

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

PATRÍCIA MAURER

**POLIMORFISMOS DO GENE DA ÓXIDO NITRICO SINTASE ENDOTELIAL
(GLU298ASP) E DA ADIPONECTINA (ADIPOQ +45 T>G) COMO POTENCIAIS
MARCADORES DE HIPERTENSÃO E INFLAMAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO
AFRODESCENDENTE**

**Uruguiana
2019**

PATRÍCIA MAURER

**POLIMORFISMOS DO GENE DA ÓXIDO NITRICO SINTASE ENDOTELIAL
(GLU298ASP) E DA ADIPONECTINA (ADIPOQ +45 T>G) COMO POTENCIAIS
MARCADORES DE HIPERTENSÃO E INFLAMAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO
AFRODESCENDENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Jacqueline da Costa Escobar
Piccoli

**Uruguiana
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M453p Maurer, Patricia

POLIMORFISMOS DO GENE DA ÓXIDO NITRICO
SINTASE ENDOTELIAL (GLU298ASP) E DA
ADIPONECTINA (ADIPOQ +45 T>G) COMO
POTENCIAIS MARCADORES DE HIPERTENSÃO E
INFLAMAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO
AFRODESCENDENTE / Patricia Maurer.

94 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal
do Pampa, DOUTORADO EM BIOQUÍMICA, 2019.

"Orientação: Jacqueline da Costa
Escobar Piccoli".

1. Polimorfismos. 2. Negros. 3.
Hipertensão. 4. Inflamação. I. Título.

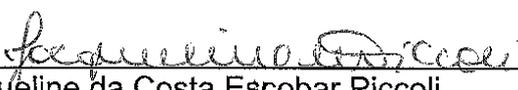
PATRICIA MAURER

POLIMORFISMOS DO GENE DA ÓXIDO NITRICO SINTASE ENDOTELIAL (GLU298ASP) E DA ADIPONECTINA (ADIPOQ +45 T>G) COMO POTENCIAIS MARCADORES DE HIPERTENSÃO E INFLAMAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO AFRODESCENDENTE

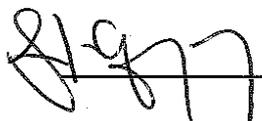
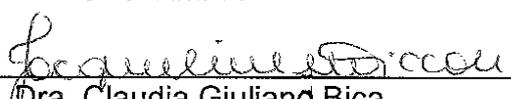
Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Tese defendida e aprovada em: 27 de setembro de 2019.

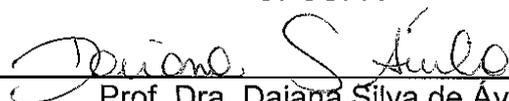
Banca examinadora:



Prof. Dra. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli
Orientador
UNIPAMPA

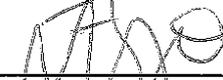
Prof. Dra. Claudia Giuliano Bica
UFCSPA



Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila
UNIPAMPA



Prof. Dra. Francieli Weber Santos Cibir
UNIPAMPA



Prof. Dr. Matias Nunes Frizzo
UNIJUI

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de aprender mais a cada dia.

A minha “super hiper diva” orientadora, Prof^a Dr^a Jacqueline Piccoli. Você é e sempre serás meu melhor presente! Se no mestrado já me senti acolhida imensamente mesmo tendo acabado de lhe conhecer, no doutorado pude ter a certeza de que minha caminhada foi muito mais florida ao teu lado. Obrigada por se tornar meu exemplo científico, de vida, dedicação a família e ao trabalho, positividade, gentileza, carinho, enfim. Conseguiu ser uma mãe e uma grande educadora. Me deste um norte, apontou o caminho, e o percorreu comigo a cada dia. Admiro tua força de vontade e resiliência! Sempre carregarei comigo esse exemplo! Mil vezes Obrigada!

Ao Luiz Henrique C. Gonçalves, que mais uma vez, esteve do meu lado em todos os percalços, alegrias e tristezas! Obrigada por não desistir de mim, ouvir minhas frustrações, choros, inseguranças, crises de ansiedade e ainda assim ter uma palavra de carinho. Esse título será nosso!

Aos meus pais! Vocês não têm ideia do quanto saber que vocês existem é capaz de me dar forças aqui. Obrigada por acreditarem em mim, apoiarem, puxarem a orelha ou simplesmente mandar um “bom dia” ou “boa noite meu anjo”. A cada despedida deixo um pouco de mim com vocês, mas o carinho que trago comigo me faz ter certeza de que sou amada e aceita, com mil defeitos, mas com a certeza de que cada palavra de incentivo e que cada ano de estudos não foi perdido. Vocês são minha fortaleza! Amo vocês!

Aos colegas de laboratório que acompanharam toda ou quase toda essa trajetória: Lyana Berro, Renata Montagner, Débora Rubio, Fernandez Garcia, Marcia Cattelan, Jamila Bruno e Emanuelle dal Ponte, obrigada pela parceria, ajudas, mates, conversas, géis e PCRs, vocês tornaram essa jornada mais feliz! Também à professora Vanusa Manfredini e às colegas do GESTOX e aos integrantes do Lab. Biogenômica da UFSM, Fernanda Barbisan, Verônica Azzolin e principalmente Professora Ivana da Cruz, obrigada pelas sugestões no trabalho, ajuda na cultura de células, nas respostas do artigo e também pela parceria e quarto disponível em Santa Maria, agradecerei sempre a vocês!

As amigas Juliana Alves, Bruna Escobar e Carla Heinen, vocês são responsáveis por muitos sorrisos durante essa dura etapa, obrigada por existirem,

sendo um ombro amigo, pessoalmente ou pelo Whats, meus dias foram mais felizes por saber que posso contar com vocês!

Ao PPGBioquímica meu reconhecimento pela excelência do programa, e por todos os conhecimentos e exemplos repassados durante a Pós Graduação. Aos professores que acompanharam esses quatro anos, e especialmente à banca, Professores Claudia Bica, Daiana Avila, Francielli Cibir e Matias Frizzo, pela disponibilidade na leitura deste trabalho, por aceitarem nosso convite e pelas valiosas considerações que certamente serão recebidas! Obrigada por me ajudarem a melhorar esta tese.

A UNIPAMPA pela concessão de auxílio doutorado e pela experiência singular que tive como professora substituta, e a CAPES pela bolsa recebida durante a realização dos últimos dois anos de doutorado.

“Todas as vitórias ocultam uma
abdicação”.

Simone de Beauvoir

RESUMO

A população negra brasileira corresponde à 54,9% da população do país, entretanto, ainda apresenta maior vulnerabilidade social e econômica, resultando em maior suscetibilidade a danos e agravos em saúde. Uma das doenças mais prevalentes na população negra é a hipertensão que, junto com as doenças cardiovasculares destacam-se como a maior causa de mortes e internações hospitalares no Brasil. Embora a mortalidade por doenças cardiovasculares tenha diminuído nos últimos anos de modo geral, em indivíduos negros e de baixa renda essa situação permanece inalterada. Em virtude disso, a busca por marcadores genéticos nesta população específica torna-se relevante. Variações no gene que codifica para a enzima que secreta óxido nítrico nos vasos sanguíneos tem sido relatadas como importantes para a vasodilatação e para o controle de pressão arterial, assim como alterações no gene da adiponectina, uma citocina do tecido adiposo envolvida na regulação do metabolismo lipídico e glicêmico, entretanto, a importância dessas variações e seu papel no desenvolvimento e progressão de doenças crônicas na população negra ainda não é conhecida. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de dois polimorfismos em diferentes genes e sua associação com doença hipertensiva e inflamação em negros. Participaram do estudo 203 indivíduos autodeclarados negros, a maioria mulheres, cuja prevalência de hipertensão foi de 53,8%. Com a classificação dos valores de pressão arterial, 41% dos hipertensos apresentavam-se com a doença controlada, 51% com a pressão arterial não controlada, e 8% foram classificados com hipertensão resistente, um fenótipo mais raro da doença que não responde com a diminuição dos níveis pressóricos apesar do uso de 3 medicamentos anti-hipertensivos de diferentes classes incluindo um diurético. Quanto aos polimorfismos avaliados, a presença de dois alelos mutados em qualquer um deles e a obesidade aumentaram o *odds ratio* para hipertensão não controlada. O alelo mutado do polimorfismo da ADIPOQ +45T>G foi associado com o fator de risco tabagismo no grupo com hipertensão não controlada, e com níveis significativamente menores de adiponectina, considerada importante citocina anti-inflamatória e antiaterosclerótica, principalmente no grupo que não possuía controle pressórico. Na avaliação *in vitro*, células de diferentes genótipos do polimorfismo Glu298Asp apresentaram diferenças na resposta inflamatória avaliada pelos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e também expressão de genes inflamatórios. O

alelo G demonstrou papel protetor e o alelo T foi mais suscetível à inflamação, pois houveram diferenças entre os níveis das interleucinas. Os resultados deste trabalho indicam que o polimorfismo Glu298Asp do gene da óxido nítrico sintase endotelial pode ser utilizado como biomarcador de alterações cardiovasculares na população negra.

Palavras-Chave: Afrodescendentes. Negros. Hipertensão. SNP. Inflamação.

ABSTRACT

The Brazilian black population corresponds to 54.9% of the country's population, however, still has greater social and economic vulnerability, resulting in greater susceptibility to health damage and health. One of the most prevalent diseases in the black population is hypertension, which, along with cardiovascular disease, stands out as the leading cause of death and hospitalization in Brazil. Although mortality from cardiovascular disease has declined in recent years overall, in black and low-income individuals this situation remains unchanged. Because of this, the search for genetic markers in this specific population becomes relevant. Variations in the gene that secretes nitric oxide in blood vessels have been reported to be important for vasodilation and blood pressure control, as well changes in the adiponectin gene, an cytokine involved in the regulation of lipid and glycemic metabolism, however, the importance of these variations and their role in the development and progression of chronic diseases in the black population is not yet known. The aim of this study was to evaluate the effect of two polymorphisms on different genes and their association with hypertensive disease and inflammation in blacks. The study included 203 self-declared black individuals, mostly women, whose prevalence of hypertension was 53.8%, among which 41% of hypertensive patients presented with controlled disease, 51% uncontrolled blood pressure, and 8% were classified as resistant hypertension, a rarer phenotype of the disease that does not respond with decreased blood pressure despite the use of 3 antihypertensive drugs of different classes including a diuretic. Regarding the polymorphisms evaluated, the presence of two mutated alleles in either one and obesity increased the odds ratio for uncontrolled hypertension. The mutated allele in ADIPOQ+45T>G polymorphism was associated with smoking in the uncontrolled hypertension group, and with significantly lower adiponectin levels, considered to be an important anti-inflammatory and anti-atherosclerotic cytokine, especially in the uncontrolled group. In vitro evaluation, cells of different genotypes of the Glu298Asp polymorphism showed differences in the inflammatory response evaluated by levels of pro and anti-inflammatory cytokines and also expression of inflammatory genes. The G allele showed a protective role and the T allele was more susceptible to inflammation. The results of this work indicate that the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene can be used as a biomarker of cardiovascular changes in the black population.

Keywords: African descendants. Blacks. Hypertension. SNP. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de hipertensão arterial em cidades brasileiras.....	24
Figura 2 - Composição da parede vascular.....	25
Figura 3 - Reação de formação do óxido nítrico catalisada pela NOS.....	29
Figura 4 - Ação do NO sobre o músculo liso.....	29
Figura 5 – Obesidade e sinalização.....	33
Figura 6 - Início e progressão da placa aterosclerótica.....	34
Figura 7 - Localização do SNP Glu298Asp no gene NOS3.....	38
Figura 8 - Polimorfismos da eNOS.....	40
Figura 9 - Localização do SNP +45T>G no gene ADIPOQ.....	41
Figura 10 – Estresse oxidativo induz disfunção endotelial.....	91

Artigo I

Figure 1 - Experimental design.....	48
Figure 2 - eNOS Glu298Asp genotyping. (A) Frequency distribution of TT, TG and GG genotypes in the 202 self-declared blacks subjects. B: Allelic discrimination plot.....	51
Figure 3 - Comparison of oxidative metabolism markers among PBMCs carrier's different Glu298Asp genotypes after 72 hours.....	52
Figure 4 - Comparison of some inflammatory indicators of cell cultures from PBMCs carrier's different Glu298Asp genotypes (TT, TG and GG).....	53
Figure 5 - Variations in NO levels in PBMC PHA-activated genotyped Glu298Asp...	55
Figure 6 - Inflammatory gene expression modulation.....	55
Graphical Abstract.....	60

Manuscrito I

Figure 1 – Study design.....85

Figure 2 - Results of the biochemical analysis between the controlled and uncontrolled hypertension groups, divided by the haplotypes of the 2 polymorphisms. **A:** Glu298Asp SNP of the eNOS gene. **B:** +45 T>G of the ADIPOQ gene.....86

Figure 3 - Odds ratio (95% confidence interval) for developing uncontrolled hypertension associated with cardiovascular risk factors and individuals with 1 mutated allele (A) and 2 mutated allele (B), in any SNP studied.....87

Graphical Abstract.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categorias de Pressão Arterial em adultos segundo critérios da “American College of Cardiology” (2018).....	22
Tabela 2 - Valores de referência para a definição de HAS pelas medidas de consultório, MRPA e MAPA.....	23
Tabela 3 - Técnicas disponíveis para o desenvolvimento de biomarcadores.....	36

Artigo I

Table 1. List of primers used and gene information.....	49
---	----

Manuscrito I

Table 1 - Baseline characteristics of the participants, divided between resistant and uncontrolled hypertension (UH) and controlled hypertension (CH).....	80
Table 2 - Allele and genotype frequencies of Glu298asp and +45 T>G polymorphisms in blacks.....	82
Table 3 - Cardiovascular risk factors between uncontrolled hypertension (UH) and controlled hypertension (CH) groups and haplotypes of the Glu298Asp and ADIPOQ +45T>G SNPs.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE – 4-Hidroxi-nonenal

8-OHdG - 8-deoxiguanosine

ADIPOQ – Gene codificante da proteína adiponectina

ADMA – Dimetil-arginina assimétrica - *Asymmetric dimethyl arginine*

AHA – *American Heart Association*

AVC – Acidente Vascular Cerebral

AVE – Acidente Vascular Encefálico

CA – Câncer

DAC – Doença Arterial Coronariana

DCV – Doença Cardiovascular

DM – Diabetes mellitus

DP – Desvio padrão

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial

G6PD – Glicose-6-fosfato-desidrogenase

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

GTP – Guanosina trifosfato – Trifosfato de guanosina

GWAS - Estudos de Associação Pan-genômica - *Genome-wide Association Studies*

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HbA1c – Hemoglobina Glicada

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL – Interleucina

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

IMA – Albumina modificada por isquemia - *Ischemia Modified Albumin*

IMC – Índice de Massa Corporal

INF γ – Interferon gamma

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IP₃ - fosfatidilinositol trifosfato

IRC – Insuficiência renal crônica

MAPA - Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial

MDA – Malondialdeído

MRPA - Monitorização Residencial da Pressão Arterial

Na - Sódio

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NO – Óxido Nítrico

NOS3 – Óxido nítrico sintase endotelial isoforma 3

nNOS- Óxido nítrico sintase neuronal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Pressão arterial

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico - *peripheral blood mononuclear cell*

PCR – Reação em cadeia da polimerase - *Polymerase chain reaction*

PCR-us – Proteína C Reativa ultrassensível

PHA – Fitohemaglutinina - *Phytohemagglutinin*

PNSIPN – Política Nacional de Saúde Integral da População Negra

q-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RAAS - Sistema renina-angiotensina-aldosterona - *Renin-angiotensin-aldosterone system*

RNA_m – RNA mensageiro – ácido ribonucleico mensageiro

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio - *Reactive Oxygen Species*

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real - *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*

RHTN – Hipertensão resistente - *resistant hypertension*

RfHTN - hipertensão refratária - *refractory hypertension*

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único - *single nucleotide polymorphism*

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

VNTR - Repetição em tandem de número variável - *variable number of tandem repeats*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	5
RESUMO	8
SUMÁRIO	17
CAPÍTULO I	19
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Saúde da População Negra.....	21
2.3 Hipertensão	22
2.5 Função endotelial.....	27
2.5.1 Função do óxido nítrico.....	28
2.3 Metabolismo oxidativo e Epidemiologia da inflamação	30
2.3.1 Estresse Oxidativo.....	30
2.3.2 Obesidade e inflamação	31
2.4 Biomarcadores	34
2.4.1 Genes candidatos.....	37
2.4.2 Polimorfismo genético Glu298Asp	37
2.4.3 Polimorfismo ADIPOQ.....	40
3 OBJETIVOS	42
CAPÍTULO II	43
4 ARTIGO I	43
5 MANUSCRITO I	53
DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85

ANEXO A – Comprovante de Aprovação pelo Comitê de Ética	93
ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito I	94

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Segundo informações do Censo Demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 54,9% da população brasileira se autodeclara quanto ao quesito raça/cor como negra (preta ou parda). Entretanto, este grupo populacional ainda sofre com menor qualidade de vida, acesso à saúde e doenças tanto geneticamente determinadas como as adquiridas em situações desfavoráveis. Sendo assim, esta situação de saúde é o foco da presente tese de doutorado. Injustos processos sociais, culturais e econômicos estiveram presentes na história brasileira e deram origem a situação contemporânea dos negros, sendo que atualmente as doenças cardiovasculares, além de serem a maior causa de mortes no mundo, correspondem a uma crescente preocupação entre a população negra, que apresenta, entre outros fatores de risco, maior prevalência de hipertensão.

As condições de saúde da população negra foram reconhecidas pelo Ministério da Saúde, que em 2008 criou a Política Nacional de Saúde Integral da População Negra, reconhecendo que alguns problemas de saúde ainda são mais prevalentes na população negra, devido a fatores fisiológicos e também sociais. Neste sentido, estudos têm sido realizados com o intuito de entender o conjunto dos fatores de risco em indivíduos negros e estabelecer novos biomarcadores, com o propósito de identificar o risco, identificar alvos potenciais e auxiliar no tratamento e prognóstico da hipertensão e de outras doenças.

Além dos marcadores cardíacos conhecidos como troponina, Proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) e a Albumina Modificada por Isquemia (IMA), os marcadores genéticos surgem como uma alternativa de predição de risco, apesar da etiologia multifatorial da hipertensão e de muitos genes correlacionados

As variações genéticas mais comuns são os polimorfismos, como os Polimorfismos de base única ou Polimorfismos de nucleotídeo único (Single nucleotide polymorphism- SNP), que constituem 90% de todas as variações do genoma humano, acarretando em mudanças morfológicas e/ou funcionais no organismo, que podem ser associados à ocorrência de doenças como a hipertensão.

O óxido nítrico e seus metabólitos como o nitrito e o nitrato surgem como uma possibilidade de indicar o estado de saúde de pacientes com doenças cardiovasculares e podem afetar a avaliação clínica da hipertensão, devido a seu papel como vasodilatador atuando como biomarcador. O gene da Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) está localizado no cromossomo 7, e sintetiza o óxido nítrico endotelial. SNPs na região promotora, em éxons e íntrons do gene da eNOS já foram correlacionados com aumento de risco cardiovascular em grupos populacionais diferenciados, mas a associação destes com fatores étnicos raciais e hipertensão ainda são escassos.

Outro biomarcador que tem sido utilizado como preditor de doenças cardiovasculares é a adiponectina. A adiponectina é uma citocina secretada pelo tecido adiposo que possui propriedades anti-inflamatórias e anti-aterogênicas. Considerando o reconhecimento do tecido adiposo como órgão funcional e não apenas de reserva, variações no gene que sintetiza a adiponectina, localizado no tecido adiposo, tem sido associadas com doenças do metabolismo como diabetes e com a progressão de doenças como as cardiovasculares e inflamatórias.

Conforme o acima exposto, o estudo de marcadores genéticos e inflamatórios relacionados à hipertensão e às doenças cardiovasculares no que se refere a questões étnico-raciais ainda são necessários para elucidar o maior risco cardiovascular observado na população negra.

Neste sentido, esta tese foi dividida em três capítulos. No **capítulo I** encontra-se a INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e OBJETIVOS traçados para este trabalho. A metodologia e os resultados e discussão que fazem parte dessa tese estão apresentados sob a forma de um artigo publicado em periódico científico e um manuscrito, já submetido a um periódico e que se encontra no **capítulo II** deste trabalho, seguido por uma DISCUSSÃO sobre os resultados dos dois artigos. O item CONCLUSÃO encontra-se no **capítulo III** da tese. O item REFERÊNCIAS refere-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica dessa tese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Saúde da População Negra

Segundo a terminologia oficial dada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), população negra é um termo que envolve as cores de pele “preta” e “parda”. Em 1996, 44,1% da população brasileira autodeclarou-se preta ou parda, em 2010, este número aumentou para 50,7%, correspondendo a mais de 91 milhões de pessoas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010), enquanto que em 2015, a porcentagem foi correspondente a 54,9% da população brasileira, com a distribuição por cor ou raça igual a 46,7% de população parda e 8,2% de população preta (BRASIL, 2016). Este aumento se deveu principalmente a maior visibilidade que tem sido dada à temática racial nos últimos anos possibilitando às pessoas que reformulem questões relacionadas as suas identidades.

Esta população, embora em grande número, é notadamente mais vulnerável social e economicamente, apresentando menor expectativa de vida e maior suscetibilidade a danos e agravos em saúde, o que condiz com dados do IBGE, segundo o qual 76% da população negra está entre os mais pobres, com renda média de R\$130,00 por pessoa (IBGE, 2016).

A situação de saúde da população negra motivou a criação, em 2008, pelo Ministério de Saúde, da PNSIPN, uma Política do SUS, que já está na sua terceira edição (BRASIL, 2017). A iniquidade e vulnerabilidade que afeta a saúde da população negra foi decisiva para a criação desta política, uma vez que a precocidade dos óbitos, altas taxas de mortalidade materna e infantil, maior prevalência de doenças crônicas, altos índices de violência, e principalmente o racismo, incidem negativamente sobre as condições de saúde desta população (BRASIL, 2017).

O objetivo geral da PNSIPN é promover a saúde integral da população negra, priorizando a redução das desigualdades étnico-raciais, o combate ao racismo e discriminação nas instituições e serviços do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2017). Neste enfoque, a política reconhece algumas diferenças nas

condições de vida e saúde das pessoas, e apresenta a anemia falciforme, deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase e foliculite como as doenças genéticas mais prevalentes na população negra; desnutrição, doenças do trabalho, anemias carenciais, transtornos mentais e uso abusivo de álcool e outras drogas são problemas de saúde adquiridos em condições adversas; e ainda a **hipertensão arterial sistêmica (HAS)**, diabetes mellitus (DM), insuficiência renal crônica (IRC) e câncer (CA) como as doenças crônicas de maior prevalência neste grupo populacional (BRASIL, 2017; BRASIL 2013; BRASIL, 2001).

2.3 Hipertensão

A HAS é uma doença multifatorial crônica não transmissível, caracterizada pelo aumento consistente da pressão arterial (PA) acima de 140x90mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Entretanto, novas diretrizes americanas classificam os valores de PA em 4 níveis com novos pontos de corte, conforme a tabela 1, para ajudar na prevenção e tratamento da hipertensão, estimativas de risco cardiovascular e adoção de tratamentos não farmacológicos e de vida saudável (AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, 2018)

Tabela 1 - Categorias de Pressão Arterial em adultos segundo critérios da “American College of Cardiology” (2018)

Categoria PA	PAS		PAD
Normal	< 120 mmHg	E	< 80 mmHg
Elevada	120-129 mmHg	E	< 80 mmHg
HAS estágio 1	130-139 mmHg	OU	80-89 mmHg
HAS estágio 2	≥ 140 mmHg	OU	≥ 90 mmHg

Fonte: AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, 2018)

As recomendações brasileiras para diagnóstico da HAS indicam a medida da pressão arterial no consultório e a confirmação através de medição residencial da

pressão arterial (MRPA) ou Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA) de 24 horas, para exclusão de possível hipertensão mascarada e hipertensão do avental branco (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Tabela 2 - Valores de referência para a definição de HAS pelas medidas de consultório, MRPA e MAPA

Categoria	PAS (mmHg)		PAD (mmHg)
Consultório	≥ 140	e/ou	≥ 90
MAPA			
Vigília	≥ 135	e/ou	≥ 85
Sono	≥ 120	e/ou	≥ 70
24 horas	≥ 130	e/ou	≥ 80
MRPA	≥ 135	e/ou	≥ 85

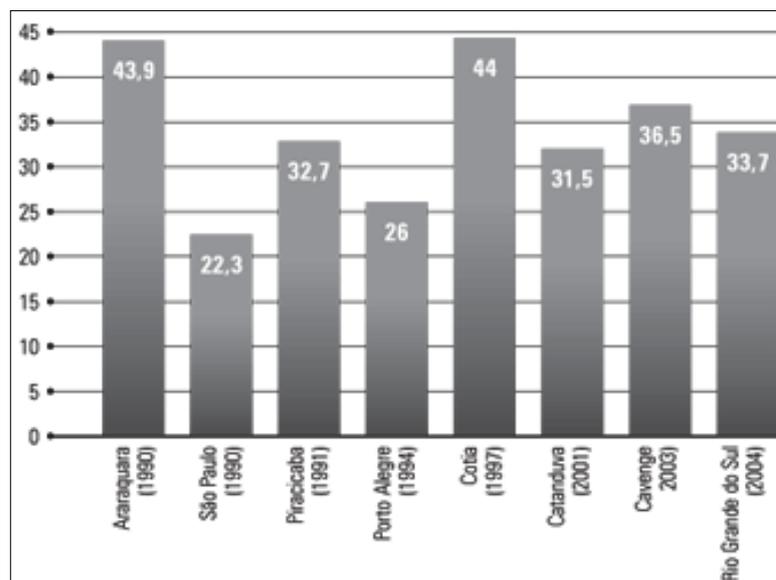
PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

Fonte: (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

A prevalência de hipertensão varia conforme a população estudada, de 22 a 44% em diferentes cidades brasileiras (figura 1) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007), chegando a atingir 66% de prevalência quando avaliada em idosos com mais de 60 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016), e alcançando 1/3 da população americana (FANG, 2014). Ainda, eventos cardiovasculares ocorrem com maior frequência e mais precocemente em negros, ocorrendo na faixa etária entre 30 e 50 anos, enquanto que na população não negra o aumento da frequência ocorre a partir dos 60 anos (LILLIE-BLANTON, 2004). Além de fatores de risco clássicos para hipertensão, como idade, obesidade, ingestão de sal e álcool, a raça negra/cor preta também é considerada fator de risco, e dados de estudos brasileiros prévios mostram prevalência de 49% em negros, enquanto este número corresponde a 30% em brancos e 38% em pardos (CHOR, 2015).

Em Uruguaiana, estudo prévio encontrou prevalência de HAS entre negros de 53,5% (MAURER, 2015), número superior ao encontrado em outra população geral do Rio Grande do Sul que era de 33,7% (GUS, 2004), e o dobro da prevalência de HAS em negros quilombolas de Sergipe, que foi de 26% (SANTOS, 2019). A razão pela qual os negros apresentam maior prevalência de HAS do que os brancos têm sido debatida muitas vezes, e envolve o somatório de vários fatores, como interações gene-ambiente, estresse relacionado ao trabalho, racismo e causas psicossociais para as disparidades raciais/étnicas (FUCHS, 2011).

Figura 1. Prevalência de HAS em cidades brasileiras



Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007.

Um dos fatores genéticos envolvidos na característica hipertensórica inerente aos negros é a presença de sensibilidade ao sal diminuída, como o funcionamento renal é crucial para a manutenção do sódio (Na) e equilíbrio hídrico, qualquer defeito na reabsorção do sódio pode resultar em perda da homeostase circulatória, resultando potencialmente em pressão ambiental para selecionar genes que retêm sódio mais ativamente; isso pode ter sido um fator importante da sobrevivência dos negros durante sua passagem da África para a América nos navios negreiros (SPENCE, 2018). Assim, a população afrodescendente tem maior propensão a sensibilidade ao sal e renina plasmática suprimida, com danos aos órgãos alvo mais frequentes e a PA de mais difícil de controle (RAYNER, 2017). A hipótese da seleção natural é conhecida como *diáspora africana* devido às condições severas de calor e privação sofridas enquanto escravos (SPENCE, 2018; TU, 2013).

Dados da *American Heart Association* (AHA - Associação Americana do Coração), apontam que, para indivíduos maiores de 20 anos, entre 47 a 55% de indivíduos negros apresentam pelo menos uma doença cardiovascular, enquanto que na população branca o número é de apenas 36% (BROTHERS, 2019). Ainda, é importante ressaltar que em diversos estudos com a população negra, a idade dos indivíduos afeta desde jovens até a meia-idade e indivíduos idosos, demonstrando que as deficiências estão presentes em indivíduos relativamente jovens e que persistirão durante toda a vida (AHA).

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de óbitos no Brasil, o que representa alta frequência de internações e um considerável custo socioeconômico (SCALA, 2015). As principais DCV podem ser divididas didaticamente em quatro categorias:

I) Infarto, Angina e Derrame (englobando Infarto agudo do miocárdio [IAM] e Acidentes vascular cerebral e encefálico [AVC e AVE]);

II) Insuficiência Cardíaca;

III) Arritmia (distúrbios do ritmo normal do coração);

IV) Doença Valvar (exemplo: Prolapso de Valva Mitral) (CAMBIAGHI, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 publicou dados que reforçam as DCV como principal causa de óbitos mundiais, analisando o período de 2000 a 2012 (WHO, 2014). Embora a conscientização e o tratamento da hipertensão tenham aumentado nos últimos anos, estima-se que menos da metade dos hipertensos apresente a pressão arterial controlada (FANG, 2014). Recomenda-se para prevenção das DCV modificações no estilo de vida, como controle do peso corporal, dieta adequada, controle do diabetes (alvo de Hemoglobina Glicada [HbA1C] < 7%), interrupção do tabagismo e controle da hipertensão visando níveis tensionais $\leq 130/80$ mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

O tratamento da hipertensão depende de sua causa básica, uma vez que existem dois tipos de hipertensão: (1) a essencial ou idiopática, que é responsável por 95% a 97% de todos os casos, e (2) a secundária, que decorre de causas vasculares, neurológicas e/ou endócrinas que podem ser tratadas com especificidade. A hipertensão essencial é quatro vezes mais frequente entre negros do que entre não negros e entre homens e as suas causas são multifatoriais (HOWLAND, 2007).

Quando a hipertensão é de difícil controle, utilizam-se as definições de hipertensão resistente (RHTN) e/ou hipertensão refratária (RfHTN) (AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, 2018). O conceito atual define que para ser classificado como resistente o paciente deve apresentar PA elevada mesmo com o uso simultâneo de 3 diferentes classes de anti-hipertensivos, em doses máximas toleradas e posologia adequadas, cuja estimativa de frequência é de 9-18% dos

pacientes hipertensos (DOROSZKO, 2016). O aumento do risco de RHTN é associado a indivíduos idosos, de origem africana (negros), sexo feminino, com sobrepeso e obesidade (PARREIRA, 2017). Já a hipertensão refratária refere-se a um fenótipo extremo de falha no tratamento de anti-hipertensivos, com falta de controle pressórico apesar do uso de pelo menos 5 agentes anti-hipertensivos de diferentes classes (AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, 2018), que afeta menos de 5% dos pacientes (ACELAJADO, 2019).

O objetivo do tratamento anti-hipertensivo é reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular e renal, mas por se tratar de uma doença frequentemente assintomática, a ausência de adesão é a razão mais comum para a falha do tratamento (HOWLAND, 2007). A resposta aos fármacos anti-hipertensivos tem grande variabilidade, e existem algumas características que influenciam essa resposta:

- Grande variabilidade da pressão do indivíduo nas 24 horas do dia;
- Aparecimento de reações compensatórias tardias apresentadas pelos indivíduos tratados com anti-hipertensivos;
- Influência de outros aspectos demográficos e clínicos sob o tratamento, como idade e etnia (SILVA, 2012).

Considerando a variabilidade das respostas aos anti-hipertensivos entre diferentes grupos populacionais, também é importante conhecermos os mecanismos pelos quais a pressão arterial pode ser controlada pelo organismo, e quais órgãos exercem as funções requeridas para a regulação da PA. Entre diversos mecanismos e órgãos envolvidos na bioquímica da hipertensão arterial, como os rins e o sistema renina angiotensina, o foco desta tese é o controle via vasodilatação endotelial, conforme discutido nos próximos itens.

2.5 Função endotelial

O endotélio é uma monocamada celular contínua sobre a superfície íntima de todo o sistema cardiovascular, incluindo artérias, veias e endocárdio. Inicialmente acreditava-se que ele era uma interface passiva entre o sangue e os tecidos, mas sabe-se que é uma camada celular ativa que responde a estímulos físicos e químicos influenciando a fisiologia do tecido circundante, particularmente em relação ao fluxo sanguíneo (BROCQ, 2013). A parede das artérias é composta de três camadas: túnica íntima (células endoteliais e membrana elástica interna), túnica média (células do músculo liso vascular e membrana elástica externa) e túnica externa ou adventícia, conforme representado pela figura 2.

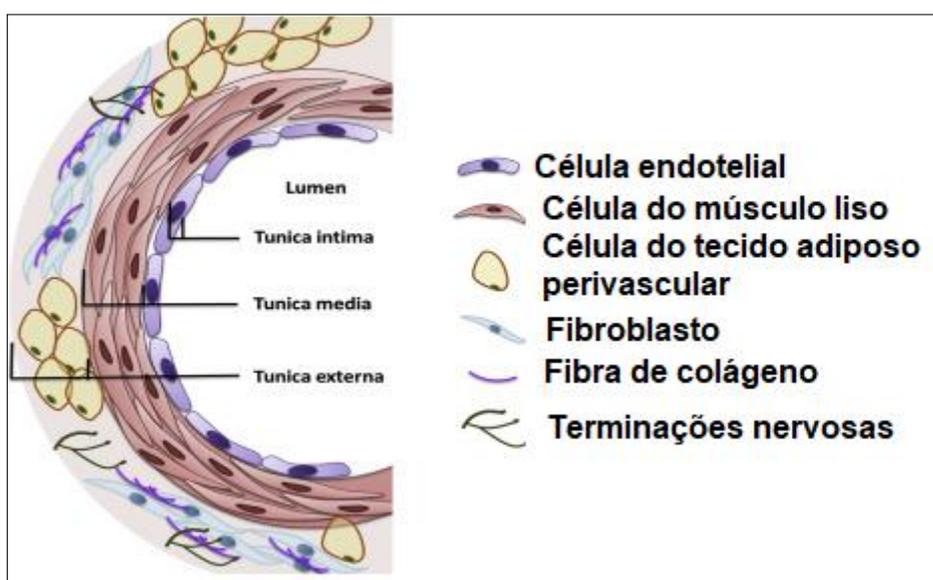


Figura 2 - Composição da parede vascular

Fonte: Adaptado de ZHAO, 2015.

O endotélio vascular é o mais complexo sensor biológico, integrado, capaz de detectar o menor sinal de inflamação/ativação da resposta imune ou agressão sistêmica, podendo processar a informação e responder de forma localizada ou global para corrigir a alteração e preservar o vaso sanguíneo (NASCIMENTO, 2003).

Fisiologicamente, o papel protetor do endotélio no vaso sanguíneo é uma resposta ao fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, que de maneira basal forma óxido nítrico mantendo o vaso num estado constante de vasodilatação

(CARVALHO, 2003). Ou seja, o endotélio regula o tônus vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas e sinais humorais ou estímulos químicos da corrente sanguínea e transmitindo os às células musculares lisas vasculares (BATLOUNI, 2001).

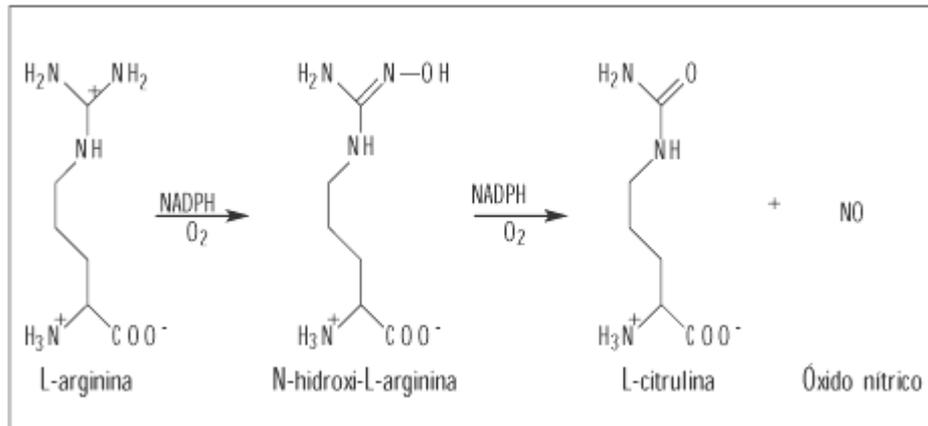
2.5.1 Função do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre liberado pelo endotélio imprescindível para a regulação da vasodilatação e pelo controle da pressão arterial em humanos (MIYAMOTO, 1998). É sintetizado por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), denominadas: induzível (iNOS), presente em vários tecidos e células como macrófagos, leucócitos, músculo liso, fígado e baço, independente de cálcio; neuronal (nNOS), que é a isoforma predominante no tecido neural e endotelial (eNOS), que é a forma predominante no endotélio, estas últimas dependentes de cálcio (CARVALHO, 2003).

O gene que sintetiza a eNOS localiza-se no cromossomo 7 (7q35-36), a sua liberação de NO nos vasos facilita a manutenção do tônus vasodilatador basal, inibe a agregação plaquetária e atenua a adesão de leucócitos ao endotélio, exercendo portanto potente efeito antiaterogênico e resistente à formação de trombos (CARVALHO, 2003; ZHANG, 2012).

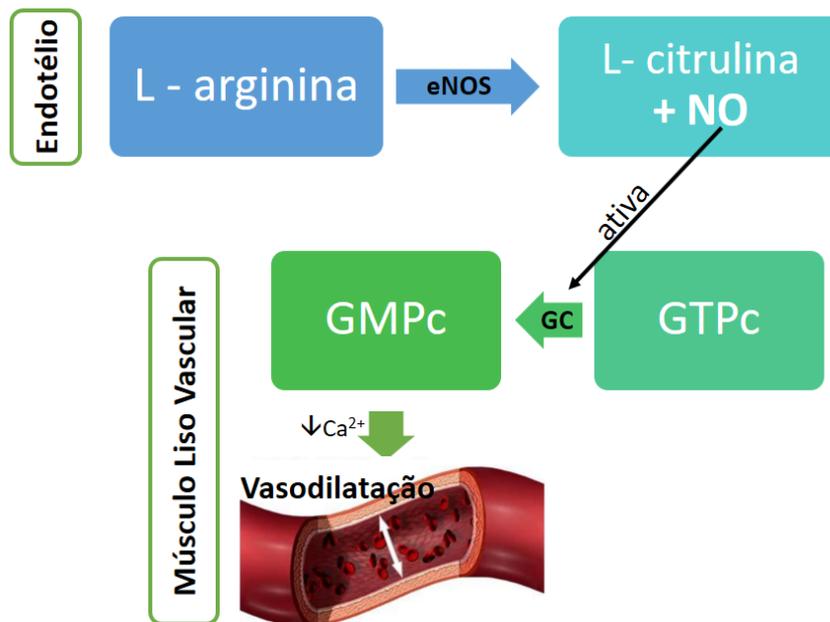
O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina via reação catalítica de desaminação em duas etapas (conforme demonstra a figura 2). A primeira é uma reação de hidroxilação, e na segunda etapa um elétron oxida a N-hidroxi-arginina, cujo subproduto NO formado tem como alvo a enzima guanilato ciclase solúvel, que sintetiza a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifosfato cíclica (GTPc). Essa reação subsequentemente, estimula proteínas quinases e fosforila proteínas como o inositol trifosfato (IP₃), diminui a concentração de Ca²⁺ e resulta na vasodilatação (Figura 4) (CARVALHO, 2003).

Figura 3 - Reação de formação do óxido nítrico catalisada pela NOS.



Fonte: Adaptado de Pratt, 2006.

Figura 4 - Ação do NO sobre o músculo liso



Fonte: A autora.

A síntese e liberação do NO também são estimuladas por alguns vasoconstritores como a angiotensina II, para que não haja vasoconstrição excessiva. Porém, caso aconteça um dano no endotélio devido à HAS crônica ou aterosclerose, o comprometimento da síntese do NO pode contribuir para a vasoconstrição excessiva e piora da HAS e do dano endotelial, que, se não tratados, podem eventualmente causar injúria e dano vascular em tecidos vulneráveis como

coração, rins e cérebro (HALL, 2011).

Considerando a síntese e a função do NO no endotélio, defeitos na função endotelial e produção de NO foram associados com aterosclerose, hipertensão, diabetes, obesidade (PETRELLA, 2014), sedentarismo, tabagismo, idade avançada, baixa biodisponibilidade de L-arginina e a presença de agentes infecciosos (BRESSLER, 2013). Evidências sugerem que alterações no metabolismo e nas funções regulatórias do endotélio estejam associadas à fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares. As manifestações clínicas dos distúrbios endoteliais incluem vasoespasmo, trombose intravascular, ruptura de placa aterosclerótica ou crescimento da íntima e desenvolvimento de estenose vascular. A disfunção endotelial associada a DCV pode ser considerada um problema biológico complexo e dependente de fatores causais, ambientais e genéticos (KRIEGER, 2003), dentre os últimos podemos citar polimorfismos genéticos, que serão discutidos no item 2.4 Biomarcadores e polimorfismos.

2.3 Metabolismo oxidativo e Epidemiologia da inflamação

2.3.1 Estresse Oxidativo

A maioria das doenças cardiovasculares envolvem desequilíbrio oxidativo e um componente genético. Sabe-se que a geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico no organismo, devido a atuação dos radicais como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos nas biomoléculas, o que ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de radicais e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes ocorre a instalação de um quadro nominado estresse oxidativo (HALLIWEL, 2001; BARBOSA, 2001).

O aumento dos radicais livres, principalmente de Espécies Reativas de

Oxigênio (ROS) é considerado um pré-fator para a obesidade, enquanto as citocinas geradas pela própria obesidade também estimulam a geração de ROS, criando um círculo vicioso de aumento de adipocinas inflamatórias e de estresse oxidativo, sendo que este pode ser um dos mecanismos pelo qual os negros apresentam maiores níveis de marcadores inflamatórios e maior risco cardiovascular (MAURER, 2015).

O próprio envelhecimento é considerado um estado sistêmico de estresse oxidativo, em que a biodisponibilidade das ROS é aumentada em relação às defesas antioxidantes, com elevação de marcadores de estresse oxidativo plasmáticos como 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdeído (MDA) e a glutationilação em resíduos de cisteína (DONATO, 2015). A presença de citocinas inflamatórias e das espécies reativas de oxigênio ativam enzimas antioxidantes como a NADPH oxidase, aumentando a produção de O_2 , que reage com o NO e ativa células imunes vizinhas.

A produção e liberação de ROS modula a atividade biológica do NO (NASCIMENTO, 2003). Embora a maioria dos efeitos do NO sejam benéficos, ele também está envolvido na produção de radicais citotóxicos; por exemplo, o NO pode reagir com o superóxido e formar o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio, os quais podem iniciar a peroxidação lipídica e potencializar a lesão inflamatória em células vasculares (CERQUEIRA, 2002).

2.3.2 Obesidade e inflamação

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal cuja prevalência também aumenta com a idade e é mais comum em pessoas de baixa renda (CHAMPE, 2006). Atualmente pode ser considerada um grande problema de saúde pública, uma vez que 30% da população mundial está com sobrepeso ou obesidade (REHO, 2017), sendo que em populações com maior grau de pobreza e menor nível educacional são vistas as maiores taxas (ABESO, 2016).

A obesidade é associada com o aumento da morbimortalidade cardiovascular devido a anormalidades como disfunção endotelial e calcificação da aorta, entre outros mecanismos fisiológicos demonstrados na figura 5 (REHO, 2017), maior morbidade secundária e aumento da resistência à insulina, diabetes, hipertensão e dislipidemias, condições que representam cerca de 8% do total de gastos em saúde pública no Brasil (ABESO, 2016). Além do risco aumentado de mortalidade, a obesidade é um fator de risco para outras situações crônicas como hipercolesterolemia, aumento de triacilgliceróis, alguns tipos de câncer, cálculos biliares, artrite e gota (CHAMPE, 2006).

Embora o tecido adiposo já tenha sido reconhecido como um tecido inerte apenas de armazenamento e acúmulo de ácidos graxos, o tecido adiposo tem sido tratado como elemento chave no metabolismo lipídico, glicêmico, e na produção de diversos hormônios e citocinas (ABRAHAM, 2017). Deste modo, o tecido adiposo é um órgão endócrino ativo que secreta, entre outros metabólitos, adipocitocinas, como a adiponectina.

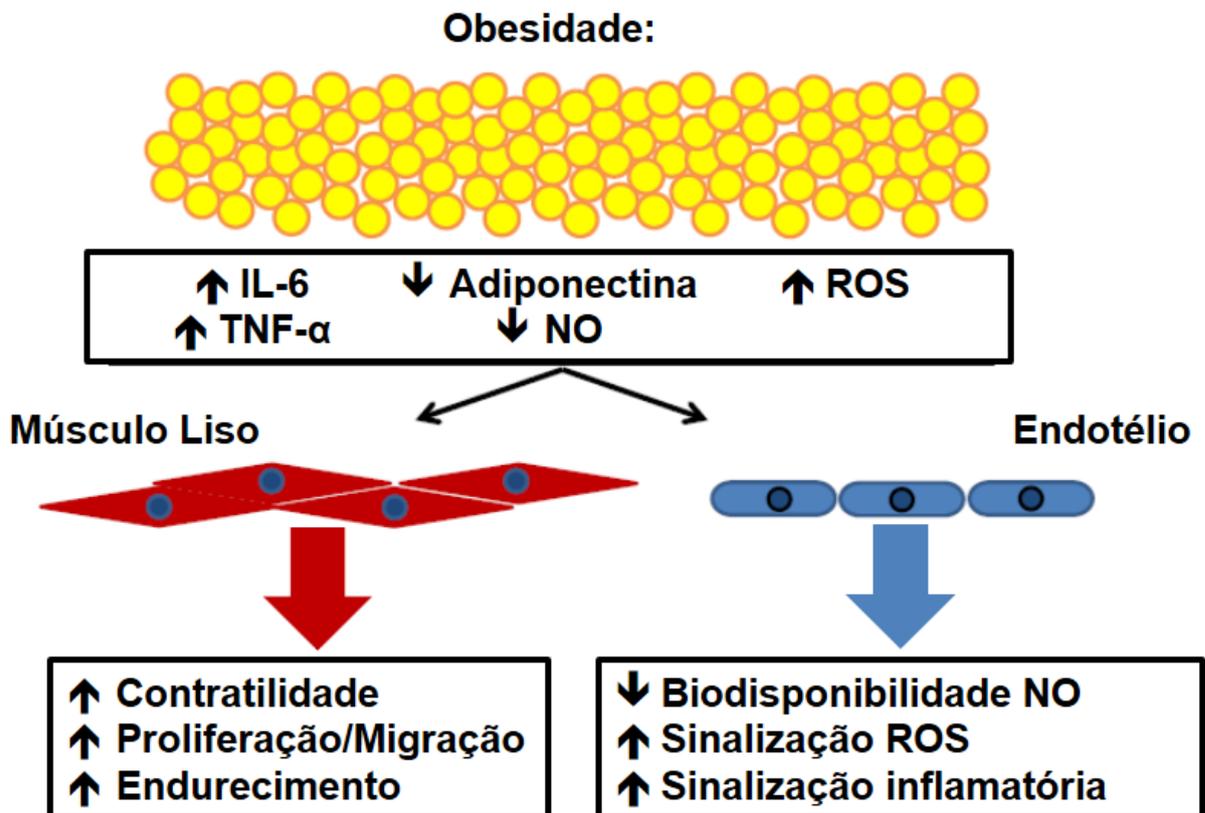
A adiponectina tem propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias, portanto, seus níveis se correlacionam inversamente com diversas doenças metabólicas como obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, diabetes tipo II e perfis lipídicos desfavoráveis (ABRAHAM, 2017). Embora o adipócito seja o maior produtor de adiponectina, outros órgãos como cardiomiócitos e o tecido muscular esquelético são sugeridos como fontes alternativas (YE, 2013).

Uma condição fortemente associada com a obesidade é a inflamatória, que está relacionada a grande infiltração de células mononucleadas nos depósitos adiposos (WELLEN, 2003). A liberação de mediadores químicos a partir dos tecidos lesados e de células migratórias desencadeia a inflamação (HOWLAND, 2007), que inclui um conjunto de alterações teciduais que inclui vasodilatação, aumento da permeabilidade dos capilares, migração de granulócitos e monócitos para os tecidos e dilatação das células teciduais (HALL, 2011). Dependendo do tipo de processo inflamatório, são liberados mediadores variados, como aminas (histamina e 5-hidroxitriptamina); lipídeos (prostaglandinas), pequenos peptídeos (bradicinina) e peptídeos maiores (interleucinas) (HOWLAND, 2007). Os macrófagos e leucócitos polimorfonucleares auxiliam na liberação de fatores solúveis de regulação da fase aguda denominados citocinas (ou interleucinas, IL), com destaque para a liberação

de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (SILVA, 2012).

A IL-1 e IL-6 são expressas em uma grande variedade de tecidos saudáveis e podem ter sua expressão aumentada em doenças autoimunes, câncer, doenças infecciosas, doenças renais, diabetes e doenças cardiovasculares (KHAZIM, 2018). Em condições fisiológicas, a homeostase vascular endotelial é mantida com ajuda dos monócitos da circulação, estes, porém, são ativados na obesidade, e contribuem para a cascata de sinalização aumentando a expressão das citocinas pró-inflamatórias e de ácidos graxos livres (REHO, 2017), rompendo assim a homeostase do vaso, causando a disfunção endotelial e a subsequente hipertensão (ENGIN, 2017).

Figura 5 - Obesidade e sinalização



Fonte: Adaptado de Reho, 2017.

No vaso sanguíneo a interação dos leucócitos com o endotélio constitui um processo dinâmico e, além disso, os leucócitos e as células teciduais lesadas liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas, criando estresse

oxidativo e produção de ROS e nitrogênio em excesso, promovendo o rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação e destruição de membranas e dano em DNA, que por sua vez, também estimula a produção de citocinas, fatores de crescimento e ativação de outras cascatas inflamatórias (SILVA, 2012).

Neste contexto complexo de inflamação e obesidade, são conhecidos diversos benefícios da perda de peso para redução das doenças cardiovasculares, inclusive, a perda de peso após cirurgia bariátrica foi capaz de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias e aumentar a biodisponibilidade do NO dentro do vaso, provavelmente através do sequestro de radicais livres e ROS e restauração da função vascular (AGHAMOHAMMADZADEH, 2013).

Outra condição clínica associada à hipertensão e à obesidade é a aterosclerose, na qual há o depósito de partículas de lipídios na íntima do vaso. O processo inicial da aterosclerose é a lesão do endotélio vascular, que envolve o aumento das moléculas de aderência, redução na capacidade de liberação do óxido nítrico e acúmulo de monócitos e lipídios no local da lesão. Com o aumento da lesão e a formação de placas cada vez maiores, temos o processo chamado de “endurecimento das artérias”, que pode resultar na oclusão ou rompimento do vaso, formação de coágulos ou trombos, levando ao bloqueio súbito de todo o fluxo sanguíneo para a artéria (LIBBY, 2012; SILVA, 2012).

2.4 Biomarcadores

Biomarcadores ou marcadores biológicos são parâmetros biológicos mensuráveis e quantificáveis que servem para avaliações relacionadas à saúde e/ou à fisiologia, como determinação de risco ou diagnóstico de doenças, abuso de substâncias, gravidez, exposição ambiental, estudos epidemiológicos, dentre outros. O termo foi introduzido como palavra chave do MeSH em 1989, e, sabendo que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, o estudo de novos marcadores tem sido muito utilizado na clínica como ferramenta para

identificar pacientes vulneráveis e em risco para doenças cardiovasculares (VASAN, 2006).

Os biomarcadores podem indicar diversas características tanto de saúde quanto de doença, como o nível ou tipo de exposição a um fator ambiental, a suscetibilidade genética, marcadores de doença subclínica e ainda indicadores da resposta terapêutica (VASAN, 2006). Biomarcadores genéticos são variações no código de DNA que sozinhos ou em conjunto estão associados com a suscetibilidade à doenças, expressão da doença, evolução e resposta a terapia (VASAN, 2006). Estudos genéticos na área de biomarcadores envolvem alterações como polimorfismos de base única, (do inglês single nucleotide polymorphism; SNP) abordagens de haplótipos associados com doenças, ou ainda os Estudos de Associação Pan-genômica (Genome wide association; GWAS), que são estudos observacionais de um conjunto de variantes genéticas do genoma humano e a associação entre os SNPs com as doenças humanas (LIBBY, 2009).

Polimorfismos são variações genéticas encontradas com frequência superior a 1% da população, quando essas variações ocorrem com a substituição de uma única base nitrogenada do DNA são chamadas de SNP (KWOK, 2003). Enquanto a maioria dos SNPs não tem consequências biológicas, algumas substituições tem significado funcional e são a base da diversidade encontrada entre os seres humanos (KWOK, 2003).

Houve um considerável avanço nas técnicas de genotipagem devido a progressos na genética e genômica, resultando no aumento do interesse em possíveis marcadores genéticos de risco cardiovascular que possam abrir novas perspectivas na medicina personalizada. Ferramentas de biologia molecular são aplicadas para investigar a organização hierárquica da informação biológica: desde o gene em si, o RNA mensageiro (RNAm), a proteína codificada pelo RNAm, células, organismos e populações diversas (CURRIE, 2017, VASAN 2006). Existem diversas técnicas utilizadas na pesquisa de biomarcadores, e um resumo delas com os objetivos é apresentado na tabela abaixo.

Tabela 3 - Técnicas disponíveis para o desenvolvimento de biomarcadores.

Tecnologia	Metodologia	Objetivo	Material
Genômica	Genotipagem SNP	Identificar genes de suscetibilidade à doenças	Células nucleadas
	Clonagem posicional/microsatélites	Mapeamento/sequenciamento de locus	
	Análise da Expressão	Identificação de expressão diferencial de genes e vias de sinalização	
Proteômica	2DGE, MS, CL-MS, CG-MS, MS-MS,	Identificação de proteínas de baixa abundância, localização subcelular, modificação pós-traducional, interações	Líquidos e tecidos biológicos
Metabolômica	Espectrometria RMN, MS, espectrometria IV	Identificação e caracterização de pequenas moléculas	
Farmacogenética	Genotipagem SNP	Relacionar a composição genética com a resposta aos fármacos	Células nucleadas

Legenda: CG-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa; CL-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa; MS: espectrometria de massa; MS-MS: espectrometria de massa em tandem; IV: infravermelho RMN: espectrometria por ressonância magnética nuclear; 2DGE: eletroforese em gel bidimensional.

Fonte: Adaptada de Vasan, 2006.

O estudo da influência de variações genéticas na resposta a fármacos pode ser uma abordagem efetiva para a seleção da terapia anti-hipertensiva adequada para um indivíduo, baseada no seu perfil genético (SALVI, 2018), porém, apesar dos benefícios claros para o paciente, ainda está longe de a farmacogenética fazer parte da prática clínica de rotina (BRITO, 2015).

2.4.1 Genes candidatos

Diversos genes tem sido estudados quanto a associações com a hipertensão em negros: genes relacionados ao controle renal e variações no canal de sódio epitelial (ENaC) (JONES, 2017), variações no CYP11B2, associados ao aldosteronismo e hipertensão com baixa renina em negros (JONES, 2017); varreduras com SNPs candidatos, que identificaram o rs3918226 na região promotora da Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS ou NOS3) como possível causa da hipertensão essencial (SALVI, 2012).

Duas regiões reguladoras nos cromossomos 6 e 14 foram potencialmente ligadas a função cardiovascular e renal, sendo que o gene 3-beta-hidroxi-delta-5-esteróide desidrogenase (HSD3B1) influencia na biossíntese de aldosterona renal (SALVI, 2017); e alterações em um gene da família de transportadores de solutos, o SLC4A5 (Família de transportadores de soluto 4, cotransportador de bicarbonato de sódio, membro 5), no cromossomo 2, podem estar envolvidas na regulação do pH intracelular e aumentar a pressão arterial em populações afro-americanas (TAYLOR, 2017).

2.4.2 Polimorfismo genético Glu298Asp

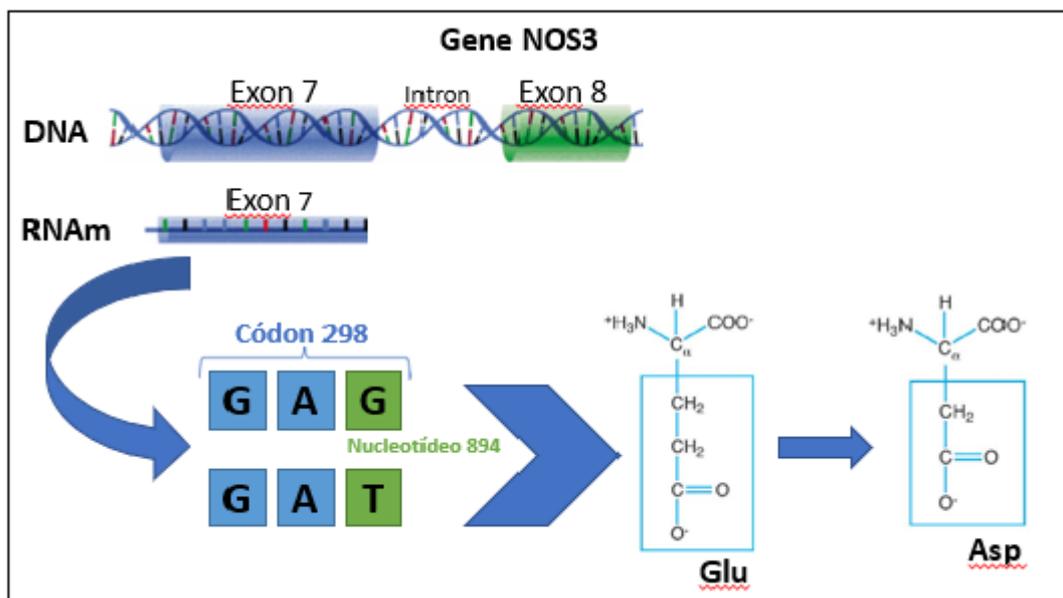
Sugere-se que alterações genéticas no gene da eNOS estejam envolvidas na patogênese da hipertensão (MIYAMOTO, 1998). Em 2015, mais de 1500 variações no gene NOS3 humano eram relatadas no banco de dados SNP (OLIVEIRA-PAULA, 2016), enquanto que em 2019, o número descrito de variações na sequência deste gene é de mais de 7300, dentre variações de perda, inversão ou deleção de bases (GENECARDS - HUMAN GENE DATABASE).

Entre as variações descritas, o polimorfismo escolhido é do tipo SNP, o que significa que apenas um nucleotídeo é substituído, no gene NOS 3 do cromossomo 7, também conhecido como eNOS. Neste polimorfismo, ocorre a substituição de uma

guanina por uma timina (G→T), no éxon 7, nucleotídeo 894. Essa troca de sequência, de GAG para GAT no códon 298, resulta na troca do aminoácido formado, de ácido glutâmico (Glu) para ácido aspártico (Asp), conforme a figura 6. Por esse motivo, esse polimorfismo é denominado como: Glu298Asp, G⁸⁹⁴T, +894G>T e/ou rs1799983. Assim, existem dois alelos G (guanina) e T (timina) que resultam em três possíveis genótipos: homocigotos GG (selvagem ou “normal”), TT (mutado) e o heterocigoto TG (OLIVEIRA-PAULA, 2016).

Ambos os aminoácidos que podem ser formados são aminoácidos alifáticos mono-amino-carboxílicos, de carga negativa, e não essenciais. Eles são relacionados com a estabilidade enzimática da eNOS e sua atividade enzimática, sendo que esta mutação pontual poderia potencialmente alterar as interações proteína-proteína em virtude da sua localização na superfície externa do dímero.

Figura 6 – Localização do polimorfismo Glu298Asp no gene NOS3.



Fonte: A autora.

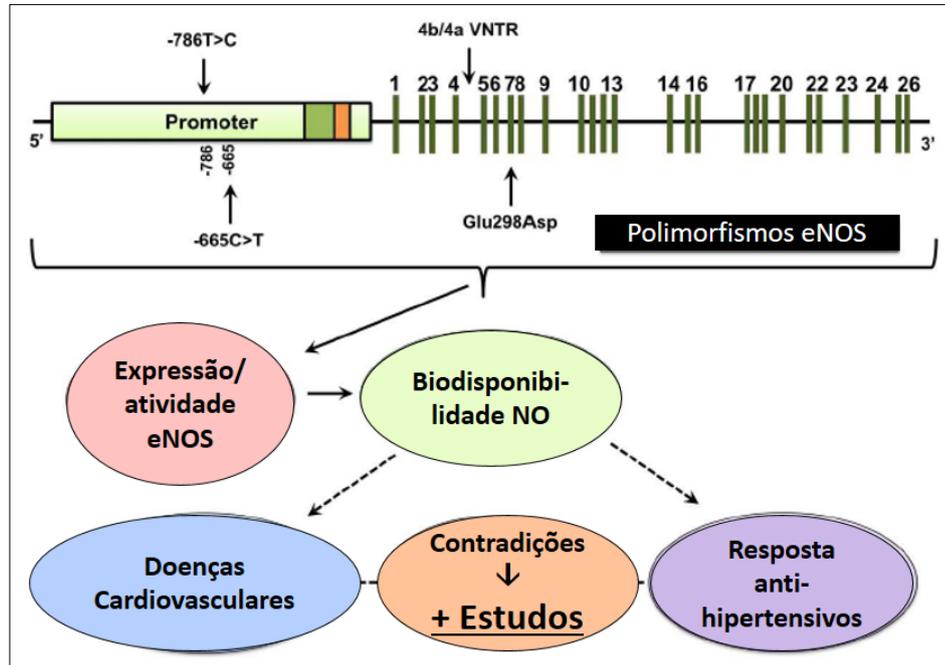
Outro polimorfismo da eNOS em uma região diferente do gene é o -786T>C, que envolve a substituição de uma timina para citosina no locus 786, o que reduz a atividade promotora do gene eNOS, diminuindo a produção de NO e levando a disfunção endotelial (PICCOLI, 2014). Ainda, na avaliação conjunta do -786T>C, Glu298Asp com o 4a/b VNTR sugere-se que estes polimorfismos hajam como fatores de risco adicionais para o desenvolvimento de doença arterial coronariana (PICCOLI, 2012).

Em estudos prévios realizados no Brasil, os autores buscaram identificar se existem diferenças na distribuição das variantes genéticas da eNOS entre brancos e negros que poderiam explicar as disparidades no risco cardiovascular e resposta a fármacos (MARRONI, 2005), e mais recentemente, sobre os mecanismos bioquímicos básicos da regulação da eNOS e o impacto clínico e farmacogenético dos polimorfismos neste gene nas doenças cardiovasculares (OLIVEIRA-PAULA, 2017).

Na análise de haplótipos de 3 polimorfismos do gene da eNOS, entre eles o Glu298Asp, foi encontrada associação dos alelos variantes com hipertensão em crianças e adolescentes obesas (SOUZA-COSTA, 2011), e de outro haplótipo com menores concentrações de nitrito no plasma, utilizado como estimativa de formação do NO endógeno, sendo que baixas concentrações de nitrito indicam disfunção endotelial e correlação com fatores de risco cardiovascular (METZGER, 2011).

Uma vez que o polimorfismo Glu298Asp afeta a liberação do óxido nítrico e consequente vasodilatação do endotélio, uma questão em aberto é se este polimorfismo poderia interferir na resposta inflamatória e na obesidade relacionada à hipertensão. Ainda, considerando a morbimortalidade decorrente das doenças cardiovasculares e sua prevalência em negros, até o momento não há estudos *in vitro* com células provenientes desta população na tentativa de melhor caracterizar as citocinas envolvidas, os efeitos prejudiciais da inflamação, mecanismos pró-oxidantes e a hipertensão como os principais fatores envolvidos na mortalidade cardiovascular em negros. Ou seja, ainda existem algumas inconsistências sobre o papel deste polimorfismo na população negra, conforme ilustrado na figura 7.

Figura 7 - Polimorfismos da eNOS



Fonte: Adaptado de Oliveira-Paula, 2017

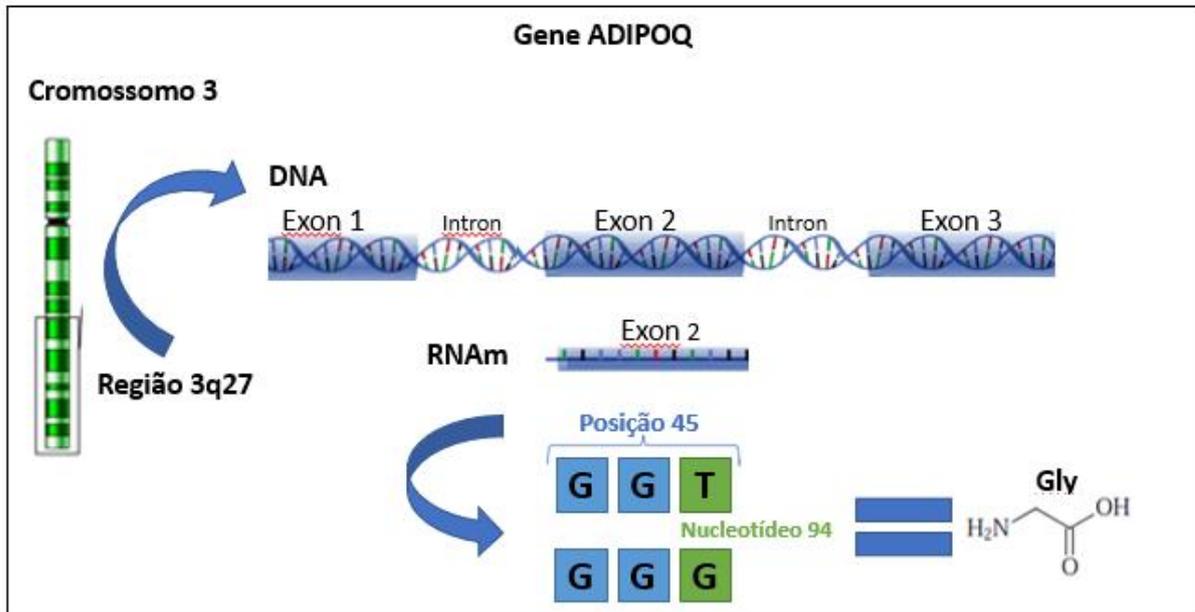
2.4.3 Polimorfismo ADIPOQ

A adiponectina é codificada pelo gene ADIPOQ, localizado no cromossomo 3q27. ADIPOQ abrange 16 kb e contém três exons. Variações genéticas no gene ADIPOQ podem levar a alterações na expressão gênica ou mudanças na estrutura da proteína ADIPOQ, que pode subsequentemente afetar as funções biológicas da ADIPOQ e estar relacionada às doenças metabólicas citadas anteriormente (ZHANG, 2019, JHUO, 2019).

Há pelo menos 22 SNPs estudados neste gene, localizados tanto no início da região promotora do gene, quando nos éxons e íntrons, como o rs864265, rs13085499, rs2241766 e rs1501299, dentre os quais, escolhemos o rs2241766, que é um polimorfismo localizado no éxon 2, nomeado como +45T>G, +45T/G ou T94G, caracterizado pela troca silenciosa de T por G no nucleotídeo 94, que não resulta em

mudança de aminoácido (STUMVOLL, 2002), conforme apresentado na figura 8 abaixo.

Figura 8 - Localização do SNP +45T>G no gene ADIPOQ



Fonte: A autora.

Porém, mesmo sem alterar o aminoácido formado, há um desequilíbrio na expressão do RNAm, provavelmente sendo a causa de hipoadiponectinemia e maior incidência de obesidade (JHUO, 2019). Além disso, já foi relatada relação deste SNP na regulação do sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), importante principalmente na hipertensão arterial e até na resposta ao tratamento anti-hipertensivo (FONTANA, 2014a).

Considerando o exposto, a hipótese do estudo é a de que estes dois polimorfismos, importantes tanto para a adequada função endotelial de vasodilatação e controle da PA, quanto para o controle dos níveis circulantes da adiponectina possam influenciar nas respostas fisiológicas em negros em relação principalmente a hipertensão e em um estado de sub-inflamação crônica, podendo ser preditores de riscos nessa população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de dois polimorfismos em diferentes genes (Glu298Asp do gene eNOS e +45T>G do gene ADIPOQ) e sua associação com doença hipertensiva e inflamação em negros.

3.2 Objetivos Específicos

- Genotipar o SNP Glu298Asp do gene eNOS em indivíduos negros;
- Genotipar o SNP +45T>G do gene ADIPOQ em indivíduos negros;
- Calcular frequências alélicas e genotípicas de ambos os polimorfismos;
- Selecionar diferentes genótipos para a cultura de células;
- Classificar os indivíduos de acordo com o controle da hipertensão arterial;
- Verificar a prevalência de hipertensão resistente;
- Verificar a prevalência de obesidade;
- Identificar a presença de fatores de risco cardiovascular;

Em cultura de leucócitos com ou sem exposição à fitohemaglutinina, analisar a ocorrência da resposta diferencial de:

- Indicadores bioquímicos do metabolismo oxidativo e inflamatório;
- Expressão de genes inflamatórios.

CAPÍTULO II

4 ARTIGO I

Título: POLYMORPHISM eNOS GLU298ASP MODULATES THE INFLAMMATORY RESPONSE OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Publicado no periódico Cytokines, ISSN: 1043-4666.

Identificação e disponibilidade: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154812>

Cytokine 125 (2020) 154812



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



Polymorphism eNOS Glu298Asp modulates the inflammatory response of human peripheral blood mononuclear cells



Patrícia Maurer^a, Fernanda Barbisan^b, Veronica Farina Azzolin^b, Lyana Feijoo Berro^a, Renata Montagner^c, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^b, Vanusa Manfredini^a, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{a,*}

^a Postgraduate Program of Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguiana, RS, Brazil

^b Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Postgraduate Program of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguiana, RS, Brazil

^d Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Polymorphism eNOS Glu298Asp modulates the inflammatory response of human peripheral blood mononuclear cells

Patrícia Maurer^a, Fernanda Barbisan^b, Veronica Farina Azzolin^b, Lyana Feijoo Berro^a, Renata Montagner^c, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^b, Vanusa Manfredini^a, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{a,*}

^a Postgraduate Program of Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

^b Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Postgraduate Program of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

^d Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

eNOS
Afrodescendant
Negroid race
Inflammation

ABSTRACT

Introduction: Nitric oxide is a gaseous radical produced by the nitric oxide endothelial synthase (eNOS) whose most studied physiological action is the vasodilation. However, it also acts in the defense of the organism through the formation of cytotoxic radicals, which can potentiate the inflammatory lesion of the cells. The Glu298Asp is a single nucleotide polymorphism (SNP) in the eNOS gene related to the risk of cardiovascular disease. Blacks present a higher prevalence of hypertension and cardiovascular mortality. Then, we aimed to evaluate the influence of Glu298Asp polymorphism on inflammatory response in vitro and gene expression in blacks.

Material and methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from blacks with different Glu298Asp genotypes were treated with phytohemagglutinin (PHA), a mitogen and activator of T cells. Oxidative, inflammatory markers, and expression of inflammation genes were evaluated.

Results: The genotype frequencies were TT 6.7%; TG 29.3% and GG 64.0%. Activation of PBMCs with 125 µg of PHA modulated the expression of inflammatory genes and increased levels of inflammatory cytokines. The T allele showed increased susceptibility to inflammation (higher levels of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha; $p < 0.001$). The G allele exhibited protection through higher levels of nitric oxide ($p < 0.001$) and fewer inflammatory cytokines.

Conclusion: Despite methodological limitations related to in vitro assays, the whole of results suggested that Glu298Asp modulates inflammatory genes, the T allele is more susceptible to inflammation and the G allele is protective.

1. Introduction

The nitric oxide (NO) has an important role in cardiovascular homeostasis, promoting vasodilation, inhibiting platelet aggregation and proliferation of vascular smooth muscle cells [1]. In the endothelial cells, NO is produced mainly by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and polymorphisms in the eNOS gene are related to the release and efficiency of NO. Interethnic differences in the distribution of eNOS genotypes and haplotypes have been consistently described in different populations that have already been reported [2].

The Glu298Asp is a single-nucleotide polymorphism at exon 7 (rs1799983), corresponds to a substitution of glutamate to aspartate at

amino acid position 298 and has been highly related to the risk of cardiovascular disease [3]. This nucleotide substitution affects the efficiency of nitric oxide formation, and it is known that higher levels of nitrite/nitrate (NOx) metabolites are associated with a lower risk of hypertension [4].

Although most of the effects of NO are beneficial, it is also involved in the production of cytotoxic radicals; for example, NO can react with superoxide and form the peroxynitrite anion and nitrogen dioxide, which can initiate lipid peroxidation and potentiate the inflammatory lesion in vascular cells [5,6].

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are widely used in in vitro experiments to evaluate the effects of drugs, plants and

* Corresponding author at: BR 472, KM 592, P.O. BOX 118, Uruguaiana, RS 97508-000, Brazil.

E-mail address: jacquelinepiccoli@unipampa.edu.br (J.d.C.E. Piccoli).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154812>

Received 17 November 2018; Received in revised form 20 March 2019; Accepted 12 August 2019
1043-4666/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

foods. After isolating peripheral blood, this cell fraction contains lymphocytes (T cells, B cells, and NK cells), monocytes, and dendritic cells at different frequencies. Effects of the immune system and the inflammatory response are generally evaluated in PBMC after activation with mitogenic lectins such as phytohemagglutinin (PHA) [7] and concanavalin A (with A) that mainly induces T cell proliferation, and lipopolysaccharide (LPS) which induces B cell proliferation and activation of monocytes [8,9]. However, to our knowledge, there are no studies with black people demonstrating the effect of polymorphism in the eNOS gene and the inflammatory response, as well as changes in anti-inflammatory and antihypertensive treatment. In this way, the present study aimed to verify if the Glu298Asp affects the inflammatory and oxidative response in vitro in blacks.

2 Materials and methods

2.1. Study population

This study was approved by the National Ethics Committee in Research, Brazil, and all volunteers signed informed consent and agreed to donate blood samples to perform in vitro assays (process number: 977.827), according to the Code of Ethics of the World Medical Association of Helsinki. The sample size was calculated and the selection of participants was described by Maurer et al. [10].

Two hundred and two ($n = 202$) self-declared blacks (i.e. blacks and browns) participated in the initial study. The baseline characteristics, previous diseases, lifestyle indicators, and socio-demographic characteristics of this population were described in a previous study [10] and although not the focus of the present study, we presented the baseline characteristics of the black population studied and the most prevalent previous diseases in the supplemental file.

The baseline characteristics of the studied population indicate a population with increased levels of waist circumference and obesity grade I according to the body mass index (data in the supplementary material). However, for cell culture, we selected healthy individuals, as described in Section 2.4 *General in vitro design and cell culture conditions*. Exclusion criteria were inability to communicate (visual or auditory deficient), presence of hemoglobinopathies or refusal to participate in any stage of the research.

2.2. Chemical reagents and equipment

To perform the experiments in vitro, all chemicals and solvents in this study were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). Materials used in cell cultures as purchased from Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, California, USA).

Molecular biology reagents were obtained from the companies Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), Invitrogen (Carlsbad, California, USA) and Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, USA). The protocols involving spectrophotometric analysis were performed in a 96-microplate reader (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices- Sunnyvale, California, USA).

2.3. DNA extraction and genotyping

Total DNA was extracted by means of the QIAamp DNA Minikit, according to manufacturer's instruction. DNA samples were quantified in Qubit 3.0 fluorimeter with Qubit® dsDNA HS Assay Kit and stored at -20°C until they were analyzed. The Glu298Asp SNP was genotyped by TaqMan q-PCR using the pre-designed assay ID C_3219460_20 for allelic discrimination, containing specific probes for each allele marked with VIC and FAM fluorescent dyes (Applied Biosystems, Foster City, USA). The q-PCR was performed in a Step One System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following program: a start

cycle of 2 min at 50°C , one cycle of 10 min at 95°C , and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . The fluorescence signals were analyzed using the program CloudSuite (ThermoFisher®) that generates clusters of signal amplification which allow the identification of each genotype. Samples which had their genotypes previously known were used as positive controls, two per genotype.

2.4. General in vitro design and cell culture conditions

To obtain cells with different Glu298Asp genotypes, a sub-group of 6–8 subjects per genotype with the Glu298Asp genotype were invited to donate blood again in order to perform cell culture and in vitro assays. The chosen volunteers had similar health, healthy, without diagnosis of chronic diseases, no drugs for continuous use, non-smoking or alcoholics and had similar nutritional conditions (normal weight according to the body mass index). At the time of blood collection, we certified that the volunteers did not present any acute inflammatory conditions and was in 12 h fasting to minimize dietary influence on peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

15 mL blood samples were obtained by venipuncture in tubes with anticoagulant, transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:2) and centrifuged for 20 min at 2000 rpm. The PBMC were cultured in RPMI 1640 culture medium with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 24 h.

After cell attachment, the cultures were divided in two wells: PHA-activated PBMC with phytohemagglutinin (PHA) ($125\ \mu\text{g}/\text{mL}$) and the other without induction of inflammation, according to the Fig. 1. The concentration of choice was $125\ \mu\text{g}/\text{mL}$ since other studies [11] have already shown that it is not a toxic concentration to PBMCs, but able to inflammatory activation. The concentration of cells used was 1×10^5 cel/mL. The cultures were maintained in the culture media for 72 h, according to other previous studies [12,13] with similar objectives and cell culture, and then we determined the levels of the following cytokines involved in inflammation pathways: interleukin 1β (IL- 1β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 10 (IL-10). The protocols used are described below.

2.5. mRNA expression analysis by qRT-PCR assay

The expression levels of five genes were measured by qRT-PCR assay in PHA-activated PBMC from carriers of different Glu298Asp genotypes. Total RNA was extracted using Trizol, following manufacturer's instructions (Ludwig-Biotec, Brazil), and the quantity and purity was analyzed using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del., USA). A ratio of $A_{260}/_{280}$ of 1.9–2.1 signified a pure RNA sample.

For realizing the reverse transcription, the samples of RNA ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$) were added to $0.2\ \mu\text{L}$ of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 min, followed by heating at 65°C for 10 min. The cDNA was generated with $1\ \mu\text{L}$ of Iscript cDNA and $4\ \mu\text{L}$ of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The reaction consisted of the following steps: heating at 25°C for 5 min, at 42°C for 30 min, and at 85°C for 5 min, followed by incubation at 5°C for 60 min. Real time PCR was performed as previously described by Barbisan et al. [14] using a QuantiFast SYBR® Green PCR Kit in a real time machine Rotor Gene®. The concentration of the cDNA used was $1000\ \mu\text{g}$. The primers [15] for each gene were used at the concentration of $0.5\ \text{mM}$ each primer and are described in Table 1, as well as the information of the genes. The relative expression was calculated using the comparative CT and was expressed as the fold expression compared to the control group without phytohemagglutinin. Gene expression was normalized by β -actin (ACTB) housekeeping gene. Values lower than 1 indicates gene downregulation, values higher than 1 indicate up-regulation gene expression, when compared with control group. The

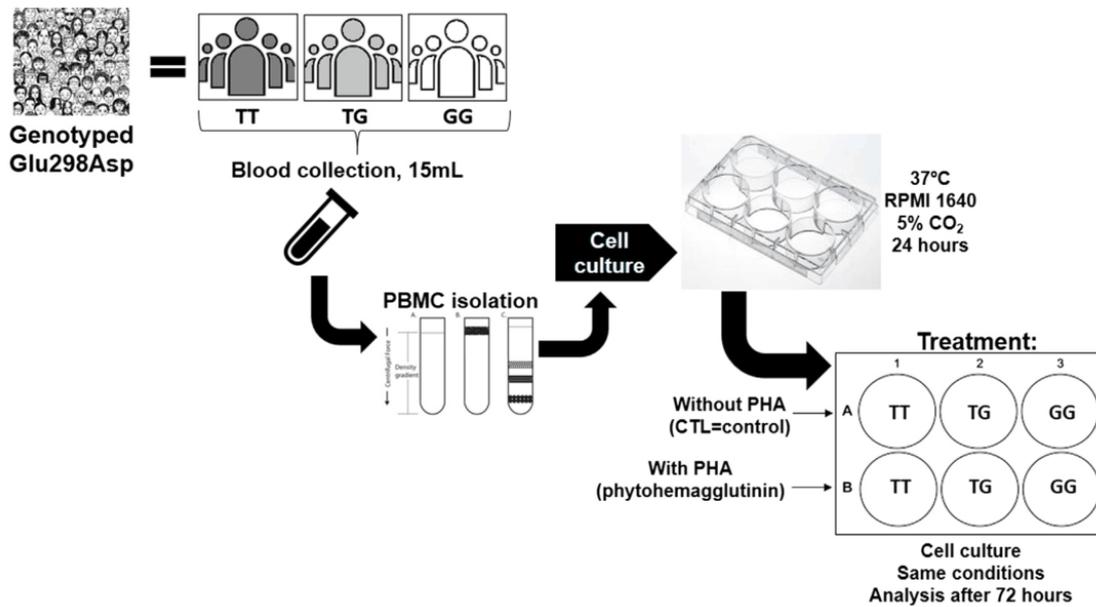


Fig. 1. Experimental design.

specific primer pairs used in this study are in the table below [15] and were designed in Primer Express software v3.3 (Applied Biosystems) based on sequences available in GeneBank and synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies).

2.6. Oxidative markers

The ROS levels were determined by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCF-DA). In this technique, the fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm, and the results were expressed as picomoles/mL of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) production from 2',7'-dichlorofluorescein in reaction with ROS molecules present in the samples [16].

Lipoperoxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measured by spectrophotometry at 532 nm [17]. The Levine method was used to quantify protein carbonylation levels, read at 370 nm [18].

NO levels were measured indirectly by modified Griess method, which detects nitrite/nitrate with read at 550 nm [19]. DNA damage was determined by 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) using an ELISA immunoassay kit obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. All levels of these variables were corrected by mg/protein.

2.7. Quantification of cytokines

Inflammatory cytokines as interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (γ) and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) were quantified using kit immune assays from a Quantikine Elisa kit obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), which is able to quantify cytokines in cell culture supernatants. The assays were performed according to the manufacturer's instructions. The sensitivity and detection range of each cytokine were respectively: IL-1 (1 pg/mL, 3.1–300 pg/mL); IL-6 (0.7 pg/mL, 3.1–300 pg/mL); TNF α (5.5 pg/mL, 15.6–1,000 pg/mL); IFN γ (8 pg/mL, 15.6–1,000 pg/mL and IL-10 (3.9 pg/mL, 7.8–500 pg/mL).

2.8. Statistical analysis

All analyses were carried out using the Graph Pad Prism 5 software, and the results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). As variance of results could be produced from individual variation or experimental errors, all evaluations were performed using an aliquot sample obtained from cultures from each volunteer with a similar Glu298Asp genotype. We used chi-squared test to test genetic distributions for Hardy-Weinberg equilibrium. One-way analysis of variance or repeated-measures analysis of variance followed by Tukey's post hoc test were used to perform univariate analysis without

Table 1
List of primers used and gene information.

Gene and ID Gene	NCBI reference sequence	Location	Exon	Size (pb)	Primers
ACTB 60	NM_0011101.5	7p22.1	6	1812	F: TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA R: TGCGCAAGTTAGGTTTGTCA
IL-1 3553	NM_000576.2	2q14.1	7	1498	F: GCGGCATCCAGCTACGAAT R: ACCAGCATCTCCTCAGCTTGT
IL-6 3569	NM_000600.5	7p15.3	6	1127	F: TACCCCCAGGAGAAGATTCCA R: CCGTCGAGGATGTACCGAATT
IL-10 3586	NM_000572.3	1q32.1	5	1630	F: GTGATGCCCAAGCTGAGA R: TGCTCTGTTTTCACAGGGAAGA
IFNG 3458	NM_00619.3	12q15	4	1211	F: GACTCCATCTTGGCTGTGA R: TGATTCTGCTCTGACAACCT
TNFA 7124	NM_000594.4	6p21.33	4	1678	F: CCGAGGCAGTCAGATCATCTT R: AGTGCCCCCTCAGCTTGA

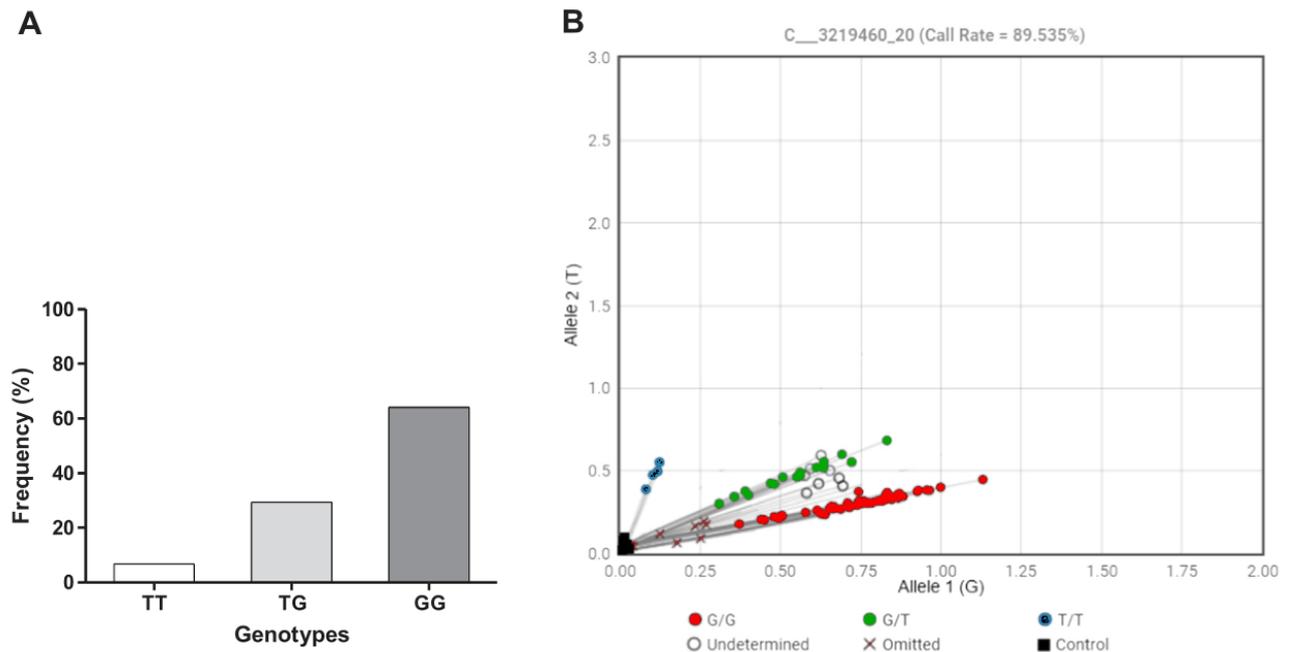


Fig. 2. eNOS Glu298Asp genotyping. (A) Frequency distribution of TT, TG and GG genotypes in the 202 self-declared blacks subjects. B: Allelic discrimination plot.

considering Glu298Asp polymorphism. The effect of Glu298Asp on inflammatory response was determined by two-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni test. The alpha value was set to < 0.05 to determine statistical relevance.

3 Results and discussion

The genotypic frequency of this black population was TT 6.7%; TG 29.3% and GG 64.0% and were in Hardy-Weinberg equilibrium [20] ($\chi^2 = 3.84$, $p > 0.05$). The Fig. 2 shows the graph of frequencies of the genotypes (2A) and the result of the q-PCR assay as discrimination plot (2B) in the CloudSuite Genotyping (Thermo Fisher®). The allele frequencies were 0.21 and 0.79 (alleles T and G, respectively).

As described by Piccoli et al. [21], in this polymorphism the frequency of the G allele is usually greater than the T allele (0.38 T and 0.62 G and in our work 0.21 T and 0.79 G).

Healthy individuals were selected for the in vitro assays with PBMCs. The modulation of oxidative metabolism in PBMCs PHA-activated by 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or without PHA was determined and the primary results are presented in Fig. 3. Cells treated with 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PHA with at least one G allele showed a decrease in carbonylation of proteins, and there were no differences in lipoperoxidation. The inflammation caused by PHA did not increase the damage to proteins and lipids, since there was a decrease in the carbonylation of proteins in the treatment with PHA.

PHA is a high molecular weight lectin that has affinity for complex oligosaccharides and binds with many carbohydrates [7], suggesting that in the GG genotype there was PHA binding with protein and the G allele has been protector, decreasing protein damage, but without exerting the same effect on the DNA. The proliferation triggered by PHA stimuli caused DNA damage in all genotypes, as demonstrated by 8-Hydroxydeoxyguanosine. Although in the generation of ROS there was no difference between the genotypes, the genotype GG showed a lower ROS even before treatment.

Modulation of cytokine levels were also investigated (Fig. 4). As expected, cells treated with PHA had higher levels of the pro-inflammatory cytokines as IL-1 β and IL-6 (Fig. 4A and B). However, TNF- α was higher only in the TT and GG homozygotes (Fig. 4D). The increase of these cytokines is explained since the PHA causes a non-

specific stimulus that activates the lymphocytes in a polyclonal way, that is, regardless of their specificity [22].

There was also a decrease in cytokine IL-10 but an increase in IFN- γ in all genotypes (Fig. 4C and E). On the other hand, in another study PBMCs treated with PHA and lavender oil showed a decrease in IFN- γ levels in a dose-dependent manner [23]. IFN- γ is a protein produced by CD4 + Th1 helper T cells and by almost all CD8 + cells, it regulates of immune and inflammatory responses and has anti-tumor effect [24]. Thus, it makes sense that PHA-stimulated cells responded with increased IFN levels in all genotypes, although in the T-genotype to a lesser degree, as seen by the p-value. In addition, Natural killer (NK) cells, lymphocytes of innate immunity, release the IFN- γ , which activates macrophages. Secretion of IL-12 by the macrophage and secretion of IFN γ by the NK cell creates a positive feedback system that enhances the activation of both cell types in infected tissue [24,25].

IL-10 is a pleiotropic cytokine produced by multiple cell types including innate immune cells, monocytes, B cells, Th1, and Th2 cells, CD4 + CD25 + FOXP3+ Treg cells, and keratinocytes [26]. IL-10 inhibits the activation of macrophages, on the other hand, IL-6 is released by macrophages, T cells and endothelial cells that together with IL-1 and TNF- α induces several inflammatory responses in the early stages of an infection [25,27]. It has been demonstrated that IL-6 plays an important role in the stimulation of immune response, promotion of endothelial dysfunction and also in the reduction of NO bioavailability [28] and high levels of this cytokine are associated with cardiovascular disease, atherosclerosis and hypertension [29]. Conversely, another polymorphism of eNOS, -786 T > C has been associated with cardiovascular diseases and the -786CC genotype has been associated with lower levels of circulating IL-6, suggesting interaction between this variant and the inflammatory process [30].

As the inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- α) were increased mainly in the TT genotype, this may explain that people with the T allele present chronic inflammation and/or do not respond to anti-inflammatory treatments or present inflammation and obesity. TNF- α released by macrophages and T cells causes activation of vascular endothelium, the production of platelet-activating factor (PAF) by endothelial cells, inducing coagulation and blocking of local blood vessels. If there was systemic release, rather than the stimulation of adaptive immunity would induce a state of sepsis [25].

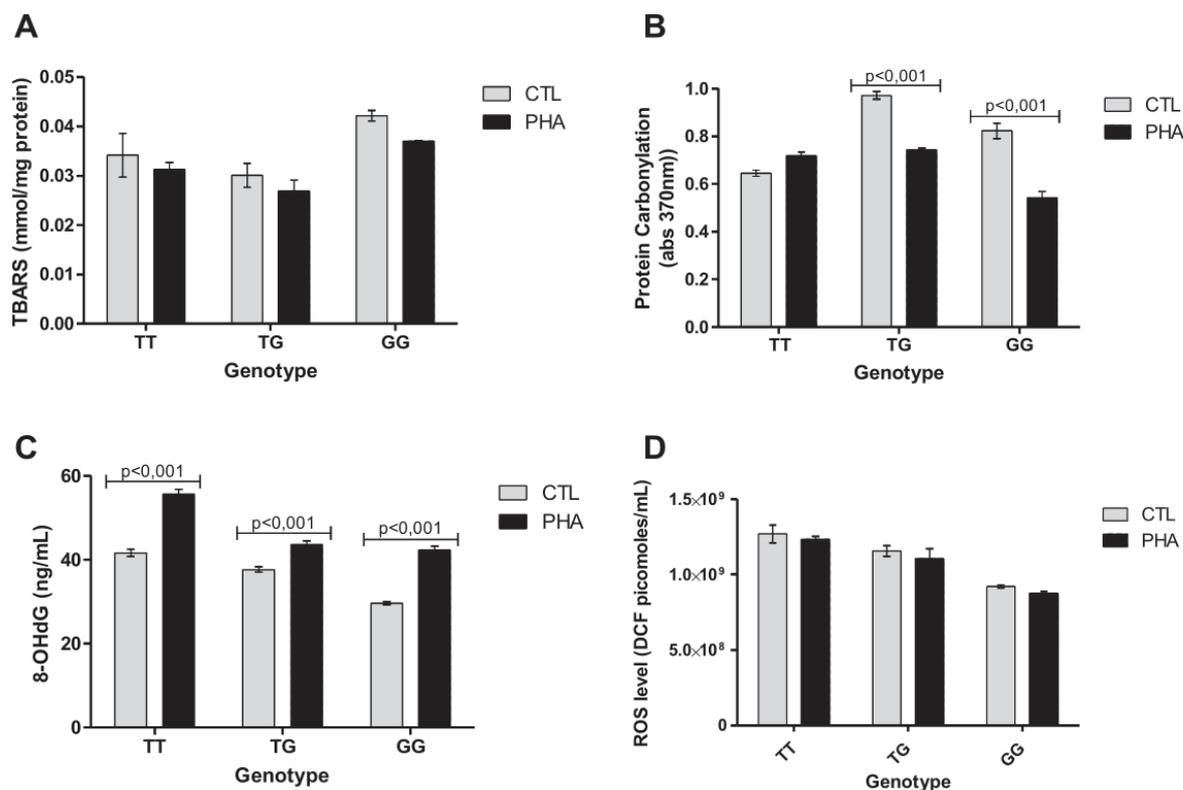


Fig. 3. Comparison of oxidative metabolism markers among PBMCs carriers different Glu298Asp genotypes after 72 h. Legend: CTL = control group. PHA = phytohemagglutinin group. TBARS = lipoperoxidation; 8-OHdG = 8-hydroxy-deoxyguanosine; ROS = reactive oxygen species. The data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test.

The variation in nitric oxide levels between carrier PBMCs of different Glu298Asp genotypes was demonstrated in Fig. 5. Interestingly, NO levels were lower after treatment with PHA only in the GG genotype and presented similar NO levels in TT and TG groups. It is known that the GG genotype has a normal and active eNOS, ie secretes normal levels of NO [28]. The results indicated here, after activation with PHA, even in the presence of the G alleles the production of NO is inefficient.

The beneficial effect of NO as an important endogenous compound in blood pressure control is counterbalanced by its role as a free radical in the reaction with the superoxide to form peroxynitrite, a strong oxidant, which may favor oxidative stress [1,31]. Therefore, focusing on cardiovascular role, NO levels seen in the GG genotype prior to treatment are beneficial for vasodilation and pressure control.

The cytokine gene expression was shown in Fig. 6. Proinflammatory cytokines were weakly modulated by PHA (as shown by Fig. 6A–C), up to 1.7-fold more than the control for the IL6 gene. Conversely, did not modulate the expression of IL1 in the TG heterozygous. Also, up-regulation at INFG which is anti-inflammatory, maybe in a compensatory mechanism, more strongly in the TG genotype, which may be protective. On the other hand, the PHA downregulated the anti-inflammatory IL10 only in the TT genotype.

In a recent study [32] PHA was used at concentrations of 0.1 and 0.5% and inflammatory activation was demonstrated by expression of CD25 antigen in the cell surface. Furthermore, cells activated by 0.5% PHA were treated with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of *Yerba mate*, a food with biological properties, and this had an inhibitory effect on the activation of leukocytes, as well as changes in the genetic expression of different pathways [32].

Besides, lipopolysaccharide treated cells increase proinflammatory mediators and triggered intensely overproduction of ROS and NO because inducible nitric oxide synthase (iNOS) was upregulated [9]. Increased levels of IL-6 and TNF- α reflect the activation of the innate

immune system, and treatment with fatty acids besides increasing these inflammatory markers was able to generate high levels of lipid peroxidation, indicating oxidative damage, as previously described [33].

Analyzing only the GG genotype, we see higher NO levels and IL10 expression. We suggest that the G allele is also protective in inflammation, and the polymorphism Glu298Asp can be used to monitor diseases such as obesity and to develop measures to reduce cardiovascular risk factors in blacks, since the T allele is susceptible to inflammation and defects in action of nitric oxide. Although at a low level, modulation in inflammatory genes demonstrates that the Glu298Asp polymorphism interfered with the activation of leukocytes, indicating its potential role in the immune system.

One limitation in our investigation is related to the lack of analysis of antioxidant markers. In the present study, enzymatic and non-enzymatic antioxidant molecules were not evaluated by logistic questions involving a limited sample volume and complex processing of the samples to perform these analyses throughout cell cultures. Therefore, complementary studies may elucidate the role of Glu298Asp polymorphism in the action of antioxidant agents and modulation of genes beyond inflammatory.

Despite the methodological constrains associated with in vitro studies, we consider these results to be relevant because is the first time the Glu298Asp genotype was used in PBMCs culture of the black people and shows inflammatory gene modulations, which implies in the pharmacogenetic role of Glu298Asp polymorphism in pathways inflammation and may be associated with the effectiveness of anti-inflammatory and antihypertensive treatment in black patients.

4. Conclusion

The present study demonstrated the Glu298Asp modified the levels of inflammatory cytokines after polyclonal activation of PBMCs and

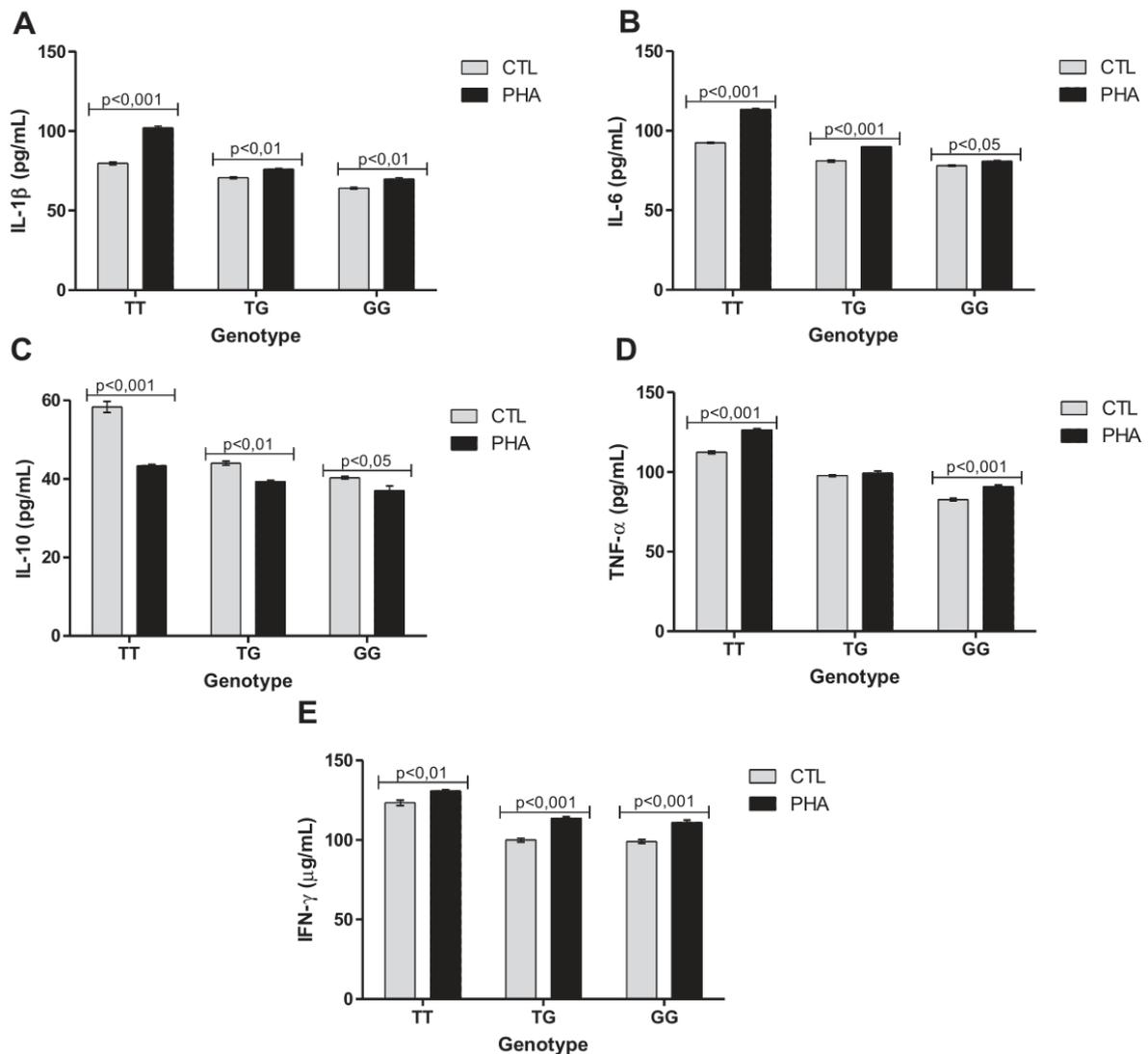


Fig. 4. Comparison of some inflammatory indicators of cell cultures from PBMCs carriers different Glu298Asp genotypes (TT, TG and GG). All cytokines were dosed in cell culture supernatant. Legend: CTL = control group; PHA = phytohemagglutinin group; IL-1 β = interleukin 1 β ; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; TNF- α = tumor necrosis factor alpha; IFN- γ = interferon γ . The data are presented as mean \pm SD. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Bonferroni's test.

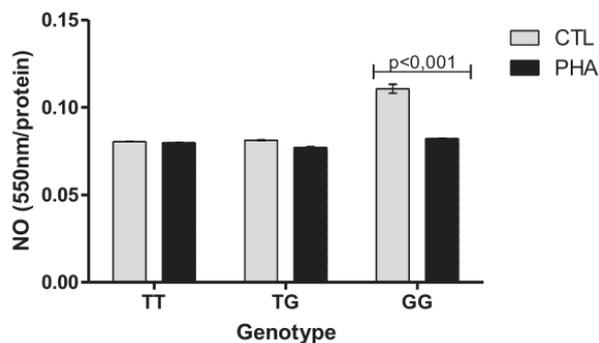


Fig. 5. Variations in NO levels in PBMC PHA-activated genotyped Glu298Asp. Legend: CTL = control group; PHA = phytohemagglutinin group; NO = Nitric oxide. The data are presented as mean \pm SD. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Bonferroni's test.

modulates the expression of inflammatory genes in vitro, the T allele is more susceptible to inflammation and the G allele is protective.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We thank the Federal University of Pampa. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Still, it was supported by grants and fellowships from Brazilian research agencies (CNPq - Call 021/2014). We wish to express our thanks to Juliana Mezzomo and Jamila Benvegnu Bruno for their help with blood collection.

We are grateful to the Biogenomic Laboratory research team that helped us with some experimental protocols and cell culture management.

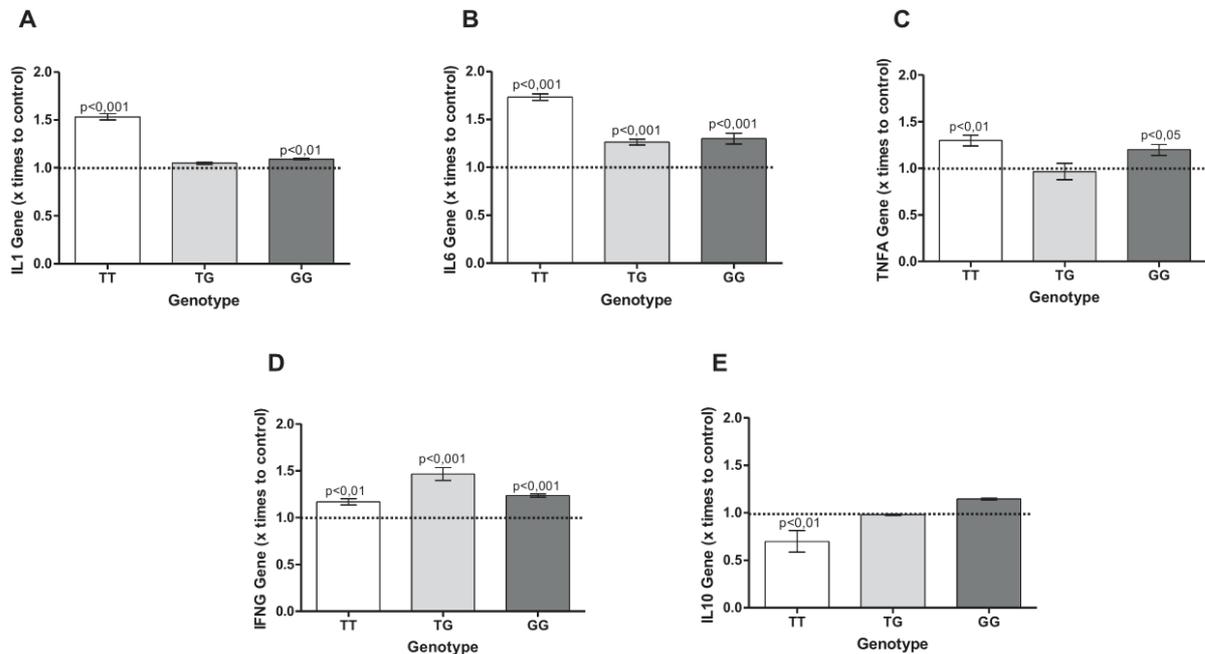


Fig. 6. Inflammatory gene expression modulation. Legend: IL1 Gene = interleukin 1 gene; IL6 Gene = interleukin 6 gene; IL10 = interleukin 10 gene; TNFA = tumor necrosis factor alpha gene; IFNG = interferon γ gene. Analysis were performed in 72h after cell cultures and compared by Two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154812>.

References

- G.H. Oliveira-Paula, R. Lacchini, J.E. Tanus-Santos, Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases, *Nitric Oxide – Biol. Chem.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.08.004>.
- I.F. Metzger, M.H. Ishizawa, F. Rios-Santos, W.A. Carvalho, J.E. Tanus-Santos, Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects, *Pharmacogenomics J.* 11 (2011) 393–399, <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.52>.
- S.K. Wattanapitayakul, M.J. Mihm, A.P. Young, J.A. Bauer, Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 361–368.
- V.C. Sandrim, R.W.C. de Syllos, H.R.K. Lisboa, G.S. Tres, J.E. Tanus-Santos, Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients, *Nitric Oxide – Biol. Chem.* 16 (2007) 348–355, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.12.007>.
- N.F. Cerqueira, W.B. Yoshida, Óxido nítrico: revisão, *Acta Cir. Bras.* 17 (2002) 417–423, <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>.
- C.A. Nascimento, G. Patriarca, J.C. Heimann, Estrutura orgânica do endotélio vascular, in: P.L. Luz, F.R.M. Laurindo, A.C.P. Chagas (Eds.), *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*, Editora Atheneu, São Paulo, 2003, pp. 1–16.
- D. Kim, Y. Yamasaki, Z. Jiang, Y. Nakayama, T. Yamanishi, K. Yamaguchi, Comparative study on modectin- and phytohemagglutinin (PHA) -induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells, *Acta Biochim Biophys Sin.* 43 (2011) 52–60, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq105>. Advance.
- C.R. Kleiveland, Peripheral blood mononuclear cells, in: K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers (Eds.), *Impact Food Bioact. Heal. Vitr. Ex Vivo Model*, Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 161–167, https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15.
- K. Yin, R. Zhu, S. Wang, R.C. Zhao, Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro, *PLoS One* 12 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179175>.
- P. Maurer, V. Manfredini, R.N. Moresco, N. Frizzo, I.B.M. da Cruz, J.da.C.E. Piccoli, Association between nitrite/nitrate and metabolic risk in blacks abstract, *Arch. Med.* 8 (2015) 1–7.
- F. Barbisan, V.F. Azzolin, E.E. Ribeiro, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The in vitro influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence, *Rejuvenation Res.* 20 (2017) 334–345, <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1892>.
- T. Duarte, F. Barbisan, P.A.S. do Prado-Lima, V.F. Azzolin, I.E. da Cruz Jung, M.M.M.F. Duarte, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, I.B.M. da Cruz, Ziprasidone, a second-generation antipsychotic drug, triggers a macrophage inflammatory response in vitro, *Cytokine* 106 (2018) 101–107, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.017>.
- W. Chi, S. Zhou, P. Yang, L. Chen, CD4(+) T cells from behcet patients produce high levels of IL-17, *Eye Sci.* 26 (2011) 65–69, <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4432.2011.02.013>.
- F. Barbisan, J. De Rosso Motta, A. Trott, V. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M.M.F. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B.M. Da Cruz, Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>.
- F. Barbisan, V.F. Azzolin, C.F. Teixeira, M.H. Mastella, E.E. Ribeiro, P.A.S. do Prado-Lima, R.de.S. Praia, M.M. Medeiros Frescura Duarte, I.B.M. da Cruz, Xanthine-catechin mixture enhances lithium-induced anti-inflammatory response in activated macrophages in vitro, *Biomed Res. Int.* 2017 (2017) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2017/4151594>.
- B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Furst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256, <https://doi.org/10.1002/ajpa.21646>.
- S. Chibber, I. Hassan, M. Farhan, I. Naseem, In vitro pro-oxidant action of methotrexate in presence of white light, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 104 (2011) 387–393, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.04.005>.
- E. Tatsch, G.V. Bochi, R.da.S. Pereira, H. Kober, V.A. Agert, M.M. Anru de Campos, P. Gomes, M.M.M.F. Duarte, R.N. Moresco, A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 348–350, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.12.011>.
- S. Rodriguez, T.R. Gaunt, I.N.M. Day, Hardy-weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies, *Am. J. Epidemiol.* 169 (2009) 505–514, <https://doi.org/10.1093/aje/kwn359>.
- J.da.C.E. Piccoli, V. Manfredini, F.I. Hamester, J.B. Bandinelli, I.M. Turkienicz, J.A.B. Chies, A. Peres, L.C. Bodanese, M.R. Bogo, Interaction between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T > C, 894G > T and Intron 4 a/b) and cardiovascular risk factors in acute coronary syndromes, *Arch. Med. Res.* 43 (2012) 205–211, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.03.011>.
- F.M.P. Balestieri, *Imunologia*, first ed., São Paulo, 2006.
- J.M. Gostner, M. Ganzera, K. Becker, S. Geisler, S. Schroecksnadel, F. Uberall, H. Schennach, D. Fuchs, Lavender oil suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human PBMC, *BMC Complement. Altern. Med.* 14 (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s12900-014-0001-0>.

- doi.org/10.1186/1472-6882-14-503.
- [24] R. Priyanka, Interferons and Interferon Therapy, *J. Pharm. Sci. Res.* 6 (2014) 400–403.
- [25] P. Parham, *O sistema Imune*, third ed., Porto Alegre, Brasil, 2011.
- [26] V. Salvi, V. Gianello, L. Tiberio, S. Sozzani, D. Bosisio, Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00015>.
- [27] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Imunologia de Janeway*, seventh ed., Porto Alegre, Brasil, 2010.
- [28] I.F. Metzger, J.T.C. Sertório, J.E. Tanus-Santos, Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 987–992, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.012>.
- [29] S. Didion, Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2563, <https://doi.org/10.3390/ijms18122563>.
- [30] J.C. Piccoli, V. Manfredini, D. Faoro, F.M. Farias, L.C. Bodanese, M.R. Bogo, Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (-786T > C) and interleukin-6 in acute coronary syndrome, *Hum Exp Toxicol.* 33 (2014) 396–402, <https://doi.org/10.1177/0960327113499046>.
- [31] J.S. Beckman, W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1424–C1437, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.277>.
- [32] M. Muñoz-Culla, M. Sáenz-Cuesta, M.J. Guereca-Barandiaran, M.L. Ribeiro, D. Otaegui, Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro, *Food Funct.* 7 (2016) 4556–4563, <https://doi.org/10.1039/C6FO01061J>.
- [33] C.M.O. Volpe, L.F.M. Abreu, P.S. Gomes, R.M. Gonzaga, C.A. Veloso, J.A. Nogueira-Machado, The production of nitric oxide, IL-6, and TNF-alpha in palmitate-stimulated PBMCs is enhanced through hyperglycemia in diabetes, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/479587>.

Highlights

- Glu298Asp influences the inflammatory response of PBMCs of black people.
- Allele T of SNP Glu298Asp carries greater susceptibility to inflammation.
- Genotype GG presented higher levels of IL10 and nitric oxide.
- Allele G protect against inflammation.
- Antihypertensive and anti-inflammatory therapy may be influenced by Glu298Asp SNP.

Appendix A. Supplementary material

Source: P. Maurer, V. Manfredini, R.N. Moresco, N. Frizzo, I.B.M. da Cruz, J. da C.E. Piccoli, **Association between Nitrite/Nitrate and Metabolic Risk in Blacks** Arch. Med. 8 (2015) 1–7.

Table 1 Baseline characteristics from the studied population (n:202).

Characteristics	Mean	SD
Age (years)	46.4	14.7
Peso (kg)	78.1	15.2
BMI (kg/m ²)	30.1	5.8
WC (cm)	98.9	12.9
HC (cm)	108.6	11.5
WHR	0.91	0.84
WHtR	0.61	0.08
SBP (mmHg)	133.5	24.6
DBP (mmHg)	86.2	17.3

BMI: Body Mass Index, WC: Waist Circumference, HC: Hip Circumference WHR: Waist-Hip Ratio, WHtR: Waist-to-Height Ratio, SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure, SD: Standard Deviation.

Table 3 Baseline diseases

Disease	N (%)
Hypertension	108 (53.5)
Diabetes	32 (15.8)
Dyslipidemia	45 (22.2)
Acute Myocardial Infarction	6 (3.0)
Angina	50 (24.7)
Stroke	8 (3.9)
Smoke	38 (18.8)
Use of alcohol	52 (25.7)
Sedentary	131 (64.8)

5 MANUSCRITO I

Título: Association of the Glu298Asp SNP within the eNOS gene and the +45 T/G polymorphism in ADIPOq gene with uncontrolled hypertension in black individuals

Submetido ao periódico Association of +894G>T (rs1799983) of eNOS gene and +45T>G (rs2241766) of ADIPOq with uncontrolled hypertension in black individuals, ISSN: 0188-4409, e apresentado nesta tese de acordo com as normas da revista.



Association of +894G>T (rs1799983) of eNOS gene and +45T>G (rs2241766) of ADIPOq with uncontrolled hypertension in black individuals

Msc Patrícia Maurer¹, Débora Alejandra Vasquez Rubio², PhD Vanusa Manfredini¹, PhD Jacqueline da Costa Escobar Piccoli^{1,3}

1 Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Bachelor's degree in Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 Postgraduate Program in Pharmaceutical sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

Running title: SNPs in different genes and hypertension in blacks

Corresponding author:

Jacqueline da Costa Escobar Piccoli

Adress: Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana, BR 472 - Km 592 - box 118

Zip code: 97508-000, Uruguaiana - RS, Brazil. Phone: + 55 55 39110200.

E-mail: jacquelinepiccoli@unipampa.edu.br

Abstract count: 251 Word count: 3009

Tables: 3 Figures: 3

Association of +894G>T (rs1799983) of eNOS gene and +45T>G (rs2241766) of ADIPOQ with uncontrolled hypertension in black individuals

Abstract

Background: Hypertension is a disease with high morbidity and mortality, known to affect more black than white individuals. The control of blood pressure, through pharmacological and non-pharmacological measures, such as lifestyle changes and physical activity, brings several benefits to the health of hypertensive individuals. The impact of specific single nucleotide polymorphisms on blood pressure control on the black population, however, is unknown. **Aim:** to evaluate the prevalence of hypertension and cardiovascular risk factors within the black population and to investigate the association between cardiovascular risk factors and SNPs rs1799983 and rs2241766, in two different genes, with uncontrolled hypertension. **Methods:** We performed a descriptive and analytical cross-sectional study with self-declared, black participants. Individuals were genotyped for two previously identified SNPs, grouped according to blood pressure control, and the analysis of haplotypes and classic cardiovascular risk factors was performed. **Results:** Uncontrolled hypertensive individuals with the wild-type genotype (+894GG) were more sedentary compared to the risk haplotype (TT+TG). Smoking was associated with the risk haplotype of SNP +45T>G in the ADIPOQ gene. Allele G of the SNP +45T>G ADIPOQ and allele T of the SNP +894G>T presented lower levels of adiponectin and higher cardiovascular risk. The cardiovascular risk associated with obesity, in addition to having two mutated alleles of the polymorphisms studied here, increased the odds ratio for the development of uncontrolled hypertension. **Conclusion:** genetic markers may predict the risk of uncontrolled hypertension within the black population and the SNPs selected for this study were associated with biochemical markers and cardiovascular risk.

Keywords: Hypertension Resistant to Conventional Therapy; polymorphism; Nitric Oxide Synthase Type III; Negroid Race; Glu298Asp

Introduction

Hypertension is an emerging, non-transmissible, chronic disease, which affects around 30% of the Brazilian population (1). The prevalence of resistant hypertension varies between 3% and 30% of the hypertensive population, and among these individuals higher incidence of cardiovascular morbidity and mortality are observed (2). Resistant hypertension is currently defined as a disease state in which target blood pressure (BP) levels (140 mmHg systolic BP and/or diastolic BP 90 mmHg) are not achieved, despite treatment with at least three antihypertensive agents, including a diuretic, in correct combination and at adequate doses (3). The prevalence of hypertension, the relative risk of stroke and risk of cardiovascular events is higher within black populations than other ethnic groups, it is estimated that strokes can be virtually eliminated through control of hypertension (4). Relatively low renin levels, a tendency to retain salt and water (5), and even the degree of salt sensitivity (6), make blood pressure control in black patients difficult. Therefore, it is important to identify other factors, such as genetic predispositions, that may be interfering with the control of hypertension. The single nucleotide polymorphism (SNP) +894G>T (rs1799983) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is reported to affect endothelial function, bioavailability of nitric oxide and increase BP (7). Yet, cardiovascular prognosis depends on the presence of other risk factors, such as obesity (8), which is associated with a decrease in serum adiponectin levels, insulin resistance and an increased risk of cardiometabolic complications (9). Among the variants of the adiponectin-encoding gene, ADIPOQ +45T>G (rs2241766) have been associated with diabetes mellitus (10), metabolic syndrome and even food consumption (11), despite this, there is no evidence suggesting its role in the control of hypertension.

However, implications of these polymorphisms with respect to risk of hypertension in black individuals has not been established. Therefore, we conducted this cross-sectional study to assess the control of blood pressure and cardiovascular risk factors in black hypertensive patients and investigate the association between cardiovascular risk factors and SNPs with uncontrolled hypertension.

Methods

The present study complied with ethical principles for research involving human subjects contained in the Declaration of Helsinki (1975), the World Medical Association and Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council, and was in accordance with institutional guidelines. This study was approved by the Research Ethics Committee, number 977.827. All participants who agreed to participate in the study signed Written Informed Consent. Data were treated in a confidential manner with access granted only to investigators and with subjects identified by numbers.

This is a descriptive and analytical cross-sectional study carried out in Uruguaiana-RS, a city on the western border of the southernmost state of Brazil, Latin America. Sample calculation and the division of groups included in the study are presented in Figure 1. The sample was calculated to be representative of the regional black population of the city. The exclusion criteria were not to participate in any stage of the research, interview or blood collection, and the presence of hemoglobinopathies. Participants included individuals of both sexes and were of exclusively black ethnicity (black or brown).

Initially, to determine a baseline, participants answered a structured questionnaire about habits, diet, previous and current diseases, socioeconomic factors, lifestyle, demographic factors, heredity and medications. The BP measurements followed recommended guidelines for an appropriate measurement (12). Measurements were taken after subjects rested 10 min,

on seated individuals with their arm supported. A calibrated sphygmomanometer and trained observer evaluated measurements ensuring that cuffs were of adequate size, and the average of two readings obtained from each individual was utilized. Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight (kg) by height (m^2) and classification of participants was based on standard clinical definitions: BMI values of normal weight individuals is 18.5–24.9 kg/m^2 and BMI $> 25 kg/m^2$ is considered overweight or obese. Weight measurements were taken with light indoor clothing. Baseline hypertension was defined for patients who had already been clinically diagnosed by a physician according to Brazilian guidelines (1). From this previous diagnosis, individuals were classified according to blood pressure measurement into groups: a) Controlled hypertension (BP $< 130/80$), b) Uncontrolled hypertension (BP $\geq 140/90$), c) Resistant hypertension (BP $\geq 140/90$ plus the use of 3 antihypertensives, including a diuretic), d) Refractory hypertension (defined as failure to control BP despite use of at least 5 antihypertensive agents of different classes) (12). All patients underwent pharmacotherapeutic follow-up for at least 6 months, ensuring patient compliance, non-occurrence of pseudoresistance and exclusion of secondary causes of hypertension (12). Peripheral blood samples were collected after fasting 12-hours and centrifuged for 15 minutes at 3000g. Aliquots of serum and plasma were separated for the biochemical analysis. Glucose was determined with commercial Labtest kit on a ChemWell T semi-automated biochemical analyzer (Lagoa Santa/MG, Brazil). Ischemia modified albumin (IMA), C-reactive protein (CRP) and nitrite/nitrate (NOx) levels were quantified using Cobas Mira Plus from Roche Diagnostic Systems (Basle, Switzerland). IMA was estimated in serum using a colorimetric assay (13). CRP was measured using a commercial immunoturbidimetric kit from Bioclin following the manufacturer's instructions. The indirect determination of nitric oxide by the plasma NOx dosage was based on the Griess reaction (14). Levels of adiponectin

were determined using an adiponectin human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit, catalog number KHP0041 (Life Technologies Corporation, Invitrogen, USA).

The genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using a DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The SNP ADIPOQ +45 T > G was determined using a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using forward and reverse primers: 5' GAA GTA GAC TCT GCT GAG ATG G 3' and 5' TAT CAG TGT AGG TCT GTG ATG 3', respectively, according to conditions described by Curti et al. (15). After amplification, the size of the amplified fragment (372 bp) was confirmed using electrophoresis. The restriction enzyme SmaI (Invitrogen, Carlsbad, California) was used for genotyping. The digested fragments were analyzed on a 2.5% agarose gel. The gel was visualized using a Gel Doc XR+ System BIORAD. A single fragment, 372 bp in size was identified T alleles. The G allele resulted in two fragments 219 bp and 153bp in size.

The Glu298Asp SNP was genotyped using real-time PCR coupled with a Taqman assay. The TaqMan probe is a fluorogenic probe that consists of an oligonucleotide labeled with both a fluorescent reporter dye (VIC) and a quenched dye (FAM). Levels of fluorescence of PCR products were measured with the Step One equipment (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using assay ID C___3219460_20 and analyzed with a Thermo Fisher Cloud system. The investigator who assessed the genotype was blind to the clinical data of the subjects from whom the samples originated.

The classic cardiovascular risk factors considered in this study were: a) obesity (BMI > 25 kg/m²); b) sedentary lifestyle (those who performed physical activity less than three times a week); c) dyslipidemia (defined by total cholesterol levels > 240 mg/dL, LDL-cholesterol > 160 mg/dL, elevated triglyceride levels of > 200 mg/dL, or the use of cholesterol-lowering drugs) (16); d) diabetes (defined by glycemic levels >126 mg/dL or the use of medications to lower glucose); e) smoking (tobacco use was assessed by related history and individuals were

classified as smokers or nonsmokers); f) metabolic syndrome, as defined by the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults III (17) and g) report previously experiencing an acute myocardial infarction (AMI) or stroke.

In the statistical analysis, allele and genotype frequencies were tested using the equation for Hardy-Weinberg equilibrium. The significance of allele frequencies or genotype distributions among hypertensive groups were examined using either a nonparametric χ^2 or Fisher's exact test (two-tailed). Multivariate analyses including gender and age effects were conducted with multiple logistic regression methods, estimates of conditional relative risk and 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed using the SPSS/PC Statistical Package version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and values were considered statistically significant when $p < 0.05$. To test interfering factors, logistic regression analysis (Backward Wald method) was used.

RESULTS

Of the total 203 initial study participants, we performed the analysis on 108 patients diagnosed with hypertension and divided them into groups according to level of blood pressure control. According to this classification scheme, 44 (40.7%) subjects had controlled hypertension, 55 (50.9%) had uncontrolled hypertension and 9 (8.4%) were diagnosed with resistant hypertension. None of the participants were classified as having refractory hypertension.

Baseline characteristics of the population have been presented in Table 1. For comparisons between subjects, we grouped patients classified as uncontrolled hypertensive with resistant hypertensives in a group (named UH, $n=64$), while the hypertensive group was grouped with controlled blood pressure or controlled hypertension (named CH, $n=44$). The total population,

through the mean BMI, was characterized as obese, had a mean age of 52 years, and did not show differences between the sexes ($p = 0.574$). There were differences between the groups regarding the control of high blood pressure only on the previous report of diseases such as depression ($p=0.009$) and cancer ($p=0.048$).

Allele and genotype frequencies of both polymorphisms are presented in Table 2. The presence of cardiovascular risk factors were compared between the groups with the risk haplotypes associated with the two characterized SNPs. The results of this analysis are presented in Table 3, and we used dominant inheritance model (adding the heterozygous to the variant homozygous). Regarding the +894G>T SNP, only subjects of the uncontrolled hypertension ($p = 0.029$) group with the wild-type genotype (GG) were sedentary. For the SNP ADIPOQ +45 T>G, only smoking the only was statistically different characteristic when comparing between the risk haplotype (GG + TG) with the wild haplotype (TT) ($p = 0.050$). An additional analysis compared biochemical variables and hypertension groups with the presence of haplotypes of the two SNPs and the results are presented in figure 2.

Regarding individuals with the +894G>T SNP, only the group with controlled hypertension had different levels of glucose and great biological variation among subjects, but there was no difference regarding the previous occurrence of diabetes. Figure 2A also shows that adiponectin was higher in the + 894GG genotype in controlled hypertensive patients as well albumin modified by ischemia in genotype + 894GG uncontrolled hypertensive patients. There were no significant differences between the other markers and groups. For the haplotypes corresponding to SNP ADIPOQ +45 T > G, differences in adiponectin levels were observed within the uncontrolled hypertension group in which wild haplotype (TT) levels were lower than that of the risk haplotype group (TG+GG).

We also analyzed the odds ratio for the development of uncontrolled hypertension and cardiovascular risk factors (gender, smoking, obesity, dyslipidemia and diabetes) in

accordance with the presence of one or two variants of these SNPs, with the results of these analyses shown in Figure 3. We found that the risk of developing uncontrolled hypertension was higher for males than females with only one variant allele (OR 1.1; 95% CI 0.1-7.3) and, curiously, the cardiovascular risk factor dyslipidemia was considered protective in the presence one variant alleles of any of the polymorphisms (OR = 0.6; 95% CI = 0.1–3.6).

DISCUSSION

In the present study, we investigated the presence of uncontrolled hypertension and cardiovascular risk factors in black patients in association with the risk alleles of the polymorphisms eNOS + 894G> T and + 45T> G of ADIPOQ. The increase of obesity worldwide has been reported, and is especially common in black women (18). In the table containing information about baseline characteristics of our subjects, we showed that BMI is independent of hypertensive group classification. This demonstrates that obesity in our study is not significantly different between the sexes, although adipose tissue levels have already been associated with an increased prevalence of hypertension (18).

More people in the uncontrolled hypertension group were illiterate or did not complete elementary education (65.6%) than in the controlled hypertension group (52.3%).

Interestingly, there were significant differences observed in the prevalence of cancer and depression among controlled and uncontrolled hypertensives, however, since the groups were not absolutely paired (for cancer and depression), the association result should be taken with caution. Based in previous self-report, we found that controlled hypertensives had higher prevalence of depression (45.5%) than the uncontrolled hypertensive group (21.9%) ($p=0.009$). It has been reported that depressive symptoms impair cardiovascular outcomes in African Americans with chronic kidney disease by the same inventory (19), but there has been no previous report of this effect regarding the control of hypertension. The role of cancer in

controlling blood pressure has not been well established; however, recent findings have shown that women with breast cancer have a higher risk of cardiovascular disease than women in the general cancer-free population (20).

Previously it has been reported that there is a worrying prevalence of metabolic syndrome (75%) despite a low prevalence of diabetes in an adult black population of functional age, or working age, with low levels of education (21). Metabolic syndrome is defined by a set of factors associated with increased cardiovascular mortality. This study also considered black individuals, but had results that showed higher levels of metabolic syndrome than those reported here, indicating a worse prognosis, independently of the blood pressure control grouping, since there was no difference between controlled and uncontrolled hypertensive groups, 72.7% and 78.1%, respectively ($p = 0.334$).

Regarding the genotypic and allelic frequencies presented in Table 2, the SNP +45T>G in ADIPOQ gene were in Hardy-Weinberg equilibrium. For the SNP +894G>T in eNOS gene the population was not be in Hardy-Weinberg equilibrium. The G (wild-type) allele of the +894G>T SNP is the most frequently observed allele and we found a frequency of 35% of the risk allele T, similar to the European metanalysis (risk allele frequency 36%) that associated this polymorphism with an increased risk of stroke: odds ratio (95% CI) 1.05 (1.04–1.07) (22).

The T allele is the wild-type allele when considering the ADIPOQ +45T>G SNP and was also the most frequent. Although there were differences in the allele frequencies of this SNP between the hypertensive groups, they were not significant. Hypertension is a multifactorial disease with genetic components. Variations in the eNOS gene locus have previously been reported to be related to hypertension (23,24), but the same has not been demonstrated for the ADIPOQ gene (10).

Regarding risk factors associated with SNP +894G>T in a dominant inheritance model, there was an association between sedentary living habits and the wild genotype in the uncontrolled hypertension group only (Table 3). 45% of individuals with at least one mutated allele of the eNOS gene were physically active. Physical exercise should release vasodilator agents such as nitric oxide and protect endothelial integrity, decreasing blood pressure levels (25), but this was confirmed with our results measuring an indirect marker of nitric oxide, shown in Figure 2. Nitrite/nitrate (NO_x) levels for individuals with controlled blood pressure but with both risk haplotypes were higher than the other groups, given the importance of nitric oxide in vasodilation, we suggest that increased nitric oxide has been able to maintain control of hypertension even with the presented mutated alleles.

It is known that smoking and obesity affect the regulation of inflammatory cytokines (26), we found that most smokers in the uncontrolled hypertension group had the haplotype GG + TG of the SNP ADIPOQ +45T > G. In other words, in addition to genetic components, environmental exposure to cigarettes impaired control of hypertension in black individuals considered in this study. Smoking is known to be an environmental risk factor, and there was a difference in smoking exposure in the uncontrolled hypertension group and the risk allele in the ADIPOQ gene versus the wild genotype (p=0.05). This is an important finding, as it has been reported that the risk for other cardiovascular diseases such as coronary artery disease is increased in smokers with other risk genotypes in different genes (27). We also observed that there was no difference in C-reactive protein levels between groups, although the mean values of 9 mg/L of this marker indicate that overall the population here is classified as having high cardiovascular risk (28,29).

Results regarding ischemia-modified albumin (IMA) levels among hypertensive groups were conflicting. Since IMA may be a marker of cardiovascular damage (30), we must consider that all subjects were hypertensive. We believe that there is an interaction between the

endothelial dysfunction of hypertension and oxidative stress. Because of this, we were able to visualize elevated levels of IMA, even in hypertensive controls, with the risk haplotype of eNOS +894G>T.

Furthermore, plasma adiponectin levels are inversely associated with an increased risk of cardiovascular disease (31), this is particularly interesting since we found both the risk haplotype of the +894G>T SNP and the risk haplotype of +45T>G SNP, lower levels of adiponectin compared to the wild haplotype groups, but this difference was significant only in the group with hypertension not controlled.

Our study has limitations that should be noted. When interpreting assays, the consideration factors that can affect blood concentration, including medication, diet, exercise, infection and genetics should be considered. Although we have not evaluated gene expression levels of the genes considered here, results suggest that SNPs affected blood pressure control independently of other variables, validating the choice of SNPs and clarifying some of the effects of these SNPs hypertensive, black individuals. Strengths of this study include the unbiased way blood pressure classifications were made and validity of the genetic methodology. Results detailing allelic prevalence results could be of importance to clinicians and public health planners. A better understanding of genetic interference, such as the effect polymorphisms in the presence of cardiovascular risk factors, may improve the identification of patients with resistant hypertension and subsequent treatment success, including the adoption of non-pharmacological therapies such as health education. The use of genetic markers such as +894G>T to predict a patient's ability to control and delay onset of resistant hypertension may enhance treatment options (32), and thus reduce cardiovascular mortality and morbidity in black and non-black patients. Because hypertension is a polygenic syndrome, and blood pressure control depends on a number of factors including genetic

factors, further investigation in a larger population or ethnicities on the level gene-gene or gene-environment interactions may be useful to confirm our findings.

Conflict of Interest/Disclosure

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the participants and the Black Social Movement of Uruguaiana RS.

Grants

This work was supported by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq): Public Call CNPq/MS/SCTIE/DECIT/SGEP/DAGEP n°21/2014 - Health of the Black Population in Brazil. P.M. received a fellowship from Coordination of Improvement of Higher-Level Personnel (CAPES). V.M. is a Scholarship Research Productivity at CNPq – Level 2.

REFERENCES

1. Picon R V, Fuchs FD, Moreira LB, Riegel G, Fuchs SC. Trends in Prevalence of Hypertension in Brazil : A Systematic Review with Meta-Analysis. PLoS One. 2012;7(10).
2. Rimoldi SF, Messerli FH, Bangalore S, Scherrer U. Resistant hypertension: what the cardiologist needs to know. Eur Heart J 2015;36:2686-2695.
3. Doroszko A, Janus A, Szahidewicz-Krupska E, Mazur G, Derkacz A. Resistant Hypertension. Adv Clin Exp Med 2016;25(1):173-183.

4. Spence JD, Rayner BL. Hypertension in Blacks: Individualized Therapy Based on Renin/Aldosterone Phenotyping. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2018;72(2):263-269.
5. Akintunde A, Nondi J, Gogo K, et al. Physiological Phenotyping for Personalized Therapy of Uncontrolled Hypertension in Africa. *Am J Hypertens* 2017;30(September):923-930.
6. Dahlberg J, Sjögren M, Hedblad B, Engström G, Melander O. Genetic variation in NEDD4L, an epithelial sodium channel regulator, is associated with cardiovascular disease and cardiovascular death. *J Hypertens* 2014;32(2):294-299.
7. Muniz L, Luizon MR, Palei ACT, et al. eNOS Tag SNP Haplotypes in Hypertensive Disorders of Pregnancy. *DNA Cell Biol* 2012;31(12):1665-1670.
8. Cho NH, Cho YR, Park MK, et al. Effect of Blood Pressure on Cardiovascular Diseases at 10-Year Follow-Up. *Am J Cardiol* 2019;123(10):1654-1659.
9. Sirbu AE, Buburuzan L, Kevorkian S, et al. Adiponectin expression in visceral adiposity is an important determinant of insulin resistance in morbid obesity. *Endokrynol Pol* 2018;69(3):252-258.
10. Larifla L, Rambhojan C, Joannes M, et al. Gene Polymorphisms of FABP2, ADIPOQ and ANP and Risk of Hypertriglyceridemia and Metabolic Syndrome in Afro-Caribbeans. *PLoS One* 2016;11(9):1-14.
11. Retamoso VR, Maurer P, Feijóo LB, et al. ADIPOQ + 45T ≥ G Polymorphism, Food Intake, and Metabolic Syndrome in Elderly Persons. *J Am Coll Nutr* 2018;5724(January).
12. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM /AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults. *J Am Coll Cardiol* 2018;71(19):e127-e248.

13. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JAM, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43(4-5):450-454.
14. Tatsch E, Bochi GV, Pereira R da S, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011;44(4):348-350.
15. Curti ML, Pires MM, Barros CR, Siqueira-Catania A, Rogero MM, Ferreira SR. Associations of the TNF-alpha -308 G/A, IL6 -174 G/C and AdipoQ 45 T/G polymorphisms with inflammatory and metabolic responses to lifestyle intervention in Brazilians at high cardiometabolic risk. *Diabetol Metab Syndr* 2012;4(1):49.
16. Faludi AA, Izar MC de O, Saraiva JFK, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. *Arq Bras Cardiol* 2017;109(2):1-76.
17. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143-3421.
18. Samson R, Qi A, Jaiswal A, et al. Obesity-Associated Hypertension: the Upcoming Phenotype in African-American Women. *Curr Hypertens Rep.* 2017 May;19(5):41.
19. Fischer MJ, Kimmel PL, Greene T, et al. Elevated depressive affect is associated with adverse cardiovascular outcomes among African Americans with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2011;80(6):670-678.
20. Buttros D de AB, Branco MT, Orsatti CL, et al. High risk for cardiovascular disease in postmenopausal breast cancer survivors. *Menopause.* 2019 Sep;26(9):1024–30.
21. Maurer P, Aparecida A, Retamoso VR, et al. Componentes para diagnóstico de Síndrome Metabólica pelo NCEP-ATP III em uma população afro-brasileira. *Rev Bras Pesq Saude* 2016;18(4):55-60.

22. Malik R, Rannikmae K, Traylor M, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 3 novel loci associated with stroke. *Ann Neurol*. 2018;84(6):934-939.
23. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase : From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016;575(2):584-599.
24. Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, et al. Genome-wide association study using a high-density SNP-array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of eNOS. *Hypertension* 2012;59(2):248-255
25. Zago AS, Zanesco A. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:260-266.
26. Menezes AMB, Oliveira PD, Wehrmeister FC, et al. Association of modifiable risk factors and IL-6 , CRP , and adiponectin : Findings from the 1993 Birth Cohort , Southern Brazil. *PLoS One* 2019;May:1-18.
27. Ying Y, Luo Y, Peng H. EBF1 gene polymorphism and its interaction with smoking and drinking on the risk of coronary artery disease for Chinese patients. *Biosci Rep*. 2018 Jun;38(3).
28. Ferranti SD De, Rifai N. C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:14-21.
29. Tolmay CM, Malan L, Van Rooyen JM. The relationship between cortisol, C-reactive protein and hypertension in African and Causcasian women : the POWIRS study. *Cardiovasc J Afr* 2012;23(2):78-84.
30. Yıldırım E, İpek E, Bavunoğlu I, et al. The impact of protein oxidation on sustained and white coat hypertension. *Anatol J Cardiol* 2017;17:210-216.

31. Ji MJ, Ku EJ, Oh TK, Jeon HJ. Association of Adiponectin 45T / G Polymorphism with Diabetic Cardiovascular Complications in Korean Type 2 Diabetes. *J Korean Med Sci* 2018;33(17):1-9.
32. Fontana V, McDonough CW, Gong Y, et al. Large-scale gene-centric analysis identifies polymorphisms for resistant hypertension. *J Am Heart Assoc* 2014;3(6):e001398.

Table 1. Baseline characteristics of the participants, divided between resistant and uncontrolled hypertension (UH) and controlled hypertension (CH)

Characterist	UH	CH	p-value
Age (y), mean±SD	52.3±13.6	51.2±12.6	0.667
Male sex	12 (18.8)	8 (18.2)	0.574
BMI (kg/m ²), mean±SD	31.3±5.8	31.5±7.2	0.895
SBP (mmHg), mean±SD	142.1±18.1	138.5±23.9	0.496
DBP (mmHg), mean±SD	90.6±19.3	90.5±16.4	0.979
Education*			
Illiterate or incomplete elementary school	42 (65.6)	23 (52.3)	
To complete high school	18 (28.1)	17 (38.6)	
College/University or post-graduate	2 (3.2)	3 (6.8)	
History of			
Diabetes	11 (17.2)	13 (29.5)	0.100
Dyslipidemia	20 (31.2)	13 (29.5)	0.511
Acute myocardial infarction	5 (7.8)	1 (2.3)	0.214
Stroke	3 (4.7)	5 (11.4)	0.176
Depression	14 (21.9)	20 (45.5)	0.009
Cancer	2 (3.1)	6 (13.6)	0.048
Metabolic Syndrome	50 (78.1)	32 (72.7)	0.337
Smoking	33 (52.4)	22 (50.0)	0.266

Regular physical activity	23 (35.9)	12 (27.3)	0.232
Taking medications for hypertension	53 (82.8)	34 (79.1)	0.404
Total subjects	64 (59.3)	44 (40.7)	

Legend: Numbers represent n (%), unless otherwise specified. SD=standard deviation; BMI indicates body mass index; DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; $p \leq 0.05$ considered significant compared to participants with controlled hypertension using the chi-square test. *3 subjects did not respond about their degree of schooling.

Table 2. Allele and genotype frequencies of +894G>T and +45 T>G polymorphisms in blacks

Participants	+894G>T eNOS			Allele		χ^2	P
	% (n)			Frequency			
	TT	TG	GG	T	G		
All (n=108)	1.9 (2)	64.8 (70)	33.3 (36)	0.34	0.66	20.8	<0.05
Controlled hypertension (n=44)	2.3 (1)	65.9 (29)	31.8 (14)	0.35	0.65	8.68	<0.05
Resistant and uncontrolled hypertension (n=64)	1.6 (1)	64.1 (41)	34.4 (22)	0.34	0.66	12.16	<0.05
	ADIPOQ +45 T>G			Allele		χ^2	P
	% (n)			Frequency			
	TT	TG	GG	T	G		
All (n=108)	63.0 (68)	30.6 (33)	6.5 (7)	0.78	0.22	1.14	0.28
Controlled hypertension (n=44)	54.5 (24)	38.6 (17)	6.8 (3)	0.74	0.26	0	0.99
Resistant and uncontrolled hypertension (n=64)	68.8 (44)	25.0 (16)	6.3 (4)	0.83	0.19	2.06	0.15

χ^2 refer to the Hardy-Weinberg equilibrium; P-values is for Chi-squared test.

Table 3. Cardiovascular risk factors between uncontrolled hypertension (UH) and controlled hypertension (CH) groups and haplotypes of the +894G>T and ADIPOQ +45T>G SNPs

Risk factor	SNP					
	+894G>T eNOS					
	UH (n=64)			CH (n=44)		
	TT+TG	GG	p	TT+TG	GG	p
Diabetes	5 (11.9)	6 (27.3)	0.117	7 (23.3)	6 (42.9)	0.166
Obesity	24 (57.1)	13 (59.1)	0.989	14 (46.7)	7 (50.0)	0.394
Sedentary lifestyle	23 (54.8)	18 (81.8)	0.029	21 (70.0)	11 (78.6)	0.417
Dyslipidemia	12 (28.6)	8 (36.4)	0.358	10 (33.3)	3 (21.4)	0.332
Smoking	25 (61.0)	8 (36.4)	0.139	15 (50.0)	7 (50.0)	0.571
Acute myocardial infarction	3 (7.1)	2 (9.1)	0.565	1 (3.3)	0	0.682
Stroke	1 (2.4)	2 (9.1)	0.270	3 (10.0)	2 (14.3)	0.515
Metabolic Syndrome	35 (83.3)	15 (68.2)	0.142	20 (66.7)	12 (85.7)	0.170
	+45 TG ADIPO Q					
	UH (n=64)		p	CH (n=44)		p
	GG+TG	TT		GG+TG	TT	
Diabetes	2 (10.0)	9 (20.5)	0.258	4 (20.0)	9 (37.5)	0.175
Obesity	13 (65.0)	24 (54.5)	0.630	11 (55.0)	10 (41.7)	0.176
Sedentary lifestyle	7 (35.0)	16 (36.4)	0.573	14 (70.0)	18 (75.0)	0.486
Dyslipidemia	9 (45.0)	11 (25.0)	0.096	6 (30.0)	7 (29.2)	0.605
Smoking	14 (73.7)	19 (43.2)	0.050	11 (55.0)	11 (45.8)	0.801

Acute myocardial infarction	1 (5.0)	4 (9.1)	0.499	0	1 (4.2)	0.545
Stroke	1 (5.0)	2 (4.5)	0.682	3 (15.0)	2 (8.3)	0.411
Metabolic Syndrome	16 (80.0)	34 (77.3)	0.542	13 (65.0)	19 (79.2)	0.238

Figure and legends:

Figure 1. Study design.

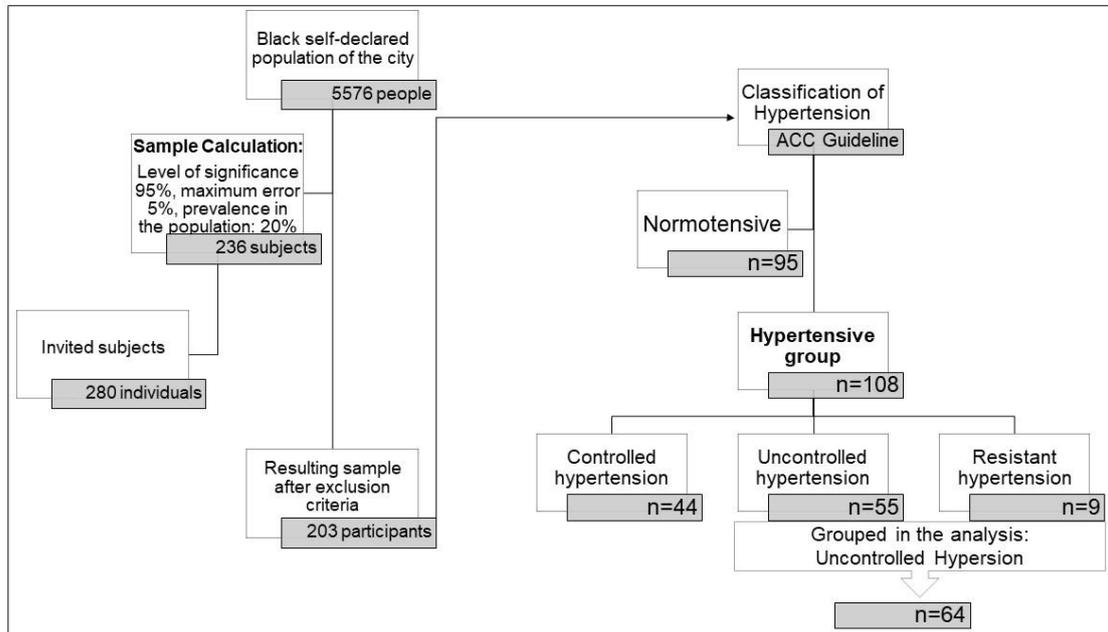


Figure 2. Results of the biochemical analysis between the controlled and uncontrolled hypertension groups, divided by the haplotypes of the 2 polymorphisms. All results were presented in mean \pm standard deviation. A: +894G>T SNP of eNOS gene. B: +45 T>G of ADIPOQ gene.

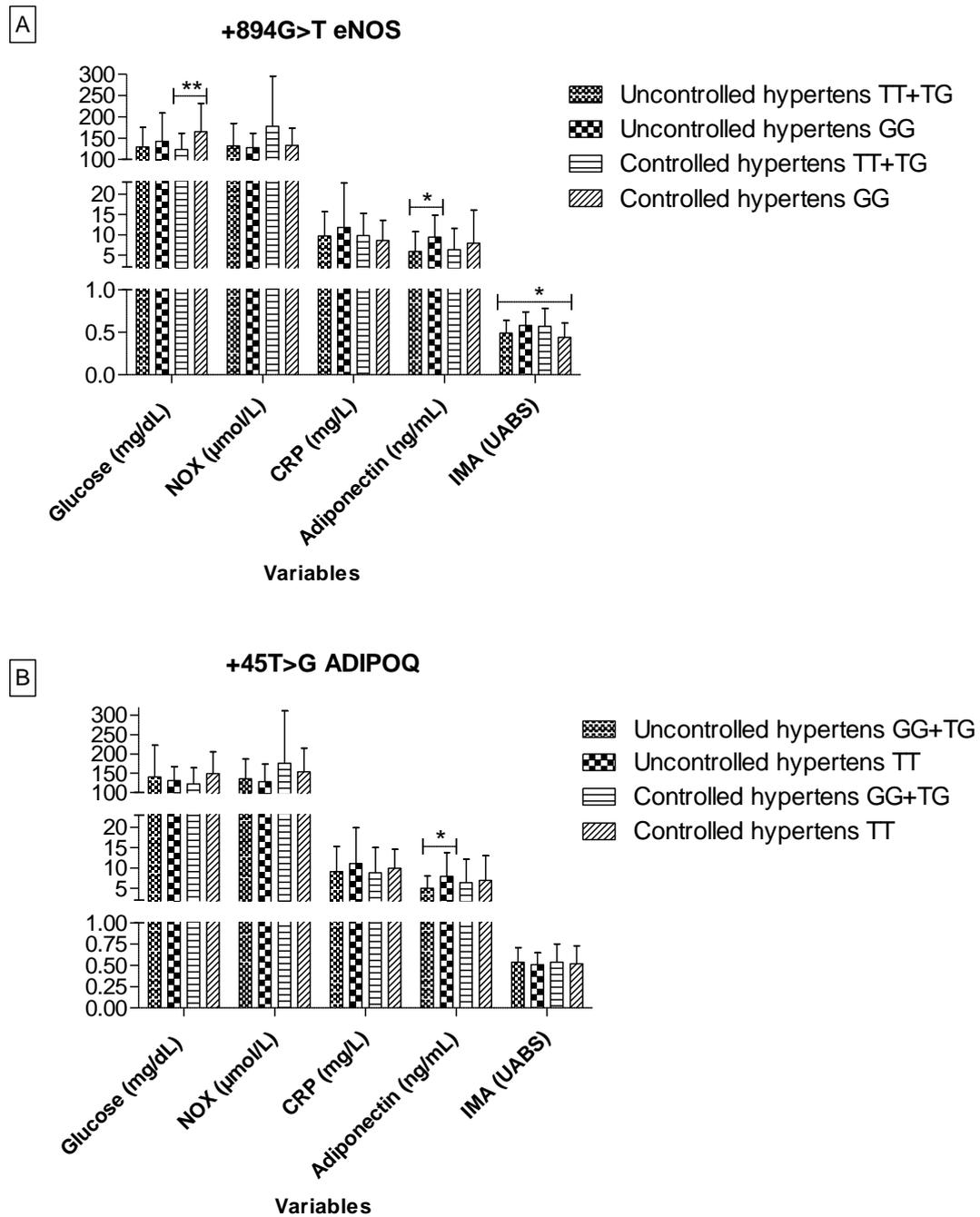
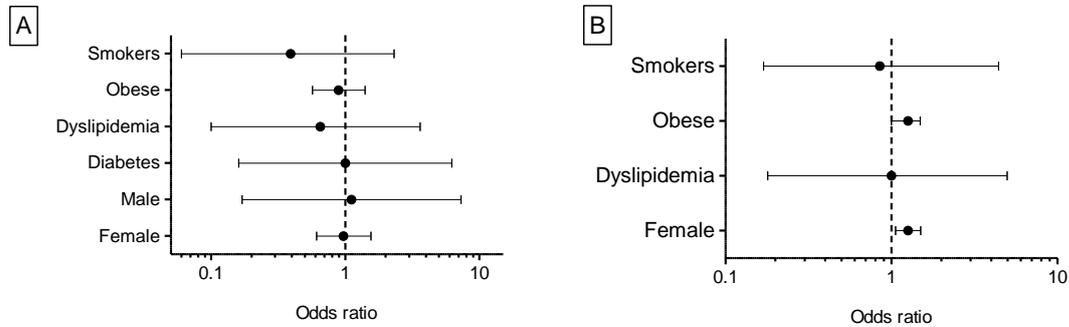


Figure 3. Odds ratio (95% confidence interval) for developing uncontrolled hypertension associated with cardiovascular risk factors and individuals with 1 mutated allele (A) and 2 mutated allele (B), in any SNP studied.



Highlights

- 41% of blacks had controlled hypertension, 51% uncontrolled hypertension and 8% resistant hypertension
- Genotype eNOS +894GG has higher levels of adiponectin, a protective cytokine
- Smoking was associated with the risk haplotype of SNP +45T>G in the ADIPOQ gene
- The total black population, regardless of the hypertension control group, had the risk factor obesity
- The presence of two mutated alleles in these SNPs increased the OR for uncontrolled hypertension

DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar a influência de fatores genéticos (polimorfismos) na resposta a inflamação em cultura celular e também seu papel no desenvolvimento de hipertensão não controlada na população negra.

Para a população inteira do estudo (203 pessoas), a frequência genotípica do polimorfismo Glu298Asp foi igual a TT 6,7%, TG 29,3% e GG 64%, apresentando uma frequência do alelo T de 0,21 e do alelo G de 0,79, com $\chi^2 = 3,84$, $p > 0,05$, indicando uma frequência de genótipos que segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Considerando apenas a população negra com diagnóstico prévio de hipertensão (108 pessoas), obtivemos uma frequência genotípica no Glu298Asp de TT=2%, TG=65%, GG=33%, Frequência T = 0,34 e Frequência G = 0,66, com o χ^2 de 20,8 e $p < 0,05$, indicando que essa população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em comparação simples, indivíduos hipertensos possuem maior número do alelo variante em comparação com o resto da população negra do estudo, porém, o número dos alelos encontrados é próximo da frequência apresentada em uma população com doença arterial coronariana de T=0,38 e G=0,62 (PICCOLI, 2012).

Na mesma população hipertensa, para o polimorfismo ADIPOQ +45T>G, a frequência genotípica foi GG = 6%, TG = 31% e TT = 63%, com frequências alélicas do T de 0,78 e do alelo G de 0,22; para esse SNP o $\chi^2 = 1,14$ e $p = 0,28$, ou seja, para o equilíbrio de populações, $p > 0,05$ indica que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy Weiberger.

Após a genotipagem dos indivíduos, selecionamos uma sub-amostra de cada um dos genótipos Glu298Asp do gene da eNOS para a realização da cultura celular e verificação da influência desse SNP na via inflamatório. Para esse estudo, cujos resultados foram apresentados no artigo 1, foi realizada a cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que foram divididas conforme os genótipos e tratadas com uma dose única de fitohemaglutinina (PHA), que é um antígeno que desencadeia a reação inflamatória, via estimulação mitogênica de células imunes (SELL, 2000).

Sabe-se que as respostas inatas e adaptativas do sistema imunológico estão envolvidas na inflamação de baixo grau mediada pela hipertensão (NI, 2017), incluindo infiltração vascular de células inflamatórias, incluindo células T, células B, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Todos os mecanismos inflamatórios, incluindo a adesão de moléculas e expressão de quimiocinas parecem ser desencadeadas durante a hipertensão (NI, 2017), ou seja, sabendo do papel vasodilatador do óxido nítrico e da importância da enzima eNOS na hipertensão e a maior prevalência da hipertensão na população negra, buscamos com a indução da inflamação via fitohemaglutinina (PHA) verificar a influência do polimorfismo na resposta inflamatória ao tratamento a que foram expostas as células de diferentes genótipos Glu298Asp.

A PHA é uma lectina extraída do feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), com a estrutura de glicoproteína que se ligam a açúcares, possuindo potente atividade aglutinadora sobre eritrócitos e mitogênica para linfócitos (HE, 2018; SELL, 2000), além da capacidade de aumentar a síntese de DNA e estimular a produção de diversas citocinas, como as interleucinas.

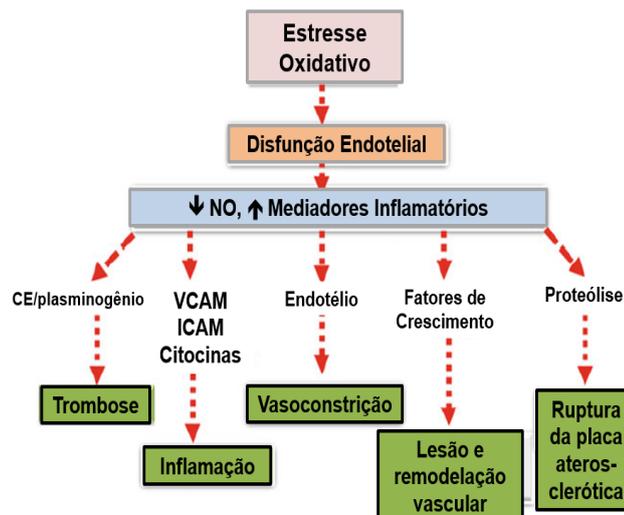
No artigo 1, verificamos que a fitohemaglutinina na dose de 125µg/ml foi capaz de ativar a inflamação na cultura celular, confirmando o propósito do nosso tratamento (BARBISAN, 2017), como pode ser verificado na figura 4 do artigo 1, pelo aumento das citocinas inflamatórias IL-1B e IL-6. Ainda, verificamos que, na presença de pelo menos um alelo T (genótipos TT e TG), o aumento das citocinas e do TNF-α indica que portadores desse alelo podem ser mais suscetíveis à inflamação e à obesidade. O aumento de TNF-α e IL-6 estimulam a produção das ROS por neutrófilos e eosinófilos e causa disfunção microvascular no tecido adiposo visceral, o que tem sido correlacionado com eventos cardiovasculares (SAMSON, 2017).

Quanto ao metabolismo oxidativo, verificamos que houve uma diminuição nos níveis de carbonilação protéica com a exposição ao PHA apenas nas culturas que possuíam o alelo G, sugerindo que esse alelo exerceu um efeito protetor, pois mesmo os níveis de ROS antes do tratamento eram menores no genótipo GG, embora esse efeito de proteção não tenha sido observado na mensuração do dano ao DNA através da 8-OHdG.

O aumento dos níveis de NO mesmo antes da indução inflamatória apenas no genótipo GG é benéfico do ponto de vista da vasodilatação cardiovascular, uma vez que a enzima que secreta o NO, a eNOS, nesse genótipo, é considerada funcional. Porém, após a ativação com PHA, mesmo na presença do alelo G a produção de NO foi insuficiente. Diversos fatores podem ser responsáveis pela diminuição da biodisponibilidade do NO, como a redução nos níveis do substrato, presença de antagonistas enzimáticos, degradação elevada do NO e redução nos cofatores enzimáticos como tetrahydrobiopterina (BH4) e (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) NADPH (CERQUEIRA, 2002; KONUKOGLU, 2016). Considerando o papel fisiológico do NO, a redução da biodisponibilidade do mesmo é um fator preditor de aterosclerose, e já foi demonstrado que homens negros saudáveis apresentam níveis maiores de dimetil-arginina assimétrica (ADMA) do que homens brancos, sendo que esse composto compete com a L-arginina como substrato para a enzima eNOS, resultando em níveis menores de NO sintetizado (MELIKIAN, 2007).

Sabe-se que a disfunção endotelial é mais prevalente em indivíduos hipertensos do que normotensos, e a biodisponibilidade do NO é importante tanto na progressão da HAS quanto da diabetes e aterosclerose (KONUKOGLU, 2016). Os diversos mecanismos envolvidos estão sintetizados na figura 10.

Figura 10 – Estresse oxidativo induz disfunção endotelial



Fonte: Adaptado de Konukoglu, 2017.

Após obtermos esses resultados sobre a influência do SNP Glu298Asp na resposta inflamatória, buscamos avaliar se esse polimorfismo, bem como o SNP no

gene da adiponectina, o ADIPOQ+45T>G é associado com o controle ou não da hipertensão em indivíduos negros.

Na classificação da pressão arterial, obtivemos uma prevalência de hipertensão de 53% (108 pessoas), destas, 41% apresentaram HAS controlada, 51% HAS não controlada, 8% RHTN, e não foi identificada nenhuma situação de RfHTN. Sabendo da importância do controle pressórico na prevenção de eventos cardiovasculares, vimos que essa população apresenta um risco inerente, já que mais da metade da população estudada (59%) não apresentou níveis pressóricos que indicam controle e sucesso no tratamento medicamentoso utilizado.

A RHTN é uma condição multifatorial cujos fatores ambientais e genéticos contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença, sendo que a etnia africana, bem como idade avançada, sexo feminino, presença de sobrepeso e obesidade são considerados fatores que aumentam o risco (LACERDA, 2018). Uma característica importante da RHTN é que pacientes com esse tipo de hipertensão não controlada apresentam maior incidência de comorbidades como apneia obstrutiva do sono, aldosteronismo, obesidade, diabetes e maior prevalência de danos aos órgãos-alvo (LACERDA, 2018), ou seja, é essencial a identificação de pacientes com essas características para que seja dada maior atenção ao tratamento e às orientações de saúde, bem como sejam elaboradas pela equipe de saúde novas estratégias de tratamento (RIMOLDI, 2015).

A prevalência encontrada por nós de RHTN de 9% em uma população especificamente da etnia negra é semelhante ao encontrado por outros autores, que consideraram que a RHTN atinge de 13-25% da população hipertensa (LACERDA, 2018), de 3 a 30% de hipertensos (RIMOLDI, 2015) de 10 a 30% dos pacientes hipertensos (TSUJIMOTO, 2018), mas ainda menor do que o número específico de 24% de “aparente hipertensão resistente” encontrada após um acompanhamento realizado por 7 anos com americanos hipertensos que utilizou a definição de hipertensão noturna e não dipping (decréscimo da PA durante o período da noite) através do MAPA (IRVIN, 2019).

Ainda, verificamos que a população total do estudo apresentava um IMC característico de obesidade, de 31kg/m², independentemente do grupo de controle pressórico e do sexo. A obesidade é considerada um problema de saúde emergente, e já foi relatada que mulheres afrodescendentes estão mais propensas a apresentarem sobrepeso e obesidade (SAMSON, 2017). Fatores de risco

associados à obesidade, como hipertensão, glicemia >100mg/dL, HDL <50mg/dL. Triglicérides >150mg/dL e o uso de anti-hipertensivos tem maior impacto no risco cardiovascular geral em mulheres afro-americanas em comparação as mulheres caucasianas, visto que, quando quatro destes fatores estão presentes em mulheres caucasianas considera-se o risco aumentado, enquanto que para mulheres negras apenas dois desses fatores são suficientes para maior risco (SAMSON, 2017).

Indivíduos hipertensos não controlados com o genótipo selvagem do Glu298Asp eram mais sedentários em comparação com o haplótipo de risco (TT+TG).

O tabagismo foi associado com o haplótipo de risco somente do gene da adiponectina. Porém, indivíduos com alelos não mutados da eNOS (alelo G) e do +45T>G (alelo T) apresentaram menores níveis de adiponectina plasmática e consequentemente maior risco cardiovascular. A adiponectina regula ativamente o metabolismo lipídico e glicêmico e possui atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica (JI, 2018), sendo preditora de doenças cardiovasculares em pacientes com diabetes tipo 1 e, já foi relatado que indivíduos negros apresentavam maiores níveis de leptina e menores níveis de adiponectina em comparação aos brancos, porém não está claro qual seria o mecanismo envolvido nesta diferença (HACKLER, 2019).

De um modo geral, os resultados mostraram que os marcadores genéticos estudados influenciam na resposta inflamatória e hipertensiva da população negra. Embora seja conhecido o impacto negativo das DCV em negros, outros autores não confirmaram a associação entre autodeclaração de raça/cor com ancestralidade africana e complicações renais (PIZARRO, 2019). A população brasileira é heterogênea e miscigenada entre ancestrais europeus, africanos e ameríndios, e uma alternativa a estudos com autodeclaração de cor é o uso da ancestralidade genômica, como o método Marcadores Informativos de Ascendência (AIM, do inglês *Ancestry Informative Markers*), que identifica sequências de DNA específicas por continente de origem (PIZARRO, 2019), e poderia ser utilizado para estratificar populações miscigenadas como a brasileira e também a população autodeclarada negra do nosso estudo.

CAPÍTULO III

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que:

- A prevalência de hipertensão não controlada entre a população negra foi de 51%;
- O polimorfismo Glu298Asp afetou a resposta inflamatória de PBMCs obtidas de indivíduos negros;
- O alelo T apresenta maior suscetibilidade à inflamação (aumento de citocinas inflamatórias) e o alelo G protegeu contra a inflamação causada pela PHA o que pode ser útil na predição de resposta a terapia anti-inflamatória e anti-hipertensiva.
- O polimorfismo Glu298Asp pode ser útil na avaliação/predição da efetividade da terapia anti-inflamatória e anti-hipertensiva em pacientes negros.
- O polimorfismo ADIPOQ +45T>G foi associado ao tabagismo, que é um fator de risco cardiovascular;
- Níveis diminuídos de adiponectina foram encontrados em hipertensos em um modelo de herança dominante (GG+TG) do SNP +45T>G.
- A genotipagem do SNP Glu298Asp é um marcador genético apropriado para estimativa de risco cardiovascular em negros.

REFERÊNCIAS

- ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**. 4.ed. São Paulo, SP: Companygraf, 2016.
- ABRAHAM, Preetha Anna; ATTIPOE, Selasi; KAZMAN, Josh B; *et al.* Role of plasma adiponectin/C-reactive protein ratio in obesity and type 2 diabetes among African Americans. **African Health Sciences**, v. 17, n. 1, p. 99–107, 2017.
- ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 19, p. e127–e248, 2018.
- ACELAJADO, Maria Czarina; HUGHES, Zachary H; OPARIL, Suzanne; *et al.* Treatment of Resistant and Refractory Hypertension. **Circulation Research**, v. March, p. 1061–1070, 2019.
- AGHAMOHAMMADZADEH, Reza; GREENSTEIN, Adam S; YADAV, Rahul; *et al.* Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 2, p. 128–135, 2013.
- BARBISAN, Fernanda; DE ROSSO MOTTA, Jéssica; TROTT, Alexis; *et al.* Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- BARBISAN, Fernanda; AZZOLIN, Verônica Farina; RIBEIRO, Euler Esteves; *et al.* The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. **Rejuvenation Research**, v. 20, n. 4, p. 334–345, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/rej.2016.1892>>.
- BARBISAN, Fernanda; AZZOLIN, Verônica Farina; TEIXEIRA, Cibele Ferreira; *et al.* Xanthine-Catechin Mixture Enhances Lithium-Induced Anti-Inflammatory Response in Activated Macrophages *In Vitro*. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017b. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/4151594/>>.
- BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, Rita; *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Departamento de Apoio à Gestão Participativa e ao Controle Social. **Política Nacional de Saúde Integral da População Negra: uma política para o SUS**. 3. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017. 44 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Departamento de Apoio à Gestão Participativa. **Política Nacional de Saúde Integral da População Negra: uma política para o SUS**. 2. ed. Brasília: Editora do

Ministério da Saúde, 2013. 36 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente**. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRESSLER, Jan; PANKOW, James S.; CORESH, Josef; *et al.* Interaction between the NOS3 gene and obesity as a determinant of risk of type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

BRITO, Miguel. A farmacogenética e a medicina personalizada Pharmacogenetics and personalized medicine. **Saude & tecnologia**, v. 14, p. 5–10, 2015.

BROCQ, Michelle Le; LESLIE, Stephen J; MILLIKEN, Philip; *et al.* Endothelial Dysfunction : From Molecular Mechanisms Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1631–1673, 2013.

BROTHERS, R Matthew; FADEL, Paul J; KELLER, David M. Racial Disparities in Cardiovascular Disease Risk: Mechanisms of Vascular Dysfunction. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 2019.

CAMBIAGHI, Arnaldo Schizzi. Capítulo 30, **Distúrbios Cardiovasculares**. In: Dr. Arnaldo Cambiaghi e Cia. Bem estar da mulher, a essência da vida. Editora Lavidapress, 2006.

CARVALHO, M.H.C. et al. Funções normais do endotélio – Uma visão geral. In: LUZ, PL.; LAURINDO, FRM.; CHAGAS, ACP. **Endotélio & Doenças Cardiovasculares**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 17-32.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHAMPE, PC.; HARVEY, RA.; FERRIER, DR. **Bioquímica Ilustrada**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544p.

CHOR, Dóra; PINHO RIBEIRO, Antonio Luiz; SÁ CARVALHO, Marília; *et al.* Prevalence, awareness, treatment and influence of socioeconomic variables on control of high blood pressure: Results of the ELSA-Brasil study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.

CURRIE, Gemma; DELLES, Christian. The Future of “ Omics ” in Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 33, n. 5, p. 601–610, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2016.11.023>>.

DONATO, Anthony J; MORGAN, R Garrett; WALKER, Ashley E; *et al.* Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 89, p. 122–135, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.021>>.

DOROSZKO, Adrian; JANUS, Agnieszka; SZAHIDEWICZ-KRUPSKA, Ewa; *et al.* Resistant Hypertension. **Advances in clinical and experimental medicine**, v. 25, n. 1, p. 173–183, 2016.

ENGIN, A. Endothelial Dysfunction in Obesity. In: ENGIN A.; ENGIN A. B. **Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1^a ed. Springer, 2017.

FANG, Jing; YANG, Quanhe; AYALA, Carma; *et al.* Disparities in access to care among US adults with self-reported hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 27, n. 11, p. 1377–1386, 2014.

FONTANA, Vanessa; MCDONOUGH, Caitrin W; GONG, Yan; *et al.* Large-Scale Gene-Centric Analysis Identifies Polymorphisms for Resistant Hypertension. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 3, n. 6, p. 1–12, 2014.

FUCHS, Flávio D. Why do black Americans have higher prevalence of hypertension?: An enigma still unsolved. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 379–380, 2011.

GUS, Iseu; HARZHEIM, Erno; ZASLAVSKY, Cláudio; *et al.* Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. 5, p. 424–428, 2004.

HACKLER, Eddie 3rd; LEW, Jeanney; GORE, M Odette; *et al.* Racial Differences in Cardiovascular Biomarkers in the General Population. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 18, p. e012729, 2019.

HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151p.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and other reactive species in Disease**. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.

HE, Shudong; SIMPSON, Benjamin K; SUN, Hanju; *et al.* Phaseolus vulgaris lectins : A systematic review of characteristics and health implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 70–83, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>>.

HOWLAND, R. D. **Farmacologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 560p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD)**. Síntese dos Indicadores de 2009. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

IBGE. **Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

IRVIN, Marguerite R; III, John N Booth; SIMS, Mario; *et al.* The association of nocturnal hypertension and nondipping blood pressure with treatment-resistant hypertension: The Jackson Heart Study. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 20, n. 3, p. 438–446, 2019.

JHUO, Shih-Jie; TSAI, Wei-Chung; LEE, Hsiang-Chun; *et al.* Association between adiponectin T94G polymorphism and resistant hypertension in young-onset Taiwanese patients. **Gene**, v. 689, p. 161–165, 2019.

JI, Myeong Jin; KU, Eu Jeong; OH, Tae Keun; *et al.* Association of Adiponectin 45T / G Polymorphism with Diabetic Cardiovascular Complications in Korean Type 2 Diabetes. **J Korean Med Sci**, v. 33, n. 17, p. 1–9, 2018.

JONES, Erika S; SPENCE, J David; MCINTYRE, Adam D; *et al.* High Frequency of Variants of Candidate Genes in Black Africans with Low Renin-Resistant Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 30, n. May, p. 478–483, 2017.

KHAZIM, Khaled; AZULAY, Etti Ester; KRISTAL, Batya; *et al.* Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 40–56, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12620>>.

KONUKOGLU, Dildar; UZUN, Hafize. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 956, p. 511–540, 2017.

KRIEGER, J.E.; PEREIRA, AC.; KRIEGER, EM. **Endotélio e Genética**. In: LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. Endotélio & Doenças Cardiovasculares. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 173-180.

KWOK, Pui-yan; CHEN, Xiangning. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. **Current Issues Molecular Biology**, v. 5, p. 43–60, 2003.

LACERDA, Heleno Guimarães; VASCONCELLOS, Rebecca; VASCONCELLOS, Rebecca; *et al.* Treatment-Resistant Hypertension: An update in Device Therapy. *In: Blood Pressure from bench to bed*. Aise Seda. [s.l.: s.n.], 2018, v. 7.

LIBBY, Peter. Inflammation in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2045–2051, 2012.

LIBBY, Peter; RIDKER, Paul M; HANSSON, Göran K. Inflammation in Atherosclerosis From Pathophysiology to Practice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 23, p. 2129–2138, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>>.

LILLIE-BLANTON, Marsha; MADDOX, Thomas M.; RUSHING, Osula; *et al.* Disparities in cardiac care: Rising to the challenge of Healthy People 2010. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 3, p. 503–508, 2004.

MARRONI, Aline S.; METZGER, Ingrid F.; SOUZA-COSTA, Debora C.; *et al.* Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial

nitric oxide synthase genetic polymorphisms. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 177–182, 2005.

MAURER, P. **Análise do óxido nítrico como biomarcador de alterações cardiometabólicas em afrodescendentes na região sul do Brasil**. 2015. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, 2015a.

MAURER, P. et al. Association between Nitrite / Nitrate and Metabolic Risk in Blacks Abstract. **Archives of Medicine**, v. 8, p. 1–7, 2015b.

MELIKIAN, Narbeh; WHEATCROFT, Stephen B; OGAH, Okechukwu S; *et al.* Asymmetric Dimethylarginine and Reduced Nitric Oxide Bioavailability in Young Black African Men. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n. June, p. 873–877, 2007.

METZGER, I. F.; ISHIZAWA, M. H.; RIOS-SANTOS, F.; *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. **Pharmacogenomics Journal**, v. 11, p. 393–399, 2011.

MIYAMOTO, Yoshihiro; SAITO, Yoshihiko; KAJIYAMA, Noboru; *et al.* Associated With Essential Hypertension. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 3–8, 1998. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/content/32/1/3>>.

NASCIMENTO, C.A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J.C. **Estrutura Orgânica do Endotélio Vascular**. In: LUZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, ACP. Endotélio & Doenças Cardiovasculares. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 1-16.

OLIVEIRA, Jamille Silva; BOERY, Rita Nirrian Silva de Oliveira. An integrative review of associations between polymorphic variants and the metabolic syndrome. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 17, n. 2, p. 141–147, 2018.

OLIVEIRA, Carolina S V; GIUFFRIDA, Fernando M A; CRISPIM, Felipe; *et al.* ADIPOQ and adiponectin: the common ground of hyperglycemia and coronary artery disease? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 7, p. 446–454, 2011.

OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H; LACCHINI, Riccardo; TANUS-SANTOS, Jose E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. **Gene**, v. 575, n. 2 Pt 3, p. 584–599, 2016.

OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H; LACCHINI, Riccardo; TANUS-SANTOS, Jose E. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 63, p. 39–51, 2017.

PAIVA, Maria Sanali; OLIVEIRA, Itamar Ribeiro de; OLIVEIRA, Ludmilla Almeida da Rocha Ribeiro de; *et al.* Proteína C-Reativa como Marcador Prognóstico. **Rev Bras Cardiol Invas**, v. 14, n. 1, p. 71–75, 2006.

PARREIRA, Ricardo Cambraia; LACERDA, Leandro Heleno Guimarães; VASCONCELLOS, Rebecca; *et al.* Decoding resistant hypertension signalling pathways. **Clinical Science**, v. 131, n. November, p. 2813–2834, 2017.

PICCOLI, Jacqueline da Costa Escobar; MANFREDINI, Vanusa; FAORO, Debora; *et al.* Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (-786 T>C) and interleukin-6 in acute coronary syndrome. **Hum Exp Toxicol**, v. 33, n. 4, p. 396–402, 2014.

PICCOLI, Jacqueline da Costa Escobar; MANFREDINI, Vanusa; HAMESTER, Fernanda Irma; *et al.* Interaction Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (-786T>C, 894G>T and Intron 4 a/b) and Cardiovascular Risk Factors in Acute Coronary Syndromes. **Archives of Medical Research**, v. 43, n. 3, p. 205–211, 2012.

PIZARRO, Marcela Haas; SANTOS, Deborah Conte; GOMES, Laura; *et al.* Influence of genomic ancestry and self-reported color-race in CKD in a nationwide admixed sample of Brazilian patients with type 1 diabetes. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 1831–1840, 2019.

PRATT, C.W. **Bioquímica essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 716p.

RAYNER, Brian L; SPENCE, J David. Hypertension in blacks : insights from Africa. **Journal of Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 234–239, 2017.

REHO, John J; RAHMOUNI, Kamal. Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 14, p. 1689–1700, 2017.

RIMOLDI, Stefano F; MESSERLI, Franz H; BANGALORE, Sripal; *et al.* Resistant hypertension : what the cardiologist needs to know. **European Heart Journal**, v. 36, p. 2686–2695, 2015.

SALVI, Erika; KUTALIK, Zoltán; GLORIOSO, Nicola; *et al.* Genome-wide association study using a high-density SNP-array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of eNOS. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 248–255, 2012.

SALVI, Erika; WANG, Zhiying; RIZZI, Federica; *et al.* NOVEL LOCI INFLUENCING BLOOD PRESSURE RESPONSE TO HYDROCHLOROTHIAZIDE. **Hypertension**, v. 69, n. 1, p. 51–59, 2018.

SAMSON, Rohan; QI, Andrea; JAISWAL, Abhishek; *et al.* Obesity-Associated Hypertension: the Upcoming Phenotype in African-American Women. **Current hypertension reports**, v. 19, n. 5, p. 41, 2017.

SANTOS, Deyse Mirelle Souza; PRADO, Beatriz Santana; OLIVEIRA, Cristiane Costa da Cunha; *et al.* Prevalence of Systemic Hypertension in Quilombola Communities, State of Sergipe, Brazil. **Arq Bras Cardiol**, 2019.

SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B, MACHADO, A. **Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica**. In: Moreira SM, Paola AV; Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2ª. ed. São Paulo: Manole; 2015. p. 780-5.

SELL, Ana Maria; DA COSTA, Celso Paulino. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297–303, 2000.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1325p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 89, n. 3, p. e24-e79, Sept. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3, Set. 2016.

SOUZA-COSTA, D C; BELO, V A; SILVA, P S; *et al.* eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 3, p. 387–392, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.146>>.

SPENCE, J David; RAYNER, Brian L. Hypertension in Blacks. Individualized Therapy Based on Renin/Aldosterone Phenotyping. **Hypertension**, v. 72, n. 2, p. 1–8, 2018.

STUMVOLL, Michael; TSCHRITTER, Otto; FRITSCHKE, Andreas; *et al.* Association of the T-G Polymorphism in Adiponectin (Exon 2) With Obesity and Insulin Sensitivity. **Diabetes**, v. 51, p. 37–41, 2002.

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D. A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics**, v. 11, n. 8, p. 719–725, 2001.

TAYLOR, Jacquelyn Y.; SUN, Yan V.; MENDOZA, Veronica Barcelona De; *et al.* The combined effects of genetic risk and perceived discrimination on blood pressure among African Americans in the Jackson Heart Study. **Medicine**, v. 96, n. 43, 2017.

TU, Wanzhu; PRATT, J. Howard. A consideration of Genetic Mechanisms behind the development of hypertension in blacks. **Current hypertension reports**, v. 15, n. 2, p. 108–113, 2014.

TSUJIMOTO, Tetsuro; KAJIO, Hiroshi. Intensive Blood Pressure Treatment Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial. **Hypertension**, v. 73, p. 415–423, 2019.

VASAN, Ramachandran S. Biomarkers of Cardiovascular Disease: Molecular Basis and Practical Considerations. **Circulation**, v. 113, p. 2335–2362, 2006.

WELLEN, Kathryn E.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Obesity-induced inflammatory

changes in adipose tissue. **The journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1785–1788, 2003.

World Health Organization. **Health statistics and information systems**. Geneva: World Health Organization, 2014.

ZHANG, Xia; CAO, Yan Jun; ZHANG, Hong Yu; *et al.* Associations between ADIPOQ polymorphisms and coronary artery disease : a meta-analysis. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 19, n. 63, p. 1–8, 2019.

ZHANG, Xue; LYNCH, Amy I.; DAVIS, Barry R.; *et al.* Pharmacogenetic association of NOS3 variants with cardiovascular disease in patients with hypertension: The genhat study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

ZHAO, Yingzi; VANHOUTTE, Paul M; LEUNG, Susan W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, p. 83–94, 2015.

ANEXO A – Comprovante de Aprovação pelo Comitê de Ética

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de hemoglobinas variantes, marcadores genéticos e bioquímicos relacionados com o polimorfismo Glu298Asp do gene NOS 3 em indivíduos da etnia africana

Pesquisador: Patricia Maurer

Área Temática: Genética Humana;

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.);

Versão: 5

CAAE: 30841014.2.0000.5323

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 977.627

Data da Relatoria: 27/01/2015

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASILIA, 10 de Março de 2015

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 530 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-IVAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61) 3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito I

15/09/2019

Gmail - manuscript ARCMED_2019_820 received by Archives of Medical Research



Patricia Maurer <patytm@gmail.com>

manuscript ARCMED_2019_820 received by Archives of Medical Research

Archives of Medical Research <EvisSupport@elsevier.com>

15 de setembro de 2019 14:21

Responder a: support@elsevier.com

Para: patytm@gmail.com

Dear Dr. Maurer,

We have received the manuscript 'Association of +894G>T (rs1799983) of eNOS gene and +45T>G (rs2241766) of ADIPOq with uncontrolled hypertension in black individuals' for consideration for publication in Archives of Medical Research. You have designated Jacqueline Piccoli as the Corresponding Author of this manuscript.

The manuscript can now only be accessed by Jacqueline Piccoli - it no longer appears on your homepage under 'My Submissions'. All further communications related to this submission will be sent to Jacqueline Piccoli.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Archives of Medical Research

This message was sent automatically. Please do not reply

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.