72)	0,839	1,000	0,426	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	G/G + G/C	193 (0,95)	90 (0,94)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/C	10 (0,05)	6 (0,06)	1,32 (0,49 - 3,52)	0,574	1,000	0,581	1,000
<i>Alelos</i>	G	318 (0,78)	148 (0,77)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C	88 (0,22)	44 (0,23)	1,07 (0,71 - 1,62)	0,716	1,000	0,391	1,000
rs1799987		n= 149	n= 76					
CCR5	<i>Genótipos</i>	G/G	50 (0,34)	21 (0,28)	1,00 (Ref.)	-	-	-

		G/A	63 (0,42)	36 (0,47)	0,74 (0,38 - 1,40)	0,36	0,999	0,376	1,000
		A/A	36 (0,24)	19 (0,25)	0,79 (0,38 - 1,66)	0,546	1,000	0,74	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
		G/G	50 (0,34)	21 (0,28)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	99 (0,66)	55 (0,72)	1,31 (0,72 - 2,38)	0,375	0,999	0,447	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/A	113 (0,76)	57 (0,75)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	36 (0,24)	19 (0,25)	1,05 (0,56 - 1,97)	0,869	1,000	0,882	1,000
	<i>Alelos</i>	G	163 (0,55)	78 (0,51)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A	135 (0,45)	74 (0,49)	1,14 (0,77 - 1,69)	0,829	1,000	0,7	1,000
	rs1024611		n= 190	n= 89					
		A/A	111 (0,58)	46 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G	59 (0,31)	36 (0,4)	0,67 (0,39 - 1,15)	0,155	0,997	0,222	1,000
		G/G	20 (0,11)	7 (0,08)	1,13 (0,47 - 2,75)	0,77	1,000	0,994	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
MCP-1	<i>Genótipos</i>	A/A	111 (0,58)	46 (0,52)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/G + G/G	79 (0,42)	43 (0,48)	1,31 (0,79 - 2,16)	0,288	0,999	0,298	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		A/A + A/G	170 (0,89)	82 (0,92)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/G	20 (0,11)	7 (0,08)	0,75 (0,32 - 1,77)	0,521	1,000	0,775	1,000
	<i>Alelos</i>	A	281 (0,74)	128 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G	99 (0,26)	50 (0,28)	1,11 (0,74 - 1,65)	0,599	1,000	0,509	1,000
	rs2107538		n=132	n= 60					
CCL5	<i>Genótipos</i>	C/C	68 (0,52)	33 (0,55)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/T	46 (0,35)	23 (0,38)	0,96 (0,50 - 1,83)	0,92	1,000	0,393	1,000

		T/T	18 (0,14)	4 (0,07)	2,01 (0,69 - 5,84)	0,199	0,999	0,897	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
		C/C	68 (0,52)	33 (0,55)	1,00 (Ref.)	-	-		
		C/T + T/T	64 (0,48)	27 (0,45)	0,87 (0,47 - 1,59)	0,656	1,000	0,855	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		SS+MS	114 (0,86)	56 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-		
		MM	18 (0,14)	4 (0,07)	0,49 (0,17 - 1,38)	0,18	0,999	0,359	1,000
	<i>Alelos</i>	C	182 (0,69)	89 (0,74)	1,00 (Ref.)	-	-		
		T	82 (0,31)	31 (0,26)	0,77 (0,48 - 1,25)	0,306	0,999	0,578	1,000
	rs7138803		n= 189	n= 91					
		G/G	109 (0,58)	51 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A	70 (0,37)	30 (0,33)	1,08 (0,63 - 1,85)	0,76	1,000	0,526	1,000
		A/A	10 (0,05)	10 (0,11)	0,47 (0,19 - 1,15)	0,099	0,974	0,344	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
	<i>Genótipos</i>	G/G	109 (0,58)	51 (0,56)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/A + A/A	80 (0,42)	40 (0,44)	1,06 (0,64 - 1,76)	0,791	1,000	0,825	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/A	179 (0,95)	81 (0,89)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	10 (0,05)	10 (0,11)	2,20 (0,91 - 5,28)	0,077	0,939	0,263	1,000
	<i>Alelos</i>	G	288 (0,76)	132 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A	90 (0,24)	50 (0,27)	1,21 (0,81 - 1,81)	0,339	0,999	0,759	1,000
	rs4074134		n= 204	n= 97					
		C/T	147 (0,72)	64 (0,66)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	<i>Genótipos</i>	C/T	51 (0,25)	29 (0,3)	0,76 (0,44 - 1,30)	0,323	0,999	0,258	1,000
		T/T	6 (0,03)	4 (0,04)	0,63 (0,19 - 2,06)	0,447	0,999	0,323	1,000

		<i>Modelo Dominante</i>							
		C/C	147 (0,72)	64 (0,66)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		C/T + T/T	57 (0,28)	33 (0,34)	1,332322211	0,273	0,999	0,186	0,999
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		C/C + C/T	198 (0,97)	93 (0,96)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/T	6 (0,03)	4 (0,04)	1,46 (0,45 - 4,75)	0,519	1,000	0,392	1,000
	<i>Alelos</i>	C	345 (0,85)	157 (0,81)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T	63 (0,15)	37 (0,19)	1,29 (0,83 - 2,01)	0,252	1,000	0,157	0,997
	rs2282697		n= 201	n= 98					
		G/G	127 (0,63)	72 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-		
		G/C	65 (0,32)	25 (0,26)	1,46 (0,85 - 2,49)	0,166	0,998	0,147	0,996
		C/C	9 (0,04)	1 (0,01)	3,60 (0,76 - 16,88)	0,104	0,979	0,183	0,999
GC	<i>Genótipos</i>	<i>Modelo Dominante</i>							
		G/G	127 (0,63)	72 (0,73)	1,00 (Ref.)	-	-		
		G/C + C/C	74 (0,37)	26 (0,27)	0,62 (0,36 - 1,05)	0,08	0,946	0,085	0,955
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/C	192 (0,96)	97 (0,99)	1,00 (Ref.)	-	-		
		C/C	9 (0,04)	1 (0,01)	0,31 (0,06 - 1,45)	0,137	0,994	0,223	1,000
	<i>Alelos</i>	G	319 (0,79)	169 (0,86)	1,00 (Ref.)	-	-		
		C	83 (0,21)	27 (0,14)	0,620793811	0,045	0,842	0,056	0,867
	rs6013897		n= 159	n= 75					
CYP24A1	<i>Genótipos</i>	T/T	96 (0,6)	38 (0,51)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/A	46 (0,29)	32 (0,43)	0,57 (0,31 - 1,01)	0,058	0,876	0,046	0,877
		A/A	17 (0,11)	5 (0,07)	1,26 (0,46 - 3,43)	0,639	1,000	0,831	1,000

		<i>Modelo Dominante</i>							
		T/T	96 (0,6)	38 (0,51)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/A + A/A	63 (0,4)	37 (0,49)	1,48 (0,85 - 2,55)	0,159	0,998	0,102	0,977
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		T/T + T/A	142 (0,89)	70 (0,93)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A/A	17 (0,11)	5 (0,07)	0,63 (0,24 - 1,67)	0,357	0,999	0,506	1,000
	<i>Alelos</i>	T	238 (0,75)	108 (0,72)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		A	80 (0,25)	42 (0,28)	1,160517503	0,5	1,000	0,339	1,000
	rs12785878		n= 208	n= 96					
		G/G	82 (0,39)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/T	79 (0,38)	45 (0,47)	0,73 (0,42 - 1,24)	0,251	0,999	0,254	1,000
		T/T	47 (0,23)	17 (0,18)	1,13 (0,58 - 2,21)	0,711	1,000	0,799	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							
NADSYN1	<i>Genótipos</i>	G/G	82 (0,39)	34 (0,35)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		G/T + T/T	126 (0,61)	62 (0,65)	1,18 (0,71 - 1,94)	0,511	1,000	0,471	1,000
		<i>Modelo Recessivo</i>							
		G/G + G/T	161 (0,77)	79 (0,82)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T/T	47 (0,23)	17 (0,18)	0,74 (0,40 - 1,36)	0,347	0,999	0,413	1,000
	<i>Alelos</i>	G	243 (0,58)	113 (0,59)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
		T	173 (0,42)	79 (0,41)	0,98 (0,69 - 1,38)	0,924	1,000	0,982	1,000
	rs1800450		n=205	n= 97					
		C/C	173 (0,84)	76 (0,78)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	<i>Genótipos</i>	C/T	29 (0,14)	19 (0,2)	0,66 (0,35 - 1,24)	0,205	0,999	0,044	0,793
		T/T	3 (0,01)	2 (0,02)	0,61 (0,13 - 2,82)	0,533	1,000	0,541	1,000
		<i>Modelo Dominante</i>							

	C/C	173 (0,84)	76 (0,78)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/T + T/T	32 (0,16)	21 (0,22)	1,50 (0,82 - 2,74)	0,186	0,999	0,038	0,742
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	C/C + C/T	202 (0,99)	95 (0,98)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/T	3 (0,01)	2 (0,02)	1,51 (0,33 - 6,90)	0,591	1,000	0,616	1,000
<i>Alelos</i>	C	375 (0,91)	171 (0,88)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T	35 (0,09)	23 (0,12)	1,44 (0,83 - 2,50)	0,183	0,999	0,052	0,846
rs1800451		n= 187	n= 86					
	C/C	153 (0,82)	71 (0,83)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/T	33 (0,18)	13 (0,15)	1,15 (0,58 - 2,28)	0,278	0,999	0,515	1,000
	T/T	1 (0,01)	2 (0,02)	0,27 (0,04 - 1,70)	0,167	0,998	0,514	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
<i>Genótipos</i>	C/C	153 (0,82)	71 (0,83)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/T + T/T	34 (0,18)	15 (0,17)	0,96 (0,50 - 1,85)	0,912	1,000	0,636	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	C/C + C/T	186 (0,99)	84 (0,98)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	CT/T	1 (0,01)	2 (0,02)	3,67 (0,60 - 22,42)	0,157	0,997	0,495	1,000
<i>Alelos</i>	C	339 (0,91)	155 (0,9)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T	35 (0,09)	17 (0,1)	1,07 (0,59 - 1,95)	0,809	1,000	0,798	1,000
rs7096206		n= 193	n= 82					
	C/C	148 (0,77)	52 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
<i>Genótipos</i>	C/G	42 (0,22)	27 (0,33)	0,54 (0,30 - 0,96)	0,037	0,733	0,084	0,954
	G/G	3 (0,02)	3 (0,04)	0,35 (0,08 - 1,46)	0,151	0,997	0,121	0,989
	<i>Modelo Dominante</i>							

	C/C	148 (0,77)	52 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	C/G + G/G	45 (0,23)	30 (0,37)	1,89 (1,09 - 3,29)	0,023	0,558	0,044	0,793
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	C/C + C/G	190 (0,98)	79 (0,96)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G/G	3 (0,02)	3 (0,04)	2,39 (0,58 - 9,81)	0,224	0,999	0,159	0,998
<i>Alelos</i>	C	338 (0,88)	131 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	G	48 (0,12)	33 (0,2)	1,77 (1,09 - 2,87)	0,019	0,490	0,028	0,630
rs525891		n= 205	n= 94					
	A/A	117 (0,57)	59 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/T	69 (0,34)	32 (0,34)	1,08 (0,64 - 1,81)	0,762	1,000	0,077	0,939
	T/T	19 (0,09)	3 (0,03)	2,82 (0,92 - 8,62)	0,068	0,915	0,741	1,000
	<i>Modelo Dominante</i>							
TNFRSF1B <i>Genótipos</i>	A/A	117 (0,57)	59 (0,63)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	A/T + T/T	88 (0,43)	35 (0,37)	0,79 (0,48 - 1,30)	0,357	0,999	0,357	1,000
	<i>Modelo Recessivo</i>							
	A/A + A/T	186 (0,91)	91 (0,97)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T/T	19 (0,09)	3 (0,03)	0,36 (0,12 - 1,10)	0,073	0,930	0,083	0,952
<i>Alelos</i>	A	303 (0,74)	150 (0,8)	1,00 (Ref.)	-	-	-	-
	T	107 (0,26)	38 (0,2)	0,72 (0,47 - 1,09)	0,124	0,993	0,144	0,996

Legenda:

p-valor_✖ : Este valor representa o p-valor ajustado pela correção de Holm-Bonferroni, onde n = 35.

p-valor_⌘ : Este valor representa o p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade.

p-valor_♣ : Este valor representa o p-valor da regressão logística ajustada por peso e idade e com a correção de Holm-Bonferroni (n = 35).