



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

**Avaliação da distribuição de polimorfismos genéticos associados a fatores de risco cardiovascular em uma amostra populacional de escolares de 10 a 15 anos: estudo do Rio de Janeiro II**

Rio de Janeiro  
2021

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

**Avaliação da distribuição de polimorfismos genéticos associados a fatores de risco cardiovascular em uma amostra populacional de escolares de 10 a 15 anos: estudo do Rio de Janeiro II**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Araújo Brandão  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M149 Machado, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz.  
Avaliação da distribuição de polimorfismos genéticos associados a fatores de risco cardiovascular em uma amostra populacional de escolares de 10 a 15 anos: estudo do Rio de Janeiro II / Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado – 2021.  
158f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Araújo Brandão  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Polimorfismo (Genética) - Teses. 2. Sistema cardiovascular - Teses. 3. Obesidade infantil - Teses. 4. Técnicas de Genotipagem - Teses. 5. Fatores de Risco de Doenças Cardíacas. I. Brandão, Andréa Araújo. II. Silva, Dayse Aparecida da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

**Avaliação da distribuição de polimorfismos genéticos associados a fatores de risco cardiovascular em uma amostra populacional de escolares de 10 a 15 anos: Estudo do Rio de Janeiro II**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de dezembro de 2021.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Araújo Brandão (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Aguiar Costa Lima

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Tereza de Souza Fernandez Seixas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Carmen Lucia Antão Paiva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

À todos aqueles que colaboraram para minha formação, acreditaram e acreditam no meu potencial e que hoje acompanham o encerramento de mais esta etapa na minha vida acadêmica e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que, em tempos inimagináveis e imprevisíveis como este que vivenciamos, nos convidou a repensar sobre nossas limitações e potencialidades, sobre perdas e ganhos, sobre a vida, sua impermanência e tudo aquilo que nos torna “humanos” mas que sem a coragem, resiliência, esperança, ânimo e principalmente fé e confiança e amor na Fonte Criadora para superar as dificuldades podemos desmoronar como um castelo de areia com o repentino bater de uma onda ou rajada de vento.

À Dr<sup>a</sup> Andréa Brandão, Dr. Pozzan (o mago do SPSS sempre disposto a ajudar) e a toda equipe de Hipertensão Arterial do HUPE, pela oportunidade do trabalho colaborativo na área médica que vem desde o mestrado e que se renovou com o Estudo do Rio de Janeiro, linha de pesquisa desenvolvida pelo Dr Ayrton Pires Brandão, onde meu trabalho e esforço pessoais contribuíram um “pedacinho” para este projeto de importância pessoal, acadêmica e social que ainda tem muito a oferecer.

À Prof<sup>a</sup> Dayse, que não só me recebeu em seu laboratório como aluna e ex-técnica de laboratório para que eu desenvolvesse e ampliasse conhecimentos na área da genética clínica como vem acompanhando e apoiando minha formação como pesquisadora com direcionamento, suporte logístico, intelectual e pessoal nos momentos bons e ruins que todos passamos.

Aos amigos que passaram ou ainda estão no Laboratório de Diagnósticos por DNA, ou carinhosamente LDD, como Holy, Silvia, Lorena, Vanusca, Fernanda, Amanda, Gizella, Masinda e tantos outros nesses 4 a 8 anos de convivência que ajudaram a descontrair o ambiente de trabalho nos momentos de “perrengue” acadêmico e experimentos frustrados, pela troca de dicas, bolos de pote, coffee breaks e festinhas surpresa.

À minha família e aos meus amigos mais íntimos que ganharam maior importância em minha vida, em especial no momento atual onde mesmo residindo a 2.000 km de distância, sinto seu amor, confiança e incentivo e que durante todos esses anos vivenciaram minha rotina indiretamente, acompanharam meu crescimento pessoal e profissional, presenciaram minhas conquistas e vitórias, procuraram me amparar, apoiar e incentivar nos momentos de angústia, de ansiedade e desânimo,

repassando suas próprias experiências para mostrar que lutas diárias e particulares todos têm, mas que nunca estamos sozinhos no caminho que percorremos.

Ao meu marido Luiz Guilherme, que vem acompanhando minha trajetória durante os últimos anos e que, principalmente em meio ao caos da pandemia, mudança de cidade, adaptação a nova vida, crises de ansiedade, procurou me apoiar nesses momentos finais do doutorado, com muita paciência, carinho, compreensão, tolerância, incentivos e amor incondicional.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Toda prova, seja qual for, aparece na estrada, a fim de elastecer-nos a força e  
aperfeiçoar-nos a  
experiência.

*Emmanuel*

## RESUMO

MACHADO, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz. **Avaliação da distribuição de polimorfismos genéticos associados a fatores de risco cardiovascular em uma amostra populacional de escolares de 10 a 15 anos:** estudo do Rio de Janeiro II. 2021. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

**Objetivos:** Avaliar a distribuição de 8 polimorfismos genéticos relacionados a fatores de risco cardiovascular e sua associação com a pressão arterial elevada, obesidade e suas variáveis quantitativas em escolares de 10 a 15 anos de idade. **Método:** Uma subamostragem constituída por 1.054 adolescentes, de ambos os sexos, pertencentes a população do ERJ II (Estudo do Rio de Janeiro II). Análise genética de 8 polimorfismos de base única (M235T (rs699) do gene *AGT*, c.-344T>C (rs1799998) do gene *CYP11B2*, G894T (rs1799983) do gene *NOS3*, variante intrônica T>A (rs9939609) do gene *FTO*, Q223R (rs1137101) do gene *LEPR*, T6K (rs3746619) e V81I (rs3827103) do gene *MC3R*, variante intrônica T>C (rs17782313) do gene *MC4R*) através de Minisequenciamento Multiplex/SNaPshot® personalizado. Frequências alélicas e genotípicas foram avaliadas através do teste  $\chi^2$  de forma geral e estratificadas por sexo, cor da pele, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CAbd) e perfil de pressão arterial (PA). Variantes genéticas foram avaliadas para correlações com variáveis contínuas através de one-way ANOVA e para associações com PA elevada e obesidade através de modelos de regressão logística uni e multivariada. **Resultados:** Prevalências de PA elevada e de sobrepeso/obesidade detectadas foram de 13,5% e 41,4%, respectivamente. Genótipo variante AA do V81I *MC3R* mostrou-se mais prevalente em negros ( $P<0.0001$ ) e em meninos ( $P=0.013$ ). Genótipo variante TT do M235T *AGT* esteve mais prevalente em brancos ( $P=0,001$ ) e naqueles com PA elevada ( $P=0,014$ ). Genótipo selvagem TT do rs1799998 *CYP11B2* mais prevalente em negros ( $P=0,018$ ) e com CAbd aumentada ( $P=0,021$ ). Genótipo variante AA do T6K *MC3R* esteve mais prevalente em negros ( $P=0.001$ ) e correlacionado com PA sistólica aumentada ( $P=0.023$ ). Genótipo selvagem GG do G894T *NOS3* esteve mais prevalente em obesos (IMC,  $P=0.002$ ; CAbd,  $P=0.027$ ), em indivíduos com PA elevada ( $P=0.035$ ), correlacionado com IMC aumentado ( $P=0.020$ ) e associado com obesidade na regressão logística univariada (OR=0.713,  $P<0.001$ ) e multivariada ajustada para idade e PA elevada (OR=0.730,  $P=0.001$ ). Nenhum dos demais polimorfismos apresentou diferenciada distribuição de suas frequências alélicas e genotípicas ou esteve associado com PA elevada, obesidade ou variação em seus traços quantitativos. **Conclusão:** O alelo selvagem G do rs1799983 (G894T) do *NOS3* esteve correlacionado com valores aumentados de IMC e risco aumentado para o desenvolvimento de obesidade em adolescentes brasileiros saudáveis mais jovens e com PA alterada.

**Palavras-chave:** Adolescentes brasileiros miscigenados. Polimorfismos genéticos. Multiplex SNaPshot®. G894T. *NOS3*. rs1799983. Genotipagem. Obesidade infantil. Estudo de associação genética.

## ABSTRACT

MACHADO, Yasmin Lemos Rollemberg Cruz. **Evaluation of genetic polymorphisms associated to cardiovascular risk factors in a populational sample of schoolchildren 10 to 15 aged: Rio de Janeiro Study II.2021.** 158 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Aim: To evaluate the distribution of 8 genetic polymorphisms related to cardiovascular risk factors and their association with elevated blood pressure, obesity, and its quantitative traits in schoolchildren 10 to 15 aged. Method: subsampling of 1.054 adolescents, both sexes, belonging to ERJ II's population. Genetic analysis of 8 SNPs (M235T (rs699) of *AGT* gene, c.-344T>C (rs1799998) of *CYP11B2* gene, G894T (rs1799983) of *NOS3* gene, intronic variant T>A (rs9939609) of *FTO* gene, Q223R (rs1137101) of *LEPR* gene, T6K (rs3746619) and V81I (rs3827103) of *MC3R* gene, intronic variant T>C (rs17782313) of *MC4R* gene) was performed through customized Minisequencing Multiplex/SNaPshot®. Allele and genotype frequencies were evaluated by  $\chi^2$  test overall and stratified by sex, skin color, body mass index (BMI), waist circumference (WC), blood pressure (BP) status. Genetic variants were evaluated for correlation with continuous variables by one-way ANOVA e for associations with elevated BP and obesity through univariate and multivariate logistic regression models. Results: Prevalence of elevated BP was 13.5% and overweight/obesity was 41.4%. Mutant genotype AA of V81I *MC3R* showed more prevalent among black individuals ( $P<0.0001$ ) and boys ( $P=0.013$ ). Mutant genotype TT of M235T *AGT* was more prevalent among white individuals ( $P=0.001$ ) and those with elevated BP ( $P=0.014$ ). Mutant genotype TT of rs1799998 *CYP11B2* was more prevalent among black individuals ( $P=0.018$ ) and those with increased WC ( $P=0.021$ ). Mutant genotype AA of T6K *MC3R* was more prevalent among black ( $P=0.001$ ) and correlated with increased systolic BP ( $P=0.023$ ). Wild-type genotype GG of G894T *NOS3* was more prevalent in obese (BMI,  $P=0.002$ ; WC,  $P=0.027$ ), individuals with elevated BP ( $P=0.035$ ), correlated with increased BMI ( $P=0.020$ ) and associated with obesity in univariate (OR=0.713,  $P<0.001$ ) and age- and elevated BP-adjusted multivariate logistic regression (OR=0.730,  $P=0.001$ ). None of the further SNPs presented differentiated allele and genotype distribution or showed association with elevated BP, obesity, or their quantitative traits. Conclusion: Mutant allele A of rs3746619 (T6K) *MC3R* was correlated with increased SBP while wild-type allele G of rs1799983 (G894T) *NOS3* was associated with higher BMI and increased risk for development of obesity in younger healthy Brazilian admixed adolescents with altered BP.

Keywords: Admixed Brazilian adolescents. Genetic Polymorphisms. Multiplex SNaPshot®. G894T. *NOS3*. rs1799983. Genotyping. Childhood obesity. Genetic association study.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ranking das 10 principais causa de morte no mundo no ano de 2019.....	16
Figura 2 – Número de óbitos por doenças do aparelho circulatório registrados no ano de 2019 no estado do Rio de Janeiro.....	18
Figura 3 – Estrutura e expressão do gene humano.....	24
Figura 4 – Efeito dos polimorfismos de base única no organismo humano.....	25
Figura 5 – Estratégias genômicas utilizadas para a descoberta de biomarcadores associados a doenças complexas.....	26
Figura 6 – Interações gene-ambiente e seus efeitos no epigenoma.....	28
Figura 7 – Cascata enzimática do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).....	30
Figura 8 – Representação esquemática da via leptina-melanocortina reguladora da homeostase energética.....	34
Figura 9 – Ilustração demonstrativa da marcação química da técnica de minisequenciamento.....	50
Figura 10– Eletroferograma dos painéis Multiplex A e B de Minisequenciamento dos 8 PGs analisados.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências e características dos <i>primers</i> de amplificação personalizados utilizados nos painéis de PCR Multiplex A e B	46
Tabela 2 – Sequências e características dos <i>primers</i> de extensão personalizados utilizados nos painéis de Minisequenciamento Multiplex A e B.....	48
Tabela 3 – Codificação dos genótipos a partir do número de cópias do alelo de risco presentes utilizada nas análises de regressão logística.....	51
Tabela 4 – Dados clínicos e demográficos das 1.054 amostras submetidas às análises genéticas.....	53
Tabela 5 – Frequências alélicas e genóticas dos 8 PG na amostragem total analisada.....	55
Tabela 6 – Distribuição das frequências genóticas dos PG estratificadas pelas variáveis demográficas.....	57
Tabela 7 – Distribuição das frequências genóticas dos PG estratificados pelas variáveis antropométricas.....	59
Tabela 8 – Distribuição das frequências genóticas dos PG estratificados pelo perfil de PA.....	60
Tabela 9 – Análise <i>one-way</i> ANOVA para variáveis quantitativas relacionadas à obesidade e PA entre genótipos.....	62
Tabela 10 – Modelos de regressão logística uni e multivariada de associação com PA elevada e obesidade.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AGT	<i>Angiotensinogen gene</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
C	Citosina
CAbd	Circunferência abdominal
CEP/HUPE	Comitê de Ética em Pesquisa/Hospital Universitário Pedro Ernesto
CGIAE	Coordenação Geral de Informações e Análises Epidemiológicas
<i>CYP11B2</i>	<i>Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 2 gene</i>
dbSNP	<i>Database Single Nucleotide Polymorphism</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERJ	Estudo do Rio de Janeiro
<i>FTO</i>	<i>Fat Mass and Obesity Associated gene</i> Guanina
G	Guanina
G894T	Polimorfismo de substituição da guanina por tirosina no códon 894
HA	Hipertensão Arterial
IC	Insuficiência Cardíaca
IMC	Índice de Massa Corpórea
<i>LEPR</i>	<i>Leptin Receptor gene</i>
<i>M235T</i>	Polimorfismo de substituição da Metionina por Treonina no códon 235
<i>MC3R</i>	<i>Melanocortin 3 Receptor gene</i>
<i>MC4R</i>	<i>Melanocortin 4 Receptor gene</i>
MS	Ministério da Saúde
<i>NOS3</i>	<i>Endotelial Nitric Oxide Synthase gene</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico

PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pb	Pares de base
PG	Polimorfismo genético
Q223R	Polimorfismo de substituição da Glutamina por Arginina no códon 223
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RCV	Risco cardiovascular
rs	<i>Reference sequence</i> (sequência referência utilizada na identificação do polimorfismo de base única no banco de dados dbSNP)
S/O	Sobrepeso/Obesidade
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SEB	<i>Single Base Extension</i>
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SM	Sistema Nervoso Simpático
SNP	Síndrome Metabólica
SNS	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SISNEP	Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	Timina
T>A	Variação do nucleotídeo T por A em região não-codificante
T>C	Variação do nucleotídeo T por C em região não-codificante
T6K	Polimorfismo de substituição da treonina por lisina no códon 6
TBE	Tris-Borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
V81I	Polimorfismo de substituição da Valina por Isoleucina no códon 81
Vs.	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\geq$	Maior ou igual que
$<$	Menor que
$\chi^2$	Teste do Qui-quadrado
Kg	Quilograma
M	Molar
$\mu$	Micro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mmHg	Milímetro de mercúrio
p	Percentil
V	Volts

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
1.1	<b>Geral</b> .....	40
1.2	<b>Específicos</b> .....	40
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
2.1	<b>Caracterização da população amostral</b> .....	41
2.2	<b>Procedimentos</b> .....	42
2.2.1	<u>Coleta de dados e de material biológico</u> .....	42
2.2.2	<u>Avaliação clínica para medida da pressão arterial</u> .....	42
2.2.3	<u>Avaliação antropométrica</u> .....	43
2.2.4	<u>Avaliação demográfica</u> .....	44
2.3	<b>Análise molecular dos polimorfismos genéticos</b> .....	44
2.3.1	<u>Extração de DNA genômico</u> .....	44
2.3.2	<u>Minisequenciamento Multiplex dos polimorfismos genéticos (PGs) associados à hipertensão e à obesidade</u> .....	45
2.4	<b>Aspectos éticos</b> .....	50
2.5	<b>Análise estatística</b> .....	51
3	<b>RESULTADOS</b> .....	52
3.1	<b>Características gerais da população amostral</b> .....	52
3.2	<b>Distribuição dos PG estratificados por variáveis demográficas e clínicas</b> .....	56
3.3	<b>Análise de correlação entre PG e variáveis quantitativas</b> .....	61
3.4	<b>Análises de associação entre PGs, PA elevada e excesso de peso</b> .....	64
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
	<b>APÊNDICE A</b> – Questionário de atendimento dirigido ao responsável do aluno.....	117
	<b>APÊNDICE B</b> – Carta informativa sobre o estudo dirigida aos pais.	118
	<b>APÊNDICE C</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	119

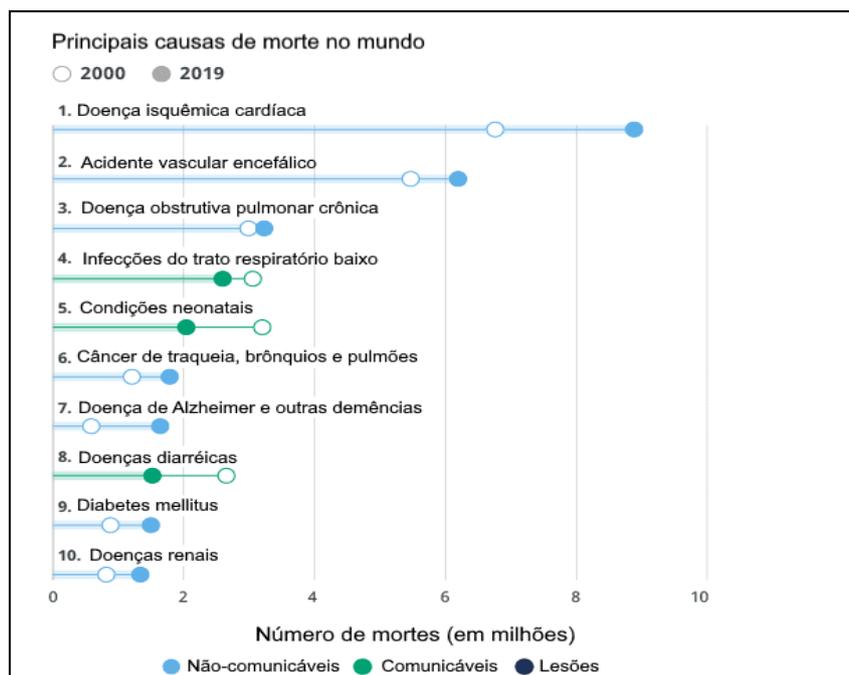
<b>APÊNDICE D - Lista de soluções e tampões utilizados.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO B– Comprovação de submissão do 1º artigo científico ao periódico <i>Eelctrophoresis</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO C – Formato final do 1º artigo científico submetido.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO D – Formato final do 2º artigo científico submetido a ser submetido no periódico <i>The Journal of Pediatrics</i>.....</b>	<b>138</b>

## INTRODUÇÃO

### a) Panorama epidemiológico das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) integram o grupo das “doenças não-comunicáveis”, envolvendo condições de estreitamento ou bloqueio dos vasos sanguíneos de músculos, coração e válvulas que afetam o ritmo cardíaco - como o doenças coronarianas, cerebrovasculares e cardiopatias congênitas - segundo a Organização Pan-Americana de Saúde. Dados disponibilizados no ano de 2020 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que, durante os últimos 20 anos (2000 a 2019), esse grupo de doenças continua a liderar o *ranking* das 10 principais causas de morte no mundo, aumentando de 14,2 para 17,9 milhões o número de óbitos, valor que representou 32% do total de mortes para ano de 2019, sendo 8,9 milhões por doenças cardíacas isquêmicas (DIC) e pouco mais de 6,2 milhões por acidente vascular encefálico (AVE) - para ambos os sexos. Em seguida, encontram-se a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), com 3,22 milhões, e infecções do trato respiratório baixo, com 2,6 milhões (Figura 1).

Figura 1- Ranking das 10 principais causa de morte no mundo no ano de 2019



Fonte: adaptado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

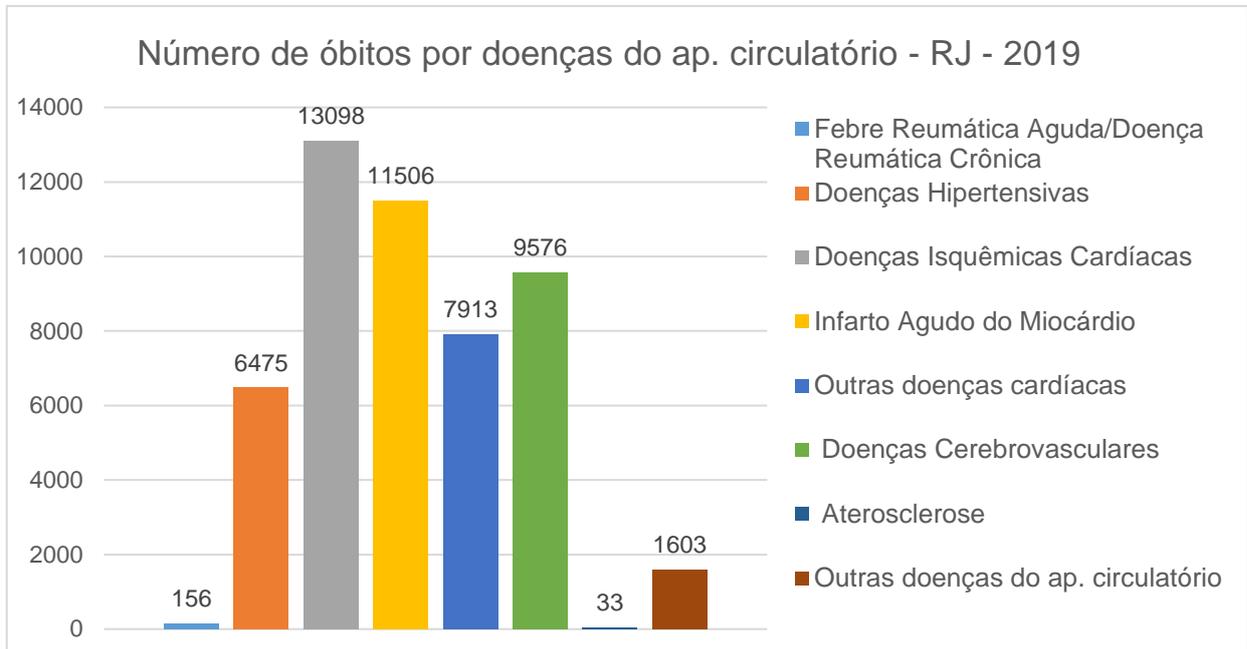
Neste período de 20 anos, segundo a OMS, a taxa de mortalidade por DCVs, estratificada pelo perfil de renda bruta nacional, apresentou um decréscimo no número de óbitos em países de renda alta (3,6 para 3,3 milhões). Entretanto, em países de renda média alta, no qual se inclui o Brasil, houve um aumento de quase 2 milhões no número de óbitos (6,17 para 8,08 milhões), o qual correspondeu a quase metade do número total de 17,8 milhões de mortes por DCV neste mesmo ano.

Índices nacionais de prevalência fornecidos pelo Ministério da Saúde (MS) revelam que o Brasil acompanha essa tendência global na taxas de mortalidade, com "doenças do aparelho circulatório" liderando esse ranking com pouco mais de 364 mil óbitos (26,97% dentre 1,35 milhão de óbitos totais) registrados em 2019, sendo cerca de 117 mil por DIC e cerca de 101 mil por doenças cerebrovasculares. Dados estratificados por regiões geográficas brasileiras apontam maiores taxas de mortalidade registradas na região Sudeste (171 mil), Nordeste (96 mil) e Sul (54 mil) - com os maiores índices em São Paulo (89 mil), Rio de Janeiro (38 mil) e Minas Gerais (35 mil). Já os menores foram observados em Roraima (596 casos), Amapá (719 casos) e Acre (956 casos) - todos estados da região Norte.

Relativamente ao estado do Rio de Janeiro, segundo o MS e Secretaria Estadual de Saúde (SES), no ano de 2019 mais de um 1/4 do total das 144 mil mortes registradas em todo o estado foram em decorrência de "doenças do aparelho circulatório" (38,8 mil óbitos), sendo as maiores taxas por doenças isquêmicas cardíacas (13 mil óbitos) e por infarto agudo do miocárdio (11 mil óbitos) (Figura 2).

Ademais, o impacto econômico gerado por essas doenças no Brasil vem aumentando significativamente. No período de 2010-2015 seus custos financeiros estimados aumentaram 17%<sup>1</sup>, sendo que no ano de 2015 seus gastos foram estimados em cerca de R\$ 56,2 bilhões (17,3 bilhões de dólares), com 62,9% relacionados ao sistema de saúde e 37% à perda de produtividade que envolve incapacidade ou morte prematura<sup>2</sup>. Embora estes custos possivelmente acompanhem o progressivo envelhecimento da população, os dados epidemiológicos apresentados reforçam a importância da adoção precoce de medidas preventivas, principalmente através de políticas públicas de saúde, dado o seu significativo impacto financeiro com relação à produtividade e os elevados custos no sistema de saúde, assim como no bem-estar do indivíduo.

Figura 2 – Número de óbitos por doenças do aparelho circulatório registrados no ano de 2019 no estado do Rio de Janeiro



Fonte: Dados adaptados de MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Mortalidade [Acesso em 20 novembro de 2020].

Apesar do impacto dessas doenças ser evidenciado em adultos, dados na literatura correlacionam o surgimento dessas condições patológicas e suas complicações na vida adulta com a presença de dois dos seus principais fatores de risco - pressão arterial (PA) elevada e obesidade - durante a infância.<sup>3</sup> Tais evidências resultaram de diversos estudos longitudinais que acompanharam temporalmente indivíduos desde a infância até a fase adulta jovem, dentre os quais podemos destacar em nosso país a contribuição do Estudo do Rio de Janeiro I (ERJ I). Este estudo faz parte da linha de pesquisa denominada Estudo do Rio de Janeiro, que se iniciou na década de 80 com o Estudo do Rio de Janeiro (ERJ I)<sup>4-6</sup>, no qual a prevalência de variáveis de risco cardiovascular (RCV) e suas relações com a PA desde a infância e adolescência, bem como o comportamento dessas variáveis ao longo do tempo, foram investigadas em cinco fases de avaliação (escolar, domiciliar, hospitalar, familiar e ambulatorial).

## **b) Fatores de risco cardiovascular na infância/adolescência**

Em adultos, a hipertensão arterial (HA) é caracterizada pela elevação persistente da PA sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg em pelo menos duas ocasiões diferentes<sup>7</sup>. Representa uma condição patológica multifatorial, dependente da interação de fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais, e frequentemente assintomática, que tende a evoluir com lesões em órgãos-alvo como coração, cérebro e rins<sup>7</sup>. Neste grupo etário, alguns dos principais fatores de risco envolvidos são a idade (em função do enrijecimento vascular progressivo), excesso de peso (sobrecarga na função cardíaca e alterações vasculares), sedentarismo, ingestão de sódio, condições socioeconômicas e a genética, cujo efeito de variantes genéticas em populações miscigenadas não é totalmente definido<sup>7</sup>. Além disso, níveis pressóricos elevados em associação com alterações metabólicas como obesidade abdominal, dislipidemia e diabetes mellitus (DM) configuram-se como fatores de risco para DCVs e renal<sup>8</sup>.

No Brasil, no ano de 2017, a HA esteve associada a 45% das mortes por doença coronariana e insuficiência cardíaca (IC), bem como a 51% das doenças cerebrovasculares, enquanto apenas 13% estavam relacionadas a HA propriamente<sup>7</sup>. Dados de prevalência em adultos brasileiros mostram-se variáveis de acordo com a metodologia utilizada, de tal modo que no ano de 2019 foram observados 23,9% de indivíduos com HA autorreferida e 45,1% diagnosticados hipertensos e que fazem uso de medicação anti-hipertensiva, segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde<sup>9</sup>.

Já em crianças e adolescentes, a HA dita primária é definida quando os valores de PAS e/ou PAD forem superiores ao percentil 95 (p95), ajustados de acordo com idade, sexo e percentil de altura, em pelo menos 3 ocasiões distintas, segundo as recomendações mais recentes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2020)<sup>7</sup> e da *American Academy of Pediatrics* (2017)<sup>10</sup>. A HA primária, na maioria das vezes, mostra-se assintomática nesta faixa etária e pouco se sabe sobre a sua causalidade, porém encontra-se comumente associada ao sobrepeso/obesidade ou ao histórico familiar de HA<sup>7</sup>. A incidência de PA elevada e HA tem demonstrado crescimento em crianças e adolescentes nos últimos anos, com prevalências estimadas entre 10-15% e 3-5%, respectivamente<sup>7,11</sup>.

Assim como em adultos, a persistência desta condição, combinada com fatores como hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS), resistência à insulina e anormalidades na estrutura e função vascular, também resultam em lesões de órgãos-alvo no sistema nervoso, cardiovascular e rins nesta fase etária<sup>12,13</sup>, caracterizando-se como um dos principais marcadores de DCV precoce na vida adulta - como relatado em estudos longitudinais.

O estudo norte-americano *Bogalusa Heart Study*, que rastreou fatores de risco cardiovascular em coorte de 1.505 indivíduos jovens caucasianos e afro-americanos de 5 a 14 anos de idade, identificou, após 15 anos de acompanhamento, a correlação entre presença e persistência de PA elevada na infância com a progressão para HA na vida adulta, principalmente entre indivíduos negros e com excesso de peso na infância<sup>14</sup>; bem como a presença de lesões arterioscleróticas em vasos da aorta e carótidas em adultos de ambos os sexos<sup>15</sup>. Na Europa, o estudo finlandês *The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*, que analisou 2.625 crianças e adolescentes europeias de 3 a 19 anos, também identificou, após 30 anos de acompanhamento, PA elevada e obesidade durante a infância como alguns dos preditores para o surgimento de HA na fase adulta<sup>16</sup>. Achados similares, na população brasileira, foram reportados pelo Estudo do Rio de Janeiro I (ERJ I), que avaliou mais de 3.000 escolares de 10 a 15 anos de idade, no qual, após 15 anos de acompanhamento, foi identificada uma correlação entre a presença de PA elevada durante a infância com sua persistência na vida adulta, bem como alterações cardiomorfológicas e no perfil metabólico<sup>4,6,17,18</sup>.

Já a obesidade, tradicionalmente vista como um transtorno de compulsão alimentar, hoje é considerada, sob o ponto de vista epidemiológico, uma doença crônica que representa um dos mais sérios fardos na saúde global<sup>19</sup>, com mais pessoas morrendo em função das condições resultantes da obesidade do que das relacionadas a má nutrição ou baixo peso<sup>20</sup>. Esse problema atinge ambos os sexos, todas as idades e classes sociais, facilitado, sobretudo, pelo processo de transição nutricional em estabelecimento em diversos países, principalmente nos em desenvolvimento, associado a mudanças graduais nos padrões de vida que envolvem o aumento do poder aquisitivo e uma “piora” na qualidade alimentar<sup>21</sup>.

Assim como a HA, a obesidade apresenta etiologia complexa e multifatorial resultante de alterações no sistema neuroendócrino regulador do balanço energético corporal, envolvendo fatores genéticos, ambientais, estilos de vida e componentes

emocionais<sup>22</sup>. Muitos dos aspectos relacionados ao “novo” estilo de vida em meio urbano, como diminuição da atividade física, do número de refeições em casa, das horas de sono, aumento nas porções alimentares, no consumo de alimentos hipercalóricos e stress atuam como fortes determinantes no ganho de peso, em adultos e crianças<sup>22</sup>. Quanto à contribuição de fatores genéticos, a obesidade pode apresentar origem monogênica (alteração em um único gene, normalmente por herança), sindrômica (fenótipo severo associada a má formação em órgãos/sistemas) ou poligênica (contribuição de diversos genes somados a um ambiente obesogênico)<sup>23,24</sup>, sendo a última a sua manifestação clínica mais comum.

Para estratificação do risco cardiometabólico em adultos é comumente utilizado o cálculo do índice de massa corpórea (IMC, peso em kg dividido pela altura em metros elevada ao quadrado, kg/m<sup>2</sup>), no qual as condições de sobrepeso e obesidade são caracterizadas por valores de IMC de 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> e  $\geq$  a 30 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente, segundo pontos de corte propostos pela OMS<sup>22</sup>. Outro indicador de adiposidade corporal utilizado é a medida de circunferência abdominal (CAbd), a qual reflete melhor o conteúdo de gordura visceral. Este indicador pode ser avaliado por vários métodos e locais, mas no Brasil recomenda-se a medição no ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca, com pontos de corte entre 80–88 cm para mulheres e entre 94–102 cm para homens, segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica<sup>25</sup>. Assim como na hipertensão, dados referentes ao estado nutricional de adultos brasileiros, no ano de 2019, mostraram-se variáveis, com percentuais de sobrepeso e de obesidade, por auto referenciamento, de 55,4% e 20,3%, segundo inquérito telefônico<sup>26</sup>; enquanto a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) reportou prevalência de 60,3% e 25,9%, respectivamente, para este mesmo ano<sup>27</sup>.

Em crianças e adolescentes a definição da condição de sobrepeso/obesidade (S/O) pode ser baseada em diferentes critérios, mas, no Brasil, são comumente adotadas as curvas de IMC específicas para faixa etária e gênero, ajustadas pelo peso e altura, elaboradas pela OMS<sup>28</sup>. Para avaliação da obesidade central (abdominal) não há uma padronização sobre melhor local anatômico e pontos de corte para medições, limitando seu uso na avaliação do risco cardiovascular neste grupo etário; entretanto, segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria, os critérios mais utilizados são o p85, proposto por McCarthy e cols.<sup>29</sup> para estudos populacionais ou o p90 para idade e sexo, proposto por Freedman e cols.<sup>30</sup> para uso clínico e ambulatorial.

O Brasil acompanha a tendência mundial de elevação na prevalência de S/O na população pediátrica, posto que dados mais recentes, oriundos de estudos municipais ou isolados, indicam percentuais entre 15,3% e 29,1% de adolescentes com excesso de peso, considerando diferentes critérios diagnósticos, segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria<sup>31</sup>. Já a PNS mostrou prevalência de 26,1% de excesso de peso (19,4% de sobrepeso e 6,7% de obesidade) entre adolescentes de 15 a 17 anos no ano de 2019, seguindo critérios de classificação da OMS<sup>27</sup>. Além dos fatores de risco anteriormente mencionados, outras situações relacionadas ao desenvolvimento da criança e do adolescente também contribuem para obesidade infantil como peso ao nascer, aleitamento materno e estrutura familiar que envolve histórico familiar (principalmente a mãe) e o ambiente doméstico obesogênico<sup>32</sup>.

Assim como observado na hipertensão, estudos longitudinais também identificaram a relação do S/O durante a infância e adolescência com a sustentação dessa condição e suas complicações na vida adulta. A análise de dados do mesmo estudo de Bogalusa mostrou que o excesso de peso durante a infância persistiu em 77% dos indivíduos jovens<sup>33</sup>, acompanhou o aumento longitudinal de parâmetros de adiposidade, como IMC e espessura de dobras subcutâneas<sup>34</sup>, e foi associado com hipertrofia ventricular esquerda na vida adulta<sup>35</sup>. Em adultos do *The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*, IMC aumentado, alterações no espessamento médio-intimal de carótidas, na elasticidade vascular e no músculo cardíaco estiveram correlacionadas com medidas aumentadas de IMC e dobras cutâneas durante a infância<sup>36-38</sup>. Resultados do ERJ I também demonstraram que indivíduos com excesso de peso durante a infância tornaram-se jovens adultos obesos com maiores médias de PA, IMC, CA<sub>Abd</sub>, percentual de gordura corporal e alterações na insulina e colesterol<sup>5</sup>.

Além disso, o excesso de peso tem demonstrado forte influência na elevação da PA em crianças e adolescentes, independentemente da etnia. Dados do Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes (*ERICA*), estudo seccional brasileiro de base escolar envolvendo 73.399 estudantes de 12 a 17 anos, demonstraram que 17,8% da prevalência total de HA em adolescentes foi atribuída à obesidade, sendo essa fração quase 6 vezes maior nos obesos das regiões Norte e Nordeste<sup>39</sup>. Moreira e cols., ao analisarem 1.716 adolescentes de 10 a 16 anos de Cuiabá/MT, observaram que a obesidade aumentou em 1,27 vezes a incidência de PA elevada<sup>40</sup>. Guimarães e cols.<sup>23</sup>, ao avaliarem 536 adolescentes de 11 a 18 anos de Salvador/BA,

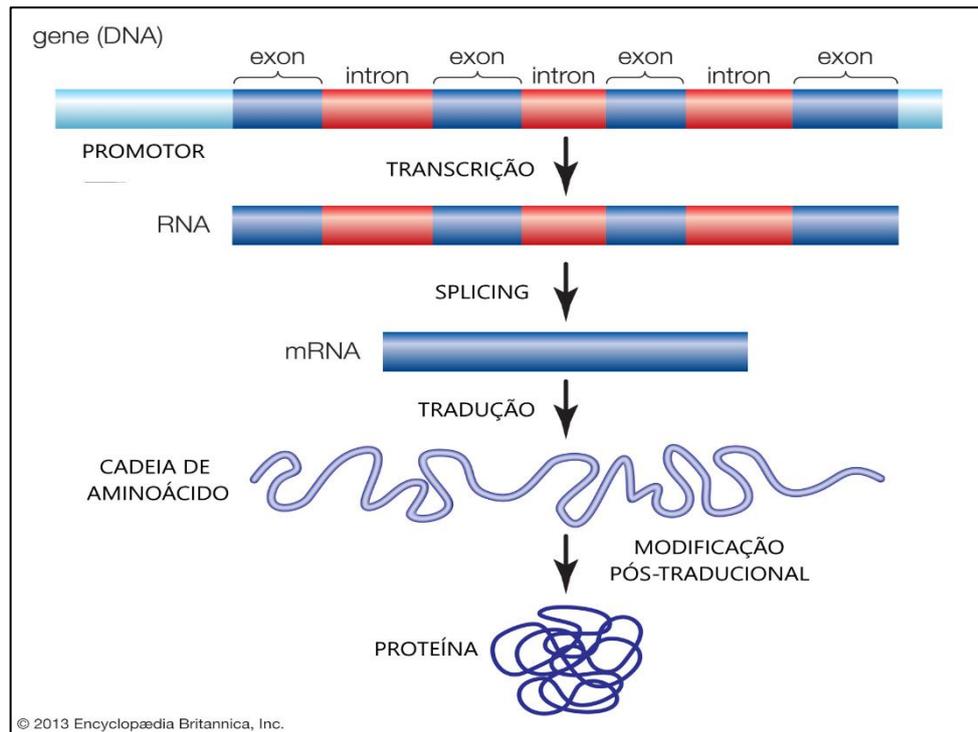
observaram que o aumento percentual de PAS e PAD elevadas acompanhou a elevação do IMC, com cada 1kg/m<sup>2</sup> do IMC correspondendo a um incremento da PAS em 1,198mmHg e cada 1cm da CA<sub>abd</sub>, em 0,622mmHg<sup>41</sup>. Já Cheung e cols., ao analisarem 21.062 escolares norte-americanos de 10 a 19 anos, de diferentes etnias, também detectaram correlação positiva entre HA e IMC, com indivíduos com S/O apresentando prevalência de HA 2 a 6 vezes maior do que os com IMC normal<sup>42</sup>.

### **c) Bases da genética humana nas associações a doenças complexas**

O genoma humano compreende a informação genética total do organismo humano, compreendendo informações referente a todas as moléculas de ácido ribonucleico (RNA) e proteínas a serem sintetizadas durante toda a vida. Localizado majoritariamente no núcleo das células eucarióticas, o genoma encontra-se armazenado na molécula de DNA (ou ácido desoxirribonucleico), organizada sob a forma de duas longas cadeias polinucleotídicas compostas por quatro tipos de bases nucleotídicas - adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T) - covalentemente ligadas a grupamentos fosfato e ao açúcar desoxirribose. Cada cadeia posiciona-se em sentido antiparalelo entre si e estão unidas através de pontes de hidrogênio, estruturada como uma dupla-hélice de DNA<sup>43</sup>.

Todo esse material genético encontra-se dividido em 22 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais, nos quais uma fita linear de DNA nuclear juntamente com proteínas histonas estão enoveladas e empacotadas em uma estrutura mais compactada chamada cromatina. Além da compactação, importantes processos como expressão gênica, replicação e reparo do DNA também envolvem a ação de histonas, outras proteínas acessórias e diferentes moléculas de RNA<sup>43</sup>. Cada gene é composto basicamente por uma sequência alternada de regiões codificadoras da produção de proteínas (éxons) e de não-codificadoras (íntrons), além de uma região promotora que contém uma sequência reguladora dos níveis de expressão e está sujeita aos processos de repressão ou ativação (Figura 3)<sup>43</sup>.

Figura 3 – Estrutura e expressão do gene humano



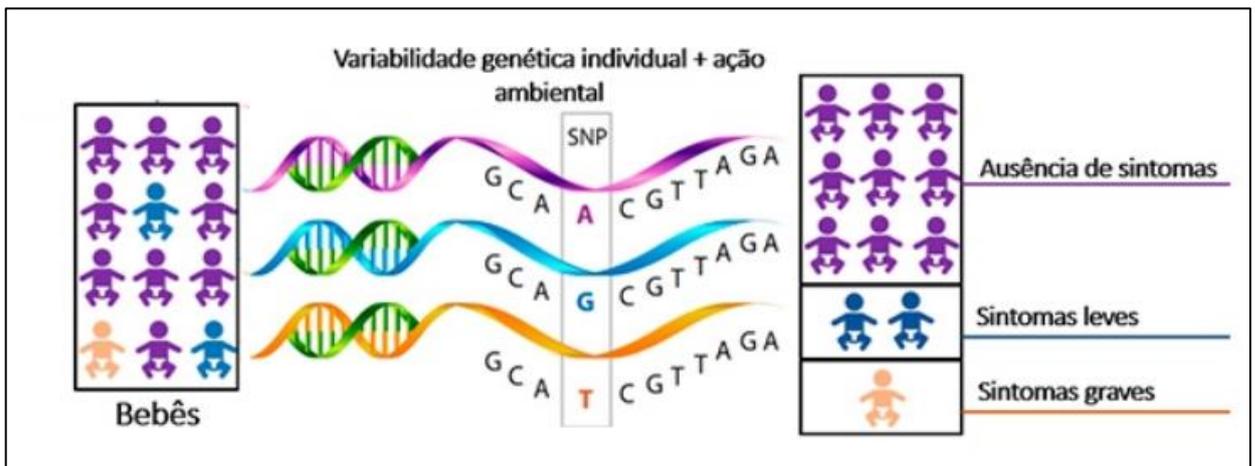
Fonte: adaptado de *Encyclopedia Britannica*©.

Alterações na sequência nucleotídica entre diferentes genomas representam a base da variabilidade genética entre organismos, um fenômeno comum que pode resultar em caracteres favoráveis ou desfavoráveis no indivíduo, assim como pode representar uma vantagem seletiva quando difundido na população<sup>44</sup>. Variantes genéticas são classificadas de acordo com a natureza, o tamanho e a localização das modificações em relação a sequência gênica referência, sendo denominadas polimorfismos genéticos (PG) quando apresentam frequência populacional igual ou superior a 1%. Dentre os diferentes tipos existentes, tem-se os de inserção-deleção (Indels), que constituem pequenas inserções ou deleções de 1 a 50pb; as variações no número de cópias (do inglês "*Copy Number Variation*"), que envolvem inserção ou deleção de trechos repetidos do DNA; e as mutações de ponto ou de base única, que envolvem a substituição de uma única base nucleotídica por outra<sup>44</sup>.

Comumente referidas como SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), tais alterações são as mais frequentes e correspondem a 85% da variabilidade genética na população humana<sup>45</sup>. A ocorrência dessa substituição na região da sequência codificante do DNA resultará na expressão de ambos os alelos e

de perfis genotípicos (genótipos) diferentes. Tal modificação pode causar ou não alterações nos processos de transcrição do RNA mensageiro ou na estrutura e funcionalidade da proteína traduzida, e que, quando associadas a patologias e em conjunto com fatores ambientais e comportamentais, será manifestada de diferentes formas no organismo constituindo o chamado fenótipo (Figura 4).

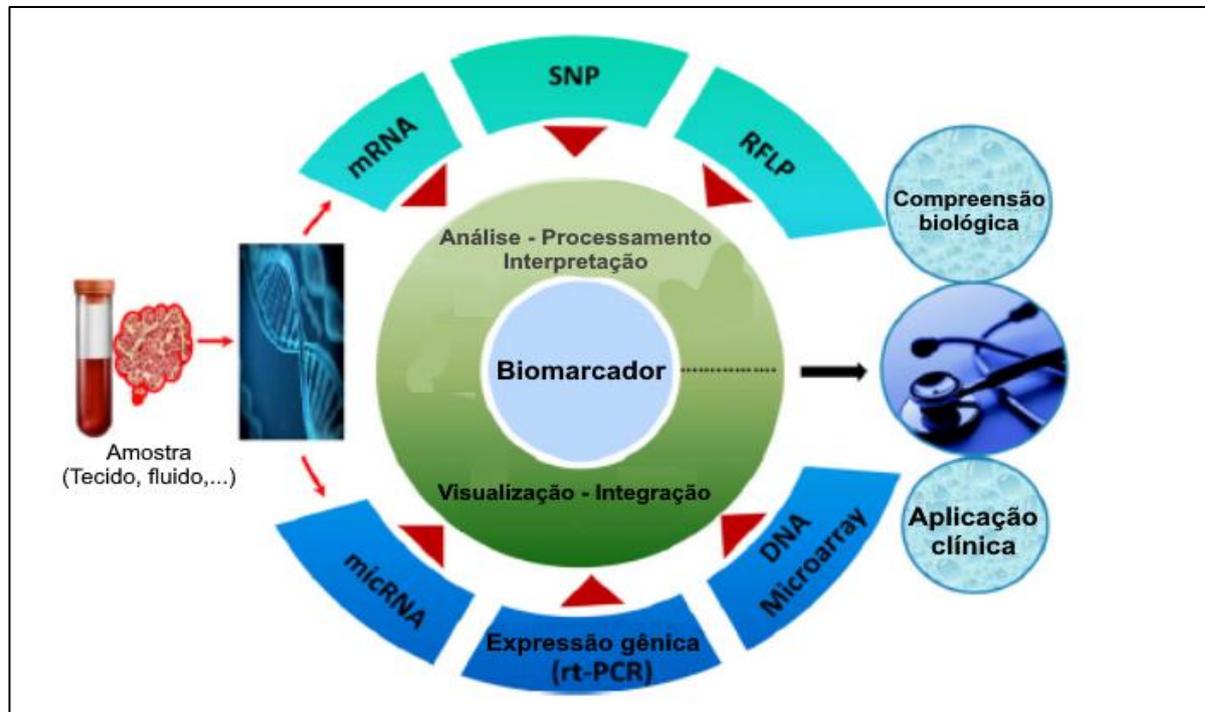
Figura 4 – Efeito dos polimorfismos de base única no organismo humano



Fonte: adaptado de <https://agencia.fapesp.br/fatores-geneticos-associados-a-bronquiolite-viral-aguda-sao-identificados/27218/> (Ilustração Fernando Marson).

Iniciativas como o Projeto Genoma Humano, Projeto Internacional HapMap e *The 1000 Genomes Project*, ao disponibilizarem publicamente sequências do genoma humano e de suas variações genéticas comuns, auxiliaram na compreensão do envolvimento dessas variantes no desfecho de doenças complexas como as cardiovasculares, na respostas a drogas e fatores ambientais<sup>44,46</sup>. Além disso, essas ações também impulsionaram o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de sistemas de análise molecular de polimorfismos SNP que visam a caracterização de perfis genéticos, como escaneamento de genoma completo, sequenciamento de nova geração, análise de expressão gênica e microarranjos (do inglês “*microarray*”) (Figura 5)<sup>47</sup>.

Figura 5 – Estratégias genômicas utilizadas para a descoberta de biomarcadores associados a doenças complexas



Fonte: adaptado de RATHER E DHAWAN, 2016.

Nota: RFLP, *Restriction Fragment-Length Polymorphism* (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

No campo clínico, as abordagens mais utilizadas são os estudos de associação genética, com análises direcionadas para alguns poucos genes candidatos, ou de forma mais abrangente, os estudos de associação genômica ampla (ou *Genome Wide Association Studies, GWAS*), onde centenas de genes e variantes SNP são identificados e correlacionados a doenças<sup>48</sup>. Em ambos os casos, quando um gene ou alelo é associado como causador de determinada patologia ou traço de interesse, tende a se apresentar em maior frequência entre pacientes/indivíduos afetados, sendo então referido como marcador molecular de um perfil genético de risco associado<sup>24,47,49</sup>. Nesses estudos são analisados os padrões de distribuição dos alelos e genótipos deste marcador, bem como possíveis alterações metabólicas associadas em indivíduos saudáveis e/ou afetados, dentro de uma ou entre determinadas populações/etnias.

Outro aspecto importante é que variantes SNPs podem ser encontradas como um haplótipo no genoma, configuração onde alelos de diferentes marcadores ao longo do mesmo cromossomo encontram-se combinados e herdados como uma unidade<sup>50</sup>,

resultantes tanto da contribuição materna quanto paterna. Com isso, análises de haplótipos de genes candidatos para doenças complexas permitem a identificação de SNPs geneticamente ligados (em desequilíbrio de ligação), ou seja, tais variantes ocorrem simultaneamente e seus efeitos somados, ao invés de individuais, podem contribuir de forma significativa para o fenótipo ou para aumento no risco de desenvolver a doença<sup>50</sup>.

A relevância do rastreamento e identificação de variantes do tipo SNP como marcadores moleculares (biomarcadores) tem sido observada em patologias com anormalidades bem definidas como doença falciforme e  $\beta$ -talassemia (genes *BCL11A* e *HBS1L-MYB*)<sup>51</sup> e variações no metabolismo de drogas e anti-coagulantes (genes *VKORC1* e *CYP2C9*)<sup>52</sup>. Apesar do uso como marcadores genéticos, para doenças multigênicas/complexas a maioria dessas variantes comuns isoladas possui pouco ou nenhum efeito no aumento do risco do seu desenvolvimento, enquanto as deletérias sofreriam seleção negativa durante processos evolutivos, sendo raramente encontradas (como no albinismo e hemofilia, por exemplo).

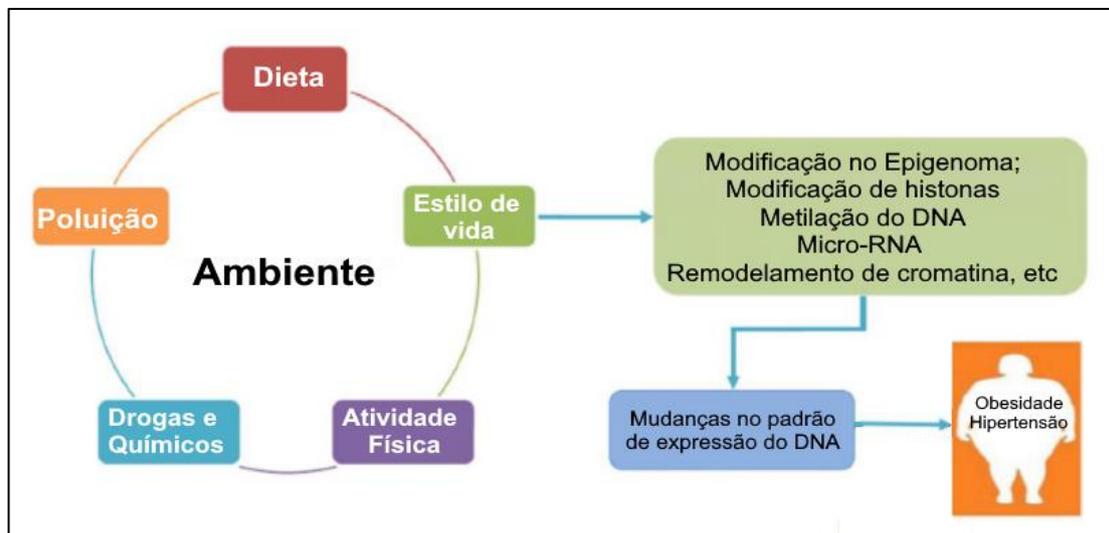
Já uma predisposição genética relacionada à hipertensão e obesidade, que possuem caráter multifatorial, pode envolver o sinergismo entre fatores ambientais/comportamentais com PGs relacionados às vias metabólicas de controle da PA e do peso corporal, respectivamente<sup>24,47</sup>. Entre 30-50% da variação interindividual da PA<sup>48</sup> e 40-70% do IMC<sup>53</sup> foram atribuídas à herança genética, ou seja, a transmissão genética herdada através de relações familiares, enquanto o grau de participação por genes candidatos nas suas formas comuns ainda é incerto. Além disso, diferenças na manifestação dos sintomas clínicos/fenótipos de ambas as doenças demonstram a heterogeneidade de efeitos relacionados a essas variantes entre grupos populacionais e também entre indivíduos de uma mesma população.

Nestes casos, especula-se sobre a contribuição e o grau de influência de variantes raras, interações com fatores ambientais, interações gênicas e a epigenética, ao invés de um simples polimorfismo<sup>48,54</sup>. Essas condições biológicas e ambientais são intrínsecas de um indivíduo e também podem justificar a variabilidade inter/intraindividual na susceptibilidade a estas doenças complexas. Nesse contexto, a epigenética tem atraído crescente interesse, pois envolve mudanças hereditárias na funcionalidade de genes, sem promover alterações na sua sequência de bases nucleotídicas<sup>55</sup>, constituindo uma programação epigenética ou epigenômica. Essa programação envolve diferentes mecanismos moleculares, como repressão do DNA

por metilação e remodelamento de cromatina, os quais alteram a expressão de genes e são ativados desde o ambiente intra-uterino, em diferentes períodos da vida, por diversos fatores ambientais como alimentação, medicações, envelhecimento (Figura 6)<sup>56,57</sup>.

Além disso, o componente étnico/racial também representa um fator contribuinte para a variabilidade nesta relação, devido a diferenças inter e intrapopulacionais no que se refere a comportamentos e estilo de vida, fisiologia de alguns dos sistemas biológicos<sup>58</sup> e na frequência dos alelos variantes de marcadores associados<sup>59,60</sup>. Este componente mostra-se particularmente importante em populações altamente miscigenadas por efeito de estratificação populacional, onde a associação de um alelo com determinada doença pode estar relacionado não a manifestação clínica em si mas pela maior prevalência entre afetados de um determinado grupo étnico que apresenta este alelo em maior frequência.<sup>49</sup>

Figura 6 – Interações gene-ambiente e seus efeitos no epigenoma



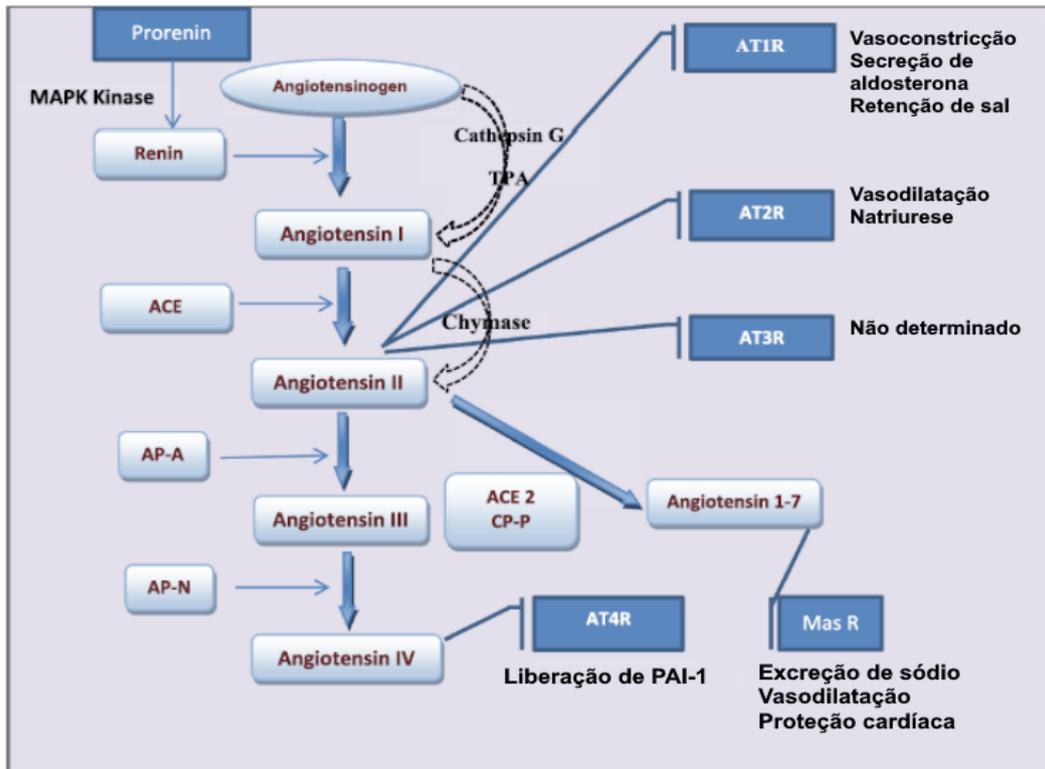
Fonte: adaptado de SINGH, 2017.

#### d) Polimorfismos associados a elevação da PA / Hipertensão arterial

O desenvolvimento da hipertensão arterial essencial, a forma mais comum, envolve uma interação complexa com múltiplos PG em diferentes genes, variando em

torno de 60 SNPs em diferentes populações, de acordo com estudos GWA<sup>61</sup>. Alguns destes SNPs estão relacionados a genes que expressam componentes moleculares do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), uma cascata enzimática que conecta os sistemas renal, adrenal e cardiovascular, visando a homeostase da PA pela regulação no balanço de água e eletrólitos (Figura 7)<sup>62</sup>. De forma simplificada, a queda da pressão arterial, com redução do tônus vascular, resulta em diminuição da perfusão renal, o que estimula a secreção da enzima renina pelos rins. Essa enzima atua clivando o angiotensinogênio circulante liberado pelo fígado para formação do peptídeo inativo angiotensina I, a qual é convertida pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) endotelial em angiotensina II, forma ativa. Ao final da cascata, a ligação desse peptídeo com seus receptores ATR1 promove múltiplos efeitos vasoconstritivos para a retomada dos níveis pressóricos normais, como estímulo da secreção adrenal de aldosterona, reabsorção de sódio e retenção de líquidos, estímulo do SNS para liberação de noradrenalina atuante no músculo liso endotelial<sup>62</sup>. Logo, um desequilíbrio nesse sistema pode levar ao desenvolvimento e progressão da HA e suas complicações vasculares, como IC, hipertrofia ventricular, lesões em órgão-alvo como cérebro, rins etc.

Figura 7 – Cascata enzimática do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)



Fonte: adaptado de GAHFAR, 2020.

Alguns genes e PG investigados por alterações relacionadas a essa via são o rs699 (M235T), no gene do angiotensinogênio (*AGT*); o rs1799998 (c.-344T>C), no gene da enzima aldosterona sintase (*CYP11B2*); e o rs1799983 (G894T), no gene da enzima óxido nítrico sintase 3 (*NOS3*).

### Gene *AGT* (rs699)

O gene codificante do angiotensinogênio (*AGT*), localizado na região 42.2 do braço longo do cromossomo 16<sup>3</sup>, é o responsável pela biossíntese da proteína plasmática angiotensinogênio, principalmente no fígado, a qual é modulada por diferentes fatores, como hormônios esteroides, tireoidianos, angiotensina II e citocinas (Figura 7)<sup>62</sup>. A relevância desse hormônio na PA foi identificada, por Tanimoto e cols.<sup>64</sup>, em estudo experimental no qual modelos animais modificados que não expressavam angiotensinogênio apresentavam valores de PAS muito baixos, sugerindo que desequilíbrios no controle pressórico estariam relacionados a alterações neste gene. Em humanos, Jeunemaitre e cols., em estudo familiar sobre

HA e variantes do AGT, originalmente, identificaram dois PG neste gene associados com HA<sup>65</sup>: o M235T e o T174M; sendo o M235T (rs699), caracterizado pela substituição do nucleotídeo C por T no códon 803, com a formação do aminoácido Metionina, ao invés de Treonina, na posição 235, um dos mais investigados. Neste estudo, o alelo variante T, do M235T, esteve mais frequente entre pares de irmãos hipertensos e associado a maiores níveis de AGT plasmático<sup>65</sup>. Posteriormente, estudos genéticos relacionados a hipertensão replicaram estes achados encontrando o M235T associado com variáveis pressóricas elevadas em crianças norte-americanas<sup>66</sup> e com risco aumentado para HA em adultos brasileiros<sup>67</sup>. Entretanto, a influência do M235T na produção do AGT pode não ser exclusiva como reportado por Inoue e cols., que identificaram, em estudo *in vitro*, uma forte ligação genética entre este PG e outro na região promotora do gene *AGT* o qual afetou a expressão deste gene e a produção do seu hormônio<sup>68</sup>.

#### Gene *CYP11B2* (rs1799998)

Esse gene, que está localizado na região 24.3 do braço longo do cromossomo 8, codifica a enzima aldosterona sintase, uma proteína de atividade enzimática pertencente à família da citocromo P450, que é responsável pelos estágios finais da biossíntese do mineralocorticoide aldosterona, a partir do colesterol<sup>69</sup>. Seus receptores mineralocorticoides estão presentes em diversos tecidos, como cérebro e coração, porém de forma mais concentrada no aparato renal, onde a aldosterona promove a reabsorção de sódio e excreção de potássio através dos canais iônicos, sob estímulo da angiotensina II, ao final da cascata de eventos do SRAA (Figura 7)<sup>62</sup>. Investigando a correlação entre aldosterona e PA, White e Slusker identificaram em indivíduos hipertensos, próxima à região promotora 5' do *CYP11B2*, a variante c.-344T>C (rs1799998), caracterizada pela presença do nucleotídeo T ou C, o que, *in vitro*, apresentavam diferenças na afinidade de ligação com o fator de transcrição esteroideogênico SF-1, que poderiam afetar a produção deste hormônio<sup>70</sup>. Investigações posteriores, em estudos populacionais com humanos, identificaram diversos efeitos relacionados a essa variante, como a associação do alelo T com a razão renina-aldosterona elevada em adultos hipertensos ingleses<sup>71</sup> e níveis de aldosterona plasmática e PA elevados em adultos europeus<sup>72</sup>; enquanto em homens

de diferentes países europeus o alelo C foi associado com aumento na susceptibilidade para HA e níveis pressóricos aumentados<sup>73</sup>.

### Gene NOS3 (rs1799983)

O gene da enzima óxido nítrico sintase 3 (*NOS3*), localizado na região 35-36 do braço longo do cromossomo 7, codifica uma das três isoenzimas produtoras do vasodilatador óxido nítrico (ON), a partir da L-arginina nas células endoteliais<sup>74</sup>. Esta molécula, além de regular o controle do tônus vascular, exerce funções em múltiplos processos biológicos no organismo, como regulação de efeitos antioxidantes, agregação plaquetária, resposta imune e proliferação de células musculares lisas do endotélio<sup>75,76</sup>. Este gene é altamente polimórfico, com mais de 1000 variantes genéticas diferentes reportadas em bancos de dados, sendo as com implicações funcionais, como a G894T (rs1799983), as mais amplamente estudadas. Esta variante compreende a substituição do nucleotídeo G para T na posição 894 do éxon 7, com a codificação de ácido aspártico ao invés do ácido glutâmico no códon 298<sup>74</sup>, que, *in vitro*, demonstrou alterar a capacidade de ligação da enzima NOS3 com a proteína endotelial caveolina-1, diminuindo sua atividade e a formação de ON<sup>77</sup>. Em seres humanos, o alelo variante T deste marcador esteve presente em maior frequência entre adultos tchecos hipertensos controlados e resistentes, em comparação a normotensos<sup>78</sup>, e sua presença esteve associada com aumento do risco para HA em espanhóis hipertensos<sup>79</sup> e de valores pressóricos em coorte de adolescentes europeus<sup>80</sup>.

Além do controle pressórico, outro processo fisiológico que envolve a participação do óxido nítrico é a obesidade, outra alteração clínica de nosso interesse potencialmente influenciada por polimorfismos no *NOS3* devido a expressão desta enzima também pelos adipócitos<sup>81</sup>. Modelos animais obesos, induzidos por dieta hiperlipídica, apresentaram redução da resposta vasodilatadora coronária em função da biodisponibilidade reduzida de ON e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio<sup>82</sup>. Já a superexpressão de *NOS3* em murinos exerceu efeito protetor contra obesidade causada por alimentação hiperlipídica, com a diminuição do acúmulo de tecido adiposo, lipídios séricos e aumento do metabolismo de carboidratos e oxidação lipídica em seus adipócitos<sup>83</sup>. Como sua biodisponibilidade é dependente do balanço produção/degradação, é possível que essa diminuição esteja relacionada a alterações

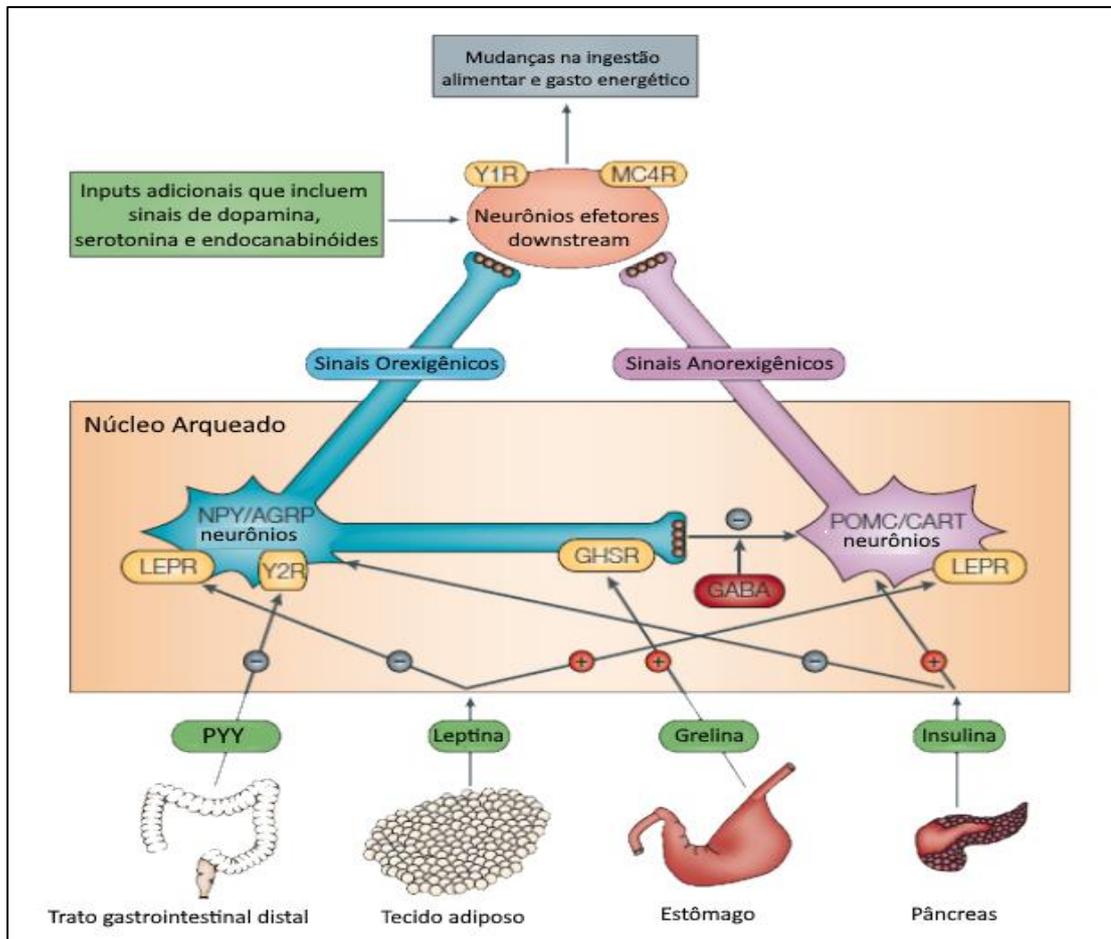
moleculares nas diferentes vias que regulam a expressão e a funcionalidade da NOS3, bem como pela interação do ON com espécies reativas de oxigênio.<sup>76</sup> Quanto às alterações genéticas no gene *NOS3*, seus efeitos foram demonstrados em murinos com deleção parcial deste gene, que sob dieta hiperlipídica apresentaram resistência insulínica, hiperlipidemia e hipertensão, fenótipo similar a síndrome metabólica (SM) humana<sup>84</sup>; e em indivíduos obesos, onde as variantes T-786C e G894T mostraram-se associadas, respectivamente, com SM e diabetes mellitus tipo 2 (DM2).<sup>85,86</sup>

### **e) Polimorfismos associados ao excesso de peso/obesidade**

Como mencionado anteriormente, o desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, a partir de processos metabólicos como respiração, digestão e termogênese<sup>19</sup>, promove o ganho de peso corporal. Aproximadamente 127 regiões no genoma mostraram-se associadas ao desenvolvimento da obesidade, segundo estudos GWA<sup>46</sup>, refletindo em alterações no controle do apetite e da saciedade<sup>76</sup>.

Fisiologicamente, a regulação do peso corporal e do apetite é desempenhada principalmente pela via leptina-melanocortina, um complexo sistema neuroendócrino localizado centralmente na região do núcleo arqueado no hipotálamo, que coordena e integra a sinalização hormonal de regiões periféricas com populações neuronais que estimulam diferentes efeitos relacionados a manutenção da homeostase energética corporal (Figura 8)<sup>23</sup>. Nesse contexto, diversos hormônios vão estimular ou reprimir a propagação de efeitos anorexigênicos (supressão alimentar) ou orexigênicos (ingestão alimentar), dependendo do status energético corporal que envolve um estado “alimentado” ou “em jejum”. Em sequência, a propagação do estímulo em neurônios anorexigênicos resulta na produção de moléculas POMP/CART (Pró-ópiomelanocortina / *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcripts*), as quais são processadas para originar o hormônio estimulante de melanócitos (MSH) dos tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - principais ligantes da família de receptores melanocortinas (5 tipos)(Figura 8)<sup>20,46</sup>. Estes receptores atuam em processos biológicos como controle do apetite (satisfação), da ingestão alimentar, metabolismo lipídico e absorção de glicose<sup>46</sup>, os quais regulam o peso corporal. Logo, variantes genéticas que afetem a expressão ou funcionalidade de qualquer componente relacionado a esse sistema têm sido investigadas como potenciais contribuintes para o desenvolvimento da obesidade.

Figura 8 - Representação esquemática da via leptina-melanocortina reguladora da homeostase energética



Fonte: Adaptado de BELL, 2005.

### Gene *LEPR* (rs1137101)

Um destes genes investigados é o *LEPR*, codificador dos receptores de leptina. Localizado na região p31.3 do cromossomo 1<sup>87</sup>, ele expressa seis isoformas diferentes, as quais possuem sítio de ligação à leptina similar e domínios intracelulares diferentes<sup>88</sup>, sendo sua isoforma LepRb a mais ativa nesse sistema. É um clássico receptor de citocina altamente expresso em neurônios hipotalâmicos que exercem efeitos opostos em resposta a mudanças no status nutricional (Figura 8). Seu principal ligante é o hormônio leptina, uma adipocina que promove a inibição do apetite estimulando neurônios anorexigênicos e inibindo os orexigênicos, em sinal de reserva energética positiva, enquanto o jejum exerce efeitos opostos<sup>23,46,88</sup>.

Periféricamente, a leptina também está envolvida em uma série de processos fisiológicos, como angiogênese, absorção intestinal e regulação do metabolismo lipídico e de carboidratos<sup>19</sup>. A relevância desta adipocina e seus receptores foi identificada primariamente a partir do clássico estudo de parabiose, no qual animais ob/ob tinham sua obesidade e hiperfagia corrigidos por uma substância circulante ainda desconhecida, a qual não surtia o mesmo efeito em animais db/db<sup>89</sup>. Através de clonagem, posteriormente, a leptina e seu gene *LEP* foram identificados e sua forma recombinante foi considerada capaz de corrigir a obesidade e anormalidades metabólicas associadas nos raros casos de deficiência de leptina em humanos e roedores<sup>88</sup>. Entretanto, a deleção do gene *LEPR* em neurônios de murinos, apenas produzindo obesidade leve e não replicando o fenótipo de murinos db/db<sup>90</sup>, demonstrou que a regulação do metabolismo corporal é dependente da ação central e periférica da leptina através dos seus receptores.

Mutações e polimorfismos no *LEPR* humano são raros, sendo a variante Q223R (rs1137101) uma das mais investigadas para associações com obesidade. Essa variante compreende a substituição do nucleotídeo A por G na posição 668 do gene, resultando na produção do aminoácido arginina, ao invés da glutamina, no códon 223 e foi acidentalmente identificada por Considine e cols. em tecido cerebral de indivíduos obesos<sup>91</sup>. Embora não associada com fenótipo obeso neste mesmo estudo, posteriormente outros trabalhos identificaram o genótipo variante GG associado com peso corporal, IMC, CA<sub>bd</sub> e leptina sérica aumentados em adultos obesos da Indonésia<sup>92</sup>, mais frequente em jovens obesos gregos<sup>93</sup> e associado ao risco de obesidade em crianças obesas árabes<sup>94</sup>.

#### Genes *MC3R* e *MC4R* (rs3746619, rs3827103 e rs17782313)

Outros genes e seus PG pertinentes nesse sistema que podem contribuir para susceptibilidade à obesidade são os codificadores dos receptores de melanocortina, mais especificamente os do tipo 3 (*MC3R*) e 4 (*MC4R*). O gene *MC3R* localiza-se na região q13.2-13.3 do cromossomo 20 humano, sendo originalmente identificado em humanos através de clonagem a partir de linhagens celulares<sup>95</sup>. Receptores de melanocortina tipo 3 (MC3) são expressos em diferentes tecidos, mas principalmente no hipotálamo e sistema límbico de humanos<sup>95</sup> e murinos<sup>96</sup>, em áreas relacionadas ao

apetite e metabolismo, e seus ligantes MSH promovem a inibição da ingestão alimentar pós-refeição (Figura 8).

Apesar disso, o interesse no papel dos receptores MC3 no controle metabólico e obesidade mostrou-se reduzido durante anos devido a resultados inconclusivos em diversos estudos experimentais, nos quais a deleção do *MC3R* em murinos *knockout*, sob livre alimentação, resultaram em fenótipo obeso leve (massa gorda relativamente aumentada e massa magra reduzida) e hipofagia<sup>97,98</sup>. Entretanto, a recente identificação de alterações no comportamento alimentar, relacionadas a não-percepção de restrição nutricional em animais *knockout* para *MC3R* sob dieta hipocalórica<sup>99</sup>, indicaram que a influência deste receptor no apetite e ingestão alimentar é modificável de acordo com as condições nutricionais envolvidas.

A influência do *MC3R* e suas variantes genéticas no metabolismo corporal que favoreça o desenvolvimento da obesidade em humanos ainda é inconsistente<sup>20</sup>, principalmente se considerarmos as metodologias de investigação utilizadas experimentalmente. Apesar disso, bancos de dados de mutações genéticas humanas têm reportado 18 diferentes tipos de mutações neste gene<sup>46</sup>, dentre as quais temos os polimorfismos T6K (rs3746619) e o V81I (rs3827103) investigados para alterações no controle do peso corporal em humanos, principalmente em obesos.

A variante V81I corresponde à troca do G por A na posição 241, resultando na formação de Isoleucina, no lugar da Valina, no códon 81; e no T6K, à troca do nucleotídeo C por A na posição 17, resultando na formação do aminoácido Lisina, ao invés da Treonina, no códon 6. Apesar da primeira ter sido originalmente identificada em mulheres caucasianas com obesidade severa<sup>100</sup> e a segunda ocasionalmente identificada em desequilíbrio de ligação com a primeira variante em um estudo familiar europeu sobre DM2<sup>101</sup>, ambas estavam igualmente distribuídas entre pacientes e controles, não demonstrando relação com obesidade. Estudos posteriores, entretanto, replicaram em populações pediátricas achados positivos com relação a essas variantes e aspectos da obesidade, como valores aumentados de indicadores antropométricos em crianças norte-americanas<sup>102</sup> e chinesas<sup>103</sup>, assim como maior ingestão alimentar<sup>104</sup>.

Já o gene *MC4R* localiza-se na região 21.32 do braço longo do cromossomo 18. Seus receptores melanocortina tipo 4 (MC4), diferentemente dos MC3, são amplamente expressos em diferentes pontos do hipotálamo, cérebro, tronco encefálico e em outros tecidos<sup>105</sup>. Tem como seus ligantes o MSH e o hormônio

adrenocorticotrófico (ACTH), que promovem a inibição da ingestão alimentar pós-refeição (saciedade), também regulando a homeostase balanço entre o gasto energético e ingestão alimentar<sup>46</sup> (Figura 8).

Apesar de localizados em regiões neuronais próximas, estes receptores MC3 e MC4 demonstraram ser funcionalmente independentes, exercendo efeitos diferentes na regulação do equilíbrio energético. Enquanto murinos *knockout MC3R* apresentavam fenótipo obeso leve e apetite regular<sup>97,98</sup>, os *knockout* para *MC4R* eram maiores, com hiperfagia, hiperinsulinemia, massa magra reduzida e peso proporcionalmente maior conforme o número de deleções do gene<sup>106</sup> enquanto; os duplo *knockout MC3R/MC4R*, por sua vez, apresentaram fenótipo obeso mais severo<sup>97</sup>. Além disso, alterações na composição corporal em *knockout MC3R* tornaram-se significativas após intervalo de tempo maior e agravada por dieta hiperlipídica, em comparação aos *knockout MC4R*<sup>97,98,106</sup>. Juntos, esses resultados conduziram a investigações acerca de alterações genéticas no receptor MC4 que replicassem o mesmo efeito severo de desregulação em comportamentos alimentares e no peso corporal em seres humanos. Após os primeiros estudos em obesos mórbidos identificarem raras mutações no *MC4R* associadas a histórico familiar de obesidade infantil precoce, afetando diferentemente a funcionalidade dos receptores MC4<sup>107,108</sup>, em torno de 139 diferentes tipos de alterações neste gene foram reportadas em bancos de dados genéticos humanos<sup>46</sup>, sendo uma delas a variante rs17782313 (T>C).

O PG rs17782313 compreende a troca do nucleotídeo T por C em região não-codificante próxima a região promotora do gene *MC4R*, identificado originalmente em 2008, em meta-análise de estudos GWA que reuniu dados genéticos de mais de 77 mil adultos e 10 mil crianças e adolescentes de ancestralidade europeia<sup>109</sup>. Assim como diferentes mutações produziram diferentes fenótipos obesos nos casos com caráter hereditário no estudo de Farooqi e colaboradores<sup>108</sup>, nas diferentes populações analisadas nesta meta-análise, cada cópia do alelo variante C rs17782313 promoveu aumento progressivo nas medidas antropométricas e no risco associado ao desenvolvimento de excesso de peso em ambos os grupos etários<sup>109</sup>. Similar relação entre o rs17782313 *MC4R* e alterações em medidas corporais e de adiposidade foi identificada posteriormente em crianças e adolescentes na China<sup>110</sup>, e Portugal<sup>111</sup>, e com risco aumentado de obesidade em adultos mexicanos<sup>112</sup>. Por outro lado, estudos recentes identificaram uma relação deste PG com o desenvolvimento de obesidade

por influência em comportamentos alimentares em crianças e adolescentes no Chile<sup>113</sup> e também nos aspectos psicoemocionais em adultos canadenses<sup>114</sup>.

### Gene *FTO* (rs9939609)

Por último, temos o gene *Fat Mass and Obesity-associated* (*FTO*), que embora não relacionado à via leptina-melanocortina, é considerado o primeiro gene de susceptibilidade à obesidade identificado por estudo GWA<sup>115</sup>. Localizado na região 12.2 do braço longo do cromossomo 16, este gene é amplamente expresso em diversos tecidos fetais e adultos de humanos, assim como de murinos, porém com maior concentração no núcleo do hipotálamo, região envolvida no controle da homeostase energética<sup>115,116</sup>. Frayling e cols. rastreando SNPs associados a DM2, em amostra caso-controle envolvendo mais de 4.000 adultos, encontraram este gene e 10 SNPs relacionados, em sua região não-codificante, ligados entre si e associados com IMC ( $P=5 \times 10^{-8}$ )<sup>115</sup>. Dentre estas variantes, nosso estudo avaliou a variante rs9939609, que corresponde à troca do nucleotídeo T por A em região não-codificante, umas das mais investigadas em relação à obesidade. Neste mesmo estudo genômico, dados adicionais de outros estudos populacionais com adultos e crianças de ancestralidade europeia, totalizando mais de 38.000 indivíduos, reforçaram este achado ao identificarem o alelo variante A associado com valores aumentados de outros indicadores de adiposidade, como CA<sub>bd</sub> e gordura corporal, além de maiores chances de desenvolver excesso de peso em ambas as fases de vida<sup>115</sup>. Posteriormente, este SNP mostrou-se associado ao excesso de peso, em diferentes aspectos relacionados a esta condição, em outras populações, como medidas antropométricas, percentual de gordura corporal alterados e risco aumentado para obesidade em crianças e adolescentes chineses<sup>117</sup>, adultos japoneses<sup>118</sup> e adultos obesos não-diabéticos mexicanos<sup>119</sup>.

Apesar das inéditas associações reportadas nos estudos genômicos, a função do *FTO* no organismo ainda era desconhecida, principalmente porque sua descoberta (assim como a de outros genes próximos) foi ocasional, a partir da clonagem de um grande trecho deletado do cromossomo 8 de murinos mutantes e que não apresentavam correlação com alterações corporais/adiposidade<sup>120</sup>. Entretanto, após a publicação de Frayling e cols., um estudo experimental *in vivo* e *in vitro* identificou seu produto de expressão gênica, uma enzima demetilase que atua modificando

trechos das moléculas de DNA e RNA por remoção de radicais metil. Neste estudo, foi observado que a privação alimentar reduziu em 60% a expressão dessa enzima no hipotálamo de modelos murinos-independente de sinalizações da leptina<sup>116</sup>, indicando que, sob regulação do status alimentar, o *FTO* influencia no peso corporal através de mecanismo epigenético.

## **JUSTIFICATIVA**

Diante dos cenários descritos acima, é notável uma heterogeneidade de efeitos associados a estes marcadores genéticos na elevação da PA e no ganho excessivo de peso, os quais tem sido majoritariamente identificados em populações adultas de origem europeias, enquanto em outras populações não-europeias, como a brasileira, o efeito de biomarcadores associados a doenças complexas em meio a um background genético altamente miscigenado ainda não é bem conhecido.

Desta forma, é possível que em nossa população miscigenada polimorfismos em genes relacionados às vias metabólicas envolvidas no controle da pressão arterial, função vascular e controle do peso corporal possam contribuir para alterações fisiológicas que elevem o risco para obesidade e pressão arterial elevada. Além disso, a detecção de um perfil genético preditor do RCV em indivíduos jovens permitiria a adoção precoce de medidas preventivas, bem como o desenvolvimento de tratamentos médicos personalizados (farmacogenômica) visando uma melhor saúde cardiovascular na fase adulta.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Geral

Avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos relacionados a fatores de risco cardiovascular e sua relação com variáveis antropométricas e pressóricas em escolares adolescentes do Estudo do Rio de Janeiro II.

### 1.2 Específicos

- a) Determinar a prevalência de pressão arterial (PA) elevada e obesidade geral em indivíduos do ERJ II;
- b) Determinar as distribuições alélicas e genotípicas dos polimorfismos nos genes *AGT*, *CYP11B2*, *NOS3*, *FTO*, *LEPR*, *MC3R* e *MC4R* na amostragem geral;
- c) Avaliar o perfil de distribuição de polimorfismos dos genes *AGT*, *CYP11B2*, *NOS3*, *FTO*, *LEPR*, *MC3R* e *MC4R* em indivíduos do ERJII estratificados segundo sexo, cor, classificação do IMC, perfil de circunferência abdominal e de PA;
- d) Correlacionar os polimorfismos estudados com variação nas medidas de adiposidade corporal (IMC e circunferência abdominal) e variáveis pressóricas (PAS e PAD);
- e) Investigar a associação entre os polimorfismos dos genes estudados com o risco para obesidade e elevação da PA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização da população amostral

A população do presente trabalho compreendeu adolescentes escolares, de 10 a 15 anos de idade, de ambos os sexos, provenientes do Estudo do Rio de Janeiro II (ERJ II), novo estudo longitudinal brasileiro em andamento que visa avaliar fatores de risco cardiovascular em jovens e suas famílias. A amostra populacional estimada para o ERJ II foi baseada em cálculo amostral que garantisse a representatividade da população avaliada na Fase Escolar do ERJ I, há cerca de 30 anos. Para este fim, utilizou-se a estimativa de 12.135 adolescentes matriculados nas escolas da rede pública da mesma área geográfica do ERJ I (hoje correspondente a 2ª Coordenadoria Regional de Educação), no entorno da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; considerou-se erro amostral de 2%, nível de confiança de 95% e percentual máximo de S/O nessa faixa etária de 15%. Foi estimado um quantitativo total de 1.116 adolescentes, com 93 jovens para cada estrato de sexo (masculino e feminino) e de idade (6 classes), porém durante o período de captação de participantes nos anos de 2015-2016 esse quantitativo foi superado, sendo obtido um total de 1.892 amostras.

No presente estudo foram realizadas análises genéticas em 1.054 amostras, pois houve perda amostral devido a limitações técnicas, tais como material genético de baixa qualidade, que inviabilizaram a tipagem. Inicialmente, foram selecionadas amostras de indivíduos que apresentavam alteração no perfil de pressão arterial e/ou excesso de peso, seguido por aqueles que não apresentavam nenhum tipo alteração, caracterizados então como indivíduos controle. As amostras submetidas a análises genéticas (n=1.054) apresentam características demográficas e clínicas muito semelhantes à população total do ERJ II (n=1.892), exceto pela maior presença de pressão arterial (PA) elevada (13,5% versus (vs). 8,4%), o que foi relacionado à prioridade de análise genética dos casos que tinham esta condição.

## 2.2 Procedimentos

### 2.2.1 Coleta de dados e material biológico

Um questionário de avaliação (APÊNDICE A) foi encaminhado aos responsáveis para registro dos seguintes dados: identificação; variáveis epidemiológicas (gênero, idade, cor da pele autodeclarada, endereço e ano atual na escola); variáveis clínicas (englobando a presença de doenças e fatores de RCV e antecedentes familiares), assim como a informação referente aos hábitos de vida (avaliação do consumo alimentar e atividade física). A avaliação destes indivíduos aconteceu em ambiente escolar, por equipe multidisciplinar, onde foram obtidas três medidas de PA e registro de dados antropométricos (peso, altura, IMC e CA) e a coleta de material biológico.

A coleta de amostra biológica foi realizada por meio de *swab* da mucosa oral CEP™ (FitzCO) para obtenção de células epiteliais e de saliva a partir da cavidade oral, nas regiões da mucosa interna das bochechas, palato e língua. Os mesmos foram devidamente identificados e armazenados em solução de PBS 1X em freezer a -20 °C, no ambulatório do setor de Hipertensão do HUPE. Posteriormente, lotes desse material foram encaminhados periodicamente para o Laboratório de Diagnóstico por DNA do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, para a extração e análise do material genético.

### 2.2.2 Avaliação clínica para medida da pressão arterial

A pressão arterial (PA) foi medida no membro superior não dominante apoiado ao nível do coração, com o indivíduo sentado e com os pés no chão, pelo método oscilométrico, após 2-3 minutos de repouso, com o aparelho automático *OMRON HEM7120* calibrado e validado pelo protocolo da Sociedade Europeia de Hipertensão<sup>121</sup>, seguindo a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial vigente à época<sup>122</sup>. Foram realizados três registros da PA, com intervalos de 1 a 2 minutos entre

cada medida, sendo a última delas utilizada para análise. Em ambos os períodos foram selecionados manguitos de tamanho e largura apropriados para a circunferência e comprimento do braço dos indivíduos.

No ERJ II, o perfil de pressão arterial foi classificado segundo o *Fourth Report do the National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group on Children and Adolescents*<sup>123</sup> e a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial<sup>122</sup>: pressão normal quando a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) <p90; normal alta quando PAS e/ou PAD ≥p90 e <p95; e elevada quando PAS e/ou PAD ≥p95 - ajustados para idade, gênero e percentil de altura.

### 2.2.3 Avaliação antropométrica

As variáveis antropométricas coletadas foram: peso (P) medido em quilogramas (kg), em balança digital da marca *OMRON*, modelo *HBF 214*, com capacidade até 150kg e precisão de 100g; altura (A) medida em centímetros (cm), com auxílio de estadiômetro portátil *SECA 206* com graduação em centímetros, sendo considerada a distância do ponto vértex à região plantar, com os indivíduos eretos, trajando roupas leves e sem calçados; circunferência abdominal (CAbd) medida em centímetros (cm), realizada por trena antropométrica portátil inelástica de *SECA 201*, na altura do ponto médio entre a borda inferior da última costela e a crista ilíaca<sup>29</sup>.

O índice de massa corporal (IMC) foi medido em kg/m<sup>2</sup> através do quociente resultado da divisão do peso pelo quadrado da altura. O estado nutricional foi classificado de acordo com percentis ajustados para gênero e idade propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2007<sup>28</sup>, para os quais foram reconhecidas as condições de: IMC ≥p0 e p1 e <p3 (baixo peso); IMC ≥p3 e <p85 (eutrofia); IMC ≥p85 e <p97 (sobrepeso), IMC ≥p97 (obesidade).

A presença de obesidade central, analisada a partir dos valores da CAbd, foi definida quando ≥p90, com base nas tabelas valores correspondentes aos percentis por gênero e faixa etária (jovens de 5 a 16,9 anos), segundo o mesmo trabalho citado acima<sup>29</sup>.

#### 2.2.4 Avaliação demográfica

A variável demográfica “cor” foi caracterizada por meio do questionário de avaliação (APÊNDICE A) entregue e preenchido pelos responsáveis, contendo as opções “Branco”, “Preto”, “Não Branco/Não Preto” (NB/NP). A atividade física foi descrita utilizando-se a frequência da prática de esporte ou atividade física dentro e fora do ambiente escolar, estratificada como: “nunca/quase pratica” (menos que 1 vez por semana), “pratica algumas vezes” (de 1 a 2 vezes na semana) e “pratica sempre” (igual ou superior a 3 vezes na semana). Os indicadores construídos foram: sedentarismo para a primeira condição e não sedentarismo para as duas últimas.

### 2.3 **Análise molecular dos polimorfismos genéticos**

#### 2.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras de *swab* foi extraído por kit comercial Mini Spin Plus (Biopur), baseado no método de extração por coluna, de acordo com o manual do fabricante. Ao término, o DNA genômico extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

#### 2.3.2 Minisequenciamento Multiplex dos polimorfismos genéticos associados ao RCV

As amostras foram genotipadas para polimorfismos genéticos (PG) relacionados à hipertensão arterial e à obesidade, os dois principais fatores de risco cardiovascular. Foram analisados os PG relacionados a componentes do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) – M235T (rs699) do angiotensinogênio, a variante -344T>C (rs1799998) do gene da aldosterona (*CYP11B2*) e o E298T (rs1799983) do gene da óxido nítrico sintase 3 (*NOS3*) – e aqueles relacionados a componentes do sistema de controle do balanço energético – a variante intrônica T>A (rs9939609) do gene

*FTO*, o Q223R (rs1137101) do *LEPR*, T6K (rs3746619) e V81I (rs3827103) do *MC3R* e a variante intrônica T>C (rs17782313) do *MC4R*. O processo de genotipagem dos mesmos foi realizado através da técnica de minisequenciamento ou sequenciamento de base única, após as etapas de desenho e validação dos *primers* (iniciadores) de PCR e de minisequenciamento em reações Singleplex, finalizando com a construção e padronização das reações Multiplex.

A fim de se elaborar os *primers* para cada polimorfismo genético, foi o utilizado o banco de dados online “dbSNP Short Genetic Variations” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), disponível no site do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para a obtenção de informações como número da sequencia referência da variante, variantes alélicas e visualização das regiões flangeadoras disponíveis para anelamento de primers. Todos os *primers* foram desenhados usando o software Primer 3 ([http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/version\\_0.4.0](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/version_0.4.0)), a checagem para a formação de estruturas secundárias que interferissem na funcionalidade dos mesmos foi realizada com o *Primer Tools* no site *the National Institute of Standards and Technology* (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/>). Todos os *primers* foram sintetizados e purificados através de dessalinização pela Exxtend (Exxtend). Primeiramente, todos os *primers* foram testados em reações individuais (reações *Singleplex*), para determinar a eficácia e especificidade dos mesmos, bem como os alelos presentes e suas posições no painel de genotipagem (eletroferograma). Esta etapa de padronização é fundamental para a identificação de possíveis erros técnicos e correções antes da construção do painel Multiplex.

Após a conclusão da padronização, foi realizada a construção dos painéis Multiplex de PCR e de minisequenciamento, versão final utilizada para a genotipagem neste trabalho. A primeira etapa de análise consistiu na amplificação simultânea de fragmentos de todas as regiões de interesse em uma única reação em cadeia da polimerase (PCR Multiplex), com o uso de 2 painéis Multiplex contendo 4 pares de iniciadores personalizados e específicos para cada região, cada um (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequências e características dos *primers* de amplificação personalizados dos painéis de PCR Multiplex A e B.

<b>Painel Multiplex de PCR A</b>				
<i>PG Gene</i>	<i>Sequência dos primers (5' to 3')</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>Concentração final na reação (uM)</i>	<i>Tamanho do fragmento (pb)</i>
rs3746619 <i>MC3R</i>	F-5'-TCTTCCTCCACCCTCTCTCA-3' R-5'-GCTGCTCACAGGAAAGACAA-3'	59,9 59,1	0,13 0,13	140
rs1137101 <i>LEPR</i>	F-5'-GCAGTTTTTCAGATGGTTCACTG-3' R-5'-GGGCTGAACTGACATTAGAGGT-3'	59,7 59,6	0,13 0,13	158
rs1799998 <i>CYP11B2</i>	F-5'-TGGAGGGTGTAC <b>S</b> TGTGTCA-3' R-5'-GACCTGGCCTCTCCTTTCTC-3'	60,0 60,3	0,13 0,13	196
rs9939609 <i>FTO</i>	F-5'-GGATTCAGAAGAGATGATC-3' R-5'-TGCTCTCCCACTCCATTTCT-3'	48,9 59,8	0,26 0,26	203
<b>Painel Multiplex de PCR B</b>				
<i>PG Gene</i>	<i>Sequência dos primers (5' to 3')</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>Concentração final na reação (uM)</i>	<i>Tamanho do fragmento (pb)</i>
rs699 <i>AGT</i>	F-5'-GAACTGGATGTTGCTGCTGA-3' R-5'-TTGCCTTACCTTGGAAAGTGG-3'	59,9 60,1	0,13 0,13	137
rs3827103 <i>MC3R</i>	F-5'-TCAGCCAACACTGCCTAATG-3' R-5'-ACCAGGATGTTTTCCAGC <b>M</b> G-3'	59,8 60,1	0,13 0,13	147
rs1799983 <i>NOS3</i>	F-5'-ACTCCCCACAGCTCTGCATT-3' R-5'-CAGTCAATCCCTTTGGTGCT-3'	62,1 60,1	0,13 0,13	174
rs17782313 <i>MC4R</i>	F-5'-TTGGAAGCAGGAAAACCAGA-3' R-5'-GCTACCTCAATCCCAGATGC-3'	60,7 59,6	0,13 0,13	179

Legenda: T<sub>m</sub>= Temperatura de melting, F= forward, R= reverse, rs= referencesequence, pb= pares de base.

Nota: Letras em negrito indicam bases degeneradas de acordo com a IUPAC (<http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>).

Fabricante: EXXTEND;

Fonte: A autora, 2021.

Adaptando-se as condições do fabricante, cada reação continha 5 ng/ $\mu$ L de DNA de amostra, 2,5  $\mu$ L do tampão Multiplex Qiagen Master Mix 2x (Qiagen Multiplex PCR Kit) e 2,0  $\mu$ L do mix de iniciadores de um dos painéis Multiplex para amplificação de suas respectivas regiões. As reações foram incubadas no termociclador Veriti 96 Well ThermalCycler (AppliedBiosystem), sob as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial de 95°C, por 15 minutos; 35 ciclos de 94°C, por 30 segundos; 59°C, por 1 minuto e 30 segundos; 72°C, por 1 minuto; e 72°C, por 10 minutos de extensão final. Alíquotas de 2  $\mu$ L dos produtos de amplificação foram homogeneizadas com 1  $\mu$ L do corante fluorescente SaferDye (Kasvi), submetidas à detecção através de eletroforese em matriz de gel de poliacrilamida 10 %, imersas em tampão TBE 1X e então submetidas a uma tensão elétrica de 100 V por 45 minutos em cuba de eletroforese vertical (BRL). O tamanho dos *amplicons* está descrito na Tabela 1.

Em seguida, 1,0  $\mu$ L do produto de PCR amplificado foi purificado com a adição de 0,7  $\mu$ L da exonuclease ExoSAP-IT (USB), incubando-se a reação em termociclador a 37 °C, por 30 minutos e depois a 80 °C, por 15 minutos.

Já a segunda etapa envolveu a reação de minisequenciamento pelo método cíclico de terminação de cadeia, onde ocorre o sequenciamento mínimo desses fragmentos na presença de nucleotídeos modificados, marcados com fluoróforos (di-deoxinucleotídeos) e iniciadores de extensão de base única (SBE) personalizados para cada região, também organizados em 2 painéis Multiplex de 4 iniciadores (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequências e características dos *primers* de extensão personalizados utilizados nos painéis de Minisequenciamento Multiplex A e B

<b>Painel Multiplex de Minisequenciamento A</b>					
<i>PG Gene</i>	<i>Sequencia (5'-3')</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>Concentração final na reação (μM)</i>	<i>Tamanho dos alelos (bp)</i>	<i>Alelos esperados</i>
rs3746619 <i>MC3R</i>	R-5'- (24bp)-AAAATCTCCCTCCAGATAC-3'	50,0	0,1	48; 49	C/A
rs1137101 <i>LEPR</i>	R-5'- (14bp)-TGAAGTACATTAGAGGTGAC-3'	52,0	0,1	40; 41	A/G
rs1799998 <i>CYP11B2</i>	R-5'- (36bp)-TATCGTGAGATGAGAGGG-3'	52,0	0,2	58; 59	T/C
rs9939609 <i>FTO</i>	R-5'- (29bp)-GACTATCCAAGTGCATCAC-3'	51,0	0,8	51;53	T/A
<b>Painel Multiplex de Minisequenciamento B</b>					
<i>PG Gene</i>	<i>Sequencia (5'-3')</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>Concentração final na reação (μM)</i>	<i>Tamanho dos alelos (bp)</i>	<i>Alelos esperados</i>
rs699 <i>AGT</i>	F-5'- (36bp)-CTGGCTGCTCCCTGA-3'	54,0	0,2	56; 57	T/C
rs3827103 <i>MC3R</i>	R-5'- (41bp)-CCCAGAGACAGGAAAA-3'	49,0	0,2	60; 61	G/A
rs1799983 <i>NOS3</i>	R-5'- (49bp)-GAAGAGTTCTGGGGG-3'	48,0	0,2	46; 47	G/T
rs17782313 <i>MC4R</i>	R-5'- (19bp)-TTTTCTTGTCATTTCCATC-3'	51,0	0,2	43; 44	T/C

Legenda: T<sub>m</sub>= Temperatura de melting, F= forward, R= reverse, rs= referencesequence, pb= pares de base.

Nota: Números em parênteses na coluna de sequênciaindicam o tamanho da cauda 5'.

Fabricante: EXXTEND

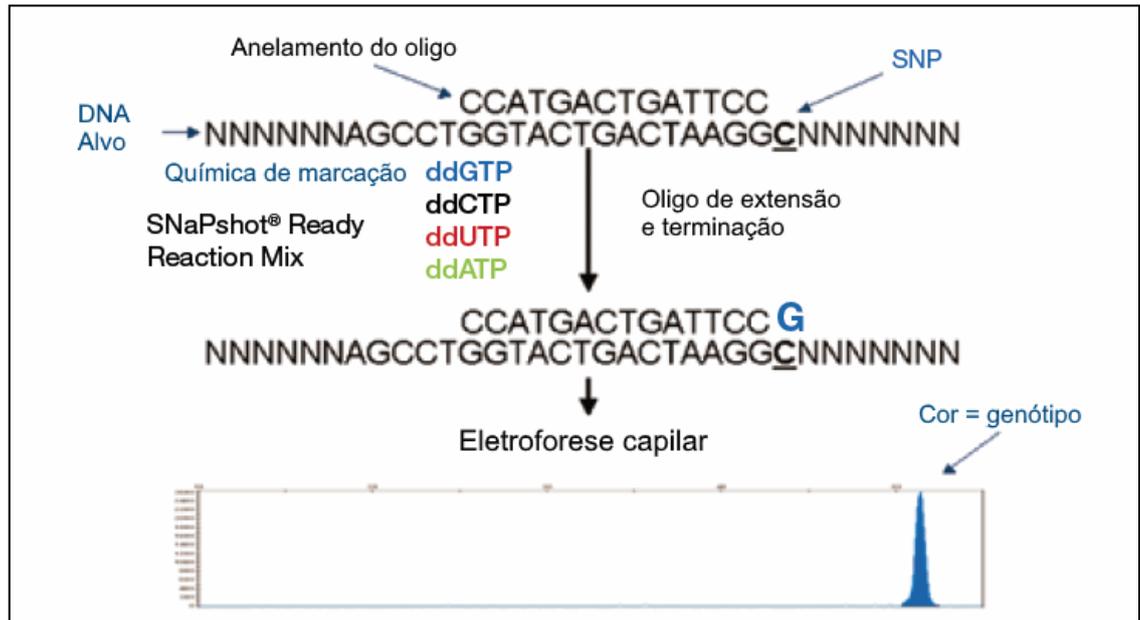
Fonte: A autora, 2021.

Os iniciadores SBE foram confeccionados no sentido *Forward* ou *Reverse* da fita 5'-3' para que o mesmo anele adjacente ao sítio polimórfico, de forma a inserir ali sua respectiva base complementar encerrando o processo de extensão da cadeia. Cada reação utilizou 1,7 µL do produto de PCR purificado, 1,0 µL do mix de reação do kit SNaPshot® Multiplex (AppliedBiosystems) e 2,5 µL do mix de iniciadores SBE de um dos painéis Multiplex. As reações foram incubadas no termociclador sob as condições de termociclagem indicadas pelo fabricante: 25 ciclos de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C e 30 segundos a 60 °C. A seguir, foi realizada uma nova purificação enzimática, com a adição de 1U da exonuclease *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (USB) a todo produto final do minisequenciamento e sua incubação em termociclador a 37 °C por 1h e depois a 80 °C por 15 minutos.

Por último, os produtos de minisequenciamento purificados foram submetidos a eletroforese capilar para separação dos fragmentos de DNA, através da sua migração no interior de um capilar e detecção dos nucleotídeos nos sítios polimórficos, gerando-se um perfil genotípico da amostra. Alíquotas de 2 µL de cada produto de minisequenciamento foram homogeneizadas com 7,8 µL de formamida *HiDi* (AppliedBiosystems) e 0,2 µL de *LIZ 120 Size Standard* (AppliedBiosystem), um padrão interno de fragmentos de DNA, aplicados em placa de 96 poços de fundo cônico e submetidos a análise no sequenciador automático GeneticAnalyzer ABI 3500 (AppliedBiosystems). Os resultados gerados foram analisados no *software* GeneMapper v4.1 (AppliedBiosystems), que capta a fluorescência de um ou dois alelos em cada sítio polimórfico do fragmento, caracterizando indivíduos homocigotos ou heterocigotos.

Os alelos são representados no eletroferograma por picos coloridos, conforme a fluorescência emitida pelos corantes fluorescentes ligados as bases: vermelho (ddUTP – Drox), azul (ddGTP - dR110), verde (ddATP - dR6G) e amarelo (ddCTP - dTAMRA) (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração demonstrativa da marcação química da técnica de minisequenciamento



Fonte: adaptada de

[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms\\_101014.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_101014.pdf)

## 2.4 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da UERJ, sob protocolo CEP/HUPE número 380.673, atendendo à Resolução 466/2012 atualizada do Ministério da Saúde, incluído na base de dados do Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP), sob o nº CAAE:16328013.9.0000.5259 (ANEXO A). Todos os responsáveis pelos participantes do estudo foram esclarecidos sobre o objetivo do estudo através de uma carta informativa aos pais (APÊNDICE B) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C).

Foram incluídos na amostragem todos os adolescentes de 10 a 15 anos completos até a data da avaliação realizada na escola que apresentaram o TCLE e questionário de atendimento preenchidos e assinados pelos responsáveis, enquanto aqueles que não os trouxeram não foram incluídos no estudo. As informações colhidas têm sido armazenadas em um único banco de dados utilizando-se o programa *Microsoft Access*.

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS v27.0.0.0/2020 (SPSS Inc.), considerando valores de  $p$  abaixo de 0,05 ou 5% ( $\alpha=0,05$ ) como nível de rejeição da hipótese de nulidade para os seguintes métodos: teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), teste one-way ANOVA com teste post-Hoc de Tukey, e regressão logística univariada e multivariada. Para as análises de associação realizadas por modelos de regressão logística, valores de peso 0, 1 e 2 foram atribuídos aos genótipos de acordo com o número de suas cópias do alelo de risco presentes, como apresentado na Tabela 3. O desequilíbrio de ligação de um *locus* a partir da comparação entre suas frequências esperada e observada foi avaliado através de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) no teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) no *software* Arlequin v.3.5<sup>124</sup>, considerando como nível de significância valores de  $P$  abaixo de 0,05 ( $\alpha=0,05$ ), e correção de Bonferroni para ajuste dos valores de  $P$  quando significativos.

Tabela 3 – Codificação dos genótipos a partir do número de cópias do alelo de risco presentes utilizada nas análises de regressão logística

<b>Polimorfismo</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	AA	GA	GG
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	TT	CT	CC
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	GG	GT	TT
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	CC	CA	AA
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	TT	AT	AA
rs699 ( <i>AGT</i> )	TT	CT	CC
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	TT	CT	CC
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	GG	GA	AA

Fonte: A autora, 2021.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Características gerais da população amostral**

Um total de 1.054 amostras foram submetidas às análises genéticas para os 8 polimorfismos genéticos (PGs). A Tabela 4 mostra as características clínicas e demográficas dos escolares que tiveram a análise genética realizada. Dentre os 1.054 adolescentes avaliados, 53,5% eram do sexo feminino, 44,0% de cor branca, 92,5% (n=975) praticavam alguma atividade física e 55,5% eram nutricionalmente saudáveis. Destacam-se as prevalências de sobrepeso/obesidade (S/O) de 41,4%, de obesidade central de 45,2% e de pressão arterial (PA) elevada de 13,5%.

Tabela 4 – Dados clínicos e demográficos das 1.054 amostras submetidas às análises genéticas

<i>Características gerais</i>	<i>Amostragem submetida à análise genética (n=1.054)</i>
Sexo	
Feminino, n (%)	564 (53,5%)
Masculino, n (%)	490 (46,5%)
Estudantes por faixa etária, n (%)	
10 anos	107 (10,2%)
11 anos	159 (15,1%)
12 anos	200 (19,0%)
13 anos	246 (23,3%)
14 anos	208 (19,7%)
15 anos	134 (12,7%)
Idade em anos, média ( $\pm$ dp)	12,66 ( $\pm$ 1,51)
Altura em m, média ( $\pm$ dp)	1,57 ( $\pm$ 0,10)
Peso em kg, média ( $\pm$ dp)	51,26 ( $\pm$ 13,41)
IMC em kg/m <sup>2</sup> , média ( $\pm$ dp)	20,61 ( $\pm$ 4,24)
IMC, n (%)	
Baixo Peso	31 (2,94%)
Eutrofia	586 (55,5%)
Sobrepeso	218(20,7%)
Obesidade	218 (20,7%)
CAbd, n (%)	
Normal	576 (54,8%)
Aumentada	476 (45,2%)
Presença de S/O, n (%)	<b>436 (41,4%)</b>
Sedentarismo, n (%)	79 (7,5%)
Cor da pele, n (%)	
Branco	464 (44,0%)
Pretos	226 (21,4%)
Não Branco/Não Preto	338 (32,1%)
PAS em mmHg, média ( $\pm$ dp)	109,1 ( $\pm$ 12,33)
PAD em mmHg, média ( $\pm$ dp)	64,3 ( $\pm$ 18,22)
Presença de PA elevada, n (%)	<b>142 (13,5%)</b>

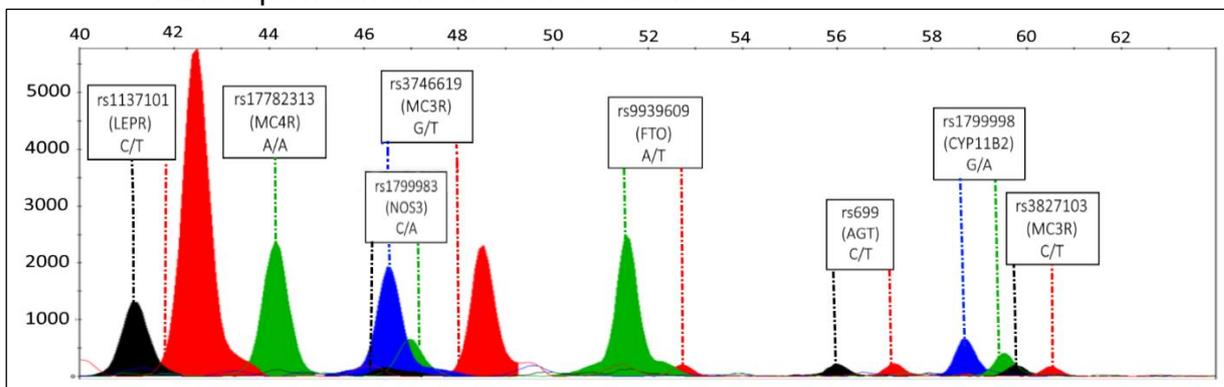
Legenda: dp – desvio padrão.

Fonte: A autora, 2021.

Com relação à análise molecular, a Figura 10 ilustra a representação gráfica (eletroferograma) gerado pelo *software* de análise dos 2 painéis Multiplex de minisequenciamento (sobrepostos) utilizados na genotipagem de uma amostra. Nesta técnica, em cada marcador (sítio polimórfico) estará presente um ou dois picos coloridos caracterizando os genótipos homocigotos (selvagem ou mutante, de acordo com a cor específica) ou heterocigotos. Dessa forma, para cada marcador foi possível

identificar seus genótipos, suas frequências alélicas, genotípicas e o percentual de perda de tipagens.

Figura 10 – Eletroferograma dos painéis agrupados Multiplex A e B de minisequenciamento dos 8 PGs analisados



Nota: Cada marcador (caixa) está conectado por uma linha tracejada com seus respectivos alelos, representados pelos picos coloridos em cores específicas: C/preto, G/azul, T/vermelho e A/verde. O eixo X representa o tamanho dos fragmentos em pb; eixo Y a unidade de fluorescência emitida.

Fonte: A autora, 2021.

Os alelos e genótipos dos 8 PGs analisados, bem como o perfil de distribuição de suas frequências alélicas e genotípicas, encontram-se descritos na Tabela 5. Das 1.054 amostras analisadas geneticamente, 680 (64,52%) forneceram perfil genético completo para todos os marcadores e 374 (35,58%) forneceram perfil parcial, com ausência de informação para um ou mais marcadores.

Na amostragem total analisada, perdas de tipagens foram detectadas para todos os *loci* analisados. Os marcadores rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs3746619 (*MC3R*) apresentaram os menores índices de falha de amplificação, cujos perfis genotípicos não foram obtidos em 23 amostras (2,2%), 42 (4,0%) e 50 (4,7%), para cada marcador, respectivamente. Já os marcadores rs1799998 (*CYP11B2*) e rs9939609 (*FTO*) apresentaram os maiores percentuais de falha de amplificação, com perda de informação em 154 (14,6%) e 190 (18,0%) amostras, respectivamente.

O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) aplicado identificou desvio na distribuição das frequências genotípicas dos marcadores rs17782313 (*MC4R*) ( $P=0,0174$ ), rs3746619 (*MC3R*) ( $P=0,04326$ ) e rs3827103 (*MC3R*) ( $P<0,00001$ ). Porém, ao nível de significância corrigido por Bonferroni ( $\alpha=0,007$ ), estes marcadores mantiveram-se em equilíbrio, com exceção do marcador rs3827103 (*MC3R*) ( $P<0,00001$ ).

As frequências dos alelos variantes dos polimorfismos rs1137101 (*LEPR*), rs1799983 (*NOS3*), rs9939609 (*FTO*), rs699 (*AGT*), e rs1799998 (*CYP11B2*) mostraram-se mais próximas das observadas em populações europeias do que em africanas, com base em dados de frequência alélica e genotípica dos bancos de dados públicos *HapMap Project* e *database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP)*. Comparação similar não pôde ser aplicada para os marcadores rs17782313 (*MC4R*), rs3746619 e rs3827103 (*MC3R*), pelos percentuais de perda de dados e de frequência de seus homozigotos mutantes estarem muito próximos entre si.

Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas dos 8 PG na amostragem total analisada

<i>Polimorfismo genético</i>	<i>Genótipos</i>	<i>Frequências Genotípicas n, (%)</i>	<i>Alelos</i>	<i>Frequências Alélicas, n, (%)</i>
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	AA	302 (28,7%)	A	1.109 (54,79%) 915 (45,21%)
	GA	505 (47,9%)		
	GG	205 (19,4%)	G	
	<i>missing</i>	42 (4,0%)		
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	TT	534 (50,7%)	T	1.415 (54,55%) 1.179 (45,45%)
	CT	347 (32,9%)		
	CC	83 (7,9%)	C	
	<i>missing</i>	90 (8,5%)		
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	GG	400 (38,0%)	G	1.239 (63,41%) 715 (36,59%)
	GT	439 (41,7%)		
	TT	138 (13,1%)	T	
	<i>missing</i>	77 (7,3%)		
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	CC	615 (58,3%)	C	1.557 (77,54%) 451 (22,46%)
	CA	327 (31,0%)		
	AA	62 (5,9%)	A	
	<i>missing</i>	50 (4,7%)		
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	TT	280 (26,6%)	T	1.003 (58,05%) 725 (41,95%)
	AT	443 (42,0%)		
	AA	141 (13,4%)	A	
	<i>missing</i>	190 (18,0%)		
rs699 ( <i>AGT</i> )	TT	187 (17,7%)	T	911 (44,19%) 1.151 (55,81%)
	CT	537 (50,9%)		
	CC	307 (29,1%)	C	
	<i>missing</i>	23 (2,2%)		
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	TT	378 (35,9%)	T	1.156 (64,22%) 644 (35,78%)
	CT	400 (38,0%)		
	CC	122 (11,6%)	C	
	<i>missing</i>	154 (14,6%)		
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	GG	610 (57,9%)	G	1.499 (77,83%) 427 (22,17%)
	GA	279 (26,5%)		
	AA	74 (7,0%)	A	
	<i>missing</i>	91 (8,6%)		

Fonte: A autora, 2021.

### 3.2 Distribuição dos PG estratificados por variáveis demográficas e clínicas

A distribuição das frequências genóticas dos PG estratificada pelas variáveis demográficas (sexo e cor), antropométricas (IMC e CAbd) e de PA, foi analisada pelo teste do  $\chi^2$  e revelou alguns resultados significativos (Tabela 6, 7 e 8). Nestas análises, indivíduos com baixo peso foram incluídos no grupo de eutróficos, devido ao baixo quantitativo (n=34).

Quanto as distribuições estratificadas pela variável cor (Tabela 6), quatro marcadores apresentaram diferença estatisticamente significativa no perfil de distribuição dos seus genótipos.

Os rs3746619 e rs3827103 do gene *MC3R*, com seus homozigotos selvagens CC e GG mostrou-se mais frequente entre indivíduos brancos comparados aos negros e NB/NP (68,7% vs. 54,8% e 55,3%; 71,4% vs. 54,6% e 58,4%, respectivamente) e seus homozigotos mutantes AA mais frequentes entre indivíduos pretos e NB/NP em comparação aos brancos (6,9% em ambos vs. 5,2%,  $P=0,001$ ; 12,1% e 8,4% vs. 4,7%,  $P<0,0001$ ).

No rs699 (*AGT*), o homozigoto mutante TT mostrou-se mais frequente entre indivíduos brancos do que pretos e NB/NP (20,3% vs. 15,4% e 16,0%) e o homozigoto selvagem CC entre indivíduos pretos (40,7% vs. 26,6%) ( $P=0,001$ ).

No marcador rs1799998 (*CYP11B2*) ( $P=0,018$ ), o homozigoto selvagem TT mostrou-se mais frequente entre indivíduos pretos e NB/NP, comparados aos brancos (49,0% e 45,8% vs. 36,1%) e o homozigoto mutante CC mais frequente entre indivíduos brancos e NB/NP do que os pretos (14,9% e 13,0% vs. 9,9%).

Para as distribuições estratificadas pelo sexo (Tabela 6), somente o marcador rs3827103 (*MC3R*) apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,013$ ), com homozigotos selvagens GG mais frequentes entre indivíduos do sexo feminino (67,4% vs. 58,6%) e o homozigotos variante AA mais frequente entre indivíduos do sexo masculino (9,4% vs. 6,2%).

Tabela 6 – Distribuição das frequências genóticas dos PG estratificadas pelas variáveis demográficas.

PG	Genótipos	Cor da pele			$\chi^2$	P-valor	Sexo		$\chi^2$	P-valor
		Branco, n (%)	Preto, n (%)	NB/NP, n (%)			Masculino, n (%)	Feminino n (%)		
rs1137101 (LEPR)	AA	129 (29,2%)	56 (25,9%)	110 (33,5%)	8,208	0,084	127 (27,5%)	175 (31,8%)	5,743	0,057
	GA	232 (52,5%)	112 (51,9%)	143 (43,5%)			249 (54,0%)	256 (46,5%)		
	GG	81 (18,3%)	48 (22,2%)	75 (22,9%)			85 (18,4%)	120 (21,8%)		
rs17782313 (MC4R)	TT	250 (57,9%)	109 (54,5%)	164 (53,1%)	2,641	0,620	249 (56,0%)	285 (54,9%)	0,147	0,929
	CT	147 (34,0%)	71 (35,5%)	120 (38,8%)			159 (35,7%)	188 (36,2%)		
	CC	35 (8,1%)	20 (10,0%)	25 (8,1%)			37 (8,3%)	46 (8,9%)		
rs1799983 (NOS3)	GG	157 (36,3%)	89 (43,0%)	142 (45,1%)	7,003	0,136	182 (39,7%)	218 (42,0%)	0,863	0,649
	GT	205 (47,5%)	92 (44,4%)	133 (42,2%)			213 (46,5%)	226 (43,5%)		
	TT	70 (16,2%)	26 (12,6%)	40 (12,7%)			63 (13,8%)	75 (14,5%)		
rs3746619 (MC3R)	CC	303 (68,7%)	119 (54,8%)	177 (55,3%)	18,951	<b>0,001</b>	269 (58,1%)	346 (64,0%)	3,695	0,158
	CA	115 (26,1%)	83 (38,2%)	121 (37,8%)			162 (35,0%)	165 (30,5%)		
	AA	23 (5,2%)	15 (6,9%)	22 (6,9%)			32 (6,9%)	30 (5,5%)		
rs9939609 (FTO)	TT	124 (33,3%)	61 (31,8%)	87 (31,3%)	2,926	0,570	119 (30,1%)	161 (34,4%)	3,155	0,206
	AT	185 (49,7%)	96 (50,0%)	153 (55,0%)			216 (54,5%)	227 (48,5%)		
	AA	63 (16,9%)	35 (18,2%)	38 (13,7%)			61 (15,4%)	80 (17,1%)		
rs699 (AGT)	TT	92 (20,3%)	34 (15,4%)	53 (16,0%)	17,587	<b>0,001</b>	84 (17,5%)	103 (18,7%)	5,813	0,055
	CT	243 (53,6%)	97 (43,9%)	183 (55,3%)			269 (55,9%)	268 (48,7%)		
	CC	118 (26,0%)	90 (40,7%)	95 (28,7%)			128 (26,6%)	179 (32,5%)		
rs1799998 (CYP11B2)	TT	140 (36,1%)	94 (49,0%)	137 (45,8%)	11,917	<b>0,018</b>	171 (40,7%)	207 (43,1%)	1,291	0,524
	CT	190 (49,0%)	79 (41,1%)	123 (41,1%)			195 (46,4%)	205 (42,7%)		
	CC	58 (14,9%)	19 (9,9%)	39 (13,0%)			54 (12,9%)	68 (14,2%)		
rs3827103 (MC3R)	GG	302 (71,4%)	113 (54,6%)	181 (58,4%)	25,458	<b>&lt;0,0001</b>	262 (58,6%)	348 (67,4%)	8,753	<b>0,013</b>
	GA	101 (23,9%)	69 (33,3%)	103 (33,2%)			143 (32,0%)	136 (26,4%)		
	AA	20 (4,7%)	25 (12,1%)	26 (8,4%)			42 (9,4%)	32 (6,2%)		

Legenda:NB/NP – não branco/não preto.

Fonte: A autora, 2021.

Quanto às distribuições dos genótipos estratificadas por variáveis antropométricas (Tabela 7), e destacando-se, primeiramente, àquelas realizadas de acordo com a classificação do IMC, somente o marcador rs1799983 (*NOS3*) apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,002$ ), com o homozigoto selvagem GG mostrando-se mais frequente entre indivíduos com excesso de peso, comparado a eutróficos (51,5% sobrepeso e 43,5% obesidade vs. 36,5%) e o homozigoto mutante TT mais frequente entre indivíduos eutróficos do que os com excesso de peso (16,1% vs. 12,0% sobrepeso e 10,5% obesidade).

Já pelo perfil de CAbd (Tabela 7), dois marcadores apresentaram diferenças significativas em suas distribuições. O marcador rs1799983 (*NOS3*), com homozigotos selvagens GG mais frequentes entre indivíduos com CAbd aumentada (45,7% vs. 37,2%,  $P=0,027$ ). O marcador rs1799998 (*CYP11B2*) apresentou homozigotos selvagens TT mais frequentes entre indivíduos com CAbd aumentada (46,1% vs. 38,6%,  $P=0,021$ ).

Tabela 7 – Distribuição das frequências genóticas dos PG estratificados por variáveis antropométricas

PG	Genótipos	IMC			$\chi^2$	P-valor	CAbd		$\chi^2$	P-valor
		Eutrofia, n (%)	Sobrepeso, n (%)	Obesidade, n (%)			Normal, n (%)	Aumentada, n (%)		
rs1137101 (LEPR)	AA	193 (32,1%)	54 (26,5%)	55 (26,7%)	4,052	0,399	176 (31,7%)	126 (27,8%)	2,265	0,322
	GA	288 (47,9%)	110 (53,9%)	106 (51,5%)			274 (49,3%)	229 (50,4%)		
	GG	120 (20,0%)	40 (19,6%)	45 (21,8%)			106 (19,1%)	99 (21,8%)		
rs17782313 (MC4R)	TT	317 (56,1%)	106 (54,1%)	110 (54,5%)	0,839	0,933	283 (54,7%)	249 (56,0%)	0,625	0,732
	CT	201 (35,6%)	74 (37,8%)	72 (35,6%)			186 (36,0%)	161 (36,2%)		
	CC	47 (8,3%)	16 (8,2%)	20 (9,9%)			48 (9,3%)	35 (7,9%)		
rs1799983 (NOS3)	GG	210 (36,5%)	103 (51,5%)	87 (43,5%)	16,743	<b>0,002</b>	199 (37,2%)	201 (45,7%)	7,190	<b>0,027</b>
	GT	273 (47,4%)	73 (36,5%)	92 (46,0%)			255 (47,7%)	182 (41,4%)		
	TT	93 (16,1%)	24 (12,0%)	21 (10,5%)			81 (15,1%)	138 (14,2%)		
rs3746619 (MC3R)	CC	357 (60,8%)	136 (65,1%)	121 (58,5%)	3,541	0,472	342 (59,2%)	289 (63,5%)	4,225	0,121
	CA	189 (32,2%)	64 (30,6%)	74 (35,7%)			182 (33,3%)	145 (31,9%)		
	AA	41 (7,0%)	9 (4,3%)	12 (5,8%)			41 (7,5%)	21 (4,6%)		
rs9939609 (FTO)	TT	161 (32,1%)	61 (33,5%)	58 (32,4%)	5,558	0,235	153 (33,0%)	126 (31,6%)	5,605	0,061
	AT	267 (53,2%)	82 (45,1%)	93 (52,0%)			247 (53,3%)	195 (48,9%)		
	AA	74 (14,7%)	39 (21,4%)	28 (15,6%)			63 (13,6%)	78 (19,5%)		
rs699 (AGT)	TT	111 (18,4%)	34 (16,0%)	42 (19,6%)	3,662	0,454	93 (16,4%)	93 (20,1%)	5,407	0,067
	CT	319 (52,8%)	104 (49,1%)	113 (52,8%)			313 (55,3%)	223 (48,2%)		
	CC	174 (28,8%)	74 (34,9%)	59 (27,6%)			160 (28,3%)	147 (31,7%)		
rs1799998 (CYP11B2)	TT	212 (39,7%)	78 (43,6%)	88 (47,1%)	5,229	0,265	193 (38,6%)	184 (46,1%)	7,751	<b>0,021</b>
	CT	253 (47,4%)	73 (40,8%)	74 (39,6%)			243 (48,6%)	157 (39,3%)		
	CC	69 (12,9%)	28 (15,6%)	25 (13,4%)			64 (12,8%)	58 (14,5%)		
rs3827103 (MC3R)	GG	361 (63,6%)	125 (64,1%)	123 (61,8%)	4,680	0,322	336 (63,3%)	272 (63,3%)	0,053	0,974
	GA	167 (29,4%)	49 (25,1%)	63 (31,7%)			155 (29,2%)	124 (28,8%)		
	AA	40 (7,0%)	21 (10,8%)	13 (6,5%)			40 (7,5%)	34 (7,9%)		

Fonte: A autora, 2021.

Quanto às distribuições estratificadas pelo perfil de PA (Tabela 8), três marcadores apresentaram diferença estatisticamente significativa na distribuição dos seus genótipos. No rs1799983 (*NOS3*), enquanto homozigotos mutante TT mostraram-se similarmente distribuídos, os homozigotos selvagens GG mostraram-se mais frequentes entre indivíduos com PA elevada (51,2% vs. 39,4%,  $P=0,035$ ). No marcador rs3746619 (*MC3R*) ( $P=0,017$ ), os homozigotos selvagens CC mostraram-se mais frequentes entre normotensos (61,9% vs. 57,2%) e o homozigoto mutante AA apresentou-se mais frequente entre indivíduos com PA elevada (11,6% vs. 5,3%). Já para o marcador rs699 (*AGT*), homozigotos mutantes TT mostraram-se mais frequentes entre indivíduos com PA normal (19,5% vs. 9,9%,  $P=0,014$ ).

Tabela 8 – Distribuição das frequências genotípicas dos PG estratificados pelo perfil de PA

<i>PA elevada</i>					
<i>PG</i>	<i>Genótipos</i>	Não, n (%)	Sim, n (%)	$\chi^2$	<i>P-valor</i>
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	AA	257 (29,4%)	45 (32,4%)	0,694	0,707
	GA	440 (50,4%)	65 (46,8%)		
	GG	176 (20,2%)	29 (20,9%)		
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	TT	473 (56,4%)	61 (48,4%)	3,650	0,161
	CT	297 (35,4%)	50 (39,7%)		
	CC	68 (8,1%)	15 (11,9%)		
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	GG	334 (39,4%)	66 (51,2%)	6,732	<b>0,035</b>
	GT	393 (46,3%)	46 (35,7%)		
	TT	121 (14,3%)	17 (13,2%)		
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	CC	536 (61,9%)	79 (57,2%)	8,125	<b>0,017</b>
	CA	284 (32,8%)	43 (31,2%)		
	AA	46 (5,3%)	16 (11,6%)		
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	TT	235 (31,3%)	45 (40,2%)	3,550	0,169
	AT	392 (52,1%)	51 (45,5%)		
	AA	125 (16,6%)	16 (14,3%)		
rs699 ( <i>AGT</i> )	TT	173 (19,5%)	14 (9,9%)	8,497	<b>0,014</b>
	CT	451 (50,7%)	537 (52,1%)		
	CC	265 (29,8%)	42 (29,6%)		
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	TT	323 (41,6%)	55 (44,4%)	1,861	0,394
	CT	343 (44,2%)	57 (46,0%)		
	CC	110 (14,2%)	12 (9,7%)		
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	GG	534 (63,9%)	76 (59,8%)	1,199	0,549
	GA	237 (28,3%)	42 (33,1%)		
	AA	65 (7,8%)	9 (7,1%)		

Fonte: A autora, 2021.

### 3.3 Análise de correlação entre PG e variáveis quantitativas

A variação nos valores médios de IMC, das medidas de CA<sub>bd</sub>, de PAS e de PAD entre os genótipos dos PGs foi analisada pelo *one-way* ANOVA, revelando diferenças significativas em dois marcadores (Tabela 9).

O rs1799983 (*NOS3*) mostrou-se significativamente correlacionado com alterações nos valores médios de IMC, onde homozigotos selvagens GG apresentaram, comparativamente, maiores médias do que heterozigotos GT e estes apresentaram valores considerados equivalentes aos dos homozigotos mutantes TT após teste post-Hoc ( $P=0,020$ ). A mesma diferença significativa foi observada para medidas de CA<sub>bd</sub>, porém ela não se manteve após teste post-Hoc ( $P=0,047$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre genótipos deste marcador quanto às variáveis quantitativas PAS e PAD.

O rs3746619 (*MC3R*) mostrou-se significativamente correlacionado com a variação nos valores médios de PAS, onde homozigotos mutantes AA apresentaram, comparativamente, maiores médias de PAS do que os dos heterozigotos CA e estes apresentaram valores equivalentes aos dos homozigotos selvagens CC após teste post-Hoc ( $P=0,023$ ). As variações nas médias de PAD, IMC e CA<sub>bd</sub> entre genótipos deste marcador não foram significativas.

A variação nos valores médios de IMC, CA<sub>bd</sub>, PAS e PAD não se mostrou significativamente diferente entre os genótipos dos demais SNPs analisados ( $P>0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise *one-way* ANOVA para variáveis quantitativas relacionadas à obesidade e PA entre genótipos

Variável	Média ± DP			F	P	Comparação 2 X 2
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )						
	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,30 ± 4,37	20,71 ± 4,30	20,69 ± 3,98	0.967	0,381	
CAbd (cm)	70,457 ± 10,46	71,19 ± 10,29	71,35 ± 9,37	0.654	0,328	-
PAS (mmHg)	108,73 ± 12,43	109,82 ± 12,20	108,24 ± 12,92	1.444	0,237	
PAD (mmHg)	65,61 ± 29,94	64,05 ± 9,87	63,71 ± 10,87	2.846	0,412	
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )						
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,55 ± 4,00	20,79 ± 4,38	20,98 ± 5,25	0.563	0,570	
CAbd (cm)	71,19 ± 9,82	71,38 ± 10,19	71,46 ± 12,16	0.049	0,952	-
PAS (mmHg)	108,39 ± 11,81	109,38 ± 12,62	111,65 ± 13,24	2.772	0,063	
PAD (mmHg)	64,01 ± 23,06	63,93 ± 10,43	68,10 ± 14,61	1.824	0,162	
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )						
	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,97 ± 4,34	20,46 ± 4,28	19,86 ± 3,84	3.905	<b>0,020</b>	GG > GT = TT
CAbd (cm)	71,98 ± 10,58	70,70 ± 10,04	69,75 ± 9,24	3.065	0,047*	
PAS (mmHg)	109,80 ± 13,00	108,14 ± 11,68	109,67 ± 12,05	2.115	0,121	
PAD (mmHg)	64,02 ± 11,39	64,76 ± 25,08	64,05 ± 10,66	0.185	0,831	
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )						
	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,53 ± 4,12	20,79 ± 4,36	20,23 ± 4,41	0.636	0,530	
CAbd (cm)	71,23 ± 10,05	70,87 ± 9,93	69,90 ± 11,68	0.548	0,578	
PAS (mmHg)	109,17 ± 11,82	108,61 ± 12,73	113,31 ± 15,13	3.788	<b>0,023</b>	AA>CA=CC
PAD (mmHg)	64,75 ± 22,07	63,48 ± 9,65	66,19 ± 14,23	0.801	0,449	

Continua

(Continuação) Tabela 9. Análise *one-way* ANOVA para variáveis quantitativas relacionadas à obesidade e PA entre genótipos.

	rs9939609 ( <i>FTO</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TA</b>	<b>AA</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,72 ± 4,21	20,47 ± 4,16	20,93 ± 4,84	0.697	0,499	
CAbd (cm)	71,17 ± 10,46	70,87 ± 9,76	72,08 ± 10,73	0.762	0,467	-
PAS (mmHg)	109,74 ± 12,90	108,45 ± 12,41	109,65 ± 11,01	1.118	0,327	
PAD (mmHg)	65,75 ± 30,86	63,23 ± 9,68	64,82 ± 9,21	1.526	0,218	
	rs699 ( <i>AGT</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,46 ± 4,30	20,58 ± 4,25	20,74 ± 4,26	0.282	0,754	
CAbd (cm)	71,48 ± 10,28	70,88 ± 10,24	71,09 ± 9,94	0.242	0,785	-
PAS (mmHg)	107,91 ± 11,06	109,49 ± 12,81	109,78 ± 12,30	1.478	0,228	
PAD (mmHg)	62,75 ± 8,78	65,44 ± 23,58	63,50 ± 10,63	1.972	0,140	
	rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,81 ± 4,73	20,31 ± 3,83	20,70 ± 4,05	1.403	0,246	
CAbd (cm)	71,51 ± 11,01	70,27 ± 9,25	71,33 ± 9,39	1.579	0,207	-
PAS (mmHg)	109,69 ± 12,18	109,28 ± 12,61	108,45 ± 13,17	0.458	0,633	
PAD (mmHg)	64,67 ± 10,27	63,53 ± 10,49	64,68 ± 11,90	1.287	0,277	
	rs3827103 ( <i>MC3R</i> )					
	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>GA</b>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,56 ± 4,26	20,58 ± 4,31	20,74 ± 3,62	0.058	0,943	
CAbd (cm)	71,06 ± 10,23	70,90 ± 9,95	70,73 ± 9,68	0.050	0,952	-
PAS (mmHg)	109,25 ± 11,91	108,88 ± 12,80	108,54 ± 12,76	0.168	0,845	
PAD (mmHg)	64,82 ± 22,27	63,12 ± 9,15	61,66 ± 9,45	1.474	0,229	

Legenda: dp: desvio padrão; *F*: Fisher test.

\*Não significante após teste post-Hoc Tukey.

### 3.4 Análises de associação entre PGs, PA elevada e excesso de peso

A regressão logística univariada (Tabela 10) avaliou a associação independente de variáveis clínicas e genéticas com a presença de PA elevada e de obesidade.

As variáveis clínicas IMC (OR=1.084, IC95% [1.044-1.126],  $P<0,001$ ) e CA<sub>Abd</sub> (OR=1.026, IC95% [1.010-1.043]  $P=0,002$ ) representaram fatores independentes significativamente associadas a PA elevada, com contribuição mais acentuada do IMC. Já entre as variáveis genéticas, os alelos mutantes do rs1799983 (*NOS3*) (OR=0.757, IC95% [0.573-1.000],  $P=0,050$ ) e do rs3746619 (*MC3R*) (OR=1.321, IC95% [0.999-1.748],  $P=0,051$ ) apresentaram-se marginalmente associados com PA elevada.

Quanto à presença de S/O, associação independente significativa foi observada para as variáveis clínicas idade (OR=0.791, IC95% [0.723-0.860],  $P<0,001$ ), PAS (OR=1.024, IC95% [1.014-1.035],  $P<0,001$ ), PAD (OR=1.019, IC95% [1.007-1.031],  $P=0,002$ ) e presença de PA elevada (OR=1.546, IC95% [1.084-2.204],  $P=0,016$ ). Quanto às variáveis genéticas, o marcador rs1799983 (*NOS3*) apresentou associação independente negativa (OR=0.713; IC95% [0.590-0.861],  $P<0,001$ ), com seu alelo mutante T exercendo efeito protetor e seu alelo selvagem G contribuindo para obesidade. As demais variáveis clínicas e PG não apresentaram associações significativas com ambas as condições clínicas.

A regressão logística multivariada, ajustada para variáveis clínicas, foi então aplicada para os PGs que mostraram alguma significância estatística ou tendência nas análises anteriores (Tabela 10).

Os polimorfismos rs1799983 (*NOS3*) e rs3746619 (*MC3R*) não mantiveram a associação marginal com a PA elevada, observada anteriormente, quando ajustados pelo IMC (OR=0.761, IC95% [(0.570-1.017)],  $P=0,065$  ; OR=1.307, IC95% [(0.969-1.763)],  $P=0,079$ , respectivamente) (Tabela 10). Por outro lado, o rs1799983 (*NOS3*) manteve sua associação negativa e significativa do alelo de risco T com a ocorrência de obesidade (OR=0.730, IC 95% [0.603-0.885],  $P=0,001$ ), após ajuste pela idade e presença de PA elevada.

Tabela 10 – Modelos de regressão logística uni e multivariada de associação com PA elevada e obesidade

Regressão Logística Univariada						
Variável	PA elevada			Obesidade		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
Idade	1.074	0.954-1.208	0,236	0.791	0.723-0.860	<b>&lt;0,001</b>
Gênero	0.368	0.597-1.211	0,368	0.853	0.667-1.091	0,205
Cor	0.691	0.463-1.031	0,071	1.114	0.806-1.538	0,514
IMC	1.084	1.044-1.126	<b>&lt;0,001</b>	-	-	-
CAbd	1.026	1.010-1.043	<b>0,002</b>	-	-	-
PAS	-	-	-	1.024	1.014-1.035	<b>&lt;0,001</b>
PAD	-	-	-	1.019	1.007-1.031	<b>0,002</b>
PA elevada	-	-	-	1.546	1.084-2.204	<b>0,016</b>
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	0.956	0.740-1.234	0,727	1.136	0.950-1.359	0,162
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	1.307	0.992-1.723	0,057	1.063	0.872-1.294	0,547
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.757	0.573-1.000	<b>0,050</b>	0.713	0.590-0.861	<b>&lt;0,001</b>
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	1.321	0.999-1.748	0,051	0.925	0.752-1.137	0,458
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	0.780	0.579-1.051	0,102	1.065	0.873-1.300	0,533
rs699 ( <i>AGT</i> )	1.226	0.942-1.599	0,129	1.065	0.888-1.278	0,495
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	0.856	0.647-1.134	0,129	0.917	0.756-1.113	0,381
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	1.085	0.813-1.449	0,579	1.056	0.863-1.293	0,596
Regressão Logística Multivariada						
Variável	PA elevada		Variáveis	Obesidade		
	OR (IC 95%)	P		OR (IC 95%)	P	
IMC	1.076 (1.034-1.120)	<b>&lt;0,001</b>	Idade	0.775 (0.709-0.846)	<b>&lt;0,001</b>	
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.761 (0.570-1.017)	0,065	PA elevada	1.584 (1.082-2.320)	<b>0,018</b>	
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	1.307 (0.969-1.763)	0,079	rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.730 (0.603-0.885)	<b>0,001</b>	

Legenda: OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança.

Fonte: A autora, 2021.

## 4 DISCUSSÃO

Este estudo seccional procurou analisar o perfil de distribuição de 8 PGs relacionados ao RCV e sua associação com a presença de PA elevada e obesidade em uma amostra de 1.054 adolescentes brasileiros entre 10 e 15 anos de idade, de ambos os sexos, pertencentes ao ERJ II. Identificamos o alelo mutante A do rs3746619 (T6K) MC3R correlacionado com PAS aumentada e o alelo selvagem G do rs1799983 (G894T) do gene *NOS3* associado com índices aumentados de IMC e maior probabilidade do desenvolvimento de obesidade na presença de PA elevada em indivíduos mais jovens.

Apesar do viés de seleção na amostragem analisada ter influenciado na prevalência de PA elevada, em comparação a população do ERJ II (13,5% vs. 8,4%), este percentual mostra-se condizente com outros estudos pediátricos nacionais, mostrando-se acima do acumulado geral de 8%, mas dentro do intervalo de variação de 2,7% a 20,1%, segundo recentes meta-análises envolvendo adolescentes de 10 a 19 anos<sup>125,126</sup>. Nosso percentual também mostrou-se próximo aos 14% para PA elevada mas acima dos 9% para HA observados tanto na amostra total quanto na região Sudeste, segundo o estudo nacional *ERICA*, envolvendo mais de 73 mil escolares de 12 a 17 anos<sup>39</sup>. Meta-análises de estudos envolvendo diferentes países reportaram percentuais de prevalência significativamente diferentes em um período de 5 anos, como 11,2% para geral acumulada e 7,4% para a América Latina, segundo De Moraes e cols., em 2014<sup>127</sup>; enquanto de Song e cols., em 2019, apontaram acumulado de 4% e de 3,02% para as Américas<sup>128</sup>.

Uma grande heterogeneidade percentual também foi observada entre estudos pediátricos populacionais em diferentes cidades brasileiras e outros países. Dados variaram desde, aproximadamente, 5% entre 456 escolares da cidade de Niterói/RJ<sup>129</sup>, passando por 15% entre 4.609 escolares de Maringá/PR<sup>130</sup>, 1.338 escolares de Maceió/AL<sup>131</sup> e 15.584 crianças e adolescentes norte-americanos<sup>132</sup>, chegando a valores elevados como 17% entre 167 adolescentes no Marrocos<sup>133</sup> e 34% entre 911 crianças de Macaé/RJ<sup>134</sup>. Apesar dessas diferenças percentuais, tanto a amostragem do ERJ II quanto a deste trabalho apresentam similaridade com a maioria destes estudos, no que concerne ao tamanho amostral, as diretrizes norteadoras e ao método de aferição da PA utilizados.

Tal disparidade foi previamente identificada por alguns autores e atribuída ao design dos estudos, principalmente no que se refere ao número de aferições da PA e métodos aplicados (oscilatório ou auscultatório)<sup>125-127,135</sup>. Em acréscimo, atualizações de diretrizes podem alterar valores anteriormente registrados para este grupo com reclassificação de indivíduos, como o aumento percentual de crianças e adolescentes norte-americanas hipertensos após reanálise de dados do *NHANES* seguindo diretrizes atualizadas de 2017 da *American Academy of Pediatrics*<sup>132,136</sup>. Essas divergências reforçam o cuidado necessário na análise deste dado epidemiológico e a importância da padronização de medidas avaliativas afim de melhorar a compreensão dessa patologia nesta faixa etária e a definição de medidas preventivas.

Já a alta prevalência de S/O em nossa amostra, tanto pelo indicador geral (41,4%) quanto pelo de obesidade central (45,2%), indicaram que quase metade dos adolescentes analisados já apresentam excesso de peso, apesar da quase totalidade dos indivíduos praticar algum tipo de atividade física regular. Este índice foi acima da média de 36% estimada para adolescentes de 12 a 19 anos de países da América Latina e Caribe<sup>137</sup>, dos 26% para a região Sudeste no estudo *ERICA*<sup>39</sup> e dos 30% em diferentes cidades no estado do Rio de Janeiro<sup>134,138</sup>. Por outro lado, a prevalência de excesso de peso em nosso estudo foi próxima dos 41,5% em crianças e adolescentes norte-americanos de 2 a 19 anos, no *NHANES* 2017-2018<sup>139</sup> e dos 41,9% em adolescentes marroquinos de 11 a 17 anos<sup>133</sup>.

Ampla variabilidade neste índice também foi detectada entre estudos populacionais em cidades de diferentes regiões brasileiras. Índices de excesso de peso – considerando sobrepeso e obesidade - variaram desde em torno de 11%, entre 1.057 escolares de Porto Velho/RO<sup>140</sup> e 1.253 de Maceió/AL<sup>141</sup>, até 33%, em 364 escolares de Uberaba/MG<sup>142</sup> e 1.927 de Natal/RN<sup>143</sup>. Curiosamente, os trabalhos de Silva e cols.<sup>142</sup> e Brasil e cols.<sup>143</sup>, mesmo utilizando métodos de classificação diferentes (respectivamente z-score e percentil-IMC) em estratos etários desiguais (respectivamente, 5 a 18 anos e 6 a 11 anos), encontraram percentuais altos próximos ao nosso obtido em adolescentes de 10 a 15 anos. Tal heterogeneidade também se estende nos dados epidemiológicos internacionais, tanto entre continentes quanto entre países de uma mesma área geográfica, variando desde 1,7% para meninos na África Subsaariana até 16,8% para meninos na Europa Ocidental<sup>144</sup>. Assim como na HA, disparidades nos percentuais de prevalência de S/O foram atribuídas a variabilidade metodológica dos estudos, principalmente no que se refere aos estratos

etários avaliados, percentis de corte e critérios para definição das condições de obesidade<sup>137</sup>, dificultando a comparação de dados e erros de interpretação.

Por outro lado, o alto percentual obtido em nosso estudo parece refletir a atual epidemia de obesidade observada mundialmente, detectada em idades cada vez mais precoces, independentemente do sexo e etnia/raça. De 1999 a 2016, um aumento linear significativo nos índices de sobrepeso (28,8% para 35,1%) e de todos os tipos de obesidade - classe I (14,6% para 18,5%), classe II (4% para 6%) e classe III (0,9% para 1,9%) - foi detectado em crianças e adolescentes norte-americanas, sobretudo de forma mais acentuada entre hispânicos e afro-americanos não-hispânicos<sup>42,145</sup>. Já no Brasil essas taxas apresentam valores acima dos 20%, na maioria dos estudos e com tendência de crescimento, independentemente do seu design, segundo revisão sistemática de dados brasileiros de 2015<sup>146</sup>, ano em que o país ocupou a 4ª e a 3ª posição no ranking internacional geral de meninas e meninos, respectivamente, com obesidade<sup>144</sup>. Prevalências infanto-juvenis de excesso de peso e de PA elevada em crescimento<sup>128</sup>, independentemente da etnia, faixa etária ou critério de classificação, demonstram a instalação precoce de condições de RCV em indivíduos jovens e reforçam a necessidade de políticas públicas de saúde preventiva desde a primeira infância.

O polimorfismo rs1799983 (G894T) no gene *NOS3*, comumente relacionado a alterações da função endotelial, apresentou, em nossa amostra, apenas tendência de associação com PA elevada (Tabela 10), apesar da distribuição significativamente diferente dos seus genótipos pelo perfil de PA ( $P=0,035$ ). Entretanto, a relação deste marcador com alterações pressóricas mostra-se controversa segundo meta-análise de 60 estudos caso-controle, com ambos alelos G e T associados com HA em diversas etnias e em diferentes modelos genéticos, porém com significativo viés de publicação pela ausência de resultados negativos publicados<sup>147</sup>.

Diferente do nosso estudo, entre os 1.141 adolescentes de 14-16 anos do *European Youth Heart Study*, o genótipo mutante TT contribuiu para aumento de ~2,6mmHg na PAS ( $P=0,015$ ) e de ~2mmHg na PAD ( $P=0,004$ ) somente em homozigose, mesmo em baixa frequência ( $n=87$ , 7,62%)<sup>80</sup>. Frequências genotípicas estratificadas pelo perfil de PA não foram fornecidas para comparações, provavelmente devido a esse baixo quantitativo. Em nossa amostra, entretanto, uma significativa maior prevalência do genótipo selvagem GG foi identificada em

adolescentes com PA elevada (51,2% vs. 39,4%,  $P=0,035$ ) apesar de sua presença não ter sido suficiente para alterar níveis pressóricos como um todo (Tabela 9).

Neste mesmo estudo europeu, foi observado que homozigotos TT que não se deslocavam para escola com bicicleta ou passavam mais tempo em lazer sedentário apresentaram significativamente maiores níveis pressóricos ( $P=0,04$  e  $P=0,0057$  para interação, respectivamente) comparados aos genótipos CT e CC. Já o alto índice de atividade física detectado em nossa amostra ( $n=1.139$ , 92,5%) pode ter contribuído para a não elevação da PA nos adolescentes homozigotos TT. Estes dados sugerem uma contribuição da inatividade física no detrimento da vasodilatação e aumento da PA em portadores deste PG, o que parece corroborar com atividade vasodilatadora alterada por redução na expressão de óxido nítrico em murinos forçadamente inativos, nos quais esse efeito foi revertido com a retomada de atividade física<sup>148</sup>.

Por outro lado, nosso estudo relacionado a adolescentes miscigenados saudáveis apresenta um dado original, visto que os demais estudos pediátricos envolvendo o rs1799983 *NOS3* e PA, na literatura, são majoritariamente do tipo caso-controle que analisaram indivíduos europeus diagnosticadamente hipertensos e com comorbidades e complicações vasculares associadas<sup>149,150</sup>. Tais condições clínicas envolvem diferentes fatores de confusão que podem interferir na relação deste marcador com elevação da PA e produzir resultados conflitantes, como sua não associação com PA elevada e parâmetros oxidativos em um<sup>149</sup> e efeito protetor contra HA no outro<sup>150</sup>.

Já estudos com adultos também mostraram resultados conflitantes na relação do G894T com PA, inclusive a modulação dos seus efeitos genéticos por interações com outros genes e condições alimentares. Assim como em nossa amostra, estudo comparativo caso-controle com 950 espanhóis não identificou o G894T associado com HA controlada ou resistente, além de apresentar distribuição genotípica similar entre todos os grupos clínicos ( $P=0,47$ )<sup>151</sup>. Já em amostra de 384 brasileiros afrodescendentes não-relacionados, genótipos do G894T mostraram similar distribuição entre hipertensos e normotensos, mas sua associação com elevação da PAD ( $P=0,004$ ) decorreu somente através de interação com gene *GRK4*, em modelo estatístico multilocus, enquanto outros SNPs relacionados a HA também não exerceram efeitos genéticos significativos<sup>152</sup>.

Entre 750 espanhóis caucasianos saudáveis, diferentes tipos de gordura provenientes da dieta interagiram com diferentes genótipos do polimorfismo G894T e

modificaram de forma significativa e diferenciada valores de PAS ( $P=0,005$  de interação) e PAD ( $P=0,015$  de interação)<sup>79</sup>. Nesta mesma amostra, IMC elevado em portadores dos genótipos GT+TT, mas não GG, esteve associado com maior PAD ( $P=0,045$  de interação)<sup>79</sup>. Em amostra populacional de 1.577 brasileiros saudáveis, o G894T isolado não influenciou na variação da PA, mas sua interação com triglicérides ( $P=0,03$ ), colesterol total ( $P=0,02$ ) ou colesterol não-HDL ( $P=0,01$ ) determinaram variações na PAS, em modelos ajustados pela etnia<sup>153</sup>. Além disso, neste mesmo estudo, sua significância para o desenvolvimento da HA, na multivariada ajustada, ocorreu somente de forma marginal e na presença de níveis aumentados de colesterol<sup>153</sup>. Estes resultados demonstram que a dimensão do efeito isolado do G894T no contexto multifatorial da hipertensão pode ser pequeno, além de regulado por fatores gênicos e alimentares os quais podem ter atenuado sua ação em nossa amostra, dada sua contribuição marginal na análise univariada e não significativa na multivariada (Tabela 10).

De forma inesperada, o alelo selvagem G do rs1799983 *NOS3* mostrou relação, em nossa amostra, com o excesso de peso, tanto por correlacionar-se com IMC aumentado (Tabela 9) quanto com o risco para desenvolvimento obesidade (Tabela 10). Análise similar em estudo caso-controle com 394 adultos tunisianos, originalmente, identificou o genótipo variante TT mais prevalente em obesos (6,5% vs. 3,3%) e seu alelo T associado a um aumento 2 a 3 vezes maior no risco para obesidade, em diferentes modelos genéticos de herança<sup>154</sup>. Este dado foi parcialmente similar ao nosso, no qual o alelo selvagem G foi o que esteve mais prevalente em obesos classificados tanto pelo IMC quanto pelo diâmetro de CA<sub>bd</sub> (respectivamente 51,5% vs. 36,5% e  $P=0,002$ , 45,7% vs. 37,2% e  $P=0,027$ ; Tabela 7) e associado a um aumento de 71,3% no risco para obesidade de forma independente ( $P<0,001$ ) e de 73% na multivariada ajustada ( $P=0,001$ ). Além disso, no mesmo estudo de Nasr e cols. (2015), a influência do genótipo mutante TT no aumento do IMC decorreu do seu efeito individual ( $P=0,02$ ) e também quando combinado em haplótipo com o genótipo mutante bb do SNP 4a/b do *NOS3*, também avaliado ( $P=0,0004$ )<sup>154</sup>. Já em nossa amostra, homozigotos selvagem GG também se mostraram correlacionados com valores médios de IMC maiores do que portadores dos genótipos GT e TT ( $P=0,02$ , Tabela 9).

Avaliação de SNPs do *NOS3* como biomarcador de obesidade, similar ao estudo de Nasr e cols. (2015) e ao nosso estudo, são escassas enquanto os demais

investigam o papel deste polimorfismo em doenças metabólicas com fenótipo “obeso inflamado”, nos quais seu efeito isolado não foi significativo para o risco de síndrome metabólica (SM) em estudo caso-controle com 242 crianças brasileiras<sup>85</sup> e de DM2 em 14.374 adultos do *The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*<sup>86</sup>. Embora dosagens do ON e seus metabólitos que correlacionem sua produção com este SNP estejam ausentes nestes estudos, por outro lado eles demonstram uma interferência deste PG no papel antiobesogênico desta molécula no metabolismo energético corporal<sup>76</sup>. Estudos experimentais indicaram que níveis reduzidos de óxido nítrico interferiram na dinâmica de captação/liberação de ácidos graxos livres do músculo esquelético em humanos<sup>155</sup> e aumento na taxa de lipólise com liberação de glicerol pelos adipócitos humanos *in vitro*<sup>156</sup>, o que parece favorecer um quadro de dislipidemia e aumento de peso em portadores deste polimorfismo.

Por outro lado, como o ON também é sintetizado nas células musculares<sup>76</sup> e o IMC é um indicador relativo de obesidade que não reflete a composição de gordura corporal, é possível que a observada associação do G894T *NOS3* com excesso de peso, em nosso estudo, esteja relacionada a sua influência na regulação da massa magra. Diferentes estudos clínicos avaliaram uma mesma amostragem de 307 mulheres caucasianas e identificaram o genótipo GG G894T associado com risco 2,26 vezes maior para sarcopenia, pelo critério razão percentual de massa muscular esquelética/massa corporal (OR=2.25, P=0.016) e com menor força muscular (~7.5%, P=0.042), comparados aos genótipos GT e TT<sup>157,158</sup>. Esses escassos estudos em humanos parecem corroborar com resultados em modelos experimentais nos quais o ON promoveu hipertrofia muscular<sup>159</sup>, redução dimensional de adipócitos e níveis séricos de triglicerídeos, glicose e ácidos graxos<sup>160,161</sup>. A congruência destes achados demonstra uma influência potencial deste marcador também na proporção corporal massa magra/massa gorda e direcionam potenciais investigações acerca de variantes do *NOS3* como biomarcadores de obesidade e do peso corporal em outras populações humanas.

Interessante mencionar que os resultados significativos referentes ao G894T, em nossa amostra, relacionam-se ao alelo selvagem G e não ao variante T. Entretanto, outros estudos clínicos envolvendo indivíduos brasileiros também detectaram efeitos nocivos atribuídos a este alelo. O alelo G/genótipo GG mostraram-se mais prevalentes em amostras independentes de adultos com IC<sup>162,163</sup>, associados ao risco do seu desenvolvimento<sup>162</sup> e contribuíram para uma pior sobrevida entre

pacientes afro-brasileiros, de forma isolada ( $P=0,034$ ) e em haplótipo com outros SNPs *NOS3* ( $P=0,043$ )<sup>164</sup>. Apesar dessa particularidade, a proporção alelo G/ alelo T observada em nossa amostra total (63% vs. 36%) foi concordante tanto com a destes estudos quanto com as de grandes populações referência disponibilizada em bancos de dados públicos (HapMap e dbGap), descartando a ocorrência de erros de genotipagem. Logo, acreditamos que esta característica esteja relacionada ao background genético miscigenado, pois este e outros SNPs do *NOS3* apresentam padrão de distribuição de seus alelos altamente variável em populações geneticamente homogêneas<sup>165</sup> e também na brasileira<sup>166</sup>, a qual apresenta grande variabilidade em nível individual nas proporções de ancestralidade genética<sup>167</sup>.

O PG rs699 (M235T) no gene *AGT*, em nossa amostra, não mostrou relação com elevação da PA ou alteração de suas variáveis quantitativas, apesar da significativa maior prevalência do genótipo variante TT em normotensos (19,5% vs. 9,9%,  $P=0,014$ , Tabela 8). Este dado divergiu de estudo longitudinal com 213 crianças norte-americanas caucasianas e afro-americanas, no qual os genótipos CT e TT mostraram associação com aumento de 2 e 4 mmHg, respectivamente, nas médias de PAS ( $P=0,03$ ) em ambas as etnias e com níveis elevados de AGT plasmático somente em caucasianos ( $P=0,02$ )<sup>66</sup>. Nosso dado divergiu também de estudo caso-controle com 175 adolescentes argentinos, onde o alelo variante T esteve associado com maior z-score da PAS em meninos hipertensos ( $P<0,02$ ), porém sua associação com HA foi significativa somente em hipertensos e em haplótipo com outros SNPs relacionados ao SRAA ( $P<0,03$ )<sup>168</sup>.

Por outro lado, nossos dados mostraram-se parcialmente concordantes com estudo seccional de 709 adolescentes europeus saudáveis, no qual o rs699 mostrou frequência genotípica similar entre indivíduos estratificados por gêneros e pelo perfil pressórico e sua presença não influenciou em variáveis pressóricas e no risco para HA<sup>169</sup>. Apesar da ausência de análises estratificadas por gênero, nosso estudo parece corroborar com tais resultados, sugerindo uma não relevância do rs699 (M235T) como biomarcador de HA em jovens saudáveis de diferentes etnias, um dado importante considerando a escassez de estudos relacionados a este marcador e HA em populações pediátricas.

Já em adultos, a relação do rs699 (M235T) com elevação da PA demonstrou resultados controversos em diferentes populações. Em estudo familiar caso-controle envolvendo 215 pares de irmãos dos Estados Unidos e da França, o alelo variante T

mostrou associação com AGT plasmático aumentado ( $P < 0,0001$ ) e maior prevalência em hipertensos (47% vs. 36% controles,  $P < 0,001$ ), principalmente entre os casos mais severos (51% vs. 36% controles,  $P < 0,001$ )<sup>65</sup>. Além disso, este SNP foi detectado em *linkage* com o T174M, outro SNP do mesmo gene, e ambos, em haplótipo, também mostraram maior prevalência em hipertensos totais (14% vs. 9% controles,  $P = 0,02$ )<sup>65</sup>. Estudo de replicação em larga-escala com mais de 19.000 japoneses detectou o alelo selvagem C associado com aumento de 0.78mmHg na PAS ( $P = 0,002$ ) e 0.49mmHg na PAD ( $P = 0,001$ ), porém marginalmente com HA (OR=1.09,  $P = 0,033$ )<sup>170</sup>. Outro estudo caso-controle analisou 715 brasileiros e identificou frequência aumentada do genótipo TT/alelo T em hipertensos (32% vs. 19.8%,  $P = 0,038$ ; 54.7% vs. 46.4%;  $P = 0,031$ , respectivamente) e sua associação para HA (OR=1.8;  $P = 0,028$ ) em caucasianos, mas não em afrodescendentes<sup>67</sup>. Já em estudo caso-controle europeu, que analisou 1.358 indivíduos, o genótipo variante TT apresentou frequência aumentada de forma não significativa em controles (4.6% vs. 2.7%) e diminuiu em 48% o risco associado a hipertensão (OR=0.52,  $P = 0,034$ )<sup>171</sup>.

Uma vez que dosagens de AGT sérico não foram realizadas na maioria destes estudos e sua síntese é regulada por diversos elementos biológicos<sup>62</sup>, estes resultados demonstram que alterações na PA podem não estar relacionadas a presença do rs699 (M235T) ou angiotensinogênio plasmático elevado, mas sim com outros componentes envolvidos na fisiologia renal que regulam a absorção da água e sódio, como a enzima renina, cuja atividade mostra-se reduzida em indivíduos negros comparados aos brancos<sup>58</sup>.

Outro dado interessante observado para o rs699, em nossa amostra, foi a maior prevalência do seu genótipo variante TT em indivíduos brancos (20,3% vs. 15,4% negros vs. 16% NB/NP,  $P = 0,001$ , Tabela 6), o qual divergiu do estudo de Bloem e cols., no qual foi identificada frequência aumentada deste genótipo e seu alelo T em crianças afro-americanas (65% e 81% vs. 18% e 41% em brancas,  $P < 0,0001$  respectivamente)<sup>66</sup>, mas concordou com o perfil observado no de Bomfim-Silva e cols.; onde, embora de forma não significativa, o genótipo TT e alelo T esteve mais prevalente em Cáucaso-brasileiros (56% e 59% vs. 43% e 41% em afro-brasileiros, respectivamente)<sup>67</sup>.

Estes achados parecem indicar uma influência étnica na distribuição alélica deste marcador e, por consequência, nos seus efeitos associados. Um estudo comparativo norte-americano observou uma frequência discretamente menor, porém

não significativa, do alelo T e do genótipo TT do M235T em adultos afro-americanos nativos comparados aos nascidos na África (82% vs. 91%; 67% vs. 83%, respectivamente)<sup>172</sup>. No entanto, essa diferença não influenciou em alterações da PA, renina e prevalência de hipertensão com base no perfil étnico. Assim como observado no PG do *NOS3*, esse perfil genotípico de distribuição pareceu resultar do background genético miscigenado da nossa amostra, na qual uma frequência reduzida do alelo T, em função da miscigenação, pode ter atenuado o efeito do M235T na PA, diminuindo sua relevância como biomarcador de HA.

A variante rs1799998 c.-344T>C (*CYP11B2*) também não demonstrou relação, em nossa amostra, com alterações pressóricas ou risco para elevação da PA (Tabela 9 e 10). Parcialmente similar com nossos resultados, no mesmo estudo pediátrico argentino de Porto e cols., o rs1799998 apresentou frequência similar entre adolescentes normotensos e hipertensos e não contribuiu de forma isolada com variações da PA, porém demonstrou significância para HA quando combinado com outros 5 SNPs do RAAS, em diferentes haplótipos ( $P < 0,03$ )<sup>168</sup>. Em nosso estudo, a distribuição genotípica deste SNP também foi similar entre grupos estratificados pelo perfil de PA (Tabela 8), mas não acreditamos que sua combinação com demais PGs avaliados modificaria sua não significância na amostra como um todo. Apesar disso, nossos resultados referentes a adolescentes brasileiros saudáveis representam dados originais, considerando a escassez de estudos pediátricos envolvendo esta variante e PA elevada sem causas secundárias (como hiperaldosteronismo), o que pode sugerir sua não relevância como biomarcador desta patologia em jovens saudáveis.

Por outro lado, nos diferentes estudos com adultos, este marcador apresentou relação controversa entre seus alelos, PA e inclusive com aldosterona plasmática. Divergente do nosso estudo, nas diferentes coortes populacionais japonesas do mesmo estudo de Takeuchi e cols., o genótipo selvagem TT mostrou significativa associação com HA (OR=1.15 e  $P=2.3 \times 10^{-5}$ ) e aumento de 0.91mmHg na PAS ( $P=1,5 \times 10^{-5}$ ) e de 0.53mmHg na PAD ( $P=1,8 \times 10^{-5}$ )<sup>170</sup>. Em 1.392 indivíduos oriundos de 3 países europeus avaliados para fatores de RCV no *IMMIDIET Study*, o alelo C foi o que demonstrou associação com maiores níveis pressóricos (+ 2,9mmHg na PAS,  $P=0,026$ ; + 1,7mmHg na PAD,  $P=0,056$ ) e aumento no risco para HA (OR=2.09,  $P=0,038$ ) em homens com menos de 47 anos de idade principalmente<sup>73</sup>.

Em coortes multiétnicas e miscigenadas, como a nossa, este marcador também apresentou comportamentos discrepantes. Concordante com nossos achados, na coorte multiétnica de 3.452 indivíduos do *Dallas Heart Study*, portadores de alta prevalência de HA, variações nos níveis pressóricos, aldosterona plasmática e outros índices metabólicos não se mostraram-associadas ao rs1799998 em afro-americanos, hispânicos e caucasianos<sup>173</sup>. Em estudo seccional multiétnico envolvendo 1.313 residentes, no Reino Unido, portadores do alelo T apresentaram aumento de 3.7mmHg na PAS ( $P=0,03$ ), de 2.1mmHg na PAD ( $P=0,045$ ) e de 41pmol/L na aldosterona plasmática ( $P=0,042$ ), independentemente da etnia<sup>72</sup>. Entretanto, análises do risco associado para HA na amostra total ou estratificadas por etnia, para comparações, não foram realizadas neste estudo. Já entre 340 brasileiros avaliados em estudo caso-controle, apesar da frequência aumentada do alelo T/genótipo TT em hipertensos controlados ( $P=0,009$  e  $P=0,022$ , respectivamente) e resistentes ( $P=0,017$  e  $P=0,044$ , respectivamente), estas não influenciaram em variações da PA, aldosterona, renina e cortisol<sup>174</sup>. Em parcial concordância com este estudo, o genótipo TT também apresentou frequência aumentada em nossos adolescentes com PA elevada (44.4% vs. 41.6%), porém de forma não significativa e sem efeito suficiente para alterar significativamente seus valores pressóricos (Tabela 9).

Em conjunto, estes resultados demonstram que a influência do rs1799998 na PA e até mesmo na produção da aldosterona, ainda é inconsistente em humanos, o que corrobora com estudo *in vitro* no qual níveis de expressão gênica deste hormônio mostraram-se similares na presença tanto do alelo T quanto C<sup>175</sup>. Ademais, estudo seccional que avaliou 1.575 adultos chineses identificou que o alto consumo de álcool aumentou de 1,2 a 3 vezes o risco para HA ( $P=0,048$  de interação ajustado) nos portadores dos genótipos TT (OR=3.0,  $P=0,002$ ) e CT, (OR=2.9,  $P=0,002$ )<sup>176</sup>. Em outro estudo relacionado à esta mesma amostragem, a condição de excesso de peso modificou significativamente o risco associado dos genótipos CT e TT com PAD aumentada, com base tanto no IMC (+3,7mmHg,  $P=0,023$ ) como na CAbd (+3,9mmHg,  $P=0,020$ ) na análise multivariada ajustada<sup>177</sup>. Juntos, esses dados reforçam o caráter multifatorial da condição hipertensiva na qual diferentes fatores comportamentais ou comorbidades podem modular a influência genética do marcador rs1799998 (*CYP11B2*).

Assim como outros PGs avaliados, o rs1799998 (*CYP11B2*), em nosso estudo, apresentou diferenças na distribuição genotípica com relação a cor com uma maior

prevalência do homozigoto selvagem TT em indivíduos negros e NB/NP (respectivamente 49% e 45,8% vs. 36,1% brancos,  $P=0,018$ , Tabela 6). Nos estudos com coortes multirraciais mencionados acima estas diferenças também foram identificadas, com frequência aumentada do alelo T e do genótipo TT em afro-americanos (78% e 59,7% respectivamente) comparados a hispânicos (59% e 34,2%) e caucasianos (54% e 30,2%), no estudo de Byrd e cols.<sup>173</sup>; e em africanos (79% e 62,1%), em comparação com brancos (55% e 31,1%) e asiáticos (56% e 31,7%), no estudo de Barbato e cols.<sup>72</sup>, a despeito dos resultados de associação clínica.

Apesar da ausência de análises de ancestralidade genética que confirmassem um perfil ancestral africano em nossos indivíduos negros e NB/NP, nossos dados parecem corroborar com achados acima, indicando uma variabilidade interétnica na frequência desta variante que pode influenciar em suas associações com o risco para HA em diferentes etnias, além das já mencionadas diferenças na fisiologia renal de regulação de água e eletrólitos<sup>58</sup>.

Interessantemente, o marcador rs1799998 (*CYP11B2*) também apresentou, em nossa amostra, distribuição genotípica significativamente diferente pelo perfil de obesidade central, mas não geral, com maior prevalência do genótipo TT em indivíduos com CA<sub>abd</sub> aumentada (46,1% vs. 38,6%,  $P=0,021$ ; Tabela 7). Estudo caso-controle, que avaliou 2.163 crianças coreanas para 11 SNPs relacionados ao balanço hidroeletrólítico, identificou risco 14 a 15 vezes maior para obesidade em meninas homozigotas CC rs1799998 (*CYP11B2*), pela interação com ingestão moderada, mas não aumentada de sódio<sup>178</sup>. Entretanto, este resultado pode ter sido enviesado, uma vez que o próprio autor menciona que efeitos de aumento ou diminuição no risco atribuídos às diferentes variantes genéticas variaram conforme o parâmetro antropométrico de classificação utilizado (IMC, CA<sub>abd</sub> ou outros).

Não identificamos demais estudos pediátricos que analisaram a relação deste SNP com obesidade e seus caracteres para comparações, o que destaca a originalidade de nossos achados, enquanto nos escassos estudos com adultos essa correlação também foi confirmada. Na mesma amostra populacional de adultos do *IMMIDIET*, o genótipo CC apresentou frequência aumentada em homens com SM (32,7% vs. 24,2% CT vs. 17,3% TT,  $P=0,002$ ), nos quais apresentou OR de 2.25 e maior prevalência de obesidade abdominal (61% vs. 53.4% TT, não significativa)<sup>179</sup>. Em outro estudo populacional, com 1.358 adultos europeus, a prevalência de HA, valores de IMC e da razão renina-aldosterona não diferiu de forma significativa entre

genótipos; porém o genótipo homocigoto CC, comparado aos demais, demonstrou correlação com maiores espessuras de dobras cutâneas de tríceps e subescapular na amostra total ( $P=0,003$  e  $P=0,037$ , respectivamente) e em mulheres ( $P=0,03$  e  $P=0,015$ , respectivamente)<sup>180</sup>. Em nosso estudo, apesar da frequência significativamente aumentada do genótipo TT em obesos com CAbd aumentada, seu efeito não foi suficiente para modificar essa medida de adiposidade ou o risco associado para obesidade (Tabela 9 e 10).

Embora o papel da aldosterona seja comumente investigado com relação ao controle pressórico e absorção de sódio, todos estes resultados sugerem alguma relação do *CYP11B2* e seu PG com a gordura intra-abdominal e não a massa corporal. O possível mecanismo fisiológico desta relação foi explorado em estudos *in vitro*, nos quais a aldosterona, através de receptores mineralocorticoides, estimulou em adipócitos humanos processos de diferenciação celular (adipogênese) e a síntese de seus marcadores específicos de conversão (como adiponectina e leptina) e reguladores transcricionais<sup>181</sup>. Já outro estudo *in vitro* recente identificou, em células adrenais de murinos e humanas, que a expressão gênica do *CYP11B2* e a síntese de aldosterona plasmática foram aumentadas de forma dose-dependente pela leptina, sem interferência da angiotensina II, o principal regulador da síntese de aldosterona pelo SRAA<sup>182</sup>. A existência de um eixo parácrino de comunicação tecido adiposo-adrenais, sugerido por estes estudos, poderia justificar uma associação de PGs no *CYP11B2* com parâmetros de adiposidade aumentados. Entretanto, esse mecanismo biológico ainda não replicado em humanos requer mais estudos principalmente no contexto da obesidade comum.

Dentre os PG investigados para relações com o excesso de peso, as variantes rs3746619 (T6K) e rs3827103 (V81I) do gene *MC3R*, comumente encontradas em desequilíbrio de ligação (geneticamente ligadas) por situarem-se muito próximas entre si na sequência gênica (distantes 224pb), são majoritariamente investigadas como um haplótipo de risco para obesidade. Apesar do nosso estudo ter avaliado individualmente estas variantes, ambas não demonstraram relação significativa com obesidade (Tabela 10) ou variação de seus caracteres quantitativos (Tabela 9) em nossa amostra. Nossos achados contrastaram com os observados em amostragens caso-controle independentes de crianças e adolescentes norte-americanas, onde o genótipo variante AA de ambos SNPs em homocigose dupla apresentou significativa correlação com maiores valores de IMC, CAbd e percentual de gordura corporal

( $P < 0,001$  em todos)<sup>102,104</sup>. Além disso, Feng e cols. detectaram esse haplótipo de risco exclusivamente em indivíduos com sobrepeso ou obesos, apesar de sua baixa frequência ( $n=29$ )<sup>102</sup>, enquanto Savastano e cols. não realizaram análise similar<sup>104</sup>.

Em coortes pediátricas asiáticas também foram observados resultados positivos, onde a presença deste haplótipo esteve associada ao aumento progressivo do percentual de gordura ( $P < 0,001$ ) e de leptina sérica ( $P < 0,001$ ) em amostra caso-controle de 201 crianças com obesidade severa precoce<sup>103</sup>, enquanto em outra coorte de 1.090 crianças cada alelo variante A apresentou correlação com aumento longitudinal do IMC ( $P=0,025$ ), dobras cutâneas do tríceps ( $P=0,007$ ) e subescapular ( $P=0,002$ ) e no risco para obesidade (OR=1.58, IC95% [1.10-2.28],  $P=0,014$ )<sup>183</sup>. Apesar de não avaliadas como um haplótipo, homozigotos mutantes AA do T6K e V81I apresentaram baixa frequência em nossa amostra total (Tabela 5), tal como sua combinação em haplótipo nos estudos acima. No entanto, diferentemente destes estudos, a presença dessas variantes não promoveu modificações significativas nas medidas antropométricas avaliadas (Tabela 9).

Concordante com nossos resultados, em uma coorte de 229 crianças obesas chilenas, o T6K e V81I não exerceram efeitos significativos na variação dos indicadores IMC e CA<sub>abd</sub> e apresentaram apenas tendência de associação com obesidade somente em haplótipo com outros dois SNPs do *MC3R* ( $P=0,06$ )<sup>184</sup>. Já entre 431 adolescentes escolares sul-africanos, avaliados em estudo seccional, ambas as variantes exerceram efeito protetor promovendo individualmente significativa diminuição de indicadores antropométricos como peso, IMC, circunferência de quadril e abdominal em indivíduos miscigenados, mas não negros<sup>185</sup>.

Os efeitos controversos atribuídos aos SNPs rs3746619 (T6K) e rs3827103 (V81I), do gene *MC3R*, na regulação de medidas corporais observados em crianças e adolescentes também foram identificados em adultos de diferentes populações. Em amostra de conveniência composta por 237 afro-americanos saudáveis, portadores de homozigose dupla AA+AA, comparados aos demais genótipos, apresentaram maiores valores de IMC ( $P=0,039$ ), massa gorda ( $P=0,031$ ) e percentual de gordura corporal ( $P=0,012$ ) porém reduzido percentual de massa magra ( $P=0,012$ )<sup>186</sup>. Estudo caso-controle, que avaliou 1.008 obesos europeus caucasianos, identificou genótipos da variante rs3746619 (T6K) similarmente distribuídos entre casos e controles e sua presença não esteve associada com risco para obesidade e variações significativas

do IMC, CA<sub>abd</sub>, gordura visceral e gordura subcutânea ( $P > 0,05$  para todos), em modelos de regressão corrigidos<sup>187</sup>.

Como observado, a dimensão dos efeitos do rs3746619 (T6K) e rs3827103 (V81I) nas medidas corporais em humanos ainda não é bem definida, o que corrobora com estudos *in vitro* nos quais a presença dessas variantes não só promoveu apenas perda parcial na funcionalidade dos receptores MC3 como também produziu efeitos conflitantes quanto à sua afinidade de ligação pelo  $\alpha$ -MSH e expressão na superfície celular, que mostraram-se inalteradas em um estudo<sup>103</sup> e diminuídas em outro<sup>102</sup>. Tais achados funcionais controversos, somados a um fenótipo obeso leve relacionado a deleção do gene *MC3R* em animais experimentais<sup>97,98</sup>, apontam para uma incerteza na ação efetiva desses polimorfismos em promover significativas alterações em medidas antropométricas, ressaltando a necessidade de mais estudos que elucidem esta relação em outras populações humanas.

Ademais, os SNPs rs3746619 (T6K) e rs3827103 (V81I) apresentaram, em nossa amostra, distribuição de genótipos diferenciada de acordo com a cor da pele (Tabela 6). O genótipo variante AA do T6K apresentou frequência aumentada em indivíduos negros e NB/NP (6,9% em ambos vs. 5,2% em brancos,  $P = 0,001$ ), enquanto o mesmo genótipo variante do V81I foi 2 a 3 vezes mais frequente em indivíduos não-brancos do que em brancos (12,1% negros vs. 8,4% NB/NP vs. 4,7% brancos,  $P < 0,0001$ ). Nossos dados acompanharam outros estudos relacionados a obesidade que avaliaram amostragens multiétnicas e detectaram maiores prevalências dos genótipos/alelos variantes em jovens afro-americanos, frente aos caucasianos ( $p < 0,05$  em ambos estudos)<sup>102,104</sup>, e em adolescentes sul-africanos negros frente aos miscigenados ( $P < 0,0001$  para ambos) – o que inclusive inviabilizou a realização de análises estratificadas por etnia.<sup>185</sup>

Diferenças inter-raciais na distribuição alélica/genotípica destas variantes apontam a etnia como um fator de confusão na relação destes polimorfismos com indicadores de adiposidade, os quais podem resultar em falsas associações por estratificação populacional<sup>49</sup>. Frente a esse caráter populacional, Yoshiuchi analisou dados públicos de frequência alélica destes PG em grandes grupos populacionais e detectou evidências de seleção natural positiva para variantes do gene *MC3R* na população africana, mas não na europeia e asiática<sup>188</sup>. Segundo o autor, uma vez envolvidos na regulação do peso e gordura corporais, este gene e suas variantes genéticas podem ter sido selecionados como uma adaptação humana que garantisse

reservas energéticas durante os ciclos de abundância/escassez alimentar. Logo, esse achado parece apontar que a contribuição de marcadores do *MC3R* (e possivelmente outros marcadores e genes relacionados ao peso corporal) na susceptibilidade para obesidade é dependente do grupo populacional avaliado, como reflexo de traços evolutivos. Entretanto, somente análises de ancestralidade genética nos adolescentes negros portadores destas variantes, em nossa amostra, poderiam confirmar tal correlação, uma vez que na população miscigenada brasileira traços fenotípicos nem sempre correspondem com o background genético ancestral<sup>167</sup>.

Inesperadamente, o rs3827103 (V81I) *MC3R* apresentou diferença significativa na distribuição de seus genótipos entre gêneros, com maior prevalência do seu alelo variante A entre meninos (9.4% vs. 6.2%,  $P=0,013$ , Tabela 6). Inicialmente, acreditamos que este achado fosse um dado espúrio, considerando os percentuais muito próximos de homozigotos variante AA na amostra total e *missing data* (7% e 8,6%, respectivamente), uma proporção geral de gêneros relativamente equilibrada e similar com a da população do ERJ II (46,5% de meninos e 53,5% de meninas vs. 44,30% de meninos e 55,70% de meninas) e a ausência de significância clínica em nosso estudo.

Entretanto, no mesmo estudo pediátrico chileno de Obregon e cols., um dos poucos com dados estratificados por gênero, avaliou-se a relação entre comportamentos alimentares e SNPs *MC3R*, tendo sido observadas diferenças intergênero relacionadas aos genótipos<sup>184</sup>. Neste estudo, apesar de não associados com obesidade ou seus indicadores antropométricos, os alelos variantes A do rs3746619 e do rs3827103 apresentaram-se em maior frequência em meninos ( $n=11$  vs. 8 em meninas;  $n=11$  vs. 7 meninas, respectivamente) e, neles, estiveram associados a menores escores de “alimentação emocional” ( $P=0,01$  para ambos)<sup>184</sup>. Segundo o próprio autor, este achado resultaria da presença de receptores MC3 na região do sistema límbico regulador das respostas motivacionais relacionadas a alimentação, o que parece corroborar com estudos experimentais nos quais estes receptores estavam expressos em quase 1/3 dos neurônios relacionados à recompensa e fêmeas mas não machos *knockout MC3R* apresentaram níveis de dopamina diminuídos ( $P<0,05$ ) e alterações nas preferências de sabor<sup>189</sup>. A relação entre comportamentos alimentares e SNPs *MC3R* ainda não é bem explorada em seres humanos, sendo avaliada de forma subjetiva por questionários, porém, apesar

de não ser o foco de nosso estudo, podemos apenas especular que as diferenças intergênero observadas em nossa amostra assemelham-se aos achados acima.

Outro dado inesperado em nosso estudo foi a correlação entre a variante rs3746619 *MC3R* e PA, tanto por diferenças na sua distribuição genotípica pelo perfil de PA (Tabela 8) quanto por sua influência na variação média de PAS (Tabela 9). Influência similar foi observada no mesmo estudo pediátrico sul-africano de Yako e cols., no qual o T6K demonstrou associação com redução de 2,49mmHg na PAS e de 2,08mmHg na PAD de forma isolada ( $P=0,046$  e  $P=0,021$ , respectivamente) em adolescentes miscigenados, mas não negros<sup>185</sup>. Entretanto, as frequências genotípicas estratificadas por status clínico não foram fornecidas em função de acentuadas diferenças interétnicas na distribuição dos seus alelos. Em nossa amostra, entretanto, o genótipo variante AA apresentou frequência aumentada em hipertensos (11.6% vs. 5.3%,  $P=0,017$ , Tabela 8) e esteve correlacionado com valores médios de PAS quase 4mmHg maiores do que heterozigotos CA e homozigotos CC, segundo ANOVA corrigida ( $P=0,023$ , Tabela 9). Em concordância com nossos achados, estudo caso-controle, originalmente, avaliou 332 kuwaitianos adultos para HA e variantes nos genes *LEP*, *MC3R* e *MC4R* e detectou significativa associação da PAS com o alelo variante A do rs3746619 não isoladamente, mas em haplótipo com alelo variante A do rs3827103, em modelos de regressão múltipla ajustados ( $P=0,005$  para todos)<sup>190</sup>.

Estudos que avaliaram essa incomum influência de SNPs *MC3R* nos níveis pressóricos são escassos e seus resultados divergentes demonstram que essa relação em humanos ainda não é bem definida, porém seu mecanismo fisiológico investigado em estudos experimentais sugeriu o envolvimento deste receptor na regulação da concentração de sódio. A melanocortina- $\gamma$ , através de receptores MC3 no aparelho renal, exerceu função natriurética de aumentar a excreção de sódio em modelos murinos sob dieta hipersódica<sup>191</sup>, porém, animais *knockout MC3R*, sob a mesma dieta, desenvolveram fenótipo hipertenso, o qual não foi corrigido mesmo com a infusão exógena deste hormônio<sup>192</sup>. Essa regulação alternativa da PA via receptores MC3, ainda não foi replicada em humanos e deve ser melhor explorada em futuros estudos, porém podemos especular que uma dieta rica em sódio (especialmente pelos processados e *fast-foods*), adotada principalmente por adolescentes, pode ter contribuído para a elevação da PA nos indivíduos homozigotos variante AA rs3746619 *MC3R*, em nosso estudo.

Quanto ao significativo desvio no EHW apresentado pelo marcador rs3827103 *MC3R*, foi um dado inesperado que nos pareceu resultante do percentual de *missing data* muito próximo ao de homozigotos AA genotipados (8,6% vs. 7%, Tabela 5) ou erros de genotipagem, como sugerido por Fardo e colaboradores<sup>193</sup>. Entretanto, foi apontado pelo software de análise como causa deste desvio a perda de heteroziguidade, ou seja, diminuição no percentual esperado de heterozigotos em função de quantitativo reduzido de um de seus alelos. Com base nisso, ao investigarmos a região genômica do rs3827103 foi detectada a presença adjacente de um polimorfismo de deleção de até 5 nucleotídeos T (rs1230374156), o qual pode ter deletado, de forma natural, algumas cópias do alelo A em alguns indivíduos. Além de falha humana e nas reações de tipagem, a presença de sítios de inserção/deleção adjacentes a um SNP de interesse, bem como estratificação populacional por processos de miscigenação, são condições biológicas previamente reportadas como causadoras deste tipo de desvio<sup>194,195</sup>.

Já o polimorfismo rs1137101 (Q233R), do gene *LEPR*, não apresentou, em nosso estudo, qualquer relação com excesso de peso e variação de seus indicadores quantitativos (Tabela 9 e 10). Nosso dado divergiu de estudo caso-controle que avaliou 294 crianças sauditas, no qual o alelo variante G esteve associado a um aumento 2 vezes maior no risco para obesidade (OR=2.45, P=0,045), apresentou frequência aumentada em obesos (53,6% vs 28,6%, P<0,001) e neles aumentou significativamente o IMC, CAbd, e leptina<sup>94</sup>. No *GENYAL Study*, que avaliou longitudinalmente 221 crianças espanholas para 11 SNPs relacionados com IMC, o Q223R esteve associado com ganho de peso corporal (P=0,012) e variação nas medidas de CAbd (P=0,010) ao longo dos dois anos de acompanhamento<sup>196</sup>. Em nosso estudo, a frequência do genótipo GG em obesos pelo IMC foi discretamente maior, mas não de forma significativa (21,8% vs. 20,0%, P=0,399; Tabela 7) que promovesse alterações em medidas antropométricas.

Assim como observado em nossa amostra, análise seccional em 990 adolescentes sul-africanos, do longitudinal *Bt20 Study*, para 44 SNPs relacionados a obesidade, não identificou o Q223R ou as outras 39 variantes contribuindo de forma individual ou em haplótipo para alterações do IMC<sup>197</sup>. De forma contrastante, em coorte seccional de 773 crianças portuguesas, o Q223R exerceu efeito protetor porém fraco, com genótipo variante GG correlacionado com redução de 0,48kg /m<sup>2</sup> no IMC

da amostra total, assim como com menor IMC e percentual de gordura corporal em indivíduos magros, mas não em obesos<sup>111</sup>.

Estes resultados demonstram uma relação controversa do Q223R com alterações de parâmetros antropométricos em populações pediátricas, a qual também foi observada em estudos com adultos. Em estudo caso-controle envolvendo 200 chilenos, o genótipo variante GG esteve associado com redução de  $\sim 2,44\text{kg/m}^2$  no IMC ( $P=0,031$ ) e, de forma não significativa após correção, com o risco para obesidade ( $OR=0.26$ ,  $P=0,018$ ) e para SM ( $OR=0.36$ ,  $P=0,034$ )<sup>198</sup>. Em 326 brasileiros eurodescendentes, o genótipo variante GG esteve correlacionado com aumento de 4,86cm na CAbd ( $P<0,001$ ) e no risco para obesidade ( $OR=2.14$ ,  $P=0,047$ ), ademais sua combinação em haplótipo com outros 2 SNPs do *LEPR* acentuou este efeito nos mesmos parâmetros e também no IMC ( $P<0,05$ )<sup>199</sup>. Já Bender e cols. avaliaram amostra de 1.684 europeus saudáveis do *CoLaus Study* e também 52 estudos caso-controle, e não identificaram, em ambas as análises, uma contribuição significativa do Q223R com variações do IMC, CAbd ou leptina sérica<sup>200</sup>. Este estudo também identificou uma significativa heterogeneidade na distribuição de SNPs do *LEPR* entre etnias, onde a frequência do alelo mutante G do Q223R em caucasianos, além de reduzida, apresentou um gradiente de distribuição decrescente sentido hemisférios norte-sul, entre os grupos europeus, o qual foi atribuído a movimentos migratórios humanos, seleção natural e estratificação populacional<sup>200</sup>.

Juntos, estes achados parecem indicar que o efeito do Q223R na modificação de medidas corporais que favoreçam o desenvolvimento da obesidade, pode ser influenciado pela etnia, envolvendo diferenças no background genético devido a distribuição heterogênea de seu alelo variante. Embora a ancestralidade genética não tenha sido avaliada por limitações técnicas, a ancestralidade europeia tende a predominar na população brasileira e na do Rio de Janeiro<sup>201,202</sup>, o que poderia corroborar com a ausência de associação em nossa amostra.

Assim como na hipertensão, estudos de interação relacionados a obesidade avaliaram a influência de interações genéticas e ambientais no efeito do Q223R sobre parâmetros antropométricos. No mesmo *GENYAL Study*, a interação com atividade física semanal em crianças homocigotas mutante GG do *LEPR* promoveu redução significativa no ganho de peso corporal anual estimado ( $0,61\text{ kg/ano}$ ,  $P=0,023$ )<sup>196</sup>. Como a quase totalidade dos nossos adolescentes pratica alguma atividade física regular (92,4%), é possível que esse fator tenha atenuado os efeitos deste marcador

no ganho de peso, corroborando com o observado no estudo citado. Já em amostra de 375 adultos afro-brasileiros não-relacionados, o Q223R, isolado, não demonstrou correlação com variações do IMC e CA<sub>Abd</sub>, mas sua combinação em haplótipo com outros 2 SNPs apresentou significativo valor preditor no risco para S/O, em diferentes modelos estatísticos de associação ( $P < 0,05$ )<sup>203</sup>. Esses achados demonstram a interferência tanto de fatores ambientais quanto de outros genes no efeito individual do rs1137101 (Q233R) em promover alterações das medidas corporais que contribuam para a obesidade, os quais devem ser melhor investigados em diferentes populações.

Assim como os outros SNPs relacionados ao excesso de peso, a variante rs9939609 *FTO* não demonstrou correlação com obesidade e seus indicadores quantitativos em nossa amostra. Nosso dado foi divergente da significativa associação entre cada cópia do alelo variante A com aumento de 0,2kg/m<sup>2</sup> no IMC ( $P = 3 \times 10^{-5}$ ) e no risco para sobrepeso (OR=1.27, IC95% [1.16-1.39],  $P = 2 \times 10^{-7}$ ) e obesidade (OR=1.35, IC95% [1.14-1.61],  $P = 6 \times 10^{-4}$ ) a partir dos 7 anos de idade, segundo estudo GWA que analisou dados genéticos agrupados de mais de 10 mil crianças europeias<sup>115</sup>. Também divergente dos nossos resultados, estudo populacional que analisou 1.149 adolescentes chineses identificou o rs9939609 em associação com IMC e percentual de gordura corporal aumentados ( $P = 0,019$  e  $P = 0,004$ , respectivamente) segundo modelo de regressão linear múltipla ajustada<sup>117</sup>. Em nossa amostra, o alelo variante A apresentou frequência aumentada em adolescentes obesos, pelo IMC (21.4% vs. 14.7%, Tabela 7) e pela CA<sub>Abd</sub> (19.5% vs. 13.6%, Tabela 7), porém de forma não significativa e sem efeito suficiente que modificasse medidas antropométricas em seus portadores.

Concordante com a ausência de associação em nossa amostra, estudo seccional, que analisou 1.218 crianças e adolescentes mexicanos, não identificou o rs9939609 e outros 9 SNPs relativos à obesidade associados com variação no IMC, medidas de CA<sub>Abd</sub> e parâmetros metabólicos relacionados, como insulina e glicose<sup>112</sup>. Na mesma coorte sul-africana do *Bt 20 Study*, o rs9939609 não manteve significância estatística na sua associação com variação do IMC, nas análises ajustadas para múltiplas variáveis ( $P = 0,029$  antes e  $P = 0,071$  após ajuste)<sup>197</sup>. Em estudo caso-controle que avaliou 348 crianças brasileiras, o rs9939609 e outros SNPs nos genes *AKT1* e *AKTIP* relacionados ao excesso de peso, não se mostraram correlacionados

com variações no IMC e no índice de resistência insulínica entre obesos e controles, assim como com o risco para obesidade<sup>204</sup>.

Tal qual observado em crianças e adolescentes, a relação do rs9939609 do com variações nas medidas corporais também se mostrou controversa em estudos envolvendo adultos de outras populações. Em estudo genômico amplo de Frayling e cols., que analisou diferentes coortes europeias envolvendo mais de 38 mil indivíduos, cada cópia do alelo A apresentou significativa correlação com aumento de 0,4kg/m<sup>2</sup> no IMC ( $P=1,2 \times 10^{-29}$ ), 1 cm na CAbd ( $P=4 \times 10^{-9}$ ) e medidas aumentadas de diferentes dobras cutâneas ( $P=2 \times 10^{-5}$ ) bem como com o risco aumentado para sobrepeso (OR=1.18, IC95%=[1.14-1.26],  $P=2 \times 10^{-17}$ ) e obesidade (OR=1.32, IC95%=[1.26-1.39],  $P=3 \times 10^{-26}$ )<sup>115</sup>. Esta associação não foi replicada em estudo populacional que analisou 3.210 adultos chineses e não identificou o rs9939609 e outros marcadores SNP no *FTO* correlacionados com obesidade, DM2 ou caracteres relacionados como IMC, CAbd, percentual de gordura corporal e insulina, independentemente do sexo ou região geográfica<sup>205</sup>. Curiosamente, em um mesmo estudo mexicano, o rs9939609 *FTO* exerceu efeitos opostos em 2 diferentes coortes avaliadas, mostrando forte associação com obesidade (OR=1.42, IC95%=[1.15-1.42],  $P=0,001$ ) e obesidade classe III (OR=1.88, IC95%=[1.44-2.45],  $P=4 \times 10^{-6}$ ), em amostra caso-controle com 1.156 indivíduos, enquanto não apresentou significância com caracteres de adiposidade entre 945 adultos não-relacionados<sup>112</sup>. Estes resultados demonstram uma influência controversa do rs9939609 *FTO* nas variações de medidas corporais em algumas etnias e seu uso como marcador de obesidade deve ser melhor investigado em diferentes populações, principalmente nas miscigenadas.

Assim como nos demais marcadores avaliados, estudos investigaram o efeito de interação entre fatores genéticos e comportamentais com este SNP na regulação do peso corporal. No mesmo estudo pediátrico chinês de Jiang e cols. citado acima, o consumo de refrigerantes em alta, mas não média ou baixa frequência, interagiu com este SNP ( $P=0,010$ ) e contribuiu para aumento significativo do IMC em adolescentes com genótipo variante AA+AT, mas não em homozigotos TT ( $P<.001$ )<sup>117</sup>. Meta-análise de 54 estudos multiétnicos populacionais identificou que a atividade física atenuou em torno de 1/3 os efeitos associados do rs9939609 *FTO* no IMC (-0,14kg/m<sup>2</sup>,  $P=0,005$ ), na CAbd (-0,33cm,  $P=0,002$ ), no percentual de gordura corporal (-0,19%,  $P=0,02$ ) e no risco para obesidade (OR=1.22 vs. 1.30,  $P=0,001$ ) em adultos ativos comparados ao inativos, independente da etnia<sup>206</sup>.

Quanto as interações gênicas, estudo caso-controle com 600 adultos indianos identificou contribuição para obesidade do rs9930609 de forma isolada ( $P=0,0001$ ) e em haplótipo ( $P<0,05$ ) com outras variantes do *FTO* e do gene controlador de desenvolvimento conservado entre espécies, o *IRX3*, além de relações de desequilíbrio de ligação entre esses SNPs<sup>207</sup>. Outro estudo experimental pareado com humanos saudáveis identificou interessantes aspectos relacionados ao rs9930609 no comportamento alimentar, no qual portadores do genótipo variante AA comparados aos do TT, no pós refeição, exibiram responsividade neuronal do apetite mediante estímulos visuais alterada, menor supressão do apetite pós-prandial e não redução da grelina plasmática<sup>208</sup>. Além dessas condições facilitadoras do ganho de peso, células sanguíneas de homozigotos AA também apresentaram expressão gênica do *FTO* aumentada correlacionado com índices de metilação do RNAm da grelina reduzidos, os quais resultaram em aumento da expressão e produção deste hormônio orexigênico<sup>208</sup>. Uma vez que a ação do *FTO* não é tecido-específica<sup>116</sup>, esses dados indicam que o mecanismo molecular de ação do rs9930609 na regulação do peso corporal não é simples e restrito a uma via metabólica, podendo envolver a integração de múltiplas variáveis biológicas que podem facilitar o ganho de peso as quais ainda precisam ser melhor investigadas em seres humanos.

Em nossa amostra, a variante intrônica rs17782313 T>C do gene *MC4R* também não apresentou relação com excesso de peso, nem por diferenças na sua distribuição genotípica (Tabela 7) nem por associação com obesidade ou seus traços quantitativos (Tabelas 9 e 10). Nosso resultado mostrou-se divergente do estudo GWA de Loos e cols., que avaliou dados agrupados de mais de 5.000 crianças europeias e identificou o rs17782313 associado com aumento no risco para obesidade severa ( $OR=1.30$ ,  $IC95\%=[1.20-1.41]$ ,  $P=8 \times 10^{-11}$ ), onde cada cópia do alelo variante C esteve correlacionada com aumento progressivo de unidades score-z no IMC ( $P<7,3 \times 10^{-6}$ ) e no percentual de gordura corporal ( $P=3,0 \times 10^{-5}$ )<sup>109</sup>. De forma similar, estudo caso-controle com 2,977 crianças chinesas identificou o alelo C com frequência aumentada em obesos (25,2% vs.18,3%,  $P=2,62 \times 10^{-9}$ ), correlacionado com IMC e CA<sub>Abd</sub> aumentados ( $P<0,05$ ) e apresentando efeito aditivo no risco para obesidade ( $OR=1.49$ ,  $IC95\%=[1.26-1.77]$  para TC e  $OR=2.15$ ,  $IC95\%=[1.49-3.11]$  para CC,  $P=1,91 \times 10^{-5}$ )<sup>110</sup>. Assim como nestes estudos, o genótipo variante CC, em nossa amostra, também apresentou uma frequência discretamente aumentada em obesos pelo IMC (9% vs. 8.3%, Tabela 7) porém de forma não significativa.

Assim como em nosso estudo, ausência de associação por parte deste marcador foi também reportada em coorte seccional de 1.218 crianças mexicanas saudáveis do mesmo estudo de Léon-Mimila e cols., na qual o rs17782313 *MC4R* e outros 9 SNPs relacionados ao peso corporal não demonstraram correlações com variações do IMC, CABd, parâmetros bioquímicos como insulina e lipídeos séricos ou risco para obesidade<sup>112</sup>. De forma contrária a outros estudos, o alelo variante C exerceu efeito protetor na mesma coorte pediátrica sul-africana do *Bt20*, na qual cada cópia esteve associada com redução em torno de 2% nos valores de IMC de forma independente ( $P=0,045$ ) e combinada com SNPs nos genes *LEP* e *FTO* ( $P=0,028$ ), em modelo estatístico de efeito conjunto<sup>197</sup>.

Assim como a relação do rs17782313 *MC4R* com peso corporal mostrou-se controversa em populações pediátricas, o mesmo comportamento foi observado em diferentes populações de adultos. O mesmo estudo de Loos e cols. analisou dados agrupados de diferentes coortes europeias, totalizando mais de 60.000 mil indivíduos, e identificou cada alelo C associado com variação de  $\sim 0,22\text{kg/m}^2$  no IMC ( $P=2.8 \times 10^{-15}$ ),  $\sim 760\text{g}$  no peso corporal ( $P=2,8 \times 10^{-21}$ ) e aumento de  $\sim 12\%$  no risco para obesidade ( $\text{OR}=1.12$ ,  $P=5,2 \times 10^{-9}$ )<sup>109</sup>. Em estudo caso-controle com 200 chilenos, portadores dos genótipos CC+TC do rs17782313 apresentaram menores valores de IMC ( $-1,95\text{kg/m}^2$ ,  $P=0,033$ ) e risco reduzido para SM ( $\text{OR}=0.48$ ,  $P=0,040$ ) comparados aos homozigotos selvagem TT, apesar da sua distribuição genotípica e alélica similar entre casos e controle e não associação com risco para obesidade<sup>198</sup>.

Assim como o rs9939609 *FTO*, no mesmo estudo mexicano de Léon-Mimila e cols. o rs17782313 *MC4R* exerceu efeitos controversos nas duas populações de adultos avaliadas, não apresentando associação com variáveis antropométricas entre indivíduos saudáveis não-relacionados, mas sim com obesidade severa em amostra caso-controle ( $\text{OR}=1.85$ ,  $\text{IC95\%}=[1.23-2.80]$ ,  $P=0.012$ )<sup>112</sup>. Todos estes dados, pediátricos e adultos, demonstram a relação incerta do rs17782313 *MC4R* com obesidade em algumas etnias, indicando a necessidade de mais investigações acerca dos efeitos deste marcador em promover alterações antropométricas e metabólicas em diferentes populações, principalmente nas miscigenadas.

Uma vez situado próximo à região codificante do gene *MC4R*, o PG rs17782313 não promove alterações na estrutura do receptor MC4, contudo pode indicar sua interferência na regulação da expressão deste gene. Esta hipótese foi investigada recentemente por Tang e cols. que, utilizando abordagens genéticas e epigenéticas,

identificaram, em células humanas de homozigotos TT, uma expressão reduzida do gene *MC4R* ( $P=1,9 \times 10^{-3}$ ) correlacionada com um sítio hipermetilado (reprimido) na sua região promotora ( $P=1,7 \times 10^{-4}$ )<sup>209</sup>. Apesar das análises realizadas neste estudo basearem-se em bancos de dados públicos, estes resultados apontam para uma possível interferência do rs17782313 na funcionalidade do *MC4R* através de mecanismos epigenéticos, o que deve ser melhor investigado em grandes populações amostrais.

Este resultado experimental parece alinhar-se com os estudos de interação que investigaram a contribuição de fatores comportamentais na ação do rs17782313 no contexto da obesidade. No mesmo estudo de Lv e cols. com escolares chineses, o consumo de alimentos ricos em sódio contribuiu com 38% do risco aumentado para obesidade em portadores dos genótipos variantes TC e CC do rs17782313 (OR=3.77), enquanto o mesmo efeito não foi detectado para alimentos açucarados ou tipo de dieta<sup>110</sup>.

Já estudo seccional finlandês identificou, em 4.664 adolescentes saudáveis, uma atenuação dos efeitos do rs17782313 no aumento da massa corporal pelo padrão do número de refeições, onde sua regularidade (5 refeições por dia) representou um fator que reduziu de 1,92kg/m<sup>2</sup> para 0,34 kg/m<sup>2</sup> a diferença entre o IMC de homozigotos variante CC em relação ao dos demais genótipos ( $P=0,016$  de interação)<sup>210</sup>. Além disso, neste mesmo estudo, essa interação também se sobrepôs ao efeito cumulativo do escore genético de risco envolvendo outros 7 SNPs avaliados, reduzindo de 0,90kg/m<sup>2</sup> para 0,32kg/m<sup>2</sup> a diferença entre IMC de portadores de escore alto vs. baixo ( $P=0,003$  de interação). Apesar da composição dessas refeições não ter sido considerada, juntos esses dados demonstram que fatores comportamentais podem se sobrepor aos efeitos isolados ou em conjunto do rs17782313 e outras variantes, de forma a favorecer ou não o surgimento da obesidade.

Com relação às variáveis clínicas relevantes nas análises de regressão, detecção de cada 1mmHg da PAS/PAD aumentando em 58,4% o risco para obesidade (Tabela 10), assim como cada 1kg/m<sup>2</sup> do IMC aumenta em 7,6% o risco para elevação da PA (Tabela 10) observada em nosso estudo reforça a conhecida interrelação destes fatores de RCV já durante a infância/adolescência.

Em concordância com nossos achados, estudos com escolares de 10 a 18 anos de idade, da cidade de Salvador/BA<sup>41</sup> e de Porto Alegre/RS<sup>211</sup>, mostraram valores aumentados de PA correlacionados com IMC e diâmetro da CA<sub>Abd</sub> aumentados, assim

como a associação destes parâmetros de adiposidade com o aumento proporcional da prevalência de HA<sup>41,211</sup>. Já no estudo *ERICA*, todas as 25 capitais brasileiras, com exceção das cidades de Teresina/Pi e Boa Vista/RR, apresentaram prevalência de HA sempre maior em adolescentes obesos do que em eutróficos, com 17,8% da prevalência total atribuível à obesidade<sup>39</sup>. Esta também foi evidenciada em meta-análises de estudos pediátricos, nas quais índices de HA mostraram-se 6 vezes maiores em jovens com excesso de peso, em comparação a eutróficos ou com baixo peso (34,1% vs. 5,0%) na China<sup>135</sup> e 15 vezes maior em crianças obesas, comparadas às eutróficas (15,27% vs. 1,90%) considerando jovens de diversos países no ano de 2019<sup>128</sup>. Biologicamente, ambos os distúrbios correlacionam-se devido a demanda metabólica aumentada em função do excesso de peso, o qual promove aumento do débito cardíaco, alterações vasculares e na função renal que resultam em complicações cardiovasculares e inflamatórias diversas<sup>46</sup>.

Importante mencionar como dado relevante e inesperado a associação negativa entre obesidade e idade, indicando maior risco de desenvolvimento de excesso de peso entre adolescentes mais jovens. Outros estudos nacionais identificaram achados semelhantes nos adolescentes de faixas etárias menores avaliados como tendência a maiores prevalências de S/O no estudo *ERICA*<sup>39</sup>, risco 3 vezes maior de desenvolvimento de obesidade<sup>212</sup> e alterações no perfil lipídico e maior índice de sedentarismo<sup>213</sup>.

Resultados similares foram observados em estudos internacionais como risco para obesidade severa em crianças e adolescentes italianos, que possuíam média de idade comparativamente menor aos fora de risco (8 vs. 10 anos)<sup>214</sup>, e também em australianos, cujas maiores taxas foram mantidas em crianças de 5 a 12 anos de idade, em comparação aos mais velhos de 1997 a 2010<sup>215</sup>.

Esses resultados reafirmam os preocupantes aspectos epidemiológicos do processo de transição nutricional, em curso mundialmente, no qual um ambiente “obesogênico”, vem sendo apresentado de forma antecipada a crianças e adolescentes<sup>212</sup>, contribuindo para a instalação cada vez mais precoce de fatores de RCV, independente de fatores genéticos envolvidos.

## CONCLUSÕES

- a) Análise de 8 PGs relacionados ao risco cardiovascular para associação com PA elevada e obesidade em amostra de adolescentes brasileiros através de Multiplex SNaPshot® detectou uma correlação entre o rs3746619 (T6K) do gene *MC3R* com variação da PA e associação entre o rs1799983 (G894T) do gene *NOS3* com variação nas medidas de IMC e obesidade em indivíduos miscigenados jovens;
- b) Altas prevalências de PA elevada e de sobrepeso/obesidade identificadas na amostragem de adolescentes avaliada mostraram-se compatíveis com outros estudos nacionais e internacionais, refletindo a instalação precoce destes fatores de risco cardiovascular em populações cada vez mais jovens.
- c) Distribuições genotípicas estratificadas por variáveis demográficas identificaram frequência aumentada de homozigotos variante TT do rs699 *AGT* e variante CC do rs1799998 *CYP11B2* em brancos, de homozigotos variantes AA do rs3746619 (T6K) e do rs3827103 (V81I) do gene *MC3R* em negros e NB/NP, enquanto homozigotos variante AA do rs3827103 (V81I) *MC3R* apresentaram frequência aumentada em meninos;
- d) Distribuições genotípicas estratificadas por variáveis antropométricas identificaram frequência aumentada de homozigotos selvagens GG do rs1799983 *NOS3* em obesos pelo IMC e CA<sub>bd</sub> e de homozigotos mutante TT do rs1799998 *CYP11B2* em obesos pela CA<sub>bd</sub>;
- e) Distribuições genotípicas estratificadas pelo perfil de PA identificaram frequência aumentada de homozigotos mutante TT do rs699 *AGT* em normotensos, de homozigotos selvagens GG do rs1799983 *NOS3* e de homozigotos mutantes AA do rs3746619 *MC3R* em indivíduos com PA elevada;
- f) Análises de correlação one-way ANOVA detectou correlação entre o genótipo homozigoto mutante AA do rs3746619 (T6K) *MC3R* com PAS aumentada e do homozigoto selvagem GG do rs1799983 (G894T) com IMC aumentad;
- g) Análises de regressão logística identificaram associação do rs1799983 (G894T) do gene *NOS3* com o excesso de peso, onde seu alelo selvagem

G contribui com aumento de 27% no risco de desenvolvimento da obesidade, especialmente em indivíduos mais jovens que apresentam PA alterada;

- h) Já os polimorfismos rs9939609 do gene *FTO*, rs1137101 (Q223R) do gene *LEPR* e rs17782313 do gene *MC4R* não demonstraram alterações significativas em seus perfis de distribuição genotípica em nenhuma análise ou apresentaram relação com variações de indicadores antropométricos e risco associado para PA elevada ou obesidade.

## REFERÊNCIAS

1. Siqueira A de SE, De Siqueira-Filho AG, Land MGP. Análise do impacto econômico das doenças cardiovasculares nos últimos cinco anos no Brasil. *Arq Bras Cardiol.* 2017;109(1):39–46.
2. Stevens B, Pezzullo L, Verdian L, Tomlinson J, George A, Bacal F. The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. *Arq Bras Cardiol.* 2018 Jul;111(1):29–36.
3. Ghosh AK, Francis DP, Chaturvedi N, Kuh D, Mayet J, Hughes AD, et al. Cardiovascular Risk Factors from Early Life Predict Future Adult Cardiac Structural and Functional Abnormalities: A Systematic Review of the Published Literature. *J Cardiol Ther.* 2014;2(2):78–87.
4. Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, De Fátima França M, Fonseca FL, Pizzi OL, et al. Pressão arterial em jovens como marcador de risco cardiovascular. Estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(6):657–65.
5. Fonseca FL, Brandão AA, Pozzan R, Campana EMG, Luiz Pizzi O, Magalhães MEC, et al. Excesso de peso e o risco cardiovascular em jovens seguidos por 17 anos: estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):207–15.
6. Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC, Fonseca FL, Pizzi OL, et al. Pressão Arterial na Adolescência, Adipocinas e Inflamação no Adulto Jovem. Estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(1):60–8.
7. Markman Filho B, Carlos Sobral Sousa A, Felice Castro Issa A, Ramos Nascimento B, Correa Filho H, Luiz Campos Vieira M, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial-2020 Barroso et al. *Arq Bras Cardiol. Arq Bras Cardiolologia [Internet].* 2021;116(3):516–658. Available from: <https://doi.org/10.36660/abc.20201238>
8. Précoma DB, de Oliveira GMM, Simão AF, Dutra OP, Coelho OR, Izar MC de O, et al. Updated cardiovascular prevention guideline of the Brazilian society of cardiology – 2019. *Arq Bras Cardiol.* 2019;113(4):787–891.
9. Pesquisa Nacional de Saúde. Percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal [Internet]. Ibge. 2019. 113 p. Available from: <http://www.pns.icict.fiocruz.br/arquivos/Portaria.pdf>
10. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, Blowey D, Carroll AE, Daniels SR, et

- al. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* [Internet]. 2017 Sep 1;140(3):e20171904. Available from:  
<http://pediatrics.aappublications.org/content/140/3/e20171904.abstract>
11. McNiece KL, Poffenbarger TS, Turner JL, Franco KD, Sorof JM, Portman RJ. Prevalence of Hypertension and Pre-Hypertension among Adolescents. *J Pediatr*. 2007;150(6).
  12. Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. Obesity-Induced Hypertension. *Hypertension*. 1999;33(1):537–41.
  13. Urbina EM, Houry PR, McCoy C, Daniels SR, Kimball TR, Dolan LM. Cardiac and vascular consequences of pre-hypertension in youth. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011 May;13(5):332–42.
  14. Bao W, Threft SA, Srinivasan SR, Berenson GS. Essential Hypertension Predicted by Tracking of Elevated Blood Pressure From Childhood to Adulthood: The Bogalusa Heart Study. 1995;7061(95):657–65.
  15. Berenson GS, Srinivasan SR. Cardiovascular risk factors in youth with implications for aging: The Bogalusa Heart Study. *Neurobiol Aging*. 2005;26(3):303–7.
  16. Juhola J, Oikonen M, Magnussen CG, Mikkilä V, Siitonen N, Jokinen E, et al. Childhood physical, environmental, and genetic predictors of adult hypertension: The cardiovascular risk in young finns study. *Circulation*. 2012;126(4):402–9.
  17. Brandão AA, Pozzan R, Filho FMA, Brandão AP. Role of Anthropometric Indexes and Blood Pressure as Determinants of Left Ventricular Mass and Geometry in Adolescents. *Hypertension*. 1995;26(6):1190–4.
  18. Pozzan R, Brandão AA, da Silva SLD, Brandão AP. Hyperglycemia, Hyperinsulinemia, Overweight, and High Blood Pressure in Young Adults. *Hypertension*. 1997;30(3):650–3.
  19. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: Central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* [Internet]. 2015;64(1):35–46. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.015>
  20. Girardet C, Butler AA. Neural melanocortin receptors in obesity and related metabolic disorders. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet].

- 2014;1842(3):482–94. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.004>
21. Mendonça MRT, Silva MAM da, Rivera IR, Moura AÁ. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes da cidade de Maceió. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jul 22];56(2):192–6. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302010000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
  22. Mancini M, Obesidade D. *Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016*, 4.<sup>a</sup> edição, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade, Diretoria da ABESO e Editor-Coordenador. 2016.
  23. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*. 2005;6(3):221–34.
  24. Thaker V V. Genetic and Epigenetic Causes of Obesity. *Adolesc Med State Art Rev* [Internet]. 2017;28(2):379–405. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30416642>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6226269>
  25. Brandão A, Brandão A, Nogueira A, Suplicy H, Guimarães J, Oliveira J, et al. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Hipertensão. 2004;7:123–62.
  26. Vigilância de Fatores De Risco e Proteção Para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL). *Vigitel Brasil 2019* [Internet]. *Vigitel Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados*. 2020. 139 p. Available from:  
[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2019\\_vigilancia\\_fatores\\_risco.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf)
  27. IBGE. *Pesquisa Nacional de Saúde* [Internet]. *Pesquisa Nacional de Saúde*. 2020. 70 p. Available from:  
<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101758.pdf>
  28. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660–7.
  29. McCarthy, HD, Jarrett1and KV CH. Original Communication The development

- of waist circumference percentiles in British. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:902–7.
30. Freedman DS, Serdula MK, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1999 Feb 1;69(2):308–17. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.2.308>
  31. Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia. Obesidade na infância e adolescência – Manual de Orientação. In 2019. p. 236. Available from: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/Manual\\_de\\_Obesidade\\_-\\_3a\\_Ed\\_web\\_compressed.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Manual_de_Obesidade_-_3a_Ed_web_compressed.pdf)
  32. Metabólica AB para o E da O e S. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. VI Diretrizes Bras Obesidade. 2016;7–186.
  33. Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: The Bogalusa heart study. *Pediatrics*. 2001;108(3):712–8.
  34. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. The relation of childhood BMI to adult adiposity: The Bogalusa heart study. *Pediatrics*. 2005;115(1):22–7.
  35. Toprak A, Wang H, Chen W, Paul T, Srinivasan S, Berenson G. Relation of Childhood Risk Factors to Left Ventricular Hypertrophy (Eccentric or Concentric) in Relatively Young Adulthood (from the Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol*. 2008;101(11):1621–5.
  36. Raitakari OT, Juonala M, Viikari JSA. Obesity in childhood and vascular changes in adulthood: insights into the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Sep;29 Suppl 2:S101-4.
  37. Heiskanen JS, Hernesniemi JA, Ruohonen S, Hutri-Kähönen N, Kähönen M, Jokinen E, et al. Influence of early-life body mass index and systolic blood pressure on left ventricle in adulthood – the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Ann Med* [Internet]. 2021;53(1):160–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/07853890.2020.1849785>
  38. Juonala M, Raitakari M, S.A. Viikari J, Raitakari OT. Obesity in youth is not an independent predictor of carotid IMT in adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis*. 2006;185(2):388–93.
  39. Bloch KV, Klein CH, Szklo M, Kuschnir MCC, De Azevedo Abreu G, Barufaldi LA, et al. ERICA: Prevalences of hypertension and obesity in Brazilian

- adolescents. *Rev Saude Publica*. 2016;50(supl 1):1s-12s.
40. Moreira NF, Muraro AP, Barbosa Brito F dos S, Gonçalves-Silva RMV, Sichieri R, Ferreira MG. Obesity: Main risk factor for systemic arterial hypertension in Brazilian adolescents from a cohort study. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(7):520–6.
  41. Guimarães ICB, Almeida AM de, Santos AS, Barbosa DBV, Guimarães AC. Pressão arterial: efeito do índice de massa corporal e da circunferência abdominal em adolescentes. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):426–32.
  42. Cheung EL, Bell CS, Samuel JP, Poffenbarger T, Redwine KMN, Samuels JA. Race and obesity in adolescent hypertension. *Pediatrics*. 2017;139(5).
  43. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Biologia molecular da célula*. *Biologia Molecular da Célula*. 2017.
  44. Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J Mol Biol [Internet]*. 2013;425(21):3970–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.015>
  45. Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, et al. The minisequencing method: An alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(7–8):399–410.
  46. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *Comptes Rendus - Biol [Internet]*. 2017;340(2):87–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2016.11.007>
  47. Rather RA. Genetic markers: Potential candidates for cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 2016;220:914–23.
  48. Arnett DK, Claas SA. Omics of blood pressure and hypertension. *Circ Res*. 2018;122(10):1409–19.
  49. Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: Population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*. 2008;17(R2):143–50.
  50. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*. 2005;56:303–20.
  51. Fanis P, Kousiappa I, Phylactides M, Kleanthous M. Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB SNPs associated with fetal haemoglobin levels : a SNaPshot minisequencing approach. 2014;1–12.
  52. Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal FR,

- et al. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2008;9(9):1237–50. Available from: <https://doi.org/10.2217/14622416.9.9.1237>
53. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197–206.
54. Wise IA, Charchar FJ. Epigenetic modifications in essential hypertension. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4).
55. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* [Internet]. 2003;33(3):245–54. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng1089>
56. Raftopoulos L, Katsi V, Makris T, Tousoulis D, Stefanadis C, Kallikazaros I. Epigenetics, the missing link in hypertension. *Life Sci* [Internet]. 2015;129:22–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.08.003>
57. Lopomo A, Burgio E, Migliore L. Chapter Six - Epigenetics of Obesity. In: Tao Y-X, editor. *Genetics of Monogenic and Syndromic Obesity* [Internet]. Academic Press; 2016. p. 151–84. (Progress in Molecular Biology and Translational Science; vol. 140). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117316000429>
58. Sagnella GA. Why is plasma renin activity lower in populations of African origin? *J Hum Hypertens*. 2001;15(1):17–25.
59. Kato N. Ethnic differences in genetic predisposition to hypertension. *Hypertens Res* [Internet]. 2012;35(6):574–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2012.44>
60. Stryjecki C, Alyass A, Meyre D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obes Rev*. 2018;19(1):62–80.
61. Yako YY, Balti E V., Matsha TE, Dzudie A, Kruger D, Sobngwi E, et al. Genetic factors contributing to hypertension in African-based populations: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Hypertens*. 2018;20(3):485–95.
62. Abdel Ghafar MT. An overview of the classical and tissue-derived renin-angiotensin-aldosterone system and its genetic polymorphisms in essential hypertension. *Steroids* [Internet]. 2020;163(February):108701. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108701>

63. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet.* 1990 Mar;84(4):341–3.
64. Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, et al. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem.* 1994 Dec;269(50):31334–7.
65. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev Y V., Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell.* 1992;71(1):169–80.
66. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest.* 1995;95(3):948–53.
67. Bonfim-Silva R, Guimarães LO, Santos JS, Pereira JF, Leal Barbosa AA, Souza Rios DL. 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. *J Genet [Internet].* 2016;95(1):63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-015-0599-5>
68. Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest [Internet].* 1997;99(7):1786–97. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI119343>
69. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev.* 1994 Aug;15(4):421–38.
70. White PC, Slutsker L. HAPLOTYPE ANALYSIS OF CYP11B2. *Most.* 1995;21:437–42.
71. Lim PO, Macdonald TM, Holloway C, Friel E, Anderson NH, Dow E, et al. Variation at the aldosterone synthase (CYP11B2) locus contributes to hypertension in subjects with a raised aldosterone-to-renin ratio. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4398–402.
72. Barbato A, Russo P, Siani A, Folkerd EJ, Miller MA, Venezia A, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J*

- Hypertens. 2004;22(10):1895–901.
73. Russo P, Loguercio M, Lauria F, Barba G, Arnout J, Cappuccio FP, et al. Age- and gender-dependent association of the -344C/T polymorphism of CYP11B2 with blood pressure in European populations. *J Hum Hypertens*. 2007;21(4):333–6.
  74. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall A V, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993 Aug;268(23):17478–88.
  75. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2017;63:39–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2016.08.004>
  76. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;73:383–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016>
  77. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J* [Internet]. 2007;21(11):2655–63. Available from: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.06-7088com>
  78. Jáchymová M, Horký K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun;284(2):426–30.
  79. Goni L, Cuervo M, Milagro FI, Martínez JA. Influence of fat intake and BMI on the association of rs1799983 NOS3 polymorphism with blood pressure levels in an Iberian population. *Eur J Nutr*. 2017;56(4):1589–96.
  80. Grøntved A, Andersen LB, Franks PW, Verhage B, Wareham NJ, Ekelund U, et al. NOS3 variants, physical activity, and blood pressure in the European youth heart study. *Am J Hypertens* [Internet]. 2011;24(4):444–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2010.265/nature06264>
  81. Shen W, Hao J, Feng Z, Tian C, Chen W, Packer L, et al. Lipoamide or lipoic acid stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the endothelial NO synthase-cGMP-protein kinase G signalling pathway. *Br J*

- Pharmacol. 2011 Mar;162(5):1213–24.
82. Bender SB, Herrick EK, Lott ND, Klabunde RE. Diet-induced obesity and diabetes reduce coronary responses to nitric oxide due to reduced bioavailability in isolated mouse hearts. *Diabetes Obes Metab*. 2007 Sep;9(5):688–96.
  83. Sansbury BE, Cummins TD, Tang Y, Hellmann J, Holden CR, Harbeson MA, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circ Res*. 2012 Oct;111(9):1176–89.
  84. Cook S, Hugli O, Egli M, Ménard B, Thalmann S, Sartori C, et al. Partial gene deletion of endothelial nitric oxide synthase predisposes to exaggerated high-fat diet-induced insulin resistance and arterial hypertension. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):2067–72.
  85. Miranda JA, Belo VA, Souza-Costa DC, Lanna CMM, Tanus-Santos JE. ENOS polymorphism associated with metabolic syndrome in children and adolescents. *Mol Cell Biochem*. 2013;372(1–2):155–60.
  86. Bressler J, Pankow JS, Coresh J, Boerwinkle E. Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities study. *PLoS One*. 2013;8(11).
  87. Winick JD, Stoffel M, Friedman JM. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1. *Genomics*. 1996 Aug;36(1):221–2.
  88. Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* [Internet]. 2015;64(1):13–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.010>
  89. Coleman DL. A historical perspective on leptin. *Nat Med* [Internet]. 2010;16(10):1097–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm1010-1097>
  90. van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, et al. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology*. 2008 Apr;149(4):1773–85.
  91. Considine R V, Caro JF, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM. Identification of Incidental Sequence Polymorphisms and Absence of the <em></em>db/db</em>; Mouse and <em></em>fa/fa</em>; Rat

- Mutations. *Diabetes* [Internet]. 1996 Jul 1;45(7):992 LP – 994. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/45/7/992.abstract>
92. Hastuti P, Zukhrufia I, Padwaswari MH, Nuraini A, Sadewa AH. Polymorphism in leptin receptor gene was associated with obesity in Yogyakarta, Indonesia. *Egypt J Med Hum Genet* [Internet]. 2016;17(3):271–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.12.011>
  93. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4434–9.
  94. Maha K Eldosouky, Azza M. Abdu Allah , Abeer AbdElmoneim NSA-A. Correlation between serum leptin and its gene expression to the anthropometric measures in overweight and obese children. *Cell Mol Biol*. 2018;51(1):1.
  95. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem*. 1993 Apr;268(11):8246–50.
  96. Roselli-Rehfuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, et al. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Oct 1;90(19):8856–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8415620>
  97. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, et al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*. 2000;26(1):97–102.
  98. Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Dekoning J, et al. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3518–21.
  99. Butler AA, Girardet C, Mavrikaki M, Trevaskis JL, Macarthur H, Marks DL, et al. A life without hunger: The Ups (and downs) to modulating melanocortin-3 receptor signaling. *Front Neurosci*. 2017;11(MAR).
  100. Li WD, Joo EJ, Furlong EB, Galvin M, Abel K, Bell CJ, et al. Melanocortin 3 receptor (MC3R) gene variants in extremely obese women. *Int J Obes*.

- 2000;24(2):206–10.
101. Hani ELH, Dupont S, Durand E, Dina C, Gallina S, Gantz IRA, et al. Naturally Occurring Mutations in the Melanocortin Receptor 3 Gene Are Not Associated with Type 2 Diabetes Mellitus in French Caucasians \*. 2001;86(6):6–9.
  102. Feng N, Young SF, Aguilera G, Puricelli E, Adler- DC, Sebring NG, et al. Co-occurrence of Two Partially Inactivating Polymorphisms of MC3R Is Associated With Pediatric-Onset Obesity. *Diabetes*. 2005;54(9):2663–7.
  103. Lee YS, Poh LKS, Kek BLK, Kah YL. The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. *Diabetes*. 2007;56(10):2622–30.
  104. Savastano DM, Tanofsky-Kraff M, Han JC, Ning C, Sorg RA, Roza CA, et al. Energy intake and energy expenditure among children with polymorphisms of the melanocortin-3 receptor. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(4):912–20.
  105. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*. 1994 Oct;8(10):1298–308.
  106. Huszar D, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* [Internet]. 1997;88(1):131–141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9019399>
  107. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):253–62.
  108. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O’Rahilly S. Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1085–95.
  109. Loos RJF, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Hua Zhao J, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet*. 2008;40(6):768–75.
  110. Lv D, Zhang DD, Wang H, Zhang Y, Liang L, Fu JF, et al. Genetic variations in SEC16B, MC4R, MAP2K5 and KCTD15 were associated with childhood obesity and interacted with dietary behaviors in Chinese school-age population. *Gene*. 2015;560(2):149–55.
  111. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, Ferraz ME, Ferreira JC, Monteiro MP, et al. Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2

- polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children. *Endocrine* [Internet]. 2018;60(3):466–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-018-1587-3>
112. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, et al. Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. *PLoS One*. 2013;8(8).
  113. Obregón AM, Oyarce K, Santos JL, Valladares M, Goldfield G. Association of the melanocortin 4 receptor gene rs17782313 polymorphism with rewarding value of food and eating behavior in Chilean children. *J Physiol Biochem*. 2017;73(1):29–35.
  114. Yilmaz Z, Davis C, Loxton NJ, Kaplan AS, Levitan RD, Carter JC, et al. Association between MC4R rs17782313 polymorphism and overeating behaviors. *Int J Obes* [Internet]. 2015;39(1):114–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2014.79>
  115. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* (80- ). 2007;316(5826):889–94.
  116. Gerken T, Girard CA, Tung YCL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* (80- ). 2007;318(5855):1469–72.
  117. Jiang Y, Mei H, Lin Q, Wang J, Liu S, Wang G, et al. Interaction effects of FTO rs9939609 polymorphism and lifestyle factors on obesity indices in early adolescence. *Obes Res Clin Pract* [Internet]. 2019;13(4):352–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2019.06.004>
  118. Takeuchi F, Yamamoto K, Katsuya T, Nabika T, Sugiyama T, Fujioka A, et al. Association of genetic variants for susceptibility to obesity with type 2 diabetes in Japanese individuals. *Diabetologia*. 2011;54(6):1350–9.
  119. Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Ulloa AC, Robles L, et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity*. 2008;16(10):2296–301.
  120. Peters T, Ausmeier K, Dildrop R, Rütger U. The mouse Fused toes (Ft)

- mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome*. 2002 Apr;13(4):186–8.
121. Takahashi H, Yoshika M, Yokoi T. Validation of three automatic devices for the self-measurement of blood pressure according to the European Society of Hypertension International Protocol revision 2010: the Omron HEM-7130, HEM-7320F, and HEM-7500F. *Blood Press Monit [Internet]*. 2015;20(2). Available from:  
[https://journals.lww.com/bpmonitoring/Fulltext/2015/04000/Validation\\_of\\_three\\_automatic\\_devices\\_for\\_the.7.aspx](https://journals.lww.com/bpmonitoring/Fulltext/2015/04000/Validation_of_three_automatic_devices_for_the.7.aspx)
122. Malachias MVB, Souza WKSB, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3Supl.3):1–83.
123. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics [Internet]*. 2004 Aug 1;114(Supplement 2):555 LP – 576. Available from:  
[http://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement\\_2/555.abstract](http://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement_2/555.abstract)
124. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7.
125. Magliano ES, Guedes LG, Coutinho ESF, Bloch KV. Prevalence of arterial hypertension among Brazilian adolescents: Systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2013;13(1).
126. Gonçalves VSS, Galvão TF, de Andrade KRC, Dutra ES, Bertolin MNT, de Carvalho KMB, et al. Prevalence of hypertension among adolescents: Systematic review and meta-analysis. *Rev Saude Publica*. 2016;50:1–11.
127. De Moraes ACF, Lacerda MB, Moreno LA, Horta BL, Carvalho HB. Prevalence of high blood pressure in 122, 053 adolescents: A systematic review and meta-regression. *Med (United States)*. 2014;93(27):1–10.
128. Song P, Zhang Y, Yu J, Zha M, Zhu Y, Rahimi K, et al. Global Prevalence of Hypertension in Children: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr*. 2019;173(12):1154–63.
129. Rosa MLG, Mesquita ET, Da Rocha ERR, Fonseca VDM. Body mass index and waist circumference as markers of arterial hypertension in adolescents. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(5):573–8.

130. Rosaneli CF, Baena CP, Auler F, Nakashima ATA, Netto-Oliveira ER, Oliveira AB, et al. Elevated blood pressure and obesity in childhood: A cross-sectional evaluation of 4,609 schoolchildren. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(3):238–43.
131. Ferreira HS, Lúcio GMA, Assunção ML, Silva BC V., Oliveira JS, Florêncio TMMT, et al. High blood pressure among students in public and private schools in Maceió, Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(11):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142982>
132. Sharma AK, Metzger DL, Rodd CJ. Prevalence and severity of high blood pressure among children based on the 2017 American academy of pediatrics guidelines. *JAMA Pediatr.* 2018;172(6):557–65.
133. Mehdad S, Hamrani A, Kari K El, Hamdouchi A El, Mzibri M El, Barkat A, et al. Prevalence of elevated blood pressure and its relationship with fat mass, body mass index and waist circumference among a group of Moroccan overweight adolescents. *Obes Res Clin Pract* [Internet]. 2013;7(4):e284–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2012.02.006>
134. Pereira FEF, Teixeira F da C, Kac G, Soares E de A, Ribeiro BG. Sobrepeso e obesidade associados à pressão arterial elevada: um estudo seccional em escolares brasileiros. *Rev da Esc Enferm da USP.* 2020;54:1–7.
135. Wang L, Song L, Liu B, Zhang L, Wu M, Cao Z, et al. Trends and Status of the Prevalence of Elevated Blood Pressure in Children and Adolescents in China: a Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Hypertens Rep.* 2019;21(11):1–12.
136. Al Kibria GM, Swasey K, Sharmeen A, Day B. Estimated Change in Prevalence and Trends of Childhood Blood Pressure Levels in the United States After Application of the 2017 AAP Guideline. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2019 Jan 31;16:E12–E12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30702999>
137. Rivera JÁ, De Cossío TG, Pedraza LS, Aburto TC, Sánchez TG, Martorell R. Childhood and adolescent overweight and obesity in Latin America: A systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(4):321–32.
138. Vasconcellos MB de, Anjos LA dos, Vasconcellos MTL de. Estado nutricional e tempo de tela de escolares da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2013;29(4):713–22.
139. Ogden CL, Fryar CD, Martin CB, Freedman DS, Carroll MD, Gu Q, et al. Prevalence of Overweight, Obesity, and Severe Obesity Among Children and

- Adolescents Aged 2–19 Years: United States, 1963–1965 Through 2017–2018. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;324(12):1208–10.
140. Farias EDS, Guerra G, Petroski ÉL. Estado nutricional de escolares em Porto Velho, Rondônia. *Rev Nutr*. 2008;21(4):401–9.
141. Mendonça MRT, Silva MAM da, Rivera IR, Moura AÁ. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes da cidade de Maceió. *Rev Assoc Med Bras [Internet]*. 2010;56(2):192–6. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302010000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
142. Silva AP da, Feilbelmann TCM, Silva DC, Palhares HMC, Scatena LM, Resende EAMR de, et al. Prevalence of overweight and obesity and associated factors in school children and adolescents in a medium-sized Brazilian city. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(7):e438.
143. Brasil LDMP, Fisberg M, Maranhão HDS. Excesso de peso de escolares em região do Nordeste Brasileiro: Contraste entre as redes de ensino pública e privada. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2007;7(4):405–12.
144. Di Cesare M, Sorić M, Bovet P, Miranda JJ, Bhutta Z, Stevens GA, et al. The epidemiological burden of obesity in childhood: A worldwide epidemic requiring urgent action. *BMC Med*. 2019;17(1):1–20.
145. Skinner AC, Ravanbakht SN, Skelton JA, Perrin EM, Armstrong SC. Prevalence of obesity and severe obesity in US children, 1999-2016. *Pediatrics*. 2018;141(3).
146. Hobold E, Arruda M De. Prevalência De Sobrepeso E Obesidade De Crianças E Adolescentes No Brasil: Uma Revisão Sistemática. *Arq Ciências da Saúde da UNIPAR*. 2015;18(3).
147. Shi J, Liu S, Guo Y, Liu S, Xu J, Pan L, et al. Association between eNOS rs1799983 polymorphism and hypertension: a meta-analysis involving 14,185 cases and 13,407 controls. *BMC Cardiovasc Disord [Internet]*. 2021;21(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02192-2>
148. Suvorava T, Lauer N, Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Sep;44(6):1320–7.
149. Śladowska-Kozłowska J, Litwin M, Niemirska A, Wierzbicka A, Roszczyńko M, Szperl M. Associations of the eNOS G894T gene polymorphism with target organ damage in children with newly diagnosed primary hypertension. *Pediatr*

- Nephrol. 2015;30(12):2189–97.
150. Goncharov S V., Gurianova VL, Stroy DO, Drevytska TI, Kaplinskii SP, Nastenka EA, et al. Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms. *Fiziol Zh.* 2013;59(6):12–24.
  151. Cruz-González I, Corral E, Sánchez-Ledesma M, Sánchez-Rodríguez A, Martín-Luengo C, González-Sarmiento R. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: A prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2009;9:1–6.
  152. Kimura L, Angeli CB, Auricchio MTBM, Fernandes GR, Pereira AC, Vicente JP, et al. Multilocus family-based association analysis of seven candidate polymorphisms with essential hypertension in an African-derived semi-isolated Brazilian population. *Int J Hypertens.* 2012;2012.
  153. Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: New evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis.* 2006;184(1):193–200.
  154. Nasr H Ben, Dimassi S, M'hadhbi R, Debbabi H, Kortas M, Tabka Z, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obes Res Clin Pract.* 2016;10(4):465–75.
  155. Heinonen I, Saltin B, Kemppainen J, Nuutila P, Knuuti J, Kalliokoski K, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the exchange of glucose and fatty acids in human skeletal muscle. *Nutr Metab (Lond).* 2013 Jun;10(1):43.
  156. Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol.* 1999;126(7):1639–45.
  157. Khanal P, He L, Stebbings G, Onambele-Pearson GL, Degens H, Williams A, et al. Prevalence and association of single nucleotide polymorphisms with sarcopenia in older women depends on definition. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–9.
  158. Khanal P, He L, Herbert AJ, Stebbings GK, Onambele-Pearson GL, Degens H, et al. The Association of Multiple Gene Variants with Ageing Skeletal Muscle Phenotypes in Elderly Women. *Genes (Basel)* [Internet]. 2020;11(12).

- Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/12/1459>
159. Smith LW, Smith JD, Criswell DS. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J Appl Physiol* [Internet]. 2002;92(5):2005–11. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00950.2001>
  160. Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W, Spencer TE, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr*. 2005 Apr;135(4):714–21.
  161. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr*. 2009;139(2):230–7.
  162. Oliveira RVM, Albuquerque FN, Duque GS, Freitas RGA, Carvalho EF, Brandão AA, et al. Heart failure and endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism frequency variations within ancestries. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2018;73:60–5.
  163. Velloso MWM, Pereira SB, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2010;22(3):220–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.12.007>
  164. Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: An haplotype analysis. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2012;26(3):141–7.
  165. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*. 2001;11(8):719–25.
  166. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2005;12(3):177–82.
  167. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ, et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol*. 2011;21(4):240–5.
  168. Porto PI, García SI, Dieuzeide G, González C, Pirola CJ. Renin-angiotensin-

- aldosterone system loci and multilocus interactions in young-onset essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2003;25(2):117–30.
169. Simonyte S, Kuciene R, Medzioniene J, Dulskiene V, Lesauskaite V. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and high blood pressure in Lithuanian children and adolescents. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):1–9.
170. Takeuchi F, Yamamoto K, Katsuya T, Sugiyama T, Nabika T, Ohnaka K, et al. Reevaluation of the association of seven candidate genes with blood pressure and hypertension: A replication study and meta-Analysis with a larger sample size. *Hypertens Res*. 2012;35(8):825–31.
171. Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: Surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol*. 2005;6:1–11.
172. Carlos Poston WS, Pavlik VN, Hyman DJ, Ogbonnaya K, Hanis CL, Haddock CK, et al. Genetic bottlenecks, perceived racism, and hypertension risk among African Americans and first-generation African immigrants. *J Hum Hypertens*. 2001;15(5):341–51.
173. Byrd JB, Auchus RJ, White PC. Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism and Cardiovascular Phenotypes in a Large, Multiethnic Population-Based Study. *J Investig Med*. 2015;63(7):862–6.
174. Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009;32(2):159–62.
175. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11 $\beta$ -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol*. 2002;28(2):125–35.
176. Pan X-Q, Zhang Y-H, Liu Y-Y, Tong W-J. Interaction between the C(-344)T polymorphism of CYP11B2 and alcohol consumption on the risk of essential hypertension in a Chinese Mongolian population. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 2010;25(11):813–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10654-010-9504-y>
177. Pan X, Liu Y, Zhang Y, Zhang X, Xu Q, Tong W. Interaction of the C-344T polymorphism of CYP11b2 gene with body mass index and waist circumference affecting diastolic blood pressure in Chinese Mongolian population. *Blood Press*. 2010;19(6):373–9.

178. Lee M, Kim KM, Kim SM, Park H, Park CG, Park HK. Gender-based differences on the association between salt-sensitive genes and obesity in Korean children aged between 8 and 9 years. *PLoS One*. 2015;10(3):1–13.
179. Russo P, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Arnout J, Cappuccio FP, et al. - 344C/T Variant in the Promoter of the Aldosterone Synthase Gene (CYP11B2) Is Associated With Metabolic Syndrome in Men. *Am J Hypertens*. 2007;20(2):218–22.
180. Casiglia E, Tikhonoff V, Schiavon L, Guglielmi F, Pagnin E, Bascelli A, et al. Skinfold thickness and blood pressure across C-344T polymorphism of CYP11B2 gene. *J Hypertens* [Internet]. 2007;25(9):1828–33. Available from: [https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2007/09000/Skinfold\\_thickness\\_and\\_blood\\_pressure\\_across.13.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2007/09000/Skinfold_thickness_and_blood_pressure_across.13.aspx)
181. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*. 2007;21(9):2185–94.
182. Huby AC, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, et al. Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation*. 2015;132(22):2134–45.
183. Aris IM, Tint MT, Teh AL, Holbrook JD, Quah PL, Chong MFF, et al. MC3R gene polymorphisms are associated with early childhood adiposity gain and infant appetite in an Asian population. *Pediatr Obes*. 2016;11(6):450–8.
184. Obregón AM, Amador P, Valladares M, Weisstaub G, Burrows R, Santos JL. Melanocortin-3 receptor gene variants: Association with childhood obesity and eating behavior in Chilean families. *Nutrition*. 2010;26(7–8):760–5.
185. Yako YY, Fanampe BL, Hassan SM, Erasmus RT, van der Merwe L, Matsha TE. Negative association of MC3R variants with weight and blood pressure in Cape Town pupils aged 11 - 16 years. *South African Med J*. 2011;101(6):417–20.
186. Demidowich AP, Parikh VJ, Dedhia N, Branham RE, Madi SA, Marwitz SE, et al. Associations of the melanocortin 3 receptor C17A + G241A haplotype with body composition and inflammation in African-American adults. *Ann Hum Genet*. 2019;83(5):355–60.
187. Zegers D, Beckers S, Mertens IL, Van Gaal LF, Van Hul W. Common

- melanocortin-3 receptor variants are not associated with obesity, although rs3746619 does influence weight in obese individuals. *Endocrine*. 2010;38(2):289–93.
188. Yoshiuchi I. Evidence for natural selection at the melanocortin-3 receptor gene in European and African populations. *Acta Diabetol*. 2016;53(4):583–7.
  189. Lippert RN, Ellacott KLJ, Cone RD. Gender-specific roles for the melanocortin-3 receptor in the regulation of the mesolimbic dopamine system in mice. *Endocrinology*. 2014;155(5):1718–27.
  190. Alsmadi O, Melhem M, Hebbar P, Thareja G, John SE, Alkayal F, et al. Leptin in association with common variants of MC3R mediates hypertension. *Am J Hypertens*. 2014;27(7):973–81.
  191. Humphreys MH, Ni XP, Pearce D. Cardiovascular effects of melanocortins. *Eur J Pharmacol*. 2011;660(1):43–52.
  192. Ni XP, Pearce D, Butler AA, Cone RD, Humphreys MH. Genetic disruption of  $\gamma$ -melanocyte-stimulating hormone signaling leads to salt-sensitive hypertension in the mouse. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1251–8.
  193. Fardo DW, Becker KD, Bertram L, Tanzi RE, Lange C. Recovering unused information in genome-wide association studies: The benefit of analyzing SNPs out of Hardy-Weinberg equilibrium. *Eur J Hum Genet [Internet]*. 2009;17(12):1676–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.85>
  194. Lee S, Kasif S, Weng Z, Cantor CR. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS One*. 2008;3(12).
  195. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and genotyping error. *Front Genet*. 2017;8(OCT):1–6.
  196. Marcos-Pasero H, Aguilar-Aguilar E, Colmenarejo G, de Molina AR, Reglero G, Loria-Kohen V. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene as a predictor of weight gain in childhood obesity and the identification of possible factors involved. *Genes (Basel)*. 2020;11(5):1–11.
  197. Lombard Z, Crowther NJ, Van Der Merwe L, Pitamber P, Norris SA, Ramsay M. Appetite regulation genes are associated with body mass index in black South African adolescents: A genetic association study. *BMJ Open*. 2012;2(3):1–10.
  198. Manriquez V, Aviles J, Salazar L, Saavedra N, Seron P, Lanás F, et al. Polymorphisms in Genes Involved in the Leptin-Melanocortin Pathway are

- Associated with Obesity-Related Cardiometabolic Alterations in a Southern Chilean Population. *Mol Diagnosis Ther.* 2018;22(1):101–13.
199. De Oliveira R, Cerda A, Genvigir FDV, Sampaio MF, Armaganijan D, Bernik MMS, et al. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(9):677–84.
200. Bender N, Allemann N, Marek D, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, et al. Association between variants of the leptin receptor gene (LEPR) and overweight: A systematic review and an analysis of the colaus study. *PLoS One.* 2011;6(10):1–14.
201. Manta FSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol.* 2013;40(1):94–8.
202. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One.* 2013;8(9):1–11.
203. Angeli CB, Kimura L, Auricchio MT, Vicente JP, Mattevi VS, Zembrzuski VM, et al. Multilocus analyses of seven candidate genes suggest interacting pathways for obesity-related traits in Brazilian Populations. *Obesity [Internet].* 2011;19(6):1244–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.325/nature06264>
204. Pereira P de A, Alvim-Soares AM, Sandrim VC, Lanna CMM, Souza-Costa DC, Belo V de A, et al. Falta de associação entre o polimorfismo genético do FTO, AKT1 e AKTIP e o sobrepeso e a obesidade infantil. *J Pediatr (Rio J) [Internet].* 2016;92(5):521–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2015.12.007>
205. Li H, Wu Y, Loos RJF, Hu FB, Liu Y, Wang J, et al. Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes.* 2008;57(1):264–8.
206. Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, Sharp SJ, Sonestedt E, Demerath E, et al. Physical Activity Attenuates the Influence of FTO Variants on Obesity Risk : A Meta-Analysis of 218 , 166. *PLoS Med.* 2011;8(11).

207. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 2014;507(7492):371–5.
208. Karra E, Daly OGO, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, Neary MT, et al. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity.pdf. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3539–51.
209. Tang Y, Jin B, Zhou L, Lu W. MeQTL analysis of childhood obesity links epigenetics with a risk SNP rs17782313 near MC4R from meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(2):2800–6.
210. Jääskeläinen A, Schwab U, Kolehmainen M, Kaakinen M, Savolainen MJ, Froguel P, et al. Meal Frequencies Modify the Effect of Common Genetic Variants on Body Mass Index in Adolescents of the Northern Finland Birth Cohort 1986. *PLoS One*. 2013;8(9):1–7.
211. Schommer VA, Barbiero SM, Cesa CC, Oliveira R, Silva AD, Pellanda LC. Excesso de peso, variáveis antropométricas e pressão arterial em escolares de 10 a 18 anos. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(4):312–8.
212. Castilho SD, Nucci LB, Hansen LO, Assuino SR. Prevalência de excesso de peso conforme a faixa etária em alunos de escolas de Campinas, SP. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(2):200–6.
213. Ribas SA, da Silva LCS. Fatores de risco cardiovascular e fatores associados em escolares do Município de Belém, Pará, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2014;30(3):577–86.
214. Corica D, Aversa T, Valenzise M, Messina MF, Alibrandi A, De Luca F, et al. Does Family History of Obesity, Cardiovascular, and Metabolic Diseases Influence Onset and Severity of Childhood Obesity? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:187.
215. Hardy LL, Cosgrove C, King L, Venugopal K, Baur LA, Gill T. Shifting curves? Trends in thinness and obesity among Australian youth, 1985 to 2010. *Pediatr Obes* [Internet]. 2012;7(2):92–100. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2047-6310.2011.00016.x>
216. Brooks A, Creighton EK, Gandolfi B, Khan R, Grahn RA, Lyons LA. SNP Miniplexes for Individual Identification of Random-Bred Domestic Cats. *J Forensic Sci*. 2016;61(3):594–606.
217. Zhang L, Yang Y, Liu R, Li Q, Yang F, Liu H, et al. A multiplex method for

- detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations. 2016;37(6):739–45.
218. Inagaki S, Yamamoto Y, Doi Y, Takata T, Ishikawa T, Imabayashi K, et al. A new 39-plex analysis method for SNPs including 15 blood group loci. *Forensic Sci Int*. 2004;144(1):45–57.
  219. Fondevila M, Phillips C, Naverán N, Cerezo M, Rodríguez A, Calvo R, et al. Challenging DNA: Assessment of a range of genotyping approaches for highly degraded forensic samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2008;1(1):26–8.
  220. Freire-Aradas A, Fondevila M, Kriegel AK, Phillips C, Gill P, Prieto L, et al. A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012;6(3):341–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.010>
  221. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. 2006;1713–24.
  222. Fondevila M, Børsting C, Phillips C, de la Puente M, Consortium EN, Carracedo A, Morling N LM. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. *Forensic Sci Rev*. 2017;Jan;29(1):57–76.
  223. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298 [Internet]. National Institutes of Health. 1999. Available from: [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
  224. Fan SH, Say YH. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population. *J Physiol Anthropol*. 2014;33(1):1–10.
  225. Feng N, Young SF, Aguilera G, Puricelli E, Adler-Wailes DC, Sebring NG, et al. Co-occurrence of Two Partially Inactivating Polymorphisms of *MC3R* Is Associated With Pediatric-Onset Obesity. *Diabetes* [Internet]. 2005 Sep 1;54(9):2663 LP – 2667. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/9/2663.abstract>
  226. Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SR, Berenson GS, Dietz WH. Cardiovascular Risk Factors and Excess Adiposity Among Overweight Children and

- Adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr*. 2007;150(1).
227. Kishi S, Teixido-Tura G, Ning H, Venkatesh BA, Wu C, Almeida A, et al. Cumulative blood pressure in early adulthood and cardiac dysfunction in middle age: The CARDIA study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(25):2679–87.
228. Sanchez JJ, Endicott P. Developing multiplexed SNP assays with special reference to degraded DNA templates. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1370–8.
229. Riestra P, García-Anguita A, Schoppen S, López-Simón L, De Oya M, Garcés C. Sex-specific association between leptin receptor polymorphisms and leptin levels and BMI in healthy adolescents. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2010;99(10):1527–30.
230. Olza J, Rupérez AI, Gil-Campos M, Leis R, Cañete R, Tojo R, et al. Leptin receptor gene variant rs11804091 is associated with BMI and insulin resistance in Spanish female obese children: A case-control study. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1–14.
231. Srivastava A, Mittal B, Prakash J, Srivastava P, Srivastava N, Srivastava N. Association of FTO and IRX3 genetic variants to obesity risk in north India. *Ann Hum Biol [Internet]*. 2016;43(5):451—456. Available from: <https://doi.org/10.3109/03014460.2015.1103902>
232. Jiménez-Osorio AS, Aguilar-Lucio AO, Cárdenas-Hernández H, Musalem-Younes C, Solares-Tlapechco J, Costa-Urrutia P, et al. Polymorphisms in adipokines in mexican children with obesity. *Int J Endocrinol*. 2019;2019:10–4.
233. Zandoná MR, Sangalli CN, Campagnolo PDB, Vitolo MR, Almeida S, Mattevi VS. Validation of obesity susceptibility loci identified by genome-wide association studies in early childhood in South Brazilian children. *Pediatr Obes*. 2017;12(1):85–92.
234. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):1101–9.
235. Yugar-Toledo JC, Martín JFV, Krieger JE, Pereira AC, Demacq C, Coelho OR, et al. Gene variation in resistant hypertension: Multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA Cell Biol*. 2011;30(8):555–64.
236. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR, et al.

- Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1140–7.
237. Zhai CN, Cong HL, Zhang H, Hou K, Zhang Y, Zhang YY. M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and cardiovascular disease: An updated meta-analysis of 39 case-control comparisons. *Anatol J Cardiol.* 2019;21(4):222–32.
238. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AL, et al. Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism Predicts Outcome in African Americans With Heart Failure. Results From the A-HeFT Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(6):1277–82.

APÊNDICE A - Questionário de atendimento a ser preenchido pelo responsável do aluno.



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Hospital Universitário Pedro Ernesto  
Setor de Hipertensão Arterial e Lipídes do Serviço/Disciplina de Cardiologia

**QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO – ESTUDO DO RIO DE JANEIRO 2**

Dados de Identificação do aluno				
Escola:		Ano: _____º ano	Turma:	
Nome do aluno:				
Sexo: <input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> feminino	Data Nasc.: ____/____/____	Idade: _____ anos		
Tel cel aluno:		<input type="checkbox"/> E-mail aluno:		
Nome da mãe:		Cel:		
Nome do pai:		Cel:		
Endereço:				
<input type="checkbox"/> E-mail pai:		<input type="checkbox"/> E-mail mãe:		
Bairro:	CEP:	Tel res.:		
Dados Epidemiológicos do aluno				
Cor: <input type="checkbox"/> branco <input type="checkbox"/> negro <input type="checkbox"/> ã branco ã negro		Irmãos: <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> >4		
Reside com: <input type="checkbox"/> pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> pai + mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/> outros		Quem: _____		
Dados de saúde do aluno				
Seu filho tem alguma doença ? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Qual: _____				
Ele nasceu com que peso ? _____g <input type="checkbox"/> Prematuro (antes do tempo) <input type="checkbox"/> A termo (no tempo certo)				
Hábitos de vida do aluno				
Bebida alcoólica: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>		Fumo: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Fim de semana ou 2x/semana ou mais		<input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Ex-fumante		
Atividade física: para responder a estas perguntas você deve procurar se lembrar das atividades físicas realizadas ou não no último mês				
▪ Deslocamento para a escola: <input type="checkbox"/> andando <input type="checkbox"/> pedalando de bicicleta <input type="checkbox"/> de carro ou outro transporte				
Quanto tempo gasta por dia somando ida e volta ? _____ horas _____ minutos por dia				
▪ Realiza atividade física fora da escola? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Qual ? _____				
Com que frequência ? <input type="checkbox"/> nunca/quase nunca (menos de 1x/semana) <input type="checkbox"/> algumas vezes (1-2x/semana)				
<input type="checkbox"/> sempre (≥ 3X/semana)				
Por quanto tempo ? _____ horas _____ minutos por dia				
▪ Períodos sem fazer atividade física (representa o tempo que seu(a) filho(a) passa assistindo TV, no computador, tablete, videogame ou ao telefone): _____ horas _____ minutos por dia				
Hábitos Alimentares (Qual a frequência na semana que o aluno consome os alimentos abaixo)				
	Nunca/Raro	1-2x/sem	3-4x/sem	5-7x/sem
Ovo, carne vermelha, leite integral, frituras				
Arroz branco, pães, biscoitos, bolos, doces, balas				
Enlatados, embutidos e/ou acrescenta sal à comida depois de pronta				
Leite, queijo e iogurte				
Cereais integrais, verduras (folhas), frutas com casca e bagaço				
Legumes e frutas				
Informação de saúde dos pais				
Pressão alta: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	Diabetes: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>	Colesterol alto: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim		
Quem : pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>	Quem: pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>	Quem: pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>		
Infarto: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	Derrame: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim	Excesso de peso: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim		
Quem: pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>	Quem: pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>	Quem: pai <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> avós <input type="checkbox"/>		
Outras doenças pai/mãe:				

ESTUDO DO RIO DE JANEIRO 2 – Av. 28 de Setembro, 77 sala 251 – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20551-030  
Tel.: (21) 2968-8382 – Cel: (21) 99636-8697 – E-mail: estudodoerj2@yahoo.com.br.

**APÊNDICE B** - Carta informativa sobre o estudo dirigida aos pais

Universidade do Estado do Rio de Janeiro / HUPE

Disciplina de Cardiologia

Setor de Hipertensão Arterial

**Prezado responsável,**

Seu filho(a) está sendo convidado a participar de um estudo de investigação que inclui a verificação da pressão arterial, do peso, da altura e da circunferência abdominal. Com isso saberemos qual a faixa de pressão arterial normal das crianças brasileiras e como está a saúde cardiovascular geral e o estado nutricional.

A avaliação acontecerá no ambiente escolar, por médico e nutricionista, no horário que melhor for para a escola.

Você não é obrigado a participar, mas caso concorde muito irá colaborar para o conhecimento médico. Também é uma oportunidade de avaliação da saúde cardiovascular do seu filho(a) e, juntos adotarmos medidas em prol de uma vida saudável.

Em caso de dúvidas, procure-nos no setor de Hipertensão Arterial da Cardiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro ou no telefone 2888-8382. Falar com: Dra. Andréa Araujo Brandão ou Dra. Maria Eliane Campos Magalhães ou Nut. Flávia Lopes Fonseca.

Eu, \_\_\_\_\_ autorizo o  
aluno (a) \_\_\_\_\_ a  
participar do estudo.

**ESTUDO DO RIO DE JANEIRO II – Av. 28 de Setembro, 77 sala 251 – Vila Isabel – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20551-030 – Tel.: (21) 2868-8382.**

## APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Hospital Universitário Pedro Ernesto  
Setor de Hipertensão Arterial e Lípidos do Serviço/Disciplina de Cardiologia

### Termo de Consentimento Livre Esclarecido - Estudo do Rio de Janeiro 2

Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigação de certas condições chamadas de fatores de risco cardiovascular, que aumentam a chance das pessoas terem infarto, derrame ou outros problemas do coração e da circulação, como: pressão alta, diabetes ou açúcar alto no sangue, excesso de peso, problemas de colesterol alto e outros hábitos de vida ruins como má alimentação, fumo, uso de bebida alcoólica e falta de atividade física. Nessa pesquisa pretendemos avaliar a presença de algumas dessas condições em seu (sua) filho (a).

Para decidir se você deseja participar ou não, você precisa entender o objetivo do estudo, que explicaremos a seguir:

**Objetivo e Procedimentos do Estudo:** Identificar os principais fatores de risco cardiovascular em idades jovens, pois eles levam a doenças no coração e da circulação, que são ainda a maior causa de morte em vários países do mundo, inclusive no Brasil. Para isso, será feita uma avaliação em seu (sua) filho (a), por médicos e nutricionistas, que incluirá a verificação da pressão arterial, medidas do peso, altura e circunferência abdominal, algumas perguntas gerais que você deverá responder sobre os hábitos de alimentação e prática de atividade física, e um exame de coleta de saliva para avaliação de condições genéticas que poderiam se associar ao desenvolvimento de alterações da pressão arterial, do excesso de peso e das gorduras do sangue. A coleta desse material será feita passando suavemente um tipo de cotonete chamado swab no céu da boca, nas bochechas e na língua.

**Benefícios aos participantes:** Ao participar de estudos como este, além de você colaborar para o maior conhecimento médico e científico sobre esses problemas em nosso país, você permitirá que seja realizada uma revisão da saúde cardiovascular do(a) seu(sua) filho(a). Caso seja encontrada alguma anormalidade, você será devidamente informado e receberá as orientações médicas necessárias, porque quanto mais cedo estes fatores forem identificados, mesmo que a pessoa não sinta nada, maior o benefício que esta pessoa terá com o tratamento imediato.

**Desconfortos e Riscos:** Não há riscos para o(a) seu(sua) filho(a) em participar desta pesquisa. Nenhum novo medicamento ou forma de tratamento será testado em você. A coleta da saliva não produz risco de adquirir qualquer tipo de doença pois o material é estéril (sem contaminação) e de uso individual.

**Dados confidenciais:** A menos que sejam requeridos por lei, apenas o investigador, o comitê de revisão e a comissão de ética terão acesso aos seus dados. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou em publicações científicas; no entanto, seu(sua) filho(a) não será identificado(a).

**Pessoas para contato:** Se você não entender alguma palavra do texto ou tiver alguma dúvida, nos procure no Serviço de Hipertensão do Departamento de Cardiologia do Hospital Pedro Ernesto ou entre em contato através do telefone 2868-8382. Você poderá procurar pelas: Dra. Andréa Araujo Brandão ou Dra. Maria Eliane Magalhães ou pela Nutricionista Flávia Lopes Fonseca.

**Participação voluntária:** Você está participando voluntariamente deste estudo. Você pode se recusar a participar do mesmo a qualquer momento. Após ler, entender e concordar, você assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e somente depois, os médicos e nutricionistas irão examiná-lo.

Li o texto acima, estou ciente do conteúdo deste formulário e concordo voluntariamente em participar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Nome (aluno): \_\_\_\_\_

Nome (responsável): \_\_\_\_\_

Assinatura (responsável): \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome (investigador): \_\_\_\_\_

Assinatura (investigador): \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**APÊNDICE D – Lista de soluções e tampões utilizados**PBS 1X pH7.4

NaCl	137 mM
Fosfato	10 mM
KCl	2,7 mM

TBE 5X pH 8

TrisBase	440mM
Ácido bórico	440mM
EDTA pH 8	10mM
Água deionizada	q.s.p. 500mL

Acrilamida 30%

Acrilamida	29g
Bisacrilamida	1g
Água deionizada	q.s.p.100mL

Poliacrilamida 10%

Acrilamida 30%	3,33mL
TBE 5X	2mL
Água deionizada	4,56mL
APS 10%	100µL
TEMED	10µL

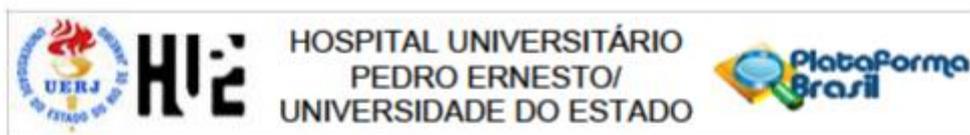
Tampão Multiplex Qiagen Master Mix 2x

HotStarTaq<sup>R</sup> DNA Polimerase

Multiplex PCR Buffer pH 8,7

dNTP Mix

## ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Comparação de curvas de peso, altura e índice de massa corporal em duas amostras populacionais de crianças e adolescentes com intervalo de 30 anos.

**Pesquisador:** Flávia Lopes Fonseca

**Área Temática:** Genética Humana;  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 16328013.9.0000.5259

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.360.583

**Apresentação do Projeto:**

**FUNDAMENTOS:** São vastas as evidências que apontam para o aumento progressivo das taxas de excesso de peso no mundo e no Brasil nos

últimos anos, independente do sexo e da idade. Por outro lado, é de conhecimento geral que a obesidade é um importante fator de risco

cardiovascular (RCV) em indivíduos adultos, sendo fundamental que este aspecto seja melhor compreendido em faixas etárias mais jovens.

**OBJETIVOS:** Conhecer o estado nutricional de crianças e adolescentes escolares na faixa etária de 6 a 15 anos e analisar o comportamento das

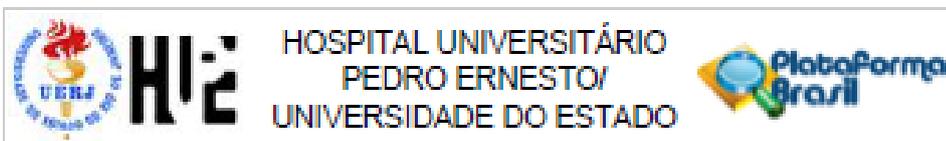
variáveis antropométricas de peso, altura e índice de massa corpórea (IMC), por sexo idade dessa população, comparando o perfil atual com aquele

obtido há 30 anos em indivíduos pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro (ERJ). **MÉTODOS:** Será utilizada uma amostra populacional composta

de 6.952 crianças e adolescentes entre 6 e 15 anos de idade, de ambos os sexos, de NSE baixo, médio e alto, matriculadas na rede pública e

privada de ensino de escolas pertencentes ao 14º Departamento de Educação e Cultura (DEC) do

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2668-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.300.503

Município do Rio de Janeiro (RJ) com abrangência aos bairros que têm como referência o Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) / Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Essa população é originária da coorte do ERJ, uma linha de pesquisa sobre pressão arterial (PA) e outros fatores de RCV em indivíduos jovens e suas famílias iniciada em 1983 na UERJ. Para efeito de comparação, uma amostra populacional com características semelhantes à coorte do ERJ, será constituída de 1.000 crianças e adolescentes, com 50 indivíduos para cada idade (6 a 15 anos) e sexo, que serão avaliados nas suas escolas para a obtenção do peso, altura, IMC e circunferência abdominal (CA).

**Objetivo da Pesquisa:**

Comparar a prevalência de baixo peso, peso normal e excesso de peso de crianças e adolescentes escolares na faixa etária de 6 a 15 anos, por idade e sexo, em duas amostras populacionais avaliadas com intervalo de 30 anos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não apresenta.

**Benefícios:**

Identificação de fatores de risco relacionados à doença cardiovascular para sensibilização da necessidade de intervenções cada vez mais precoces que envolvam o controle do peso corporal, a realização de atividade física e um hábito alimentar adequado. Essas ações devem ser realizadas em conjunto e consonância com a família, escola, sociedade e governo

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa observacional com grande relevância para saúde pública

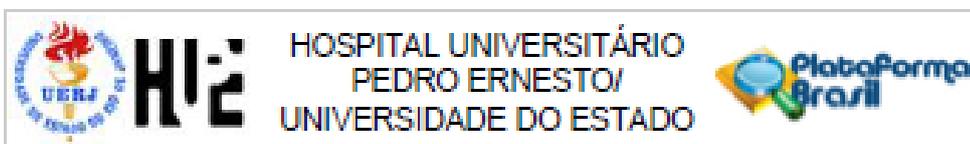
**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em conformidade

**Recomendações:**

Recomendo a inclusão dos dados dos 96 pacientes em que os responsáveis autorizaram de forma verbal a participação na pesquisa. Não há risco ou prejuízo para os sujeitos de pesquisa.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tênis  
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.561-030  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)2564-6253 Fax: (21)2564-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.300.533

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_628111_E2.pdf	17/11/2015 09:24:00		Aceito
Outros	emenda_erjl_obtencao_tcle.pdf	17/11/2015 09:23:12	Flávia Lopes Fonseca	Aceito
Outros	Adendo Genética Erika e Flávia (1)_andrea.doc	21/08/2014 12:29:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1-TCLE ERJ II com genética FF_andrea.doc	21/08/2014 12:28:22		Aceito
Outros	Adendo Genética Erika e Flávia (1)_andrea.doc	12/08/2014 12:23:32		Aceito
Outros	1-TCLE ERJ II com genética FF_andrea.doc	12/08/2014 12:23:10		Aceito
Nova versão TCLE	carta ao cep 24 out 13.pdf	24/10/2013 13:20:51		Aceito
Nova versão TCLE	TCLE novo final-1 24 out 13.pdf	24/10/2013 13:14:36		Aceito
Outros	Decl Ciência Flávia assinada.JPG	01/08/2013 06:43:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Doutorado Flávia Fonseca.pdf	15/07/2013 21:14:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Dout Flávia Fonseca - Junho-2013.pdf.pdf	02/07/2013 07:57:23		Aceito
Folha de Rosto	FR Flávia assinada.JPG	02/07/2013 07:55:46		Aceito

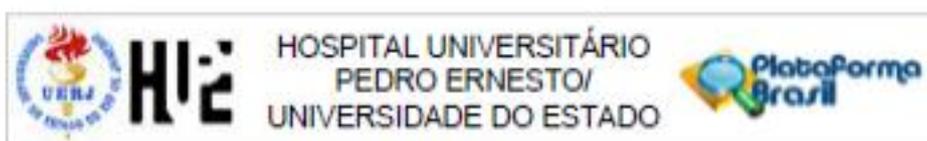
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.561-030  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)2263-0253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uef.br



Continuação do Parecer: 1.380.583

RIO DE JANEIRO, 10 de Dezembro de 2015

---

Assinado por:  
**DENIZAR VIANNA ARAÚJO**  
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Távnia  
Bairro: Vila Isabel CEP: 20.951-030  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2865-6263 Fax: (21)2264-0653 E-mail: oep-hupe@uerj.br

Página 04 de 04

**ANEXO B – Comprovação de submissão do 1º artigo científico ao periódico**  
*Electrophoresis.*

03/11/2021 17:15 Email – Yasmin Rollenber – Outlook

**ELECTROPHORESIS elps.202100224 - Decision on Manuscript # elps.202100224**

Hermann Wätzig <onbehalf@manuscriptcentral.com>  
 Quat, 13/10/2021 14:28  
 Para: rollenberg.yasmin@hotmail.com <rollenberg.yasmin@hotmail.com>  
 13-Oct-2021

Dear Ms. Machado,

There is interest in your manuscript # elps.202100224, "Customized Minisequencing Multiplex assay to genotyping of 27 cardiovascular-related SNPs for a low-cost clinical application.", which you have submitted to ELECTROPHORESIS.

However, in view of the criticisms of the reviewer(s), I must reject the manuscript in its present form for publication in ELECTROPHORESIS .

We invite you to submit the re-worked manuscript as a new paper.

We kindly request the following SEVEN items:

1. PROOF READ:  
Before you submit your revision, please proof-read the manuscript carefully to minimize typographical, grammatical, and bibliographic errors. In addition, check to make sure that all nonstandard abbreviations are defined.
2. RESPONSE TO REVIEWERS (file is needed):  
Please prepare a document entitled 'RESPONSE TO REVIEWERS' indicating in detail the changes you have made and why. Also, indicate which of the suggested changes, if any, you have elected not to make and your reasons. This document should be uploaded as "Supporting Information for the Editor and peer review".
3. CLEAN MANUSCRIPT (file is needed):  
Please upload a clean (non-highlighted) manuscript as the main document file, name this file 'CLEAN MANUSCRIPT'. Please note that this should be a .doc(x) or .rtf file.
4. MARKED UP MANUSCRIPT (file is needed):  
In addition to providing the response to the reviewers' comments, a second version of the manuscript must be uploaded as "Supporting Information for the Editor and peer review" indicating the changes made in the manuscript itself, either by using the track change mode in Word or by changing the script color of the revised sections. Name this file 'MARKED-UP MANUSCRIPT'.
5. IMAGE FILES:  
Please prepare and submit independent files (such as tiff files) for the images and figures in the manuscript following the instructions in section 5.9 of the Instruction for authors, which are available here: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15222683/homepage/forauthors.html>
6. REFERENCES:  
Please make sure that the references in your manuscript follow the guidelines listed in section 5.4 of the Instruction for authors, which are available here:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15222683/homepage/forauthors.html>  
As example, below is the required formatting for references from journal articles:  
 [1] Lidsky, M. D., Sharp, J. T., Rudel, M. L., Arch. Biochem. Biophys. 1967, 121, 491-502.  
 [2] Weiland, F., Zammit, C. M., Reith, F., Hoffmann, P., Electrophoresis 2014, 35, 1893-1902.

<https://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AGQKADAwATTYwMA80DZC04CAAN0wMA8MDAKABAAhmdJH77MEqp030%2F0ag%3D%3D> 1/4

**ANEXO C – Formato final do 1º artigo científico submetido.****Development of customized 4 Minisequencing Multiplex assays to genotyping of 27 SNPs related to cardiovascular risk for low-cost clinical application**

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado<sup>1,2\*‡</sup>, Gizella da Cunha Rodrigues<sup>1‡</sup>,  
 Rossana Ghesa Andrade de Freitas<sup>1,2‡</sup>, Maria Eliane Campos Magalhães<sup>2,3</sup>,  
 Ricardo Mourilhe-Rocha<sup>2,3</sup>, Andréa Araujo Brandão<sup>2,3</sup>, Denilson Albuquerque<sup>2</sup> and  
 Dayse Aparecida da Silva<sup>1,2</sup>.

1 Laboratório de Diagnósticos por DNA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 Rio de Janeiro, RJ, Zip Code: 20550-900. Brazil

2 Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 Rio de Janeiro, RJ, Zip Code: 20551-030. Brazil

3 Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 Rio de Janeiro, RJ, Zip Code: 20551-030. Brazil

‡ Equal contribution

\*Correspondence should be addressed to the following author(s):

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado, MSc, ORCID - 0000-0003-1996-9033  
 Laboratório de Diagnósticos por DNA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 São Francisco Xavier, 524, Maracanã, PHLC, Rio de Janeiro, Zip Code: 20550-900,  
 Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
 Email rollemberg\_yasmin@hotmail.com

**Keywords:** Clinical studies; Genotyping; Multiplex system; SNaPshot®; SNP.

**Abstract**

The role of genetic variants in multifactorial diseases has been widely investigated through genome-wide association studies. These assays are however expensive, complex-interpretation, and not accessible to the scientific community as a whole. Customized Multiplex assays offer a single, low-cost and practical option. Objective: To develop a cheaper and validated Multiplex system based on SNaPshot® technology for genotyping of SNPs applicable in clinical samples. Methods: 4 customized Multiplex Panels involving 27 cardiovascular risk-related SNPs were constructed for genotyping of 1,064 buccal swabs and 528 blood stored samples. The resulting genotypes were validated by Sanger sequencing. Results: Full genetic profile was obtained in 772 swabs for Panel A (72.55%), in 858 for Panel B (80.63%); in 272 of 294 blood samples for Panel C (92.51%), and 202 of 234 for Panel D (86.32%). Marker's performance ranged from 81-100%. Panels reached 90% of informativity in samples stored for 2 years or more. Agreement rate between genotyping methods ranged from 97.5-100%. Hardy Weinberg equilibrium test detected departed SNPs and monomorphism in the analyzed population. Conclusion: The customized SNaPshot® Multiplex Panels represented an efficient molecular methodology to genotype SNPs with high sensitivity, efficiency and low cost different biological samples stored for years.

## 1 Introduction

Molecular approaches based on nucleic acid properties have benefited contemporary medicine mainly in the diagnostic, prognostic and research of complex diseases [1]. Cardiovascular diseases represent one of them and their increasing morbimortality rates impacting health systems worldwide have stimulated the application of epidemiological studies [2] and genome-wide association studies [3] for the investigation of molecular assessed as their potential causatives [6–8], mainly SNPs, the most common DNA variation [9]. Their clinical importance as biomarkers were previously reported in markers from populational-based sampling [4,5]. Genetic polymorphisms related to blood pressure, lipids and body weight regulation are genetic diseases and blood typing [9–13], discrimination of pathogens [14,15], and forensic [16,17]. Blood is the optimal DNA source in clinical trials but the least attractive way to pick up volunteers [18], while non-invasive collecting methods may increase such adhesion in large-scale clinical studies due to less discomfort, good cost-effectiveness [19,20] and greater applicability in clinics and research laboratories workflow. However, the high costs and complex data interpretation of high-throughput genotyping platforms used in such studies have motivated the development of alternative and more accessible assays. Customized minisequencing Multiplex systems perform simultaneous amplification and discrimination of several target SNPs through fluorescent labeling from genetic material with questionable quality [21] in a flexible, quick, easy and cheap way compared to microarrays [12], quantitative PCR [20] and sequencing [11]. Thus, we proposed the development and validation of minisequencing Multiplex panels based on SNaPshot® technology customized here for typing of 27 biomarkers related to cardiovascular risk factors in different clinical samples with diverse time and conditions of storage.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Ethical, consent, clinical samples and genomic DNA extraction

1,064 buccal swabs and 528 EDTA whole blood samples from unrelated Brazilian volunteers were evaluated and obtained through signed informed consent term. Originally they belong to multiple and independent studies ongoing from our research group approved by the appropriate Ethical committee. Swabs remained frozen and blood stored at +8°C until DNA extraction during different time intervals (up to 12 months, 12-24 months, 24-36 months, 36-44 months, and 44-54 months). Genomic DNA from swabs was extracted by commercial kit from the national manufacturer, those from the blood by salting out protocol and both stored at -20 °C. As an additional challenge, swabs' DNA was highly fragmented (concentration < 0.001ng/µl, smears < 100bp in electrophoresis) after unexpected technical problems had affected their storage at beginning of the study.

### 2.2 Selected molecular markers

27 SNP markers were assembled in 4 personalized panels. Buccal swabs were genotyped with Panel A (rs1137101 *LEPR*, rs3746619 *MC3R* rs9939609 *FTO*, rs1799998 *CYP11B2*) and Panel B (rs17782313 *MC4R*, rs1799983 *NOS3*, rs699 *AGT* and rs3827103 *MC3R*).

Different sets of blood samples were genotyped with Panel C (rs1799837 and rs201148448 of APOA-1, rs3135507 and rs662799 of APOA-5, rs693 and rs577437570 of APOB, rs10455872 and rs3798220 of LPA, rs1799883 FABP2, and rs1800206 and rs4253778 of PPAR $\alpha$ ) and Panel D (rs3789678 and rs699 of AGT; rs3097, rs3802228, rs72554626, rs5317, rs146655862, and rs5315 of CYP11B2). These panels were customized for investigation of their clinical association as cardiovascular risk biomarkers in their multiple studies ongoing (data not published), based on previous associations with altered blood pressure [22–25], obesity [26–29], dyslipidemia [30–35] and potential deleterious effect in CYP11B2 [36].

### **2.3 Primer design**

Primers were designed and checked for secondary structures using Primer 3 page (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>) and Primer Tools on the National Institute of Standards and Technology page (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/>). Reference sequence of SNP variants and their genomic region available for primer annealing was checked from dbSNP Short Genetic Variations database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Temperature melting of amplification reactions was set around 60°C and Minisequencing 50°C. Extension primers were designed to adjacent annealing to the target SNP site in forward or reverse orientation. A widely used non-homologous 5' tail (often called pigtailed), comprising a non-human sequence generally free from interactions, was added in extension primers for spatial separation of SNPs with similar size in each panel [37,38].

### **2.4 Assembly of Multiplex reactions**

PCR and Minisequencing Multiplex panels were arranged according to their main studies' purposes as mentioned in item 2.2. The detailed composition of panels is described in Supporting Information. Positive and negative controls were used in all Minisequencing and PCR Multiplex reactions. PCR final reaction contained 5 ng of template DNA, 2.5  $\mu$ L of Multiplex PCR Master Mix 2x (Qiagen, Valencia, California), 2.0  $\mu$ L of amplification primers mix (final concentrations described in Supplementary Table S1). Amplification was performed in Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) under thermal-cycling conditions adapted from general protocol [39]: one cycle of 95°C for 15 minutes; followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 90 seconds (54°C for Panel A) and 72°C for 1 minute; and one cycle of 72°C for 10 minutes. 1.0  $\mu$ L of amplified product was purified with 0.7  $\mu$ L of ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems) according to manufactures' protocol. Minisequencing final reaction contained 1.7  $\mu$ L of the purified PCR product, 0.5  $\mu$ L of SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystem), 0.5  $\mu$ L of deionized water, and 2.5  $\mu$ L of extension primers mix (final concentrations described in Supplementary Table S2), performed under thermal-cycling conditions adapted from general protocol [39]: one cycle at 96°C for 10 seconds, followed by 25 cycles at 50°C for 5 seconds and 60°C for 30 seconds.

The entire genotyped content was purified with 1 unit of Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Affymetrix) according to manufactures' information. 1.0  $\mu$ L of purified products, 8.8  $\mu$ L of Hi-Di formamide (Applied Biosystems), and 0.2  $\mu$ L of size standard GeneScan 120 LIZ ladder (Applied Biosystem) were mixed and submitted to CE in ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Genotype calls were performed through GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystem). Genotypes provided by each marker were cross-validated through Sanger sequencing performed with the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), according to the adapted manufacturer's protocol and thermal-cycling conditions.

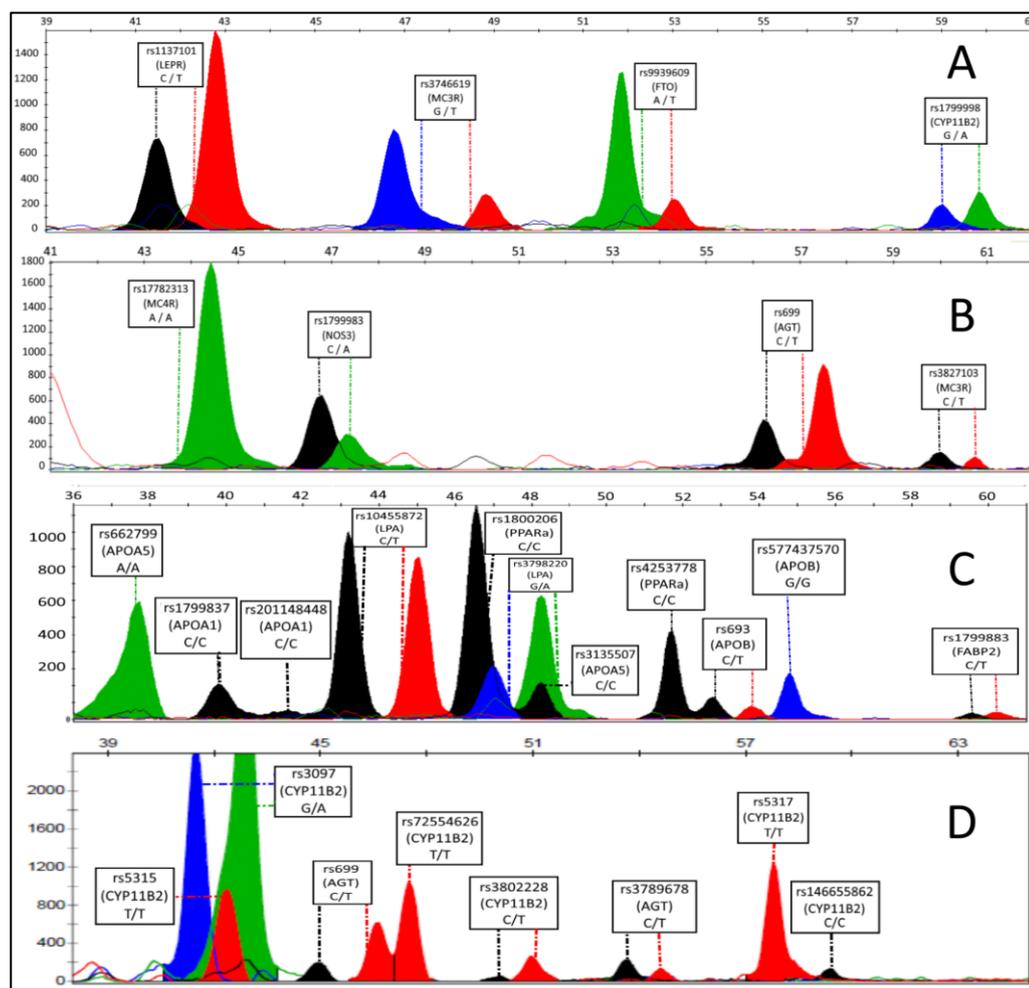
### **2.5 Population genetics analysis**

Hardy-Weinberg equilibrium test was performed to detect markers in significant deviation from independent segregation law of alleles through the software Arlequin© (version 3.5.2.2) for  $p < 0.05$ .

## **3 Results and discussion**

### **3.1 Performance of Multiplex panels and individual markers**

Firstly, PCR and Minisequencing individual reactions (singleplex) for each marker were performed as standardization step to evaluate specificity and performance of customized primers as well as to make adjustments before Multiplex assembling [38], such like reconstruction of primers due to unspecific amplification and low efficiency. Singleplex reactions followed the same protocol and cycling conditions of Multiplex reaction and obtained a successful genotyping of all markers, with fragments and alleles presenting their expected corresponding sizes (data not shown). Then, the primers were arranged in Multiplex panels according to similar technical features having final concentrations and annealing temperature adjusted for Multiplex conditions (Supplementary Table S1 and S2). Successful amplification and genotyping were obtained in all panels in their respective samples, as shown in Figure 1. As expected, slight displacement of some bp in the expected allele positions according to primer design as well as differences in peak heights were observed. Both cases resulted from fluorescent dyes' chemistry, where according to the base added in the reaction the mobility of extension products may vary from 2 to 4 bases [37,38] and their naturally different emission levels combined with variable amplicon quality may create differences in peak heights [38,40]. In the last case, we did not achieve significant improvement in the balance of peak heights, but they were distributed within the expected range of 36-61bp, and exhibited in their position one (homozygotes) or two different colored peaks (heterozygotes) with specific-dye labeling.

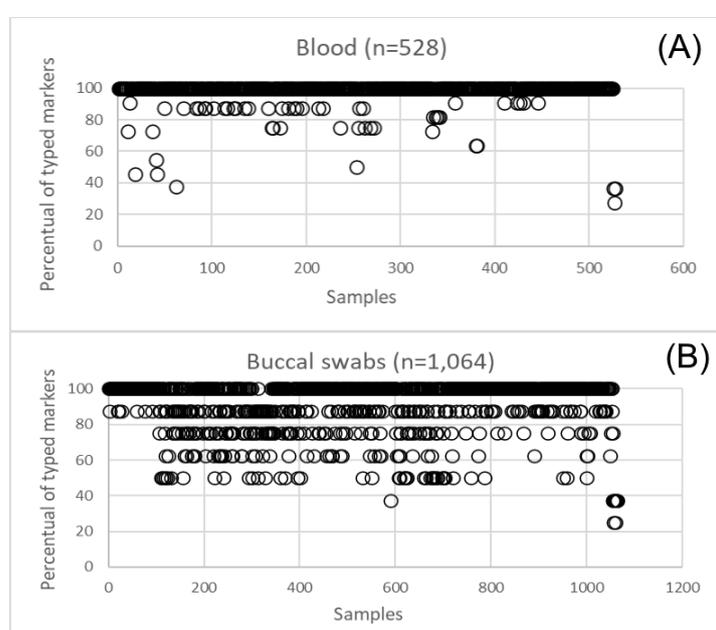


**Figure 1.** Electropherograms provided by analysis software of 4 Multiplex Minisequencing panels containing 27 SNPs. A, Panels A and B grouped; B, Panel C; C, Panel D. Each marker (box) is connected by a traced line with their respective alleles (colored peaks harboring dye-specific labeling: black-C/red-T/green-A/blue-G). X-axis, fragment sizes in bp; Y-axis, relative fluorescent units.

As observed, Multiplex genotyping in one reaction tube reduces costs per examination, processing time and sample consumption<sup>216</sup>, allowing a larger input of samples per analysis round increasing the sampling population, such as our quantitative of 1,054 samples, for example.

Yet, Multiplex panels can be rearranged after a first configuration to optimize genotyping quality from low-quality samples<sup>51,217–220</sup>, to avoid early removal of challenging markers<sup>221,222</sup> or to adjust a large quantitative of SNPs within the software analysis' window<sup>216,221</sup>. The main study with buccal swabs used this feature to avoid mistyping in rs1799983 *NOS3* and rs3746619 *MC3R*, which presented significant signal overlapping by its C and G alleles. Signal overlapping in genotyping Multiplex systems is expected but preventable with 5' tails for spatial separation of extension products during CE<sup>45,222</sup>, but it was not effective enough in the aforementioned two markers.

Overall multiplex performance was evaluated in swabs and blood samples by the percentage of total genotyped markers (Figure 2). Noteworthy, large amount of samples 100% genotyped created a visual “strip” effect at the top of the graph. Panel A was 100% typed in 772 samples (72.55%), Panel B in 858 (80.63%), and considering both panels together, 680 samples were genotyped for the eight markers (63.80%). Considering both panels, 282 swabs missed from 1-2 markers (26.50%) and 102 missed 3 or more markers (9.58%). Panel C was fully genotyped for its 11 markers in 272 of 294 blood samples (92.51%), 17 samples missed from 1-5 markers (5.79%) and 5 samples missed 6 markers or more (1.70%). In another blood set, 202 of 234 were fully genotyped for the 8 markers from Panel D (86.32%), 31 samples missed from 1-2 markers (13.67%) and one sample (0.43%) missed 4 markers.



**Figure 2.** Dispersion of samples according to the percentage of total typed markers in (A) blood samples and (B) buccal swabs.

As observed, our panels achieved an overall good performance with percentages of complete genotyping above 80%, few samples with significant loss of markers (< 50% of loci typed) in both samples and even for Panel A and B that together provided genotypes of 6 or more markers from 90.4% of highly degraded swabs (n=962). A comparative study involving 4 loci genotyped by RFLP and real-time PCR found an overall success rate of 48% in buccal swabs compared to 82.8% in saliva FTA cards [20].

Another one typed 2 SNPs using two and found rates of 100% for blood samples, 72% for saliva, and no amplification for buccal swabs by Taqman assay and 100%, 67%, and no results, respectively, by sequencing. [18]. Multiplex SNP panels presented lower average of success rate and total loci typed from diverse casework samples (like muscle, toothbrush, and hair) which were most severely degraded. [16] Thus, biological sample’s DNA quality seems to influence the variability of performance and typing rates by Multiplex panels, regardless of the applied assay.

Nevertheless, frequent amplification failures and allele drop-out from swabs DNA are expected considering its natural greater susceptibility to contamination/degradation by microflora and/or lytic enzymes [9,43] than blood, type of collecting method [21], and even interindividual differences concerning DNA resistance [16,21]. Despite the apparent “low” efficiency of some of our panels in swabs, customized SNaPshot assays remain as a sensible, accurate, and advantageous assay for allelic discrimination in challenging DNA achieving 100% of efficiency in discrimination of populational groups from 0.2ng cell lines DNA cell lines or sonicated blood DNA (<150bp) [40] 96% in mutation screening from formalin-fixed paraffin-embedded tumor-derived DNA [44], 99% in paternity and identification cases using blood group SNPs from blood and forensic samples [42], as well as 70-89% in identification of pathogen fungal DNA from human clinical samples [15].

The 27 markers from minisequencing panels had their performance within a Multiplex condition evaluated based on their genotyping rates according to sample type (Supplementary Table S3). Among buccal swabs, marker rs699 ANG from Panel B achieved the highest rate (97.65%) while the lowest by rs9939609 FTO from Panel A (81.20%). Among blood samples type with Panel C, rs10455872 LPA achieved a 100% rate and the lowest by rs693 APOB (95.57%), while in another typed with Panel D, rs72554626, rs5317, rs5315 of CYP11B2 achieved a 100% rate and the lowest rate by rs3789678 CYP11B2 (91.02%). Despite no quantification data, poor DNA integrity seemed to influence our panels' performance once partial typing in preserved blood DNA probably related to some poor quality sample was lesser frequent than in degraded swabs. Also, in these samples, an observed trend of lower efficiency rates related to long amplicons' primers compared to those that yielded short fragments (81-96% vs. 98-100%) seemed to indicate preferential amplification and competitiveness between markers from the same panel.

A comparative study with a range of degraded samples observed similar variability with longer amplicon systems presented lower overall success rate than those that yielded shorter ones (62-100% vs. 71-100%), apparently due to greater influence by PCR inhibitors and lesser effectivity of DNA polymerization in initial cycling [17]. Another comparative study aforementioned, worse performance by longer amplicon systems in degraded samples (63% vs. 81% shorter systems) was not correlated with amplicon size but with variability in locus dropout rates situated at different nucleosome regions of protection against nucleases.[16] As overall suggestion, PCR Multiplex's primers should be designed to produce short-size fragments (< 120bp) aiming for competitiveness reduction and the increase on the probability of successfully genotyping, mainly from degraded samples like our swabs [16,38]. However, biological conditions can limit this demand as we found for rs9939609 *FTO*. Our attempts to optimize its amplification primers were hampered by its localization within Adenine Thymine-rich genomic region which did not provide adequate annealing. Due to its clinical relevance in its main study, this marker was not removed as suggested<sup>222</sup> but Panel A's melting temperature was adjusted to 54°C and obtained a relatively good typing rate.

### **3.2 Impact of storage time on Multiplex's informativeness**

Decrease in the capability of Multiplex panels to obtain genetic profiles for all markers over time was calculated as the observed-expected typed markers ratio according to sample type and its time of storage (Table 1).

All panels were almost completely informative for typed markers both in swabs and blood samples stored up to 24 months. Between 24 and 36 months, loss of markers in blood was significantly higher than swabs but this remained stable or small in the following periods. Otherwise, this same decrease and stability in swabs were observed only from 36 months.

**Table 1.** Multiplex panels' informativeness according to storage intervals.

Storage time (in months)	Number of samples	Observed/Expected number of typed markers	% of complete information
Up to 12	26	205/208	99
	481	4532/4613	98
12-24	76	604/608	99
	21	200/207	97
24-36	40	308/320	96
	7	70/77	91
36-44	709	5094/5672	90
	19	185/209	89
44 or more	213	1542/1704	90
	-	-	-

a) In each time interval, swabs are referenced in the upper line and blood in the bottom line.

b) There were not blood samples stored during the last time interval.

As observed, Multiplex system was able to obtain reliable genetic profiles, with a minimum loss, in overall samples stored for until 2 years regardless of their type. Similarly, for longer periods (30 days or more) of storage, freezing was effective in preserving DNA integrity of buccal swabs, providing accurate genotyping [43], while for blood samples it was required the addition of other preserving solutions than EDTA regardless of storage temperature [45]. Also, our high percentage of informativeness (around 90%) was kept even in samples stored for 3 years or more (with probably highly degraded DNA) demonstrating the robustness and sensibility of our Multiplex system to obtain genetic profiles from old clinical samples.

### 3.2 Validation assay

Genotypes provided by the customized Multiplex system were cross-validated through Sanger sequencing, resulting in an agreement rate between genotyping techniques. 20 samples were tested for Panel A and another 20 for Panel B, totalizing 80 genotypes validated in swabs each one. Panel A was validated with 77 instead of 80 genotypes due to missing of three rs9939609 FTO sequencing data but reached 98.70% of agreement with 76 of 77 genotypes concordant and 1 genotype discordant in rs9939609 FTO (genotype TA corrected to AA). For Panel B, there wasn't sequencing data loss and the agreement rate reached 98.75%, with 79 of 80 genotypes concordant and 1 genotype discordant in rs17782313 MC4R (genotype CT corrected to TT). Panel C was tested in 33 blood samples, yielded 363 genotypes without data loss and with 100% of agreement.

Panel D was sequenced in another 10 blood samples yielding 80 genotypes without data loss and achieved 97.5% of agreement, with 78 of 80 genotypes concordant, one sample discordant for rs3802228 CYP11B2 (genotype GG corrected to AA) and another for rs3789678 AGT (genotype CT corrected to CC). Our overall agreement rate of around 99% indicates that our customized Multiplex system presented consistency and accuracy as other techniques to provide reliable genetic profiles of 27 markers from different clinical samples regardless of their type and preservation. Our performance was similar to other personalized SNP panels for screening in glucose-6-phosphate dehydrogenase gene [10] and fetal hemoglobin expression [13] validated with a 100% of agreement with different methodologies. Beyond human failure, some technical issues as allele imbalance [38], signal overlapping by clustered variants in primer binding site [38], unspecific fluorescent signals by insufficient purification [39] and polymerase DNA errors may lead to mistyping in certain SNPs, as we found, mainly when performed with low PCR products [40].

### 3.3 Populational data analyses

The Hardy-Weinberg test based on observed and expected heterozygosity for each marker detected some departed markers in our population. Noteworthy, markers rs577437570 APOB from Panel C and rs72554626, rs5317, rs146655862, and rs5315 of CYP11B2 from Panel D are monomorphic and were not tested. According to dbSNP, these SNPs are mostly monomorphic but rs577437570 APOB presents some variation in admixed American population which is being investigated for clinical association in admixed sampling in their main study (data not published), while SNPs CYP11B2 with potential deleterious effect according to computational analysis [36] exhibited monomorphism in the population sample analyzed. Among 25 remaining SNPs, after Bonferroni's correction, rs3827103 MC3R from Panel B ( $p < 0.0001$ ), rs1799883 FABP2 ( $p = 0.0006$ ), rs1799837 APOA-1 ( $p < 0.0001$ ), rs4253778 PPAR- $\alpha$  ( $p < 0,002$ ) and rs10455872 LPA ( $p = 0.003$ ) from Panel C presented significant deviations associated to loss of heterozygosity according to software. We believed that population stratification in these admixed samplings may have caused these deviations once population admixture represents real biological features associated with this type of departure [46,47] beyond experimental errors, natural selection, and inbreeding [46]. Although departed SNPs are traditionally excluded before further analyses by most clinical studies to avoid erroneous correlations (false-positive) [46], further exploration of this condition may reveal SNPs in linkage disequilibrium, that is, inherited together on the same chromosome, which combined may be acting as risk haplotype for a given disease in certain population samples as 3 SNPs NOS3 for heart failure in African-Brazilian [22] and 2 SNPs MC3R for obesity in North-American and Asian children [26,48].

### 4 Concluding remarks

Our customized SNAPshot® Multiplex assay represented a cost-effective and trustworthy molecular tool for genotyping 27 SNP markers from swabs and blood for clinical investigation in our different studies. Yet, its easy and quick workflow, single data interpretation, besides accuracy in obtaining genetic profiles even from degraded samples as ours allows its application on research and laboratory routine, on a small or large scale from fresh or stored samples.

### Acknowledgments

We are grateful to all members of the Laboratório de Diagnósticos por DNA and Hospital Universitário Pedro Ernesto (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) for technical assistance. This research was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Brazil (Finance Code 001) and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil (Award Number 421922/2016-8).

### Conflict of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

### Data Availability Statement

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

### 5 References

- [1] Orakpoghenor O, Markus T.P. *MedRead J. Fam. Med.* 2020, 1, 1–11.
- [2] Kim, M. K., Han, K., Park, Y. M., Kwon, H. S., Kang, G., Yoon, K. H., Lee, S. H. *Circulation* 2018, 138, 2627–2637.
- [3] Tian, C., Gregersen, P. K., Seldin, M. F. *Hum. Mol. Genet.* 2008, 17, 143–150.
- [4] Adeyemo, A., Gerry, N., Chen, G., Herbert, A., Doumatey, A., Huang, H., Zhou, J., Lashley, K., Chen, Y., Christman, M., Rotimi, C. *PLOS Genet.* 2009, 5, 1–11.
- [5] Zhao, J., Bradfield, J. P., Zhang, H., Sleiman, P. M., Kim, C. E., Glessner, J. T., Deliard, S., Thomas, K. A., Frackelton, E. C., Li, M., Chiavacci, R. M., Berkowitz, R. I., Hakonarson, H., Grant, S. F. A. *Obesity* 2011, 19, 2436–2439.
- [6] Abdel Ghafar, M. T. *Steroids* 2020, 163, 108701.
- [7] Rather, R. A. *Int. J. Cardiol.* 2016, 220, 914–923.
- [8] Singh, R. K., Kumar, P., Mahalingam, K. *Comptes Rendus - Biol.* 2017, 340, 87–108.
- [9] Fiorentino, F., Magli, M. C., Podini, D., Ferraretti, A. P., Nuccitelli, A., Vitale, N., Baldi, M., Gianaroli, L. *Mol. Hum. Reprod.* 2003, 9, 399–410.
- [10] Zhang, L., Yang, Y., Liu, R., Li, Q., Yang, F., Liu, H., Chen, X., Yang, Z., He, Y., Genetics, M., Province, Y., Hospital, F. A., Province, Y., Maternal, C., Hospital, C. H., Province, Y., Province, Y. 2016, 37, 739–745.
- [11] Latini, F. R. M., Gazito, D., Arnoni, C. P., Muniz, J. G., De Medeiros Person, R., Carvalho, F. O., Baleotti, W., Castilho, L., Barreto, J. A. *Blood Transfus.* 2014, 12.
- [12] Di Cristofaro, J., Silvy, M., Chiaroni, J., Bailly, P. J. *Mol. Diagnostics* 2010, 12, 453–460.
- [13] Fanis, P., Kousiappa, I., Phylactides, M., Kleanthous, M. 2014, 1–12.
- [14] Lai, G., Zhang, W., Tang, H., Zhao, T., Wei, L., Tao, Y., Wang, Z., Huang, A. *Mol. Med. Rep.* 2014, 10, 1245–1251.
- [15] Caramalho, R., Gusmão, L., Lackner, M., Amorim, A., Araujo, R. *PLoS One* 2013, 8.
- [16] Freire-Aradas, A., Fondevila, M., Kriegel, A. K., Phillips, C., Gill, P., Prieto, L., Schneider, P. M., Carracedo, A., Lareu, M. V. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012, 6, 341–349.
- [17] Fondevila, M., Phillips, C., Naverán, N., Cerezo, M., Rodríguez, A., Calvo, R., Fernández, L. M., Carracedo, Á., Lareu, M. V. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2008, 1, 26–28.

- [18] Hansen, T. V. O., Simonsen, M. K., Nielsen, F. C., Hundrup, Y. A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007, 16, 2072–2076.
- [19] García-Closas, M., Egan, K. M., Abruzzo, J., Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Franklin, T., Bender, P. K., Beck, J. C., Le Marchand, L., Lum, A., Alavanja, M., Hayes, R. B., Rutter, J., Buetow, K., Brinton, L. A., Rothman, N. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 2001, 10, 687 LP – 696.
- [20] Milne, E., Van Bockxmeer, F. M., Robertson, L., Brisbane, J. M., Ashton, L. J., Scott, R. J., Armstrong, B. K. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006, 15, 816–819.
- [21] Livy, A., Lye, S., Jagdish, C. K., Hanis, N., Sharmila, V., Ler, L. W., Pramod, B. *Indian J. Clin. Biochem.* 2012, 27, 28–33.
- [22] Martinelli, N. C., Santos, K. G., Biolo, A., La Porta, V. L., Cohen, C. R., Silvello, D., Andrades, M. E., Clausell, N., Rohde, L. E. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 2012, 26, 141–147.
- [23] Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y. V., Lifton, R. P., Williams, C. S., Charrou, A., Hunt, S. C., Hopkins, P. N., Williams, R. R., Lalouel, J. M., Corvol, P. *Cell* 1992, 71, 169–180.
- [24] Takeuchi, F., Yamamoto, K., Katsuya, T., Sugiyama, T., Nabika, T., Ohnaka, K., Yamaguchi, S., Takayanagi, R., Ogihara, T., Kato, N. *Hypertens. Res.* 2012, 35, 825–831.
- [25] Gunda, P., Nagalingam, S., Tirunilai, P. *Clin. Exp. Hypertens.* 2016, 38, 520–525.
- [26] Lee, Y. S., Poh, L. K. S., Kek, B. L. K., Kah, Y. L. *Diabetes* 2007, 56, 2622–2630.
- [27] Feng, N., Young, S. F., Aguilera, G., Puricelli, E., Adler-Wailes, D. C., Sebring, N. G., Yanovski, J. A. *Diabetes* 2005, 54, 2663 LP – 2667.
- [28] Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M. R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J. F., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N. A., Doney, A. S. F., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. *Science* (80- ). 2007, 316, 889–894.
- [29] Loos, R. J. F., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Hua Zhao, J., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Bergmann, S., Bennett, A. J., Bingham, S. A., Bochud, M., Brown, M., Cauchi, S., Connell, J. M., Cooper, C., Davey Smith, G., Day, I., Dina, C., De, S., Dermitzakis, E. T., Doney, A. S. F., Elliott, K. S., Elliott, P., Evans, D. M., Sadaf Farooqi, I., Froguel, P., Ghorji, J., Groves, C. J., *Nat. Genet.* 2008, 40, 768–775.
- [30] Asselbergs, F. W., Guo, Y., van Iperen, E. P. A., Sivapalaratnam, S., Tragante, V., Lanktree, M. B., Lange, L. A., Almoguera, B., Appelman, Y. E., Barnard, J., Baumert, J., Beitelshes, A. L., Bhangale, T. R., Chen, Y.-D. I., Gaunt, T. R., Gong, Y., Hopewell, J. C., Johnson, T., Kleber, M. E., Langae, T. Y., Li, M., Li, Y. R., Liu, K., McDonough, C. W., Meijis, M. F. L., Middelberg, R. P. S., Musunuru, K., Nelson, C. P., O’Connell, J. R., *Am. J. Hum. Genet.* 2012, 91, 823–838.
- [31] Villard, E. F., Houry, P. E. I., Frisdal, E., Bruckert, E., Clement, K., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Goff, W. Le, Guerin, M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013, 33, 822–828.
- [32] Pullinger, C. R., Aouizerat, B. E., Movsesyan, I., Durlach, V., Sijbrands, E. J., Nakajima, K., Poon, A., Dallinga-Thie, G. M., Hattori, H., Green, L. L., Kwok, P.-Y., Havel, R. J., Frost, P. H., Malloy, M. J., Kane, J. P. J. *Lipid Res.* 2008, 49, 1846—1854.

- [33] Rodrigues, A. C., Sobrino, B., Genvigir, F. D. V., Willrich, M. A. V., Arazi, S. S., Dorea, E. L., Bernik, M. M. S., Bertolami, M., Faludi, A. A., Brion, M. J., Carracedo, A., Hirata, M. H., Hirata, R. D. C. *Clin. Chim. Acta* 2013, 417, 8–11.
- [34] Zewinger, S., Kleber, M. E., Tragante, V., McCubrey, R. O., Schmidt, A. F., Direk, K., Laufs, U., Werner, C., Koenig, W., Rothenbacher, D., Mons, U., Breitling, L. P., Brenner, H., Jennings, R. T., Petrakis, I., Triem, S., Klug, M., Filips, A., Blankenberg, S., Waldeyer, C., Sinning, C., Schnabel, R. B., Lackner, K. J., Vlachopoulou, E., Nygård, O., Svingen, G. F. T., Pedersen, E. R., Tell, G. S., Sinisalo, J., Nieminen, M. S., Laaksonen, R., Trompet, S., Smit, R. A. *J.Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017, 5, 534–543.
- [35] Fan, W., Shen, C., Wu, M., Zhou, Z. Y., Guo, Z. R. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 2015, 19, 379–386.
- [36] Jia, M., Yang, B., Li, Z., Shen, H., Song, X., Gu, W. *PLoS One* 2014, 9, 1–14.
- [37] Sanchez, J. J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., Harrison, C. D., Musgrave-brown, E., Salas, A., Syndercombe-court, D., Schneider, P. M., Carracedo, A., Morling, N. 2006, 1713–1724.
- [38] Fondevila M, Børsting C, Phillips C, de la Puente M, Consortium EN, Carracedo A, Morling N, L. M. *Forensic Sci Rev.* 2017, Jan;29, 57–76.
- [39] Sanchez, J. J., Endicott, P. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 1370–1378.
- [40] Daca-Roszak, P., Pfeifer, A., Zebracka-Gala, J., Jarzab, B., Witt, M., Ziętkiewicz, E. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016, 20, 89–100.
- [41] Brooks, A., Creighton, E. K., Gandolfi, B., Khan, R., Grahn, R. A., Lyons, L. A. *J. Forensic Sci.* 2016, 61, 594–606.
- [42] Inagaki, S., Yamamoto, Y., Doi, Y., Takata, T., Ishikawa, T., Imabayashi, K., Yoshitome, K., Miyaiishi, S., Ishizu, H. *Forensic Sci. Int.* 2004, 144, 45–57.
- [43] Raffaella Cascella, L., Stocchi, C. S., Mezzaroma, I., Marco, Mannazzu, V. V., Montella, F., Giustino, Parruti, P. B., Sangiuolo, F., Novelli, G., Pirazzoli, A., Zampatti, S., & Giardina, E. 2015.
- [44] Lurkin, I., Stoehr, R., Hurst, C. D., Van Tilborg, A. A. G., Knowles, M. A., Hartmann, A., Zwarthoff, E. C. *PLoS One* 2010, 5, 1–6.
- [45] Bulla, A., De Witt, B., Ammerlaan, W., Betsou, F., Lescuyer, P. *Biopreserv. Biobank.* 2016, 14, 29–38.
- [46] Lee, S., Kasif, S., Weng, Z., Cantor, C. R. *PLoS One* 2008, 3.
- [47] Chen, B., Cole, J. W., Grond-Ginsbach, C. *Front. Genet.* 2017, 8, 1–6.
- [48] Feng, N., Young, S. F., Aguilera, G., Puricelli, E., Adler-, D. C., Sebring, N. G., Yanovski, J. A. *Diabetes* 2005, 54, 2663–2667.

### Supporting information

**Supplementary Table S1:** Description of the customized PCR Multiplex Panels A, B, C and D, SNPs, amplification primers, final concentrations in reaction and fragment sizes.

**Supplementary Table S2:** Description of the customized Minisequencing Multiplex Panels A, B, C and D, SNPs, extension primers, final concentration in reaction, expected allele and their sizes.

**Supplementary Table S3:** Genotyping rate from each SNP marker in Multiplex condition.

**ANEXO D** – Formato provisório do 2º artigo científico a ser submetido no periódico

*The Journal of Pediatrics.*

**Title:** Distribution profile of eight genetic polymorphisms related to cardiovascular risk in a sample of Brazilian adolescents: Rio de Janeiro Study II.

**Authorship**

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado, MSc<sup>1,2</sup> (ORCID:0000-0003-1996-9033)

Flávia Lopes Fonseca, PhD<sup>3</sup>

Rossana Ghesa Andrade de Freitas, PhD<sup>1</sup>

Pedro Pimenta de Mello Spinetti, MD, PhD<sup>2,3</sup>

Erika Maria Gonçalves Campana, MD, PhD<sup>3</sup>

Roberto Pozzan, MD, PhD<sup>3</sup>

Maria Eliane Campos Magalhães, MD, PhD, FESC<sup>2,3</sup>

Dayse Aparecida da Silva, PhD<sup>1,2</sup>

Andréa Araujo Brandão, MD, PhD, FESC, FACC<sup>2,3</sup> (ORCID: 0000-0002-7040-396X)

1- Laboratório de Diagnóstico por DNA, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2- Faculdade de Ciências Médicas,

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

3- Ambulatório de Hipertensão Arterial, Hospital Universitário Pedro Ernesto,

Universidade do Estado do Rio de Janeiro,

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Corresponding author:**

Yasmin Lemos Rollemberg Cruz Machado

Laboratório de Diagnóstico por DNA/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rua São Francisco Xavier, 524, Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha (PHLC) -Térreo

Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brazil - Zip code: 20550-013

Business Number: +55 21 2334 2183

Email: [rollemberg\\_yasmin@hotmail.com](mailto:rollemberg_yasmin@hotmail.com)

Name of reprint request author or notation of no reprints. No reprints.

**Conflicts of interest:** The authors declare no have conflicts of interest.

**Funding sources:** Supporting by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Brazil – Finance Code 001 and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Award Number 421922/2016-8) but they had no role in study design, the collection, analysis, and interpretation of data, and the writing of the manuscript.

**Keywords:** SNP; NOS3; genetic association; obesity; hypertension; Brazilian adolescents.

**Abstract**

**Objective:** To evaluate the distribution and association of eight 8 SNPs related to the renin-angiotensin-aldosterone system, endothelial function and leptin-melanocortin pathway with elevated blood pressure (BP) and obesity in a sample of Brazilian adolescents. **Study design:** 1,054 Brazilian adolescents aged 10 to 15 years, both genders, genotyped for rs699 (AGT), rs1799998 (CYP11B2), rs1799983 (NOS3), rs9939609 (FTO), rs1137101 (LEPR), rs3746619 and rs3827103 (MC3R), and rs17782313 (MC4R) through customized Multiplex Minisequencing System. Allele and genotype frequencies were analyzed by  $\chi^2$  test in the overall sample and subgroups stratified by demographic, anthropometric and BP status variables. Genetic variants were tested for correlations with continuous variables by one-way ANOVA, and associations with elevated BP and obesity by the univariate and multivariate logistic regression model. **Results:** Prevalence of elevated BP was 13.5% and obesity 41.4%. Minor A allele of rs3746619 (MC3R) was more prevalent in black ( $P=.001$ ) as well as that of rs3827103 (MC3R) in black ( $P<.0001$ ) and boys ( $P=.013$ ). G allele of rs1799983 (NOS3) was more prevalent in obese (BMI,  $P=.002$ ; WC,  $P=.027$ ) and hypertensive ( $P=.035$ ) individuals, correlated with increased BMI ( $P=.020$ ) and associated with obesity by logistic regression before ( $OR=0.713$ ,  $P<.001$ ) and after adjustment by age and elevated BP ( $OR=0.730$ ,  $P=.001$ ). No other SNP was associated with elevated BP, obesity or variation in their quantitative traits. **Conclusion:** G allele of rs1799983 (NOS3) seems associated with higher BMI and increased likelihood for obesity and marginally with elevated BP in Brazilian adolescents.

**Abbreviations and Acronyms:**

AGT – Angiotensinogen  
 BMI - Body Mass Index  
 BP – Blood Pressure  
 CI - Confidence Interval  
 CYP11B2 - Aldosterone Synthase  
 DBP – Diastolic Blood Pressure  
 FTO - Fat Mass and Obesity-associated  
 HTN – Hypertension  
 LEPR - Leptin Receptor  
 MC3R - Melanocortin 3 Receptor  
 MC4R - Melanocortin 4 Receptor  
 MetS - Metabolic Syndrome  
 NOS3 - Nitric Oxide Synthase 3  
 OR – Odds Ratio  
 PCR – Polymerase Chain Reaction  
 RJS – Rio de Janeiro Study  
 SBP – Systolic Blood Pressure  
 SNP – Single Nucleotide Polymorphism  
 RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosterone System  
 vs. – Versus  
 WC – Waist Circumference

**Introduction**

Hypertension (HTN) and obesity represent relevant chronic diseases in which single base polymorphisms (SNPs) related to their metabolic pathways are investigated as potential associated risk predictors.<sup>47,49</sup>

Variant rs699 (M235T) in angiotensinogen gene (*AGT*) has been associated with increased plasma angiotensinogen (*AGT*) levels<sup>65,66</sup> and HTN.<sup>61,67,170</sup> The rs1799983 (G894T) in Nitric Oxide Synthase 3 gene (*NOS3*) express the homonymous enzyme which catalyzes the production of shorter half-life nitric oxide<sup>223</sup> associated with HTN<sup>79,80</sup>. The rs1799998 (-344T>C) within the promoter region of Aldosterone Synthase gene (*CYP11B2*) was associated with increased aldosterone production<sup>70,72,175</sup> and HTN.<sup>72,170</sup> Regarding obesity, rs1137101 (Q223R) *LEPR* seems to affect leptin-binding site of leptin receptor and satiety signaling<sup>224</sup>, favoring the obese phenotype<sup>94,196</sup> and metabolic syndrome (MetS).<sup>198</sup> Melanocortin 3 and 4 receptors gene (respectively, *MC3R* and *MC4R*) express in hypothalamic region their homonymous receptors that coordinate food intake/energy balance.<sup>185</sup> Variants rs3746619 (T6K) and rs3827103 (V81I) in *MC3R* are linked to partially inactive receptors<sup>225</sup> related to increased fat mass and obesity<sup>103,104,225</sup> while intronic variant rs17782313 in *MC4R* was associated with severe onset childhood obesity and its traits<sup>109,110</sup> apparently due to lower receptor expression.<sup>209</sup> Fat Mass and Obesity-associated gene (*FTO*) has transcriptional regulatory activity in DNA under regulation by nutritional status<sup>116</sup>, which intronic variant rs9939609 was linked with body mass index (BMI) in type-2 diabetes<sup>115</sup> and childhood obesity.<sup>111</sup> Tracking studies in genetically homogenous<sup>14,16,226,227</sup> and admixed<sup>4-6</sup> populations identified both diseases in childhood as cardiovascular risk predictors in adulthood. Thus, this study aimed to evaluate the association of these eight SNPs with elevated blood pressure (BP) and obesity in Brazilian adolescents belongs to a longitudinal study.

## Methods

**Populational sampling:** This cross-sectional study was part of the Rio de Janeiro Study (RJS), a well-known Brazilian longitudinal study about cardiovascular risk factors in young<sup>4-6</sup>, currently in progress as RJS II. The 1,892 adolescents, aged 10-15 years, of both genders, enrolled in the original study were recruited between 2015-2016, in public schools from Rio de Janeiro/Brazil. Their parents or guardians received a presentation letter, a written consent form and an evaluation questionnaire. Eligibility criteria included all above-mentioned documents filled and signed, being excluded who didn't give them. The original study was approved by the appropriate ethics committee and carried out following the Declaration of Helsinki.

**BP and anthropometric measurements:** Clinical evaluation was performed in the school environment. BP was measured in one occasion, with an validated oscillometric device according to standardized method<sup>122,123</sup>, being recorded the last of 3 measurements. Elevated BP was defined when systolic blood pressure (SBP) and/or diastolic blood pressure (DBP)  $\geq$ p95 for age-, gender-, and height-adjusted percentiles<sup>122,123</sup>. Height and weight were measured in centimeters and kilograms by standard methods and equipment. Body mass index (BMI) calculated as weight/height<sup>2</sup> (kg/m<sup>2</sup>). Nutritional status was classified according to the World Health Organization criteria<sup>28</sup> for age- and gender-adjusted percentiles (BMI  $\geq$ p0 and p1 and  $<$ p3 (low weight); BMI  $\geq$ p3 and  $<$ p85 (normal weight); BMI  $\geq$ p85 and  $<$ p97 (overweight), BMI  $\geq$ p97 (obesity)); general obesity was considered grouping overweight and obese individuals. Waist circumference (WC) was measured in centimeters by inelastic portable anthropometric measuring tape according to McCarthy et al protocol<sup>29</sup>, where central adiposity defined when WC  $\geq$ p90 for gender- and age-adjusted percentiles. Collected data were stored in virtual database software.

**DNA collection and genotyping:** Buccal swab samples were collected in a scholarly environment, genomic DNA extracted by national commercial kit and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The 8 SNPs (rs699 [*AGT*], rs1799998 [*CYP11B2*], rs1799983 [*NOS3*], rs9939609 [*FTO*], rs1137101 [*LEPR*], rs3746619 and rs3827103 [*MC3R*], and rs17782313 [*MC4R*]) were genotyped using two customized SNaPshot® Multiplex System. Detailed information about Multiplex panels is described in Table 1 online. Each Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with 5 ng of genomic DNA, 2.5  $\mu\text{L}$  of Multiplex PCR Master Mix 2x (Qiagen, Valencia, California), 2.0  $\mu\text{L}$  of amplification primers mix according to the panel (final concentration described in Table 1 online). The PCR reaction was submitted to thermal-cycling conditions adapted from Sanchez et al.<sup>228</sup> on Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California). 1.0  $\mu\text{L}$  of amplified PCR products were purified with 0.7  $\mu\text{L}$  of ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems) to  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes, and one cycle to  $80^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes. 1.7  $\mu\text{L}$  of the purified PCR product were submitted to genotyping with 0.5  $\mu\text{L}$  of SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 0.5  $\mu\text{L}$  of deionized water, and 2.5  $\mu\text{L}$  of extension primers mix according to the panel (final concentration described in Table 1 online). The minisequencing reaction was submitted to thermal-cycling conditions adapted from Sanchez et al.<sup>228</sup> in the thermal cycler. Each entire reaction tube was purified with 1 unit of Shrimp Alkaline Phosphatase (Affymetrix, Cleveland, Ohio) to  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes and one cycle to  $80^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes. 1.0  $\mu\text{L}$  of purified Multiplex Minisequencing products were homogenized with 8.8  $\mu\text{L}$  of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.2  $\mu\text{L}$  of size standard GeneScan 120 LIZ ladder (Applied Biosystems), and submitted to capillary electrophoresis in ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Genotypes were attributed using GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems). Control quality of reactions was performed using negative and positive controls. Around 10% of genotypes were cross-validated through Sanger's sequencing and presented a 100% concordance for all SNPs, except for rs17782313 *MC4R* (95%) and rs9939609 *FTO* (94.11%).

**Statistical analyses:** Statistical analyses were performed with SPSS v27.0.0.0/2020 software (IBM, Armonk, NY) for  $P$ -value $<.05$  considered statistically significant. Demographic data (age, gender, and self-reported skin color - White, Black, Non-White/Non-Black [NW/NB]) were obtained from the filled questionnaire. Age, height, weight, BMI value, SBP, DBP were calculated as mean  $\pm$  standard deviation. BMI and WC classification, skin color, presence of obesity, and elevated BP were calculated as absolute numbers and percentages. Allele and genotype frequencies were calculated using the  $\chi^2$  test in the overall sample and subgroups stratified by demographic (gender, color), anthropometric (BMI and WC classification), and BP profile. Hardy-Weinberg equilibrium test (HWE) was performed by populational statistic software<sup>124</sup> for  $P$ -value $\leq.05$  statistically significant and significance corrected by Bonferroni. Comparison 2 X 2 of mean values of obesity and BP quantitative traits across genotypes were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-Hoc test. Univariate and multivariate logistic regression models tested clinical and genetic variables for associations with obesity and elevated BP, where genotypes carrying none, one or two copies of the corresponding minor allele were codified as 0, 1 and 2, respectively.

## Results

The results of this study refer to 1,054 of 1,892 samples able to be genotyped due to technical limitations.

Overall sample was mostly composed by girls (n=564, 53.5%) with mean age of 12 years old, self-reported white (n=464, 44%), with normal weight (n=586, 55.5%) and WC measures (n=576, 54.8%); prevalence of elevated BP (SBP and DBP  $\geq$ p95 adjusted) and obesity (BMI  $\geq$ p85 adjusted) in the whole population were 13.5% and 41.4%, respectively (Table 2).

Overall distribution of allele and genotype frequencies of SNPs and missing data are shown in Table 3. Minor allele frequencies of rs1137101 (*LEPR*), rs1799983 (*NOS3*), rs9939609 (*FTO*), rs699 (*AGT*), and rs1799998 (*CYP11B2*) were closer to those observed in European than in African populations in the HapMap Project and database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP). Similar comparison was unfeasible for rs17782313 (*MC4R*), rs3746619 and rs3827103 (*MC3R*) due to closer percentage of their missing data and minor homozygotes frequencies. Seven SNPs were in equilibrium ( $P \geq .05$ ) except rs3827103 (*MC3R*) ( $P < .00001$  for  $\alpha$  corrected = .007; Table 3).

Genotype distribution stratified by skin color identified significant differences in 4 of 8 markers. TT variant homozygotes rs699 (*AGT*) were more prevalent in white individuals than others (20.3% vs. 15.4% in black and 16% in NW/NB,  $P = .001$ ); TT wild-type homozygotes rs1799998 (*CYP11B2*) in black and NW/NB individuals (respectively 49% and 45.8% vs. 36.1%) and CC variant homozygotes in white (14.9% vs. 9.9% and 13%,  $P = .018$ ). AA variant homozygote of rs3746619 was significantly more frequent in black and NW/NB (6.9% in both vs. 5.2% in whites,  $P = .001$ ) as well as this same variant genotype for rs3827103 (*MC3R*) (12.1% in black and 8.4% in NW/NB vs. 4.7% in whites,  $P < .0001$ ). No significant differences in the other SNPs were observed in this analysis ( $P \geq .05$ ). Genotype distribution stratified by gender identified AA variant homozygotes rs3827103 (*MC3R*) more prevalent in boys (9.4% vs. 6.2%,  $P = .013$ ). No significant differences in the other SNPs were observed for this analysis ( $P \geq .05$ ). In genotype distribution stratified by anthropometric variables (Table 4 online), low-weight individuals (n=34) were grouped with normal-weight. GG wild-type homozygotes rs1799983 (*NOS3*) were more prevalent in obese both according to BMI classification ( $P = .002$ ) and WC status ( $P = .027$ ); TT wild-type and CC variant homozygotes rs1799998 (*CYP11B2*) were more frequent in individuals with increased WC ( $P = .021$ ). No significant differences in the other SNPs were observed for this analysis ( $P \geq .05$ ) (Table 4 online). Genotype distribution stratified by BP status (Table 5 online), GG wild-type homozygotes rs1799983 (*NOS3*) were more frequent in individuals with elevated BP (51.2% vs. 39.4%,  $P = .035$ ) as well as variant homozygotes AA of rs3746619 (*MC3R*) (11.6% vs. 5.3%,  $P = .017$ ) also did. TT variant homozygotes rs699 (*AGT*) were more frequent in normotensives (19.5% vs. 9.9%,  $P = .014$ ). No significant differences were observed regarding other SNPs ( $P \geq .05$ ) (Table 5 online).

Results of comparisons 2 X 2 of mean values of BMI, WC, SBP, and DBP across genotypes identified significant variations in two of eight SNPs (Table 6). Mean values of BMI were significantly different across rs1799983 (*NOS3*) genotypes with wild-type GG homozygotes presenting greater mean values than GT and this equal to TT after post-Hoc test (respectively  $20.97 \text{ kg/m}^2 \pm 4.34$  vs.  $20.46 \text{ kg/m}^2 \pm 4.28$  vs.  $19.86 \text{ kg/m}^2 \pm 3.84$ ,  $P = .020$ ). Mean values of SBP were significantly different across rs3746619 (*MC3R*) genotypes with variant AA homozygotes presenting greater mean values than CA and this equal to CC (respectively  $109.17 \text{ mmHg} \pm 11.82$  vs.  $108.61 \text{ mmHg} \pm 12.73$  vs.  $113.31 \text{ mmHg} \pm 15.13$ ,  $P = .023$ ).

Variation in mean values of these quantitative traits was not significantly different across the genotypes of other analyzed SNPs ( $P > .05$ ) (Table 6).

Univariate logistic regression tested clinical and genetic variables for independent associations with elevated BP and obesity (Table 7). Increased BMI (OR=1.84,  $P < .001$ ) and WC (OR=1.026,  $P = .002$ ) were independently associated with presence of elevated BP. The rs1799983 (*NOS3*) was marginally associated (OR=0.757,  $P = .050$ ) while a trend was observed for rs3746619 (*MC3R*) (OR=1.321,  $P = .051$ ) (Table 7). Age, gender, skin color and other analyzed SNPs did not show significant associations with elevated BP ( $P > .05$ ) (Table 7).

For obesity, younger age (OR=0.791,  $P < 0.001$ ), abnormal BP (SBP, OR=1.024,  $P < .001$  and DBP, OR=1.019,  $P = .002$ ), and presence of elevated BP (OR=1.546,  $P = .016$ ) showed to be independently associated with its occurrence (Table 7). Regarding genetic variables, variant T allele rs1799983 (*NOS3*) presented negative association, with wild-type G allele increasing the likelihood for obesity (OR=0.713,  $P < .001$ ) (Table 7). Gender, skin color, and other analyzed SNPs were not associated with obesity ( $P > .05$ ) (Table 7).

The multivariate logistic regression model applied for genetic variables was adjusted by previously significant independent variables in univariate model (Table 7). Neither rs1799983 (*NOS3*) nor rs3746619 (*MC3R*) demonstrated significant associations with elevated BP in the BMI-adjusted model (respectively  $P = .065$  and  $P = .079$ ) (Table 7). Otherwise, the rs1799983 (*NOS3*) sustained statistical significance with wild-type G allele associated with obesity after adjustment by age and elevated BP (OR=0.730,  $P = 0.001$ ) (Table 7).

### **Discussion (Seção provisória sob revisão dos co-autores)**

Among eight SNPs in *AGT*, *CYP11B2*, *NOS3*, *MC3R*, *MC4R*, *LEPR*, *FTO* investigated for relations with elevated BP and obesity in Brazilian adolescents, the wild-type G allele of rs1799983 (*NOS3*) was associated with increased BMI and obesity in younger carriers with elevated BP.

Our elevated BP prevalence of 13.5% was above the 8.12% pooled but within of variation 2.7-20.1% for Brazilian pediatric studies<sup>125</sup> and closer to 12.5% for our geographic region<sup>39</sup>. Percentages above ours were recently identified in other populational-based Brazilian<sup>130,131</sup> and multiethnic studies.<sup>132,133,169</sup> Likewise, our childhood obesity percentage (41.4%) was considered high but similar rates around 40% in Morocco<sup>133</sup> and the United States<sup>42</sup> and above 30% in different Brazilian cities<sup>142,143</sup> has already been reported. Although our result is sub-representative data of the ERJ II population, prevalence rates of both diseases in general pediatric populations must be carefully analyzed once ethnicity/race (involving socio-economic and cultural differences)<sup>42</sup> and methodological heterogeneity of studies<sup>125</sup> represents stronger influencers of their variability. While variant G allele of rs1137101 *LEPR* was associated with higher adiposity, lipidic parameters and increased risk for obesity in obese Saudi children<sup>94</sup> and Spanish obese girls<sup>229</sup>, similar associations was not found in our sample as well as in black South African adolescents<sup>197</sup> and cohorts of Spanish children.<sup>230</sup> Protective effects by this SNP were related too such as reduced BMI values despite high leptin and lipid levels in obese Portuguese schoolchildren<sup>111</sup> and decreased MetS risk in obese Chilean adults<sup>198</sup>.

The rs1137101 effect on body weight control seems to be dependent on ethnic background, once its variant allele and other SNPs *LEPR* presented variable distribution across homogenous and admixed big populations without relation with obesity-traits, besides a north-south distribution gradient of its frequency among European Caucasians groups.<sup>200</sup>

Variant A allele of SNP rs9939609 *FTO* was early associated with obesity and increased anthropometric indicators by a genome-wide association study in European adults and children<sup>115</sup>, including having an additive effect in obese Portuguese schoolchildren.<sup>111</sup> Conversely, it did not present any similar association in our study and also in cohorts of admixed Mexican children<sup>112</sup> and black South African adolescents.<sup>197</sup> However, once being expressed on diverse human tissues<sup>115,116</sup>, its action on body weight regulation favoring obesity may result from multiple interactions involving both genetics like other SNPs in *FTO* or in other genes as *IRX3*<sup>231</sup> and lifestyle factors as soft drink consumption.<sup>117</sup>

The SNP rs17782313 *MC4R* was strongly associated with obesity presenting an additive effect in adiposity parameters in European<sup>109</sup> and Chinese children<sup>110</sup>. Similar interactions were not found both in our sample and also in Mexican<sup>232</sup> and Brazilian<sup>233</sup> children. Besides, its variant C allele exerted protective effect decreasing BMI values in black adolescents<sup>197</sup> and the MetS-risk in admixed adults.<sup>198</sup> The rs17782313 localization near to *MC4R* transcriptional region can indicate a modulation of its effects for obesity by diverse factors which can be difficult to be measured like epigenetics mechanism<sup>209</sup>, food preferences<sup>110</sup> and gender-related differences linked to eating behavior<sup>113</sup>.

The SNP rs1799983 *NOS3* although associated with a 2-fold higher risk for premature myocardial infarction in Greek<sup>234</sup> and increased BP in European adults<sup>79</sup> and children<sup>80</sup>, in our sample a similar correlation was observed only regarding GG homozygotes predominant in hypertensives ( $P=.035$ ). Lack of association with BP was also reported in adults from different ethnicities<sup>151,152</sup> and hypertensive children presenting vascular damages linked with it.<sup>149</sup> However, diet<sup>79</sup> and physical activity<sup>80</sup> reported as modifiers of rs1799983 effects on raising of BP could have influenced on the lack of association in our sample. The rs1799983 *NOS3* significantly associated with increased BMI ( $P=.02$ ) and obesity in adjusted multivariate ( $P=.001$ ) in our sample was a singular find. Similar associations were observed in Tunisian adults by different genetic models, with a positive BMI variation potentialized by haplotype homozygotes 894TT-4bb,<sup>154</sup> while in North-American white obese, TT genotype interacted with BMI to modify diabetes-associated risk.<sup>86</sup> But, the harmful effects by rs1799983 in our sample were unexpectedly exerted by wild-type G allele. Analogous effects were observed in some Brazilian studies for increased risk for heart failure<sup>162</sup> and its worse survival event<sup>164</sup>, and resistant hypertension.<sup>235</sup> Yet, our allele frequency (63% G allele vs. 36% T allele) agreeing with such studies and populational data in public databases discarded genotyping error and pointing to a particular genetic background of our sample, influenced by a differentiated allele distribution previously identified in Brazilian<sup>166</sup> as well as in homogenous populations.<sup>165</sup>

The polymorphisms rs3746619 (T6K) and rs3827103 (V81I) of *MC3R* are commonly analyzed as a haplotype, with their double-A alleles correlated with higher adiposity indicators, fat mass and insulin levels in biracial children<sup>104,225</sup>, presenting additive effect on childhood obesity-risk and its traits in obese Asian children.<sup>103,183</sup> Contrarily, both SNPs were not associated with any adiposity parameter in our sample as well as in obese multiethnic children<sup>184,185</sup> and biracial adults<sup>236</sup>, including decreasing obesity indicators in

South-African adolescents.<sup>185</sup> Variant AA homozygotes of both SNPs predominant in our non-white individuals agreed with their greater co-occurrence in African/African-American.<sup>104,185,225</sup> Such data seemed to reflect the occurrence of natural selection in *MC3R* identified in this populational group as a probable human adaptation to cycles of plenty/famine<sup>188</sup>, although only ancestry analyses in our admixed population would confirm such supposition. Variant homozygote AA rs3827103 differently distributed across gender in our sample seemed spurious data by selection bias, but inter-gender differences in eating behavior associated with this SNP and its higher prevalence in obese admixed boys<sup>184</sup> may indicate the involvement of others neuroendocrine pathways on *MC3R* action. The rs3746619 correlated with higher SBP in our sample diverged of reduced values associated in African adolescents<sup>185</sup> but followed the increased SBP in Kuwaitin adults.<sup>190</sup> Such relation in humans is unclear but disrupted MC3 receptors impaired natriuretic effects by melanocortins hormones on a high sodium diet in murine models<sup>192</sup>, a common food profile that may have influenced on BP alterations in adolescent carriers. The HWE-departure in rs3827103 (*MC3R*) in our sample resulted from the loss of heterozygosity (data not shown) by reduced number of copies of A allele, which could have probably been caused by 5-T nucleotide deletion SNP (rs1230374156) adjacent to it, an causal intrinsic condition cited by some authors.<sup>194,195</sup>

Variant T allele rs699 (*AGT*) was associated with increased plasma AGT and BP in adults and children from homogeneous<sup>61,65,66,170</sup> and admixed populations<sup>67</sup>, but other studies did not find the same relations.<sup>169,171,237</sup> However, TT homozygotes had significance in our sample only regarding its predominance in normotensives and whites, diverging from what was observed in hypertensive Brazilian adults<sup>67,235</sup> and its prevalence in African-descendent.<sup>66,67</sup> Similar to *NOS3*, particular genetic background of our sample may have influenced on this uncommon result because the high admixture degree at an individual level in Brazil makes unpredictable the allele spreading profile and the correlation ancestry-phenotype.<sup>167</sup>

The rs1799998 (*CYP11B2*) represents a controversial marker, with major T allele associated with higher values of BP and plasma aldosterone in different ethnicities<sup>72,170</sup>, minor C allele with poorer traits for heart failure in African-American<sup>238</sup> and lack of association in our sample as well as in another multiethnic cohort.<sup>173</sup> But, TT homozygotes predominant in our no-white individuals agreed with its reported higher frequency in black individuals regardless of association results.<sup>72,173,238</sup> This genotype also predominant in obese by WC in our sample suggested some relation between *CYP11B2* with adipose tissue itself as the reported correlation with higher plasma glucose and abdominal obesity in MetS<sup>179</sup> and thickness of skinfold subtypes.<sup>180</sup> These data seemed to demonstrate the aldosterone-induced adipogenesis and expression of its markers in human adipocytes.<sup>181</sup>

This work presented some limitations. “Affected” individuals were preferentially analyzed due to technical limitations, producing a selection bias that influenced on elevated BP prevalence but not in genetic association due to low missing data and large sampling. Ancestry analyses to detect populational stratification were hindered by low-quality DNA although the global and individual profile in our city tends to be similar.<sup>201,202</sup> Absent laboratory data made it uncertain to connect SNPs-altered metabolic parameters, although such relations had not been confirmed in some studies. Confounding factors like medication, diet, previous diseases and other external factors not considered but influent in these complex diseases may have contributed to clinical alterations more than genetics.

In conclusion, the major G allele rs1799983 (*NOS3*) was associated with increased BMI and presence of obesity especially in younger Brazilian adolescents with elevated BP, contributing to the knowledge about populational genetic data in an admixed pediatric sample and possible pharmacogenomics approaches in such individual hereafter.

## References

1. Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: Population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet.* 2008;17(R2):143–50.
2. Rather RA. Genetic markers: Potential candidates for cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2016;220:914–23.
3. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev Y V., Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell.* 1992;71(1):169–80.
4. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest.* 1995;95(3):948–53.
5. Yako YY, Balti E V., Matsha TE, Dzudie A, Kruger D, Sobngwi E, et al. Genetic factors contributing to hypertension in African-based populations: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Hypertens.* 2018;20(3):485–95.
6. Takeuchi F, Yamamoto K, Katsuya T, Sugiyama T, Nabika T, Ohnaka K, et al. Reevaluation of the association of seven candidate genes with blood pressure and hypertension: A replication study and meta-Analysis with a larger sample size. *Hypertens Res.* 2012;35(8):825–31.
7. Bonfim-Silva R, Guimarães LO, Santos JS, Pereira JF, Leal Barbosa AA, Souza Rios DL. 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. *J Genet [Internet].* 2016;95(1):63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-015-0599-5>
8. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298 [Internet]. National Institutes of Health. 1999. Available from: [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
9. Goni L, Cuervo M, Milagro FI, Martínez JA. Influence of fat intake and BMI on the association of rs1799983 *NOS3* polymorphism with blood pressure levels in an Iberian population. *Eur J Nutr.* 2017;56(4):1589–96.
10. Grøntved A, Andersen LB, Franks PW, Verhage B, Wareham NJ, Ekelund U, et al. *NOS3* variants, physical activity, and blood pressure in the European youth heart study. *Am J Hypertens [Internet].* 2011;24(4):444–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2010.265/nature06264>
11. White PC, Slutsker L. HAPLOTYPE ANALYSIS OF CYP11B2. *Mol Cell Biol.* 1995;21:437–42.
12. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11 $\beta$ -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol.* 2002;28(2):125–35.

13. Barbato A, Russo P, Siani A, Folkerd EJ, Miller MA, Venezia A, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population. *J Hypertens.* 2004;22(10):1895–901.
14. Fan SH, Say YH. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population. *J Physiol Anthropol.* 2014;33(1):1–10.
15. Maha K Eldosouky, Azza M. Abdu Allah , Abeer AbdElmoneim NSA-A. Correlation between serum leptin and its gene expression to the anthropometric measures in overweight and obese children. *Cell Mol Biol.* 2018;51(1):1.
16. Marcos-Pasero H, Aguilar-Aguilar E, Colmenarejo G, de Molina AR, Reglero G, Loria-Kohen V. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene as a predictor of weight gain in childhood obesity and the identification of possible factors involved. *Genes (Basel).* 2020;11(5):1–11.
17. Manriquez V, Aviles J, Salazar L, Saavedra N, Seron P, Lanas F, et al. Polymorphisms in Genes Involved in the Leptin-Melanocortin Pathway are Associated with Obesity-Related Cardiometabolic Alterations in a Southern Chilean Population. *Mol Diagnosis Ther.* 2018;22(1):101–13.
18. Yako YY, Fanampe BL, Hassan SM, Erasmus RT, van der Merwe L, Matsha TE. Negative association of MC3R variants with weight and blood pressure in Cape Town pupils aged 11 - 16 years. *South African Med J.* 2011;101(6):417–20.
19. Feng N, Young SF, Aguilera G, Puricelli E, Adler-Wailes DC, Sebring NG, et al. Co-occurrence of Two Partially Inactivating Polymorphisms of <em>MC3R</em> Is Associated With Pediatric-Onset Obesity. *Diabetes [Internet].* 2005 Sep 1;54(9):2663 LP – 2667. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/9/2663.abstract>
20. Savastano DM, Tanofsky-Kraff M, Han JC, Ning C, Sorg RA, Roza CA, et al. Energy intake and energy expenditure among children with polymorphisms of the melanocortin-3 receptor. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(4):912–20.
21. Lee YS, Poh LKS, Kek BLK, Kah YL. The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. *Diabetes.* 2007;56(10):2622–30.
22. Loos RJJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Hua Zhao J, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008;40(6):768–75.
23. Lv D, Zhang DD, Wang H, Zhang Y, Liang L, Fu JF, et al. Genetic variations in SEC16B, MC4R, MAP2K5 and KCTD15 were associated with childhood obesity and interacted with dietary behaviors in Chinese school-age population. *Gene.* 2015;560(2):149–55.
24. Tang Y, Jin B, Zhou L, Lu W. MeQTL analysis of childhood obesity links epigenetics with a risk SNP rs17782313 near MC4R from meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(2):2800–6.
25. Gerken T, Girard CA, Tung YCL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science (80- ).* 2007;318(5855):1469–72.
26. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (80- ).* 2007;316(5826):889–94.

27. Almeida SM, Furtado JM, Mascarenhas P, Ferraz ME, Ferreira JC, Monteiro MP, et al. Association between LEPR, FTO, MC4R, and PPARG-2 polymorphisms with obesity traits and metabolic phenotypes in school-aged children. *Endocrine* [Internet]. 2018;60(3):466–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-018-1587-3>
28. Bao W, Threft SA, Srinivasan SR, Berenson GS. Essential Hypertension Predicted by Tracking of Elevated Blood Pressure From Childhood to Adulthood: The Bogalusa Heart Study. 1995;7061(95):657–65.
29. Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SR, Berenson GS, Dietz WH. Cardiovascular Risk Factors and Excess Adiposity Among Overweight Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study. *J Pediatr*. 2007;150(1).
30. Juhola J, Oikonen M, Magnussen CG, Mikkilä V, Siitonen N, Jokinen E, et al. Childhood physical, environmental, and genetic predictors of adult hypertension: The cardiovascular risk in young finns study. *Circulation*. 2012;126(4):402–9.
31. Kishi S, Teixido-Tura G, Ning H, Venkatesh BA, Wu C, Almeida A, et al. Cumulative blood pressure in early adulthood and cardiac dysfunction in middle age: The CARDIA study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(25):2679–87.
32. Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, De Fátima França M, Fonseca FL, Pizzi OL, et al. Pressão arterial em jovens como marcador de risco cardiovascular. Estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(6):657–65.
33. Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC, Fonseca FL, Pizzi OL, et al. Pressão Arterial na Adolescência, Adipocinas e Inflamação no Adulto Jovem. Estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(1):60–8.
34. Fonseca FL, Brandão AA, Pozzan R, Campana EMG, Luiz Pizzi O, Magalhães MEC, et al. Excesso de peso e o risco cardiovascular em jovens seguidos por 17 anos: estudo do Rio de Janeiro. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(2):207–15.
35. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Aug 1;114(Supplement 2):555 LP – 576. Available from: [http://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement\\_2/555.abstract](http://pediatrics.aappublications.org/content/114/Supplement_2/555.abstract)
36. Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3Supl.3):1–83.
37. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660–7.
38. McCarthy, HD, Jarrett I and KV CH. Original Communication The development of waist circumference percentiles in British. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:902–7.
39. Sanchez JJ, Endicott P. Developing multiplexed SNP assays with special reference to degraded DNA templates. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1370–8.
40. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564–7.
41. Magliano ES, Guedes LG, Coutinho ESF, Bloch KV. Prevalence of arterial hypertension among Brazilian adolescents: Systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2013;13(1).
42. Bloch KV, Klein CH, Szklo M, Kuschnir MCC, De Azevedo Abreu G, Barufaldi LA, et al. ERICA: Prevalences of hypertension and obesity in Brazilian adolescents. *Rev Saude Publica*. 2016;50(supl 1):1s-12s.

43. Ferreira HS, Lúcio GMA, Assunção ML, Silva BC V., Oliveira JS, Florêncio TMMT, et al. High blood pressure among students in public and private schools in Maceió, Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(11):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142982>
44. Rosaneli CF, Baena CP, Auler F, Nakashima ATA, Netto-Oliveira ER, Oliveira AB, et al. Elevated blood pressure and obesity in childhood: A cross-sectional evaluation of 4,609 schoolchildren. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(3):238–43.
45. Sharma AK, Metzger DL, Rodd CJ. Prevalence and severity of high blood pressure among children based on the 2017 American academy of pediatrics guidelines. *JAMA Pediatr*. 2018;172(6):557–65.
46. Mehdad S, Hamrani A, Kari K El, Hamdouchi A El, Mzibri M El, Barkat A, et al. Prevalence of elevated blood pressure and its relationship with fat mass, body mass index and waist circumference among a group of Moroccan overweight adolescents. *Obes Res Clin Pract* [Internet]. 2013;7(4):e284–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2012.02.006>
47. Simonyte S, Kuciene R, Medzioniene J, Dulskiene V, Lesauskaite V. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and high blood pressure in Lithuanian children and adolescents. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):1–9.
48. Cheung EL, Bell CS, Samuel JP, Poffenbarger T, Redwine KMN, Samuels JA. Race and obesity in adolescent hypertension. *Pediatrics*. 2017;139(5).
49. Silva AP da, Feilbelmann TCM, Silva DC, Palhares HMC, Scatena LM, Resende EAMR de, et al. Prevalence of overweight and obesity and associated factors in school children and adolescents in a medium-sized Brazilian city. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(7):e438.
50. Brasil LDMP, Fisberg M, Maranhão HDS. Excesso de peso de escolares em região do Nordeste Brasileiro: Contraste entre as redes de ensino pública e privada. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2007;7(4):405–12.
51. Riestra P, García-Anguita A, Schoppen S, López-Simón L, De Oya M, Garcés C. Sex-specific association between leptin receptor polymorphisms and leptin levels and BMI in healthy adolescents. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2010;99(10):1527–30.
52. Lombard Z, Crowther NJ, Van Der Merwe L, Pitamber P, Norris SA, Ramsay M. Appetite regulation genes are associated with body mass index in black South African adolescents: A genetic association study. *BMJ Open*. 2012;2(3):1–10.
53. Olza J, Rupérez AI, Gil-Campos M, Leis R, Cañete R, Tojo R, et al. Leptin receptor gene variant rs11804091 is associated with BMI and insulin resistance in Spanish female obese children: A case-control study. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1–14.
54. Bender N, Allemann N, Marek D, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, et al. Association between variants of the leptin receptor gene (LEPR) and overweight: A systematic review and an analysis of the colaus study. *PLoS One*. 2011;6(10):1–14.
55. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, et al. Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. *PLoS One*. 2013;8(8).
56. Srivastava A, Mittal B, Prakash J, Srivastava P, Srivastava N, Srivastava N. Association of FTO and IRX3 genetic variants to obesity risk in north India. *Ann Hum Biol* [Internet]. 2016;43(5):451–456. Available from: <https://doi.org/10.3109/03014460.2015.1103902>

57. Jiang Y, Mei H, Lin Q, Wang J, Liu S, Wang G, et al. Interaction effects of FTO rs9939609 polymorphism and lifestyle factors on obesity indices in early adolescence. *Obes Res Clin Pract* [Internet]. 2019;13(4):352–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2019.06.004>
58. Jiménez-Osorio AS, Aguilar-Lucio AO, Cárdenas-Hernández H, Musalem-Younes C, Solares-Tlapechco J, Costa-Urrutia P, et al. Polymorphisms in adipokines in mexican children with obesity. *Int J Endocrinol*. 2019;2019:10–4.
59. Zandoná MR, Sangalli CN, Campagnolo PDB, Vitolo MR, Almeida S, Mattevi VS. Validation of obesity susceptibility loci identified by genome-wide association studies in early childhood in South Brazilian children. *Pediatr Obes*. 2017;12(1):85–92.
60. Obregón AM, Oyarce K, Santos JL, Valladares M, Goldfield G. Association of the melanocortin 4 receptor gene rs17782313 polymorphism with rewarding value of food and eating behavior in Chilean children. *J Physiol Biochem*. 2017;73(1):29–35.
61. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):1101–9.
62. Cruz-González I, Corral E, Sánchez-Ledesma M, Sánchez-Rodríguez A, Martín-Luengo C, González-Sarmiento R. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: A prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2009;9:1–6.
63. Kimura L, Angeli CB, Auricchio MTBM, Fernandes GR, Pereira AC, Vicente JP, et al. Multilocus family-based association analysis of seven candidate polymorphisms with essential hypertension in an African-derived semi-isolated brazilian population. *Int J Hypertens*. 2012;2012.
64. Śladowska-Kozłowska J, Litwin M, Niemirska A, Wierzbicka A, Roszczyńko M, Szperl M. Associations of the eNOS G894T gene polymorphism with target organ damage in children with newly diagnosed primary hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2015;30(12):2189–97.
65. Nasr H Ben, Dimassi S, M'hadhbi R, Debbabi H, Kortas M, Tabka Z, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obes Res Clin Pract*. 2016;10(4):465–75.
66. Bressler J, Pankow JS, Coresh J, Boerwinkle E. Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities study. *PLoS One*. 2013;8(11).
67. Oliveira RVM, Albuquerque FN, Duque GS, Freitas RGA, Carvalho EF, Brandão AA, et al. Heart failure and endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism frequency variations within ancestries. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2018;73:60–5.
68. Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: An haplotype analysis. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2012;26(3):141–7.
69. Yugar-Toledo JC, Martín JFV, Krieger JE, Pereira AC, Demacq C, Coelho OR, et al. Gene variation in resistant hypertension: Multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA Cell Biol*. 2011;30(8):555–64.

70. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2005;12(3):177–82.
71. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719–25.
72. Aris IM, Tint MT, Teh AL, Holbrook JD, Quah PL, Chong MFF, et al. MC3R gene polymorphisms are associated with early childhood adiposity gain and infant appetite in an Asian population. *Pediatr Obes.* 2016;11(6):450–8.
73. Obregón AM, Amador P, Valladares M, Weisstaub G, Burrows R, Santos JL. Melanocortin-3 receptor gene variants: Association with childhood obesity and eating behavior in Chilean families. *Nutrition.* 2010;26(7–8):760–5.
74. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR, et al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1140–7.
75. Yoshiuchi I. Evidence for natural selection at the melanocortin-3 receptor gene in European and African populations. *Acta Diabetol.* 2016;53(4):583–7.
76. Alsmadi O, Melhem M, Hebbar P, Thareja G, John SE, Alkayal F, et al. Leptin in association with common variants of MC3R mediates hypertension. *Am J Hypertens.* 2014;27(7):973–81.
77. Ni XP, Pearce D, Butler AA, Cone RD, Humphreys MH. Genetic disruption of  $\gamma$ -melanocyte-stimulating hormone signaling leads to salt-sensitive hypertension in the mouse. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1251–8.
78. Lee S, Kasif S, Weng Z, Cantor CR. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS One.* 2008;3(12).
79. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and genotyping error. *Front Genet.* 2017;8(OCT):1–6.
80. Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: Surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol.* 2005;6:1–11.
81. Zhai CN, Cong HL, Zhang H, Hou K, Zhang Y, Zhang YY. M235T polymorphism in the angiotensinogen gene and cardiovascular disease: An updated meta-analysis of 39 case-control comparisons. *Anatol J Cardiol.* 2019;21(4):222–32.
82. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ, et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol.* 2011;21(4):240–5.
83. McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AL, et al. Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism Predicts Outcome in African Americans With Heart Failure. Results From the A-HeFT Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(6):1277–82.
84. Byrd JB, Auchus RJ, White PC. Aldosterone Synthase Promoter Polymorphism and Cardiovascular Phenotypes in a Large, Multiethnic Population-Based Study. *J Investig Med.* 2015;63(7):862–6.
85. Russo P, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Arnout J, Cappuccio FP, et al. -344C/T Variant in the Promoter of the Aldosterone Synthase Gene (CYP11B2) Is Associated With Metabolic Syndrome in Men. *Am J Hypertens.* 2007;20(2):218–22.

86. Casiglia E, Tikhonoff V, Schiavon L, Guglielmi F, Pagnin E, Bascelli A, et al. Skinfold thickness and blood pressure across C-344T polymorphism of CYP11B2 gene. *J Hypertens* [Internet]. 2007;25(9):1828–33. Available from: [https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2007/09000/Skinfold\\_thickness\\_and\\_blood\\_pressure\\_across.13.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2007/09000/Skinfold_thickness_and_blood_pressure_across.13.aspx)
87. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*. 2007;21(9):2185–94.
88. Manta FSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*. 2013;40(1):94–8.
89. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One*. 2013;8(9):1–11.

Table 2. General characteristics of the analyzed sample.

<b>Total sampling</b>	<b>N=1,054</b>
Females, n, (%)	564 (53.5%)
Age, years	12,66 ( $\pm$ 1,51)
Height (cm)	157 ( $\pm$ 0,10)
Weight, (kg)	51,26 ( $\pm$ 13,41)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20,61 ( $\pm$ 4,24)
WC (cm)	71.05 ( $\pm$ 10.13)
BMI, n (%)	
Low-Weigth	31 (2.94%)
Normal-Weight	586 (55.5%)
Overweight	218(20.7%)
Obesity	218 (20.7%)
WC, n (%)	
Normal	576 (54.8%)
Increased	476 (45.2%)
Overweight/Obesity prevalence, n (%)	436 (41.4%)
Skin color, n (%)	
White	464 (44.0%)
Black	226 (21.4%)
No-White/No-Black	338 (32.1%)
SBP (mmHg)	109,1 ( $\pm$ 12,33)
DBP (mmHg)	64,3 ( $\pm$ 18,22)
Elevated BP prevalence, n (%)	142 (13.5%)

Table 3. Allele and genotype frequencies in the overall sample.

SNP	Genotypes	Genotypic Frequency, n (%)	Alleles	Allelic Frequency, n (%)	HWE <i>P</i> -value
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	AA	302 (28.7%)	A	1.109 (54.79%)	.8024
	GA	505 (47.9%)	G		
	GG	205 (19.4%)		915 (45.21%)	
	missing	42 (4.0%)			
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	TT	534 (50.7%)	T	1.415 (54.55%)	.0252*
	CT	347 (32.9%)	C	1.179 (45.45%)	
	CC	83 (7.9%)			
	missing	90 (8.5%)			
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	GG	400 (38.0%)	G	1.239 (63.41%)	.3025
	GT	439 (41.7%)	T	715 (36.59%)	
	TT	138 (13.1%)			
	missing	77 (7.3%)			
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	CC	615 (58.3%)	C	1557 (77.54%)	.0462*
	CA	327 (31.0%)	A	451 (22.46%)	
	AA	62 (5.9%)			
	missing	50 (4.7%)			
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	TT	280 (26.6%)	T	1.003 (58.05%)	.1131
	AT	443 (42.0%)	A	725 (41.95%)	
	AA	141 (13.4%)			
	missing	190 (18.0%)			
rs699 ( <i>AGT</i> )	TT	187 (17.7%)	T	911 (44.19%)	.0786
	CT	537 (50.9%)	C	1.151 (55.81%)	
	CC	307 (29.1%)			
	missing	23 (2.2%)			
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	TT	378 (35.9%)	T	1.156 (64.22%)	.2511
	CT	400 (38.0%)	C	644 (35.78%)	
	CC	122 (11.6%)			
	missing	154 (14.6%)			
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	GG	610 (57.9%)	G	1.499 (77.83%)	<b>.00001</b>
	GA	279 (26.5%)	A	427 (22.17%)	
	AA	74 (7.0%)			
	missing	91 (8.6%)			

\*Non-significant after Bonferroni's correction ( $P \leq .007$ );

Significant associations ( $P \leq .05$ ) are indicated in bold.

Table 6. One-way ANOVA results for obesity-related and BP variables according to genotypes.

Variable	Mean $\pm$ SD			F	P	Comparisons 2 X 2
	rs1137101 ( <i>LEPR</i> )					
	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.30 $\pm$ 4.37	20.71 $\pm$ 4.30	20.69 $\pm$ 3.98	.967	.381	
WC (cm)	70.457 $\pm$ 10.46	71.19 $\pm$ 10.29	71.35 $\pm$ 9.37	.654	.328	-
SBP (mmHg)	108.73 $\pm$ 12.43	109.82 $\pm$ 12.20	108.24 $\pm$ 12.92	1.444	.237	
DBP (mmHg)	65.61 $\pm$ 29.94	64.05 $\pm$ 9.87	63.71 $\pm$ 10.87	2.846	.412	
	rs17782313 ( <i>MC4R</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.55 $\pm$ 4.00	20.79 $\pm$ 4.38	20.98 $\pm$ 5.25	.563	.570	
WC (cm)	71.19 $\pm$ 9.82	71.38 $\pm$ 10.19	71.46 $\pm$ 12.16	.049	.952	-
SBP (mmHg)	108.39 $\pm$ 11.81	109.38 $\pm$ 12.62	111.65 $\pm$ 13.24	2.772	.063	
DBP (mmHg)	64.01 $\pm$ 23.06	63.93 $\pm$ 10.43	68.10 $\pm$ 14.61	1.824	.162	
	rs1799983 ( <i>NOS3</i> )					
	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.97 $\pm$ 4.34	20.46 $\pm$ 4.28	19.86 $\pm$ 3.84	3.905	<b>.020</b>	GG > GT = TT
WC (cm)	71.98 $\pm$ 10.58	70.70 $\pm$ 10.04	69.75 $\pm$ 9.24	3.065	.047*	
SBP (mmHg)	109.80 $\pm$ 13.00	108.14 $\pm$ 11.68	109.67 $\pm$ 12.05	2.115	.121	
DBP (mmHg)	64.02 $\pm$ 11.39	64.76 $\pm$ 25.08	64.05 $\pm$ 10.66	.185	.831	
	rs3746619 ( <i>MC3R</i> )					
	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.53 $\pm$ 4.12	20.79 $\pm$ 4.36	20.23 $\pm$ 4.41	.636	.530	
WC (cm)	71.23 $\pm$ 10.05	70.87 $\pm$ 9.93	69.90 $\pm$ 11.68	.548	.578	
SBP (mmHg)	109.17 $\pm$ 11.82	108.61 $\pm$ 12.73	113.31 $\pm$ 15.13	3.788	<b>.023</b>	AA > CA = CC
DBP (mmHg)	64.75 $\pm$ 22.07	63.48 $\pm$ 9.65	66.19 $\pm$ 14.23	.801	.449	

Continue

(Continuation) Table 6. One-way ANOVA results for obesity-related and BP variables according to genotypes.

	rs9939609 ( <i>FTO</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TA</b>	<b>AA</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.72 ± 4.21	20.47 ± 4.16	20.93 ± 4.84	.697	.499	
WC (cm)	71.17 ± 10.46	70.87 ± 9.76	72.08 ± 10.73	.762	.467	-
SBP (mmHg)	109.74 ± 12.90	108.45 ± 12.41	109.65 ± 11.01	1.118	.327	
DBP (mmHg)	65.75 ± 30.86	63.23 ± 9.68	64.82 ± 9.21	1.526	.218	
	rs699 ( <i>AGT</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.46 ± 4.30	20.58 ± 4.25	20.74 ± 4.26	.282	.754	
WC (cm)	71.48 ± 10.28	70.88 ± 10.24	71.09 ± 9.94	.242	.785	-
SBP (mmHg)	107.91 ± 11.06	109.49 ± 12.81	109.78 ± 12.30	1.478	.228	
DBP (mmHg)	62.75 ± 8.78	65.44 ± 23.58	63.50 ± 10.63	1.972	.140	
	rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )					
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.81 ± 4.73	20.31 ± 3.83	20.70 ± 4.05	1.403	.246	
WC (cm)	71.51 ± 11.01	70.27 ± 9.25	71.33 ± 9.39	1.579	.207	-
SBP (mmHg)	109.69 ± 12.18	109.28 ± 12.61	108.45 ± 13.17	.458	.633	
DBP (mmHg)	64.67 ± 10.27	63.53 ± 10.49	64.68 ± 11.90	1.287	.277	
	rs3827103 ( <i>MC3R</i> )					
	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>GA</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.56 ± 4.26	20.58 ± 4.31	20.74 ± 3.62	.058	.943	
WC (cm)	71.06 ± 10.23	70.90 ± 9.95	70.73 ± 9.68	.050	.952	-
SBP (mmHg)	109.25 ± 11.91	108.88 ± 12.80	108.54 ± 12.76	.168	.845	
DBP (mmHg)	64.82 ± 22.27	63.12 ± 9.15	61.66 ± 9.45	1.474	.229	

SD, standard deviation; *F*, Fisher test. Significant associations ( $P \leq .05$ ) are indicated in bold.

\*Not significant after Tukey's post-Hoc test.

Table 7. Logistic regression models for association with elevated BP and obesity.

Univariate Logistic Regression Model						
Variable	Association with elevated BP			Association with obesity		
	OR	95%CI	<i>P</i>	OR	95%CI	<i>P</i>
Age	1.074	0.954-1.208	.236	0.791	0.723-0.860	<b>&lt;.001</b>
Gender	0.368	0.597-1.211	.368	0.853	0.667-1.091	.205
Skin color	0.691	0.463-1.031	.071	1.114	0.806-1.538	.514
BMI	1.084	1.044-1.126	<b>&lt;.001</b>	-	-	-
WC	1.026	1.010-1.043	<b>.002</b>	-	-	-
SBP	-	-	-	1.024	1.014-1.035	<b>&lt;.001</b>
DBP	-	-	-	1.019	1.007-1.031	<b>.002</b>
Elevated BP	-	-	-	1.546	1.084-2.204	<b>.016</b>
rs1137101 ( <i>LEPR</i> )	0.956	0.740-1.234	.727	1.136	0.950-1.359	.162
rs17782313 ( <i>MC4R</i> )	1.307	0.992-1.723	.057	1.063	0.872-1.294	.547
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.757	0.573-1.000	<b>.050</b>	0.713	0.590-0.861	<b>&lt;.001</b>
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	1.321	0.999-1.748	.051	0.925	0.752-1.137	.458
rs9939609 ( <i>FTO</i> )	0.780	0.579-1.051	.102	1.065	0.873-1.300	.533
rs699 ( <i>AGT</i> )	1.226	0.942-1.599	.129	1.065	0.888-1.278	.495
rs1799998 ( <i>CYP11B2</i> )	0.856	0.647-1.134	.129	0.917	0.756-1.113	.381
rs3827103 ( <i>MC3R</i> )	1.085	0.813-1.449	.579	1.056	0.863-1.293	.596
Multivariate Logistic Regression Model						
Variables	Association with elevated BP		<i>P</i>	Variables	Association with obesity	
	OR (95%CI)	<i>P</i>			OR (95%CI)	<i>P</i>
BMI	1.076 (1.034-1.120)	<b>&lt;.001</b>		Age	0.775 (0.709-0.846)	<b>&lt;.001</b>
rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.761 (0.570-1.017)	.065		Elevated BP	1.584 (1.082-2.320)	<b>.018</b>
rs3746619 ( <i>MC3R</i> )	1.307 (0.969-1.763)	.079		rs1799983 ( <i>NOS3</i> )	0.730 (0.603-0.885)	<b>.001</b>

Significant associations ( $P \leq .05$ ) are indicated in bold.

